

NOTA IMPORTANTE:

La entidad sólo puede hacer uso de esta norma para si misma, por lo que este documento NO puede ser reproducido, ni almacenado, ni transmitido, en forma electrónica, fotocopia, grabación o cualquier otra tecnología, fuera de su propio marco.

ININ/ Oficina Nacional de Normalización

ALIMENTOS PARA ANIMALES DE LABORATORIO. REQUISITOS MICROBIOLOGICOS Y METODOS DE ENSAYO

Laboratory animals food.
Myrobiological requeriments and test methods.

Descriptores: Producto para alimentación de
animales; Animal de Laboratorio;
Análisis microbiológico; Ensayo.

ICS: 07.100.30

1. Edición

1998

REPRODUCCIÓN PROHIBIDA

Oficina Nacional de Normalización (NC) Calle E No. 261 Vedado, Ciudad de La
Habana Teléf.: 30-0835 Fax: (537) 33-8048 E-mail: ncnorma@ceniai.inf.cu

NC 4:1998

Prefacio

La Oficina Nacional de Normalización (NC), es el Organismo Nacional de Normalización de la República de Cuba que representa al país ante las Organizaciones Internacionales y Regionales de Normalización.

La preparación de las Normas Cubanas se realiza generalmente a través de los Comités Técnicos de Normalización. La aprobación de las Normas Cubanas es competencia de la Oficina Nacional de Normalización y se basa en evidencias de consenso.

Esta Norma Cubana:

Ha sido preparada por el Comité Técnico Provisional de Alimentos para Animales de Laboratorio, integrado por las entidades siguientes:

- Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB)
- Instituto de Investigaciones en Normalización (ININ)
- Ministerio de la Agricultura (MINAGRI)
- Instituto de Medicina Veterinaria (IMV)
- Industria Médico Farmacéutica (IMEFA)
- Instituto "Finlay"
- Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB)
- Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED)
- Centro de Química Farmacéutica (CQF)
- Laboratorios Biológicos Farmacéuticos (LABIOFAM)
- Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM)
- Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM)
- Planta de Sueros y Hemoderivados
- Empresa de Productos Biológicos "Carlos J. Finlay"
- Centro de Inmunología Molecular (CIM)
- Centro Nacional de Salud Agropecuaria (CENSA)
- Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM)
- Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK)
- Centro Nacional de Biopreparados (BIOCEN)
- Centro de Investigaciones para la Restauración Neurológica (CIREN)
- Instituto Nacional de Oncología y Radiología (INOR)

Consta del Anexo A, Informativo.

© NC, 1998

Todos los derechos reservados, a menos que se especifique, ninguna parte de esta publicación podrá ser reproducida o utilizada por alguna forma o medios electrónicos o mecánicos, incluyendo las fotocopias o microfilmes, sin el permiso previo escrito de :

Oficina Nacional de Normalización (NC).

Calle E No. 261 Ciudad de La Habana, Habana 3. Cuba.

Impreso en Cuba.

Índice

1 Objeto	1
2 Generalidades	1
3 Requisitos Microbiológicos	1
4 Muestreo, preparación de la muestra y de la porción de ensayo.....	3
5 Método de ensayo	5
5.1 Condiciones de seguridad.....	5
5.2 Determinación del total de microorganismos Aerobios Mesófilos Viables.....	5
5.3 Determinación de microorganismos Coliformes Totales	9
5.4 Determinación de microorganismos Coliformes Fecales	12
5.5 Determinación de microorganismos Proteolíticos Viables	16
5.6 Determinación de géneros de mohos	18
5.7 Determinación de Salmonella.....	19
Anexo A. Bibliografía.....	30

**ALIMENTOS PARA ANIMALES DE LABORATORIO.
REQUISITOS MICROBIOLÓGICOS Y MÉTODOS DE ENSAYO**

1 Objeto

Esta norma establece los requisitos microbiológicos (límites microbianos de aceptabilidad), los procedimientos para el muestreo, la preparación de la muestra y de la porción de ensayo y los métodos de ensayo que deberán emplearse para evaluar las materias primas y piensos concentrados destinados a alimentos para animales de laboratorio.

2 Generalidades

2.1 Todos los aparatos y utensilios utilizados para efectuar los ensayos microbiológicos deben estar limpios, así como esterilizados en los casos que lo requieran.

2.2 Las operaciones de la siembra microbiológica deben realizarse en condiciones de asepsia, en presencia de un gabinete de seguridad biológica.

2.3 Por agua se entiende agua para análisis.

2.4 Los medios con agar requieren fundirse en baño de agua a una temperatura de 100 °C y nunca sobre la llama. Una vez fundidos, deben mantenerse en un baño de agua a una temperatura de 45 °C a 50 °C por un tiempo no mayor de 3 h y no deberán fundirse más de una vez.

2.5 Los recipientes utilizados para la preparación de los medios de cultivo y de los medios de dilución han de tener aproximadamente dos veces el volumen del medio a preparar.

2.6 Los reactivos a utilizar tienen que ser de reconocida calidad analítica (p.a).

2.7 Los medios de cultivo deshidratados deben prepararse teniendo en cuenta las especificaciones del fabricante.

3 Requisitos Microbiológicos

3.1 Las materias primas y los piensos concentrados deben cumplir con los requisitos microbiológicos (límites microbianos) dados en las tablas 1 y 2 respectivamente.

Tabla 1- Límites Microbianos de Aceptabilidad de Materias Primas [UFC / g o mL].

Tipos de Materia Prima	Aerobios mesó-filos viables	Coliformes totales	Coliformes fecales	Proteolíticos viables	Mohos	Salmonella
Cereales y subproductos de cereales 1)	3×10^6	10^4	10^1	10^5	10^5	ND
Concentrados proteicos de origen animal 2)	4×10^6	10^4	10^1	10^5	10^5	ND
Concentrados proteicos vegetales y microbianos 3)	4×10^6	10^3	10^1	10^5	10^5	ND
Aditivos energéticos 4)	3×10^6	10^3	10^1	10^5	10^5	ND
Aditivos minerovitamínicos 5)	3×10^6	10^3	10^1	10^5	10^5	ND

ND: No detectable

1) Arroz, maíz, trigo, avena, cebada, afrechillo y otros

2) Harina de carne, hueso, pescado, leche en polvo y otro

3) Soya, alfalfa, girasol, levadura torula y otros

4) Azúcar, miel, aceite y otros

5) Sal, fosfato, bentonita, zeolita, carbonato de calcio y otro

Tabla 2- Límites Microbianos de Aceptabilidad de los Piensos Concentrados [UFC / g o mL].

Piensos Forma de Presentación	Aerobios mesó-filos viables	Coliformes totales	Coliformes fecales	Proteolíticos viables	Mohos	Salmonella
Curiel, Conejo/Pellet	3×10^6	10^3	10^1	5×10^5	3×10^4	ND
Pollo (Inicio, crecimiento, desarrollo)/ Pellet	3×10^6	10^3	10^1	5×10^5	3×10^4	ND
Perro (Crecimiento) / Pellet	3×10^6	10^4	10^1	5×10^5	3×10^4	ND
Perro (Reproducción) / Pellet	3×10^6	10^4	10^1	5×10^5	3×10^4	ND
Primates / Pellet	3×10^6	10^3	10^1	5×10^5	3×10^4	ND
Rata - Ratón / Pellet	3×10^6	10^3	10^1	5×10^5	3×10^4	ND
Ovinos / Harina	3×10^6	10^4	10^1	5×10^5	10^5	ND

ND: No detectable

4 Muestreo, preparación de la muestra y de la porción de ensayo

4.1 Principio

Se basa en la homogeneización, obtención de la muestra de laboratorio, preparación de la muestra de ensayo y de las porciones de ensayo mediante diluciones.

4.2 Soluciones

4.2.1 Solución de ácido clorhídrico 1 mol/L

Medir 36.5 mL de ácido clorhídrico con una probeta graduada de 100 mL y depositar en un matraz aforado de 1 000 mL con tapa esmerilada, completar el volumen hasta 1 000 mL con agua y homogeneizar. Envasar en frascos plásticos con tapa de rosca.

4.2.2 Solución de hidróxido de sodio 1 mol/L

Pesar 40 g de hidróxido de sodio, introducir en un matraz aforado de 1 000 mL con tapa esmerilada y disolver en 50 mL de agua medida con una probeta graduada de 100 mL; completar el volumen hasta 1 000 mL con agua y homogeneizar. Envasar en frascos plásticos con tapa de rosca.

4.2.3 Polisorbato 80 al 0.02 %

Para 1 000 mL de agua:

Triptona1.0 g

Polisorbato 800.2 mL

Cloruro de sodio2.5 g

En un frasco cónico de 2 000 mL depositar los ingredientes, agregar 1 000 mL de agua, disolver en baño de agua hirviendo y refrescar a temperatura ambiente de 22 °C a 25 °C. Ajustar el PH a 7, con solución de ácido clorhídrico 1 mol/L o hidróxido de sodio 1 mol/L, según sea alcalino o ácido el medio, válido para toda la norma.

Verter 90 mL del medio en frascos cónicos de 250 mL y 9 mL en tubos de cultivo de 15 mm x 150 mm según la cantidad de muestras a procesar y las diluciones a emplear. Esterilizar a 121 °C, durante 15 min.

4.2.4 Solución salina fisiológica

Pesar 8.5 g de cloruro de sodio y depositar en un frasco cónico de 2 000 mL. Disolver en 1 000 mL de agua medida con una probeta graduada de 1 000 mL. Distribuir y proceder igual que en 4.2.3.

4.2.5 Agua peptonada diluyente

Para 1 000 mL de agua:

Peptona1.0 g

Proceder igual que en 4.2.3 incluyendo la distribución.

4.3 Aparatos y utensilios

- Balanza técnica LSP 1 kg, vD 0.1 g
- Baño de agua con temperatura regulable hasta 100 °C
- Pipetas de 1 mL, 2 mL y 10 mL, vD 0.1 mL
- Cilindros graduados de 100 mL y 1 000 mL, con pico
- Matraces aforados de 100 mL y 1 000 mL con tapa esmerilada
- Frascos cónicos de 250 mL y 2 000 mL
- Tubos para cultivos de 15 mm a 16 mm x 150 mm a 160 mm
- Frascos plásticos con tapa de rosca
- Frascos con tapa, de boca ancha estériles
- Cuchara, cala o agitador de vidrio estéril
- Batidora, molino, cuchara o tijera, guantes, todos estériles
- Autoclave
- Medidor de pH con precisión ± 0.1 unidades a 25 °C.

4.4 Muestreo

La muestra ha de ser realmente representativa del producto, y no ser dañada o cambiada durante la transportación y (o) el almacenamiento.

Para los piensos concentrados y las materias primas ensacadas, las muestras elementales deben tomarse de diferentes puntos de profundidad (superior, media e inferior) del envase y posteriormente han de unirse para constituir la muestra. De las materias primas suministradas a granel deben tomarse como mínimo cinco muestras elementales en puntos diferentes de forma aleatoria antes de ser depositadas en las tolvas de recepción. El muestreo ha de realizarse teniendo en cuenta las Normas Cubanas de muestreo de alimentos o productos sólidos, líquidos y voluminosos.

El tamaño de la muestra de laboratorio ha de ser el siguiente:

- cereales..... 1 000 g
- subproductos de cereales 500 g
- concentrados proteicos 500 g
- aditivos 250 g
- piensos concentrados 500 g

4.5 Preparación de la muestra de ensayo

4.5.1 Alimentos sólidos

Homogeneizar la muestra mediante agitación, utilizando cuchara, cala o agitador de vidrio, todos estériles. Los alimentos sólidos tales como: maíz, soya, cebada, avena, trigo y otros granos, deben molinarse previamente hasta obtener un tamaño de grano de 1 mm, eliminar las primeras porciones de granos molidos, recoger las restantes en su envase original y homogeneizar mediante agitación.

4.5.2 Alimentos semisólidos y líquidos

Flamear la boca del frasco y homogeneizar la muestra según lo establecido en 4.5.1 o utilizando una batidora.

4.5.3 Forrajes verdes

Sobre una superficie limpia y desinfectada con etanol al 70 % (v/v), cortar la muestra en fragmentos pequeños, utilizando cuchillo o tijera y proceder igual que en los alimentos que requieren ser agitados.

4.6 Preparación de la porción de ensayo

Pesar 10 g o medir 10 mL de la muestra de ensayo, verter en un frasco que contenga 90 mL de uno de los tres medios de dilución (véase 4.2.3, 4.2.4 y 4.2.5; dilución 10^{-1}), agitar fuertemente y dejar en reposo de 5 min a 10 min. Tomar 1 mL del sobrenadante, empleando pipetas de 1 mL o 2 mL estériles, verter en un tubo para cultivo que contenga 9 mL de uno de los medios de dilución (dilución 10^{-2}). Realizar diluciones consecutivas hasta obtener diluciones de 10^{-5} y utilizar para cada dilución pipetas distintas. Cada dilución constituye una porción de ensayo.

5 Método de ensayo

5.1 Condiciones de seguridad

En la toma de muestras deben adoptarse medidas asépticas para evitar la contaminación; es necesario trabajar en un gabinete con flujo laminar, protegiendo al personal con un módulo de ropa quirúrgica en condiciones de esterilidad y seguir las medidas y regulaciones descritas para el trabajo microbiológico.

5.2 Determinación del total de microorganismos Aerobios Mesófilos Viables

5.2.1 Principio

Este método se basa en la determinación cuantitativa del total de unidades formadoras de colonias de microorganismos aerobios, contenidos en las muestras de ensayos, a las que se proporcionan condiciones de temperatura, humedad y nutrientes necesarios para su desarrollo en un tiempo determinado.

5.2.2 Medios de cultivo y soluciones

5.2.2.1 Soluciones a emplear

Véase 4.2

5.2.2.2 Agar para conteo en placas

Para 1 000 mL de agua:

Tripton	5.0 g
Extracto de levadura en polvo	2.5 g
Dextrosa o Glucosa	1.0 g
Agar Agar	15.0 g

Pesar por separado cada componente en el orden que aparece.

Depositar en un frasco cónico de 2 000 mL y disolver en 500 mL de agua previamente calentada a una temperatura de 50 °C a 55 °C.

Aplicar calor hasta alcanzar una disolución total y añadir el resto del agua, agitando. Dejar reposar 10 min. Ajustar el pH a 7.0 ± 0.2 . Distribuir en frascos cónicos de 250 mL hasta la mitad o menos (aproximadamente 125 mL). Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

5.2.2.3 Agar triptona glucosa extracto

Para 1 000 mL de agua:

Extracto de carne en polvo	3.0 g
Triptona	5.0 g
Glucosa	1.0 g
Agar Agar	15.0 g

Pesar por separado cada componente en el orden que aparece.

Proceder igual que en 5.2.2.2.

5.2.2.4 Agar nutriente

Caldo nutriente..... 1 0000 mL

Agar Agar

Agar Agar	15.0 g
-----------------	--------

Pesar el agar agar y depositarlo en un frasco cónico de 2 000 mL y disolver en el Caldo nutriente previamente calentado a una temperatura de 50 °C a 55 °C. Aplicar calor hasta alcanzar una disolución total.

Dejar reposar 10 min. Ajustar el pH a 7.4 ± 0.2 . Distribuir en frascos cónicos de 250 mL hasta la mitad o menos (aproximadamente 125 mL). Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 min.

5.2.2.4.1 Caldo nutriente

Para 1 000 mL de agua:

Extracto de carne 1.0 g

Extracto de levadura..... 2.0 g

Peptona..... 5.0 g

Cloruro de sodio 5.0 g

Pesar por separado cada componente en el orden que aparece.

Depositar en un frasco cónico de 2 000 mL y disolver en 1 000 mL de agua. Dejar reposar 10 min. Ajustar el pH a 7.4 ± 0.2 . Distribuir en frascos cónicos de 250 mL hasta la mitad o menos (aproximadamente 125 mL). Esterilizar en autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 min.

5.2.3 Aparatos y utensilios

Utilizar lo indicado en un laboratorio microbiológico y en particular lo siguiente:

- Balanza técnica LSP 1 kg, vD 0.1 g
- Balanza analítica vD 0.1 mg
- Incubadora con temperatura regulable, hasta $80\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Contador de colonias
- Autoclave
- Baño de agua de temperatura regulable, hasta $100\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Gabinete con flujo laminar vertical u horizontal
- Placas Petri de 100 mm x 15 mm ó 100 mm x 10 mm ó 110 mm x 15 mm estériles
- Pipetas bacteriológicas graduadas de 1 mL, 2 mL y 10 mL, vD 0.1 mL estériles
- Medidor de pH con precisión ± 0.1 unidades a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2.4 Procedimiento

5.2.4.1 Preparación de la porción de ensayo

Véase el capítulo 4.

5.2.4.2 Siembra

Fundir uno de los medios de cultivo descritos en un baño de agua, enfriar a la temperatura de $(45 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ y mantener a esa temperatura hasta que vaya a emplearse. Trabajar las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} , deben utilizarse dos réplicas (placas) para cada dilución. Tomar 2 mL de la porción de ensayo 10^{-5} y añadir 1 mL en cada placa. Repetir la misma operación con la de 10^{-4} , el tiempo no debe ser mayor de

30 min después de añadir en la placa la porción de ensayo. Verter en cada placa de 10 mL a 15 mL del medio de cultivo fundido y proceder inmediatamente a mezclarlos con la porción de ensayo, haciendo rotar suavemente de 5 s a 10 s teniendo cuidado de que la mezcla no contacte con los bordes ni la cara interna de la tapa de la placa. Mantener las placas sobre una superficie plana nivelada, para permitir que el medio solidifique.

Utilizar una placa de control del medio de cultivo, por cada serie de placas sembradas, empleando el mismo medio de cultivo utilizado en el método de ensayo y otra placa con medio Agar para conteo en placas (véase 5.2.2.2) la cual deberá mantenerse abierta durante la ejecución del ensayo como control ambiental; válido para todos los métodos de ensayo.

5.2.4.3 Incubación

Solidificado el medio de cultivo, invertir las placas e incubar a la temperatura de 37 °C, durante (48 ± 2) h.

5.2.4.4 Determinación de la cantidad de unidades formadoras de colonias

Concluido el tiempo de incubación, contar todas las colonias de cada placa, utilizando un contador de colonias. Tomar las placas que tengan no más de 300 colonias y es necesario que una de estas placas contenga al menos 30 colonias. Eliminar las placas cuando la mitad o más del área de la superficie de la misma presente un crecimiento excesivo (sábana).

5.2.5 Expresión de los resultados

5.2.5.1 Método para los cálculos

El número total de unidades formadoras de colonias de microorganismos por gramo o mililitro de la muestra de ensayo (N) debe calcularse según:

$$N = \frac{c}{(n_1 + 0,1 n_2) d} \quad [\text{UFC/g o mL}]$$

donde:

c es la sumatoria de las colonias contadas en todas las placas seleccionadas de las dos diluciones utilizadas;

n_1 es el número de placas seleccionadas en la primera dilución;

n_2 es el número de placas seleccionadas en la segunda dilución;

d es el factor de dilución correspondiente a la primera dilución.

Redondear el resultado calculado a dos cifras significativas. Si la última cifra es menor a cinco, la cifra que antecede no se modifica, si la última cifra es cinco o mayor, la cifra que la antecede es aumentada en una unidad. Proceder siguiendo los mismos pasos hasta obtener dos cifras significativas. Tomar como resultado el número de bacterias por mililitro (productos líquidos) o por gramo (otros productos), expresar como un número entre 1.0 y 9.9 y multiplicarlo por la potencia apropiada de 10.

EJEMPLO:

Para las diluciones seleccionadas 10^{-2} y 10^{-3} en el caso de un producto sólido:

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1 n_2) d} = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{(2 + 0,1 \times 2) \times 10^{-2}} = \frac{422}{0,022} = 19\ 182$$

Redondear el resultado como fue señalado anteriormente dando 19 000 ó 1.9×10^4 de microorganismos por gramo de producto.

NOTA En el caso que cada una de las placas contenga menos de 30 colonias características, calcular el número N de colonias usando la misma ecuación.

5.2.5.2 Interpretación de los resultados

- Cuando en las placas de la dilución más concentrada no se obtienen colonias, el resultado debe expresarse como menor de 10^4 UFC/g o mL.
- Cuando las placas de la dilución más concentrada tienen más de 300 UFC, el resultado debe expresarse como mayor de 3×10^6 UFC/g o mL.
- Si al menos uno de los controles del proceso da contaminado invalidar el ensayo.
- El alimento o materia prima debe considerarse apto para el consumo siempre que cumpla con los límites microbianos (menor o igual) relacionados en las tablas 1 y 2.

5.3 Determinación de microorganismos Coliformes Totales

5.3.1 Principio

Este método se basa en la determinación cuantitativa del total de unidades formadoras de colonias de microorganismos integrantes del grupo coliforme, contenidas en las muestras de ensayo, a las que se les proporcionan condiciones de temperatura, humedad y nutrientes necesarios para su desarrollo en un tiempo determinado.

5.3.2 Medios de cultivo y soluciones

5.3.2.1 Soluciones a emplear

Véase 4.2

5.3.2.2 Agar nutriente

Véase 5.2.2.4.

5.3.2.3 Agar Drigalski

Agar nutriente	1000.0 mL
Lactosa.....	15.0 g
Sacarosa	20.0 g
Azul de bromotimol al 1.5%.....	10 mL
Solución cristal violeta al 1%.....	1 mL

En un baño de agua, licuar el Agar nutriente contenido en un frasco cónico de 2 000 mL, cuando tenga 50 °C pesar y añadir los demás ingredientes. Dejar reposar 10 min. Ajustar el pH a 7.0 ± 0.2 . Poner nuevamente en el baño de agua a 100 °C durante 30 min. Este medio no necesita esterilización adicional. Mezclar bien antes de usarse.

- Solución azul de bromotimol 1.5 %

Pesar 1.5 g de azul de bromotimol, introducir en un matraz aforado de 100 mL con tapa esmerilada y disolver en 50 mL de agua. Completar el volumen hasta 100 mL y homogeneizar. Envasar en frascos plásticos con tapa de rosca. Conservar de 4 °C a 8 °C por no más de 3 meses.

- Solución cristal violeta 1 %

Pesar 1.0 g de cristal violeta, introducir en un matraz aforado de 100 mL con tapa esmerilada y disolver en 50 mL de agua, completar el volumen hasta 100 mL y homogeneizar. Envasar en frascos plásticos con tapa de rosca. Conservar de 4 °C a 8 °C por no más de 3 meses.

5.3.2.4 Agar MacConkey No. 3

Para 1 000 mL de agua:

Peptona.....	20.0 g
Lactosa.....	10.0 g
Sales biliares No.3.....	1.5 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Rojo neutro.....	0.03 g
Cristal violeta.....	0.001 g
Agar Agar	15.0 g

Pesar por separado cada componente en el orden que aparece.

Depositar en un frasco cónico de 2 000 mL y disolver en 500 mL de agua previamente calentada a una temperatura de 50 °C a 55 °C.

Aplicar calor hasta alcanzar una disolución total y añadir el resto del agua agitando. Dejar reposar 10 min. Ajustar el pH a 7.1 ± 0.2 . Distribuir en frascos cónicos de 250 mL hasta la mitad o menos (aproximadamente 125 mL). Esterilizar en autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min.

5.3.2.5 Agar violeta rojo bilis

Para 1 000 mL de agua:

Extracto de levadura.....	3.0 g
Peptona.....	7.0 g
Cloruro de sodio.....	5.0 g
Sales biliares No. 3.....	1.5 g
Lactosa.....	10.0 g
Rojo neutro.....	0.03 g
Cristal violeta.....	0.002 g
Agar No. 1.....	12.0 g

Pesar por separado cada componente en el orden que aparece. Depositar en un frasco cónico de 2 000 mL y disolver en 500 mL de agua previamente calentada a una temperatura de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$. Añadir el resto del agua agitando. Dejar reposar 10 min. Ajustar el pH a 7.4 ± 0.2 . Aplicar calor hasta alcanzar una disolución total, dejar en ebullición durante 5 min. Este medio no necesita esterilización adicional. Mezclar bien antes de usarse.

5.3.3 Aparatos y utensilios

Véase 5.2.3.

5.3.4 Procedimiento

5.3.4.1 Preparación de la porción de ensayo

Véase el capítulo 4.

5.3.4.2 Siembra

Fundir uno de los medios de cultivo descritos en un baño de agua, enfriar a la temperatura de $(45 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ y mantener a esa temperatura hasta que vaya a emplearse. Trabajar las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} y utilizar dos réplicas (placas) para cada dilución.

Tomar 2 mL de la porción de ensayo 10^{-3} y añadir 1 mL en cada placa. Repetir la misma operación con 10^{-2} , el tiempo no deberá ser mayor de 30 min después de añadir en la placa la porción de ensayo.

Para el resto del proceso de siembra véase 5.2.4.2.

5.3.4.3 Incubación

Solidificado el medio de cultivo, invertir las placas e incubar a la temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante (24 ± 2) h.

5.3.4.4 Determinación de la cantidad de unidades formadoras de colonias.

Concluido el tiempo de incubación, si existe crecimiento de microorganismos coliformes, contar las colonias características de placa con el contador de colonias, de acuerdo con el medio de cultivo empleado:

- Agar violeta rojo bilis y Agar MacConkey No. 3: colonias de color rojo púrpura que tienen un diámetro de 0.5 mm o más.
- Agar Drigalski: colonias pequeñas y medianas de color amarillo mostaza de bordes bien definidos.

Tomar las placas que tengan no más de 300 colonias y es necesario que una de estas contenga al menos 30 colonias características.

Eliminar las placas cuando la mitad o más del área de su superficie presente un crecimiento excesivo (sábana).

5.3.5 Expresión de los resultados

5.3.5.1 Método para los cálculos

Véase 5.2.5.1.

5.3.5.2 Interpretación de los resultados

- Cuando en las placas de la dilución más concentrada no se obtienen colonias, el resultado debe expresarse como menor de 10^2 UFC/g o mL.
- Cuando las placas de la dilución más concentrada tienen más de 300 UFC, el resultado debe expresarse como mayor de 3×10^4 UFC/g o mL.
- Si al menos uno de los controles del proceso da contaminado invalidar el ensayo.
- El alimento o materia prima debe considerarse apto para el consumo siempre que cumpla con los límites microbianos (menor o igual) relacionados en las tablas 1 y 2.

5.4 Determinación de microorganismos Coliformes Fecales

5.4.1 Principio

Este método se basa en la determinación cuantitativa del total de unidades formadoras de colonias de microorganismos coliformes fecales, contenidas en las muestras de ensayo, a las que se le proporcionan condiciones de temperatura, humedad y nutrientes necesarios para su desarrollo en un tiempo determinado.

5.4.2 Medios de cultivo y soluciones

5.4.2.1 Soluciones a emplear

Véase 4.2

5.4.2.2 Agar endo

Para 1 000 mL de agua:

Peptona 10.0 g

Lactosa..... 10.0 g

Fosfato de potasio..... 3.5 g

Sulfito de sodio..... 2.0 g

Agar No. 1 10.0 g

Pesar por separado cada componente en el orden que aparece.

Depositar en un frasco cónico de 2 000 mL y disolver en 500 mL de agua previamente calentada a una temperatura de 50 °C a 55 °C.

Aplicar calor hasta alcanzar una disolución total, añadir el resto del agua agitando. Dejar reposar 10 min. Adicionar posteriormente 4 mL de solución alcohólica de fuschina básica al 10 % (m/v) y mezclar bien. Ajustar el pH a 7.5 ± 0.2 . Distribuir en frascos cónicos de 250 mL hasta la mitad o menos (aproximadamente 125 mL). Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min. Este medio debe prepararse 24 h antes de usarse.

- Solución alcohólica de fuschina básica al 10 % (m/v)

Pesar 10.0 g de fuschina básica, introducir en un matraz aforado de 100 mL con tapa esmerilada y disolver en 50 mL de alcohol etílico 96 , completar el volumen hasta 100 mL, disolver completamente en un agitador magnético y no calentar. Envasar en frascos plásticos con tapa de rosca. Conservar de 4 °C a 8 °C por no más de 3 meses.

5.4.2.3 Agar MacConkey No. 3

Véase 5.3.2.4.

5.4.2.4 Agar violeta rojo bilis

Véase 5.3.2.5.

5.4.2.5 Caldo bilis verde brillante al 2 %

Para 1 000 mL de agua:

Peptona 10.0 g

Lactosa 10.0 g

Bilis desecada 20.0 g

Verde brillante 0.0133 g

Pesar por separado cada componente en el orden que aparece.

Depositar en un frasco cónico de 2 000 mL y disolver en 500 mL de agua, mezclar bien. Añadir el resto del agua agitando. Dejar reposar 10 min. Ajustar el pH a 7.4 ± 0.2 . Distribuir en tubos para cultivo con campanas de fermentación Durham en su interior, a razón de 10 mL. Esterilizar en autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min.

5.4.3 Aparatos y utensilios

Véase 5.2.3 y además:

- Asa bacteriológica para inoculación
- Tubos para cultivo 15 mm x 150 mm con campanas Durham
- Agitador magnético/ magneto.

5.4.4 Procedimiento

5.4.4.1 Preparación de la porción de ensayo

Véase el capítulo 4.

5.4.4.2 Siembra

Fundir uno de los medios de cultivo descritos en un baño de agua, enfriar a la temperatura de $(45 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ y mantener a esa temperatura hasta que vaya a emplearse. Trabajar la dilución 10^{-1} y utilizar dos réplicas (placas). Tomar 2 mL de la porción de ensayo y añadir 1 mL en cada placa, el tiempo no deberá ser mayor de 30 min después de añadir en la placa la porción de ensayo. Para el resto del proceso de siembra véase 5.2.4.2.

5.4.4.3 Incubación

Solidificado el medio de cultivo, invertir las placas e incubar a la temperatura de $(42 \pm 0.5)\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 24 h a 48 h.

5.4.4.4 Determinación de la cantidad de unidades formadoras de colonias

Con un contador de colonias, contar las colonias que crezcan de color rojo oscuro, de un diámetro igual o mayor a 0.5 mm, en las placas que contengan no más de 150 colonias. Eliminar las placas cuando la mitad o más del área de la superficie de la misma presente un crecimiento excesivo (sábana).

Confirmación:

Las colonias características en el medio empleado deben ser confirmadas; para esto emplear tubos con 10 mL de Caldo bilis verde brillante con campanas Durham en su interior e incubar a $(42 \pm 0.5)\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 24 h a 48 h. El número de colonias a confirmar se refiere en la tabla 3.

Tabla 3- Número de colonias a confirmar.

No. de colonias características de coliformes fecales	No. de colonias a confirmar como coliformes fecales
≤ 5	confirmar todas las colonias
6 – 30	5
31 - 40	6
41 - 55	7
56 - 70	8
71 - 90	9
91 - 100	10
101 - 135	11
136 - 150	12

Si hay formación de gas en las campanas dar la prueba como positiva a coliformes fecales; en caso contrario dar la prueba como negativa.

5.4.5 Expresión de los resultados

5.4.5.1 Método para los cálculos

El número de unidades formadoras de colonias de coliformes fecales por gramo o mililitro (A) de cada placa debe calcularse según la fórmula siguiente:

$$A = a \frac{b}{c} \text{ [UFC/g o mL]}$$

donde:

a es el número total de colonias contadas (presuntivas);

b es el número de colonias confirmadas;

c es el número de colonias a confirmar, según tabla 3.

EJEMPLO:

En el caso que se tenga:

Primera placa

$$a = 7 \quad A_1 = \frac{a \cdot b}{c} \text{ [UFC/g o mL]}$$

$$b = 4 \quad A_1 = 7 \times \frac{4}{5}$$

$$c = 5 \quad A_1 = 6 \text{ UFC/mL}$$

Segunda placa

$$a = 4 \quad A_2 = \frac{a \cdot b}{c} \text{ [UFC/g o mL]}$$

$$b = 4 \quad A_2 = 4 \times \frac{4}{4}$$

$$c = 4 \quad A_2 = 4 \text{ UFC/mL}$$

El número total de unidades formadoras de colonias de coliformes fecales por gramo o mililitro (N) de la muestra de ensayo debe calcularse según la fórmula siguiente:

$$N = \frac{\sum A}{n \cdot d} \text{ [UFC/g o mL]}$$

donde:

- ∑ A es la sumatoria del número de unidades formadoras de colonias de coliformes fecales de cada placa;
- n es el número de placas seleccionadas;
- d es el factor de dilución.

EJEMPLO

$$A_1 = 6 \text{ UFC/mL} \quad N = \frac{6 + 4}{2 \times 10^{-1}}$$

$$A_2 = 4 \text{ UFC/mL}$$

$$n = 2 \quad N = 50$$

$$d = 10^{-1}$$

El número de coliformes fecales encontrados en la muestra de ensayo es de 5×10^1 UFC/mL.

5.4.5.2 Interpretación de los resultados

- Cuando en las placas no se obtienen colonias, el resultado debe expresarse como que no se detectaron coliformes fecales.
- Si al menos uno de los controles del proceso da contaminado invalidar el ensayo.
- La muestra (alimento o materia prima) debe considerarse aceptable sino se detectan coliformes fecales o se detectan 10 UFC/g o mL.

5.5 Determinación de microorganismos Proteolíticos Viables

5.5.1 Principio

Este método se basa en la determinación cuantitativa del total de unidades formadoras de colonias de microorganismos aerobios con propiedades proteolíticas, contenidas en las muestras de ensayo, a las que se proporcionan condiciones de temperatura, humedad y nutrientes necesarios para su desarrollo en un tiempo determinado.

5.5.2 Medios de cultivo y soluciones

5.5.2.1 Soluciones a emplear

Véase 4.2

5.5.2.2 Agar leche

Para 1 000 mL de agua:

Leche descremada 10.0 g

Agar No. 1 15.0 g

Pesar por separado cada componente y en un frasco cónico de 1 000 mL depositar la leche descremada y en otro, de igual volumen, el agar. Añadir 700 mL de agua al frasco que contiene el agar y 300 mL al que contiene la leche y llevar al baño de agua a 100 °C hasta disolverse. En un frasco cónico de 2 000 mL depositar ambas mezclas, dejar reposar 10 min. Ajustar el pH a 7.0. Distribuir el medio en frascos cónicos de 500 mL, a razón de 250 mL en cada recipiente y esterilizar a 115 °C durante 5 min. Utilizar inmediatamente después de haberse preparado.

5.5.3 Aparatos y utensilios

Véase 5.2.3

5.5.4 Procedimiento

5.5.4.1 Preparación de la porción de ensayo

Véase el capítulo 4

5.5.4.2 Siembra

Trabajar las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} . Para el resto del proceso de siembra véase 5.2.4.2.

5.5.4.3 Incubación

Solidificado el medio de cultivo, invertir las placas e incubar a temperatura de 37 °C, durante 48 h .

5.5.4.4 Determinación de la cantidad de unidades formadoras de colonias

Concluido el tiempo de incubación, proceder a contar las colonias de cada placa que presenten a su alrededor un halo transparente, por la hidrólisis de la caseína, utilizando un contador decolonias. Contar las colonias características de las placas que tengan no más de 300 colonias y es necesario que una de estas placas contenga al menos 30 colonias. Eliminar las placas cuando la mitad o más del área de la superficie de la misma presente un crecimiento excesivo (sábana).

5.5.5 Expresión de los resultados

5.5.5.1 Método para los cálculos

Véase 5.2.5.1.

5.5.5.2 Interpretación de los resultados

- Cuando en las placas de la dilución más concentrada no se obtienen colonias, el resultado debe expresarse como menor de 10^4 UFC/g o mL.
- Cuando las placas de la dilución más concentrada tienen más de 300 UFC, el resultado debe expresarse como mayor de 3×10^6 UFC/g o mL.
- Si al menos uno de los controles del proceso da contaminado invalidar el ensayo.
- El alimento o materia prima debe considerarse apto para el consumo siempre que cumpla con los límites microbianos (menor o igual) relacionados en las tablas 1 y 2.

5.6 Determinación de géneros de mohos

5.6.1 Principio

Este método se basa en la determinación de la cantidad de propágulas de mohos contenidas en las muestras de ensayo, a las que se les proporcionan condiciones de temperatura, humedad y nutrientes necesarios para su desarrollo en un tiempo determinado.

5.6.2 Medios de cultivo y soluciones

5.6.2.1 Soluciones a emplear

Véase 4.2

5.6.2.2 Agar Sabouraud Dextrosa + Cloranfenicol

Para 1 000 mL de agua:

Peptona micológica 10.0 g

Dextrosa 40.0 g

Agar Agar 15.0 g

Pesar por separado cada componente en el orden que aparece. Depositar en un frasco cónico de 2 000 mL y disolver en 500 mL de agua previamente calentada a una temperatura de 50 °C a 55 °C. Aplicar calor hasta alcanzar una disolución total, añadir el resto del agua agitando. Dejar reposar 10 min. Pesar 1.0 g de Cloranfenicol y adicionar, mezclar bien. Ajustar el pH a 5.6 ± 0.2 . Distribuir en frascos cónicos de 250 mL hasta la mitad o menos (aproximadamente 125 mL). Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

5.6.3 Aparatos y utensilios

Véase 5.2.3.

5.6.4 Procedimiento

5.6.4.1 Preparación de la porción de ensayo.

Véase el capítulo 4.

5.6.4.2 Siembra

Trabajar las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} . Para el resto del proceso de siembra véase 5.2.4.2.

5.6.4.3 Incubación

Solidificado el medio de cultivo, invertir las placas e incubar a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) de 5 a 7 días.

5.6.4.4 Determinación de la cantidad de unidades formadoras de colonias

Concluido el tiempo de incubación proceder a contar las colonias características de los géneros de mohos de cada placa, utilizando un contador de colonias. Contar las colonias características de las placas que tengan no más de 300 colonias y es necesario que una de estas placas contenga al menos 30 colonias. Eliminar las placas cuando la mitad o más del área de la superficie de la misma presente un crecimiento excesivo (sábana).

5.6.5 Expresión de los resultados

5.6.5.1 Método para los cálculos

Véase 5.2.5.1.

5.6.5.2 Interpretación de los resultados

- Cuando en las placas de la dilución más concentrada no se obtienen colonias, el resultado debe expresarse como menor de 10^3 UFC/g o mL.
- Cuando las placas de la dilución más concentrada tienen más de 300 UFC, el resultado debe expresarse como mayor de 3×10^5 UFC/g o mL.
- Si al menos uno de los controles del proceso da contaminado invalidar el ensayo.
- El alimento o materia prima debe considerarse apto para el consumo siempre que cumpla con los límites microbianos (menor o igual) relacionados en las tablas 1 y 2.

5.7 Determinación de Salmonella

5.7.1 Principio

Este método se basa en la determinación de los microorganismos pertenecientes al género Salmonella, contenidos en las muestras de ensayo, a los que se les proporcionan condiciones de temperatura, humedad y nutrientes necesarios que favorezcan su multiplicación y permitan su aislamiento.

5.7.2 Medios de cultivo y soluciones

5.7.2.1 Soluciones a emplear

Véase 4.2

5.7.2.2 Solución reguladora de agua de peptona (preenriquecimiento)

Para 1 000 mL de agua:

Peptona 10.0 g

Cloruro de sodio 5.0 g

Fosfato disódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 9.0 g

Fosfato monopotásico (KH_2PO_4) 1.5 g

Pesar por separado cada componente en el orden que aparece, depositar en un frasco cónico de 2 000 mL y disolver en 500 mL de agua. Añadir el resto del agua agitando. Mezclar bien y dejar reposar 10 min. Ajustar el pH a 7.0 ± 0.2 . Distribuir en frascos cónicos de 250 mL a razón de 90 mL. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 min.

5.7.2.3 Caldo nutriente

Véase 5.2.2.4.1

5.7.2.4 Agar nutriente

Véase 5.2.2.4

- Preparación de las placas con Agar nutriente. Transferir alrededor de 12 a 15 mL del medio en placas. Justo antes de usarse seque las placas con agar cuidadosamente de 37 °C a 55 °C hasta que la superficie del agar esté seca.

Las placas con agar deben conservarse por no más de 4 h a temperatura ambiente o por un día en refrigeración.

5.7.2.5 Agar nutriente semisólido

Para 1 000 mL de agua:

Extracto de carne	3.0 g
Peptona.....	5.0 g
Cloruro de sodio.....	5.0 g
Agar.....	4 g a 9 g (1)

⁽¹⁾ Según la fuerza del gel.

Pesar por separado cada componente en el orden que aparece y depositar en un frasco cónico de 2 000 mL. Disolver en 500 mL de agua previamente calentada a una temperatura de 50 °C a 55 °C.

Añadir el resto del agua agitando. Mezclar bien y dejar reposar 10 min. Ajustar el pH a 7.0 ± 0.2 . Distribuir en frascos cónicos de 250 mL hasta la mitad o menos (aproximadamente 125 mL). Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 min.

5.7.2.6 Agar verde brillante modificado (selectivo)

Para 1 000 mL de agua:

Extracto de carne	5.0 g
Peptona.....	10.0 g
Extracto de levadura.....	3.0 g
Fosfato disódico (Na ₂ HPO ₄).....	1.0 g
Fosfato monosódico (NaH ₂ PO ₄).....	0.6 g
Lactosa.....	10.0 g
Sacarosa	10.0 g
Rojo fenol.....	0.09 g
Verde brillante	0.0047 g

Agar No. 1 12.0 g

Pesar por separado cada componente en el orden que aparece. Depositar en un frasco cónico de 2 000 mL y disolver en 500 mL de agua previamente calentada a una temperatura de 50 °C a 55 °C. Añadir el resto del agua agitando, mezclar bien y dejar reposar 10 min. Ajustar el pH a 6.9 ± 0.2 . Aplicar calor hasta alcanzar una disolución total y dejar en ebullición durante 5 min.

Este medio no necesita esterilización adicional. Mezclar bien antes de usarse. Distribuir en placas petri a razón de 12 mL a 15 mL de medio y conservar de 4 °C a 8 °C.

5.7.2.7 Agar S.S. (Agar Salmonella-Shigella) (selectivo)

Para 1 000 mL de agua:

Extracto de carne en polvo..... 5.0 g
 Peptona 5.0 g
 Lactosa 10.0 g
 Sales biliares No. 3..... 8.5 g
 Citrato de sodio 10.0 g
 Tiosulfato de sodio 8.5 g
 Citrato férrico..... 1.0 g
 Verde brillante 0.00033 g
 Rojo neutro..... 0.025 g
 Agar agar..... 15.0 g

Pesar por separado cada componente en el orden que aparece. Depositar en un frasco cónico de 2 000 mL y disolver en 500 mL de agua previamente calentada a una temperatura de 50 °C a 55 °C. Añadir el resto del agua agitando, mezclar bien y dejar reposar 10 min. Ajustar el pH a 7.0 ± 0.2 . Aplicar calor hasta alcanzar una disolución total y dejar en ebullición durante 5 min.

Este medio no necesita esterilización adicional. Mezclar bien antes de usarse. Distribuir en placas petri a razón de 12 mL a 15 mL de medio y conservar de 4 °C a 8 °C.

5.7.2.8 Caldo Selenito y Cistina (medio de enriquecimiento)

Para 1 000 mL de agua:

Peptona o Triptona..... 5.0 g
 Lactosa 4.0 g
 Fosfato potásico 10.0 g
 Biselenito sódico..... 4.0 g
 L-Cistina 0.01 g

Pesar por separado cada componente en el orden que aparece. Depositar en un frasco cónico de 2 000 mL y disolver en 500 mL de agua, homogeneizar bien. Añadir el resto del agua agitando y dejar reposar 10 min. Ajustar el pH a 7.0 ± 0.2 . Aplicar calor hasta alcanzar una disolución total y dejar en ebullición durante 5 min. Este medio no necesita esterilización adicional. Mezclar bien y envasar en frascos cónicos de 250 mL a razón de 100 mL. Utilizar dentro de las 24 h siguientes a la preparación.

5.7.2.9 Caldo Base Tetrionato (medio de enriquecimiento)

Para 1 000 mL de agua:

Extracto de carne 0.9 g

Peptona 4.5 g

Extracto de levadura 1.8 g

Cloruro de sodio 4.5 g

Carbonato de calcio 25.0 g

Tiosulfato de sodio 40.7 g

Pesar por separado cada componente en el orden que aparece. Depositar en un frasco cónico de 2 000 mL y disolver en 500 mL de agua, homogeneizar bien. Añadir el resto del agua agitando y dejar reposar 10 min. Aplicar calor hasta alcanzar una disolución total y dejar en ebullición durante 5 min. Este medio no necesita esterilización adicional. La base preparada puede almacenarse por varias semanas a 4 °C, mezclarse bien antes de usarse y una vez adicionada la solución de yodo al medio base utilizarse en pocas horas. Al añadir la solución de yodo al medio, enfriar el mismo por debajo de 45 °C y adicionar después 20 mL de la solución. Mezclar bien y envasar en frascos cónicos de 250 mL a razón de 100 mL.

- Solución de yodo

Yoduro de potasio 5.0 g

Yodo metaloide 6.0 g

Agua 20.0 mL

Depositar el yoduro de potasio en un mortero de porcelana y pulverizar. Posteriormente añadir el yodo metaloide, pulverizar la mezcla y verter 20 mL de agua. Con la ayuda de la mano del mortero, disolver los ingredientes. Envasar la solución en frasco ámbar de tapa esmerilada y conservar por no más de 24 h a temperatura ambiente.

5.7.2.10 Agar hierro triple azúcar (agar TSI) (pruebas bioquímicas)

Para 1 000 mL de agua:

Extracto de carne 3.0 g

Extracto de levadura 3.0 g

Peptona 20.0 g

Cloruro de sodio 5.0 g

Lactosa.....	10.0 g
Sacarosa	10.0 g
Glucosa	1.0 g
Citrato férrico.....	0.3 g
Tiosulfato de sodio	0.3 g
Rojo fenol.....	0.05 g
Agar No. 1	12.0 g

Pesar por separado cada componente en el orden que aparece. Depositar en un frasco cónico de 2 000 mL y disolver en 500 mL de agua previamente calentada a una temperatura de 50 °C a 55 °C. Aplicar calor hasta alcanzar una disolución total y añadir el resto del agua agitando, dejar reposar 10 min. Ajustar el pH a 7.4 ± 0.2 . Distribuir en tubos para cultivo de 13 mm x 100 mm a razón de 5 mL. Esterilizar a 121 °C durante 15 min. Terminada la esterilización colocar los tubos en una posición inclinada para obtener una pendiente de 2 cm a 3 cm de largo y una profundidad de 2.5 cm, hasta que solidifique el agar.

5.7.2.11 Agar hierro Kliger (pruebas bioquímicas)

Similar al 5.7.2.10, sin sacarosa. Proceder igual.

5.7.2.12 Agar urea base (pruebas bioquímicas)

Para 1 000 mL de agua:

Peptona.....	1.0 g
Glucosa	1.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato disódico (Na_2HPO_4).....	1.2 g
Fosfato dihidrógeno de potasio (KH_2PO_4).....	0.8 g
Rojo fenol.....	0.012 g
Agar Agar	15.0 g

Pesar por separado cada componente en el orden que aparece. Depositar en un frasco cónico de 2 000 mL y disolver en 950 mL de agua previamente calentada a una temperatura de 50 °C a 55 °C. Aplicar calor hasta alcanzar una disolución total y dejar reposar 10 min. Ajustar el pH a 6.8 ± 0.2 . Esterilizar a 115 °C durante 20 min. Al usarse, una vez licuado y enfriado a unos 50 °C, añadir 50 mL de solución de urea estéril al 40 %. Distribuir en tubos para cultivo de 13 mm x 100 mm a razón de 5 mL, proceder igual que en 5.7.2.10.

- Solución de urea al 40 %.

Pesar 40.0 g de urea, introducir en un matraz aforado de 100 mL con tapa esmerilada y disolver en 50 mL de agua, completar el volumen hasta 100 mL y homogeneizar. Esterilizar por filtración (no emplear esterilización por calor). Envasar en frascos con tapa de rosca o tapón de goma, estériles. Conservar de 4 °C a 8 °C por no más de 30 días.

5.7.2.13 Medio lisina (pruebas bioquímicas)

Para 1 000 mL de agua:

Lisina monoclorhidrato 5.0 g

Extracto de levadura..... 3.0 g

Glucosa 1.0 g

Pesar por separado cada componente en el orden que aparece. Depositar en un frasco cónico de 2 000 mL y disolver en 500 mL de agua. Añadir el resto del agua agitando y dejar reposar 10 min. Adicionar 1 mL de la solución de púrpura de bromocresol al 1.5 % y mezclar bien. Ajustar el pH a 6.8 ± 0.2 . Distribuir en tubos para cultivo de 13 mm x 100 mm a razón de 5 mL. Esterilizar a 121 °C durante 15 min.

- Solución de púrpura de bromocresol al 1.5 %

Pesar 1.5 g de púrpura de bromocresol, introducir en un matraz aforado de 100 mL con tapa esmerilada, disolver en 50 mL de agua, completar el volumen hasta 100 mL y disolver totalmente. Envasar en frascos plásticos con tapa de rosca. Conservar de 4 °C a 8 °C por no más de 3 meses.

5.7.2.14 Medio Voges Proskauer (V.P.) (pruebas bioquímicas)

Para 1 000 mL de agua:

Peptona7.0 g

Glucosa5.0 g

Fosfato dipotásico (K_2HPO_4).....5.0 g

Pesar por separado cada componente en el orden que aparece. Depositar en un frasco cónico de 2 000 mL y disolver en 500 mL de agua. Añadir el resto del agua agitando y dejar reposar 10 min. Ajustar el pH a 6.9 ± 0.2 . Distribuir en tubos para cultivo de 13 mm x 100 mm a razón de 5 mL. Esterilizar a 115 °C durante 20 min.

5.7.2.15 Solución hidróxido de potasio 40 % (solución reactiva para el medio VP)

Pesar 40.0 g de hidróxido de potasio, introducir en un matraz aforado de 100 mL con tapa esmerilada, disolver en 50 mL de agua, completar el volumen hasta 100 mL y disolver totalmente en un agitador magnético. Envasar en frascos plásticos/goteros con tapa. Conservar a temperatura ambiente en oscuridad no más de 3 meses.

5.7.2.16 Solución 1 - naftol (solución reactiva para el medio VP)

1- naftol6.0 g

Etanol 96% (v/v) 100 mL

Pesar 6.0 g de 1- naftol, introducir en un matraz aforado de 100 mL con tapa esmerilada y disolver en 50 mL de etanol, completar el volumen hasta 100 mL y disolver totalmente en un agitador magnético (no calentar). Envasar en frascos plásticos/goteros con tapa. Conservar de 4 °C a 8 °C, en oscuridad no más de 3 meses.

5.7.2.17 Caldo triptona (medio para la prueba de Indol) (pruebas bioquímicas)

Para 100 mL de agua:

Triptona 1.0 g

Cloruro de sodio 0.5 g

Pesar por separado cada componente en el orden que aparece. Depositar en un frasco cónico de 250 mL y disolver en 50 mL de agua. Añadir el resto del agua agitando y dejar reposar 10 min. Ajustar el pH a 7.3 ± 0.2 . Distribuir en tubos para cultivo de 13 mm x 100 mm a razón de 5 mL. Esterilizar a 121 °C por 15 min.

5.7.2.18 Reactivo Kovacs (solución reactiva para el medio Caldo triptona)

4-Dimetilaminobenzaldehído 5.0 g

Ácido clorhídrico al 37 %, concentrado 25 mL

2- Metilbutan - 2 - ol 75 mL

Pesar o medir por separado cada componente en el orden que aparece e introducir en un matraz aforado de 100 mL con tapa esmerilada y disolver totalmente. Envasar en frascos plásticos/goteros con tapa de rosca. Conservar de 4 °C a 8 °C, en oscuridad por no más de 3 meses.

5.7.3 Aparatos y utensilios

Véase 5.2.3 y además:

- Asa y aguja bacteriológicas para inoculación
- Mortero de porcelana con su mano
- Tubos para cultivo de 13 mm x 100 mm, estériles
- Frascos cónicos de 250 mL
- Agitador magnético/magnetos
- Frasco ámbar y frascos goteros
- Frascos plásticos/cristal con tapa de rosca o de goma, estériles.

5.7.4 Procedimiento

5.7.4.1 Preparación de la porción de ensayo

Véase el capítulo 4.

5.7.4.2 Siembra

5.7.4.2.1 Preenriquecimiento

Verter la muestra de ensayo 10 g en un frasco cónico que contenga 90 mL de solución reguladora de agua de peptona. Incubar a (37 ± 1) °C no menos de 16 h y no más de 20 h.

5.7.4.2.2 Enriquecimiento

Tomar 10 mL del cultivo de preenriquecimiento y depositar en un frasco cónico que contenga 100 mL de uno de los dos medios de enriquecimiento. Incubar a (43 ± 1) °C, de 24 h a 48 h.

5.7.4.2.3 Aislamiento en medio sólido

Con un asa, sembrar por estría a partir del cultivo de enriquecimiento positivo (turbidez fuerte), en uno de los dos medios sólidos selectivos. Incubar a (37 ± 1) °C durante 24 h. Las colonias características deben ser de color rosado en Agar verde brillante modificado e incoloras en Agar S.S. Si el crecimiento es ligero o no hay presencia de colonias características de Salmonella, reincubar a (37 ± 1) °C de 18 h a 24 h adicional. Reexaminar las placas y someter a confirmación a las que ofrezcan colonias características o sospechosas de Salmonella.

5.7.4.3 Confirmación

5.7.4.3.1 Selección de colonias para confirmación

Para la confirmación tomar de cada placa cinco colonias consideradas características o sospechosas. Si en una placa hay menos de cinco colonias, tomar para la confirmación todas las colonias. Sembrar las colonias seleccionadas en placas con Agar nutriente previamente seco, y luego incubar a (37 ± 1) °C de 18 h a 24 h. Usar los cultivos para la confirmación bioquímica y serológica.

5.7.4.3.2 Confirmación bioquímica

- Prueba Agar TSI o Agar Kligler

Romper la superficie inclinada del agar y picar el fondo y preparar un tubo sin inocular como testigo. Incubar a (37 ± 1) °C durante 24 h e interpretar los cambios en el medio.

Fondo

Amarillo: Glucosa positiva (fermentación de glucosa)

Rojo o invariable: Glucosa negativa (no fermentación de glucosa)

Negro: Formación de sulfídrico

Burbujas o rajaduras: Formación de gas de la glucosa

Superficie inclinada

Amarillo: Lactosa y Sacarosa positiva (si se utiliza la lactosa y sacarosa; esta última interpretar en la intersección del fondo y la inclinación del medio TSI solamente)

Rojo invariable: Lactosa y Sacarosa negativa (no se utiliza ni lactosa ni la sacarosa)

Los cultivos de Salmonella característicos muestran pendientes alcalinas rojas con formación de gas y fondo ácido amarillo y con formación de sulfídrico que se manifiesta con el ennegrecimiento del agar, en aproximadamente el 90 % de los casos.

- Prueba de la ureasa

Sembrar por estrías sobre la superficie de 5 mL del medio Agar urea y preparar un tubo sin inocular como testigo. Incubar ambos a (37 ± 1) °C de 3 h a 4 h. Si hay un cambio de color en el medio (rosado fúsch) ello indica una reacción positiva. Si no hay cambio de color en el medio, la prueba resulta negativa después de reincubar hasta completar las 24 h.

- Prueba de Indol

Inocular en 5 mL de Caldo triptona las colonias características o sospechosas y preparar un tubo sin inocular como testigo. Incubar a (37 ± 1) °C durante 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación, añadir 0.5 mL del reactivo Kovacs.

La formación de un anillo rojo cereza en menos de 1 min. indica una reacción positiva.

La formación de un anillo amarillo carmelitoso indica una reacción negativa.

- Prueba de la lisina

Inocular justamente debajo de la superficie de 5 mL del medio líquido de Lisina las colonias características o sospechosas y preparar un tubo sin inocular como testigo. Incubar a (37 ± 1) °C durante 24 h.

La aparición de un color púrpura indica una reacción positiva. La aparición de un color amarillo indica una reacción negativa.

- Prueba de Voges Proskauer

Inocular en un tubo de cultivo que contenga 5 mL del medio V.P las colonias características o sospechosas y preparar un tubo sin inocular como testigo. Incubar a (37 ± 1) °C durante 24 h.

Transcurrido el tiempo de incubación, añadir 2 gotas de solución de hidróxido de potasio al 40 %, 3 gotas de 1-naftol y agitar bien después de cada adición.

La aparición de un color rosado a rojo brillante en 10 min indica una reacción positiva. Si no hay cambio de color en el medio la prueba resulta negativa.

En la tabla 4 se indican algunas características bioquímicas del género Salmonella.

Tabla 4- Características bioquímicas del género Salmonella

CARACTERÍSTICA BIOQUÍMICA	REACCIÓN	% DE SEROTIPOS DE SALMONELLAS QUE DAN REACCIÓN
GLUCOSA (formación ácida)	Positiva	100
GLUCOSA (formación de gas)	Positiva	91.3
LACTOSA	Negativa	99.2
SACAROSA	Negativa	99.5
SULFÍDRICO	Positiva	91.6
UREA	Negativa	99.0
INDOL	Negativa	98.9
VOGES PROSKAUER	Negativa	100
LISINA	Positiva	94.6

5.7.4.3.3 Confirmación serológica

La detección de la presencia de antígenos Salmonella O, Vi y H debe determinarse por aglutinación con el suero apropiado de colonias puras después que las cepas autoaglutinables hayan sido eliminadas.

- Eliminación de cepas autoaglutinables

Poner una gota de solución salina fisiológica sobre el portaobjetos y dispersar una parte de la colonia que va a ensayarse hasta obtener una suspensión turbia homogénea. Rotar el portaobjetos suavemente de 30 s a 60 s. Observar la reacción contra un fondo oscuro, preferentemente con ayuda de una lupa o con un microscopio estereoscópico.

Si las bacterias se agrupan en unidades más o menos diferenciables considerar que las cepas son autoaglutinables y no someterlas a los ensayos siguientes, pues resulta imposible la detección de antígenos.

- Examen de antígenos-O

Usar una colonia pura reconocida como no aglutinable y proceder de acuerdo a lo expuesto anteriormente, emplear una gota de suero antígeno-O en vez de la solución salina fisiológica.

Si la aglutinación ocurre, la reacción debe considerarse positiva. Usar los sueros poli y monovalente, uno tras otro.

- Examen de antígenos-Vi

Proceder igual que para el examen de antígenos-O, utilizar una gota de suero antígeno-Vi.

- Examen de antígenos-H

Inocular el Agar nutriente semisólido con una colonia pura no auto aglutinable. Incubar el medio a (37 ± 1) °C de 18 h a 24 h. Con este cultivo proceder igual que para el examen antígenos-O, utilizar una gota de suero antígeno-H.

5.7.5 Expresión de los resultados

Las reacciones bioquímicas y serológicas se expresan en la tabla 5.

Tabla 5- Reacciones bioquímicas y serológicas

REACCIÓN BIOQUÍMICA	AUTOAGLUTINACIÓN	REACCIÓN SEROLÓGICA	INTERPRETACIÓN
Típica	NO	Antígeno O, Vi o H positiva	Las colonias se consideran Salmonellas
Típica	NO	Todas las reacciones son negativas	Las colonias pueden ser Salmonellas
Típica	SI	No es ensayable	
No típica	NO	Antígeno O, Vi o H positiva	
No típica	NO	Todas las reacciones son negativas	Las colonias no se consideran Salmonellas

Los resultados deben expresarse como presencia o ausencia de Salmonella en una porción de ensayo de 10 g del producto.

5.7.5.1 Interpretación de los resultados

La muestra (alimento o materia prima) debe considerarse aceptable sino se detecta la presencia de Salmonella.

**ANEXO A
(Informativo)****BIBLIOGRAFÍA**

- ISO 3565:1975, Carne y productos cárnicos. Detección de Salmonella (método de referencia)
- ISO 6887:1983, Microbiología - Guía general para la preparación de diluciones para examen microbiológico
- ISO 4832:1991, Microbiología. Guía general para la numeración de coliforme - Método para conteo de colonias
- ISO 3534-2:1993, Estadística, vocabulario y símbolos. Parte 2. Proposición de normas microbiológicas de los alimentos para los animales de laboratorio
- ISO 6579:1993, Microbiología. Guía general para de detección de Salmonella
- ISO 7667:1993, Microbiología. Plan normalizativo para los métodos de ensayo microbiológico
- ISO 7218:1996, Microbiología de alimentos. Reglas generales para los exámenes microbiológicos
- Colombia, ICONTEC 971- 1975, Alimentos para animales. Ensayos microbiológicos
- Francia, NF V 18-091-1982, Alimentos para animales. Preparación de las muestras para ensayo
- Boletín Informativo UAR, Francia, 1989. Aspectos microbiológicos y control microbiológico de dietas para animales de laboratorio
- J. K. Eva y M. J. Rickett, BP Nutrition Limited (U.K.), 1981. Control microbiológico. Dietas comercialmente elaboradas. Beneficios
- M.J. Rickett y J. K. Eva, Special Diets Services Limited, 1983. Contaminantes dietéticos. Antecedentes microbiológicos
- CENPALAB,1993. Riera, O. Layna; Lugo, M. Sonia y col. Proposición de normas microbiológicas de los alimentos para los animales de laboratorio
- NC 74-18:1986, Ganadería. Pienso sólido. Método de muestreo
- NC 74-37:1986, Ganadería. Alimentación Animal. Preparación de la muestra y porción de ensayo para ensayos microbiológicos
- NC 74-38:1986, Ganadería. Alimentación Animal. Determinación del total de microorganismos aerobios mesófilos viables
- NC 74-39:1986, Ganadería. Alimentación Animal. Determinación de microorganismos coliformes
- NC 74-40:1986, Ganadería. Alimentación Animal. Determinación de microorganismos proteolíticos viables
- NC 74-41:1986, Ganadería. Alimentación Animal. Determinación de microorganismos anaerobios
- NC 74-42:1986, Ganadería. Alimentación Animal. Determinación de Salmonella

- NC 74-43:1986, Ganadería. Alimentación Animal. Determinación e identificación de géneros de mohos
- NC 76-02:1982, Productos alimenticios y bebidas. Métodos de ensayo microbiológico. Preparación de medios de cultivo y reactivos
- NC 92-01-3:1985, Control de la calidad. Control estadístico de la calidad. Términos, definiciones y símbolos.
- NC 92-02:1986, Control de la Calidad. Muestreo de líquidos
- NC 92-19:1986, Control de la Calidad. Muestreo de sólidos
- NC 00-10:1996, Directivas para la Redacción y Presentación de las Normas Cubanas.
- ONN, Disposiciones relacionadas con el proceso de desarrollo de las Normas Cubanas. La Habana, 1997.