
ESPECIFICACIÓN TÉCNICA

NC

ISO/TS 11133-2:2012
(Publicada por la ISO en 2003)

MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS DE CONSUMO HUMANO Y ANIMAL GUÍAS PARA LA PREPARACIÓN Y PRODUCCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO—PARTE 2: GUÍAS PRÁCTICAS PARA LAS PRUEBAS DE DESEMPEÑO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO (ISO/TS 11133-2: 2003 + Enmienda 2011, IDT)

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

ICS: 07.100.30

1. Edición Diciembre 2012
REPRODUCCIÓN PROHIBIDA

Oficina Nacional de Normalización (NC) Calle E No. 261 El Vedado, La Habana. Cuba.
Teléfono: 830-0835 Fax: (537) 836-8048; Correo electrónico: nc@ncnorma.cu; Sitio
Web: www.nc.cubaindustria.cu



Cuban National Bureau of Standards

NC-ISO/TS 11133-2: 2012

Prefacio

La Oficina Nacional de Normalización (NC), es el Organismo Nacional de Normalización de la República de Cuba y representa al país ante las organizaciones internacionales y regionales de normalización.

La elaboración de las Normas Cubanas y otros documentos normativos relacionados se realiza generalmente a través de los Comités Técnicos de Normalización. Su aprobación es competencia de la Oficina Nacional de Normalización y se basa en las evidencias del consenso.

Esta Especificación Técnica:

- Ha sido elaborada, por el Comité Técnico de Normalización NC/CTN 61 de Microbiología, integrado por representantes de las siguientes entidades:
 - Ministerio de Salud Pública (UNSA-MINSAP)
 - Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos (INHA-MINSAP)
 - Laboratorio Nacional de Higiene de los Alimentos (IMV-MINAGRI)
 - Centro Nacional de Inspección de la Calidad (CNICA-MINAL)
 - Laboratorio de Cuba-Control S.A. (MINCEX)
 - Oficina Nacional de Normalización (ONN)
 - Instituto de Farmacia y Alimentos (UH-MES)
 - Centros Provinciales de Higiene y Epidemiología (CPHE- MINSAP)
 - Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA)
 - Centro de Investigaciones Pesqueras (CIP-MIP)
 - LACCAL(MINCIN)
 - ALIMPORT (MINCEX)
 - Escuela de Hotelería y Turismo (MINTUR)
 - Universidad Agraria de La Habana (MES)
- Es una adopción idéntica por el método de traducción de la de la Norma Internacional 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.*
- Incluye los Anexos A y B informativos.

La NC-ISO/TS 11133:

- Consta de las siguientes partes bajo el título general - Microbiología de alimentos de consumo humano y animal – Guías para la preparación y producción de medios de cultivo:
 - Parte 1: Guías generales en el aseguramiento de la calidad para la preparación de medios de cultivo en el laboratorio
 - Parte 2: Guías prácticas para las pruebas de desempeño de los medios de cultivo.

© **NC, 2012**

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

Oficina Nacional de Normalización (NC)

Calle E No. 261, El Vedado, La Habana, Habana 4, Cuba.

Impreso en Cuba.

Índice

Introducción.....	4
1 Objeto	5
2 Referencias normativas	5
3 Términos y definiciones.....	5
4 Criterios para el control de calidad de rutina	5
5 Métodos a usar en las pruebas de desempeño de los medios de cultivo	9
6 Documentación de los resultados de los ensayos.....	18
Anexo A(informativo).....	19
Ejemplo de carta para el registro de los resultados de los ensayos de los medios de cultivo preparados por el laboratorio usuario	19
Anexo B(informativo).....	21
Bibliografía.....	34

0 Introducción

Es esencial el uso de los medios de cultivo de calidad probada, para llevar a cabo análisis microbiológicos confiables de los alimentos. Para todos los medios descritos en los métodos normativos es esencial definir el criterio mínimo de aceptación requerido para asegurar la confiabilidad de los medios. Se recomienda que las pruebas de determinación de las características del desempeño de un medio de cultivo se lleven a cabo de acuerdo con esta Especificación Técnica. Esta es aplicable a:

- a) Medios listos para el uso o deshidratados producidos comercialmente;
- b) Medios de cultivo preparados a partir de sus componentes básicos en el propio laboratorio.

El establecimiento de criterios de desempeño mínimo ampliamente aceptados para medios debe conducir a una calidad más consistente de los productos elaborados comercialmente y así reducir el alcance de ensayos necesarios en el laboratorio usuario.

Además, el criterio de aceptación mínimo medido por los métodos definidos en esta Especificación Técnica puede ser usado por todos los laboratorios de microbiología para evaluar la productividad, selectividad y/o propiedades electivas de un medio de cultivo.

En los análisis microbiológicos de los alimentos de consumo humano y animal, los requerimientos de esta Especificación Técnica tienen prioridad en la determinación de la calidad de los medios.

**MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS DE CONSUMO HUMANO Y ANIMAL — GUÍAS PARA LA PREPARACIÓN Y PRODUCCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO —
PARTE 2: GUÍAS PRÁCTICAS PARA LAS PRUEBAS DE DESEMPEÑO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO**

1 Objeto

Esta Especificación Técnica establece criterios y métodos para evaluar el desempeño de los medios de cultivo. Esta Especificación Técnica se aplica a:

- Corporaciones comerciales que producen y/o distribuyen medios para laboratorios de microbiología listos para el uso o reconstituidos semi-terminados o deshidratados;
- Corporaciones no comerciales que proveen medios a terceras partes;
- Laboratorios de microbiología que preparan medios de cultivo para su propio uso y que evalúan el desempeño de estos medios.

2 Referencias normativas

Esta Especificación Técnica incorpora referencias fechadas y no fechadas, provistas a partir de otras publicaciones. Estas referencias normativas se citan en los lugares adecuados en el texto y las publicaciones aparecen al final. Para las referencias fechadas, enmiendas subsiguientes o revisiones de cualquiera de esas publicaciones se aplican a esta Especificación Técnica solamente cuando se incorpore por una enmienda o revisión. Para las referencias no fechadas, se aplica la última edición de la publicación referida (incluyendo las enmiendas).

NC-ISO/TS 11133-1, Microbiología de alimentos de consumo humano y animal – Guías en la preparación y producción de medios de cultivo - Parte 1: Guías generales en el aseguramiento de la calidad para la preparación de medios de cultivo en el laboratorio.

3 Términos y definiciones

Para los propósitos de este documento, los términos y definiciones se ofrecen en la NC-ISO 11133-1: 2012.

4 Criterios para el control de calidad de rutina

4.1 Criterios de calidad general

4.1.1 Calidad de los medios de cultivo

La calidad de los medios de cultivo depende de la calidad de los ingredientes básicos, la correcta formulación, la calidad de los procedimientos de preparación, la eliminación de los agentes contaminantes microbiológicos y las condiciones adecuadas de embalaje y conservación (ver NC-ISO 11133-1).

El fabricante o productor en el laboratorio cumplirá con las características físico-químicas de los medios de cultivo como se especifica en la norma correspondiente. Además, la evaluación de la calidad garantizará que el medio de cultivo resulte conforme con respecto a las recomendaciones establecidas, incluyendo:

- cantidad distribuida y/o espesor.
- apariencia, color y homogeneidad;
- consistencia del gel;
- contenido de humedad;
- valor de pH;
- capacidad amortiguadora del pH
- contaminación microbiológica.

Los componentes individuales y cualquier suplemento nutritivo o selectivo serán también sometidos a adecuados procedimientos de evaluación de la calidad.

4.1.2 Calidad de los componentes básicos de los medios

Los medios de cultivo descritos en las Normas se juzgan como satisfactorios, sin embargo, debido a la variabilidad de sus calidades, puede ser aceptable que los medios comerciales modifiquen la concentración de algunos ingredientes biológicos básicos, como los que se recogen a continuación:

- peptonas de carne o extractos de levadura variables en sus propiedades nutritivas;
- agar variable en sus propiedades de gelificación;
- sustancias amortiguadoras del pH
- sales biliares, extracto de bilis y desoxicolato, colorantes antibacterianos, en dependencia de sus propiedades selectivas;
- antibióticos en dependencia de su actividad.

4.2 Criterios de calidad microbiológica

4.2.1 General

Las pruebas de desempeño microbiológico se llevarán a cabo en una muestra representativa de un lote del producto final.

4.2.2 Contaminación microbiana

Se probará la contaminación microbiana en una cantidad apropiada, en dependencia del tamaño del lote del medio de cultivo, incubando bajo condiciones adecuadas. Los límites señalados para el porcentaje de placas contaminadas o contenedores de medio líquido deben establecerse para cada medio o ser especificados por el productor.

Los productores deben redactar especificaciones en base a los componentes de los medios, límites de procesamiento y tipo de embalaje.

NOTA 1 Las muestras a probar deben ser al menos 1 placa o tubo o el 1 % de las placas o tubos al comienzo y 1 placa o tubo o el 1 % de las placas o tubos al final del proceso de verter o dispensar. Las placas o tubos deben incubarse por al menos 18 h a 37 °C o bajo las condiciones de incubación que se usan rutinariamente para estos medios de acuerdo con la norma específica.

NOTA 2 Para planes de muestreo estadístico remitirse a la ISO 2859-1:1999.

4.2.3 Crecimiento

4.2.3.1 General

Para evaluar cada lote completo de medio de cultivo, nutrientes o suplementos, el crecimiento se evaluará apropiadamente por cualquiera de estos métodos:

- a) cuantitativos; o
- b) semi-cuantitativos; o
- c) cualitativos.

Las evaluaciones cuantitativas, semi-cuantitativas y cualitativas se realizarán por los métodos descritos en esta Especificación Técnica o por otra técnica generalmente aceptada. Para la interpretación de los resultados de ensayo, es necesario comparar la cantidad de crecimiento en el medio de prueba con el de un medio de referencia. Es por consiguiente obligatorio, el uso de un medio de referencia específico para métodos cuantitativos (ver la norma específica o Anexo B).

Para los métodos semicuantitativos o cualitativos, el uso de un medio de referencia específico (ver la norma específica o el Anexo B) o un medio de cultivo que ofrece una reacción "positiva" ayuda a interpretar los resultados. El medio de referencia tiene que ser de buena calidad conocida, seleccionado a partir de un lote recién liberado, o, si se evalúa la estabilidad a largo plazo comparar con un lote recién liberado, un lote de otro suministrador, o un medio listo para el uso, etc.

Además, el crecimiento de cepas control positivo será típico en apariencia, tamaño y morfología de las colonias y el crecimiento de cepas control negativo será inhibido parcial o completamente.

4.2.3.2 Productividad

Medios de cultivo, sólidos, semisólidos y líquidos se inocularán con un inóculo adecuado (5.2.1.1) del cultivo de trabajo de cada uno de los microorganismos de prueba definidos usando un dispositivo apropiado.

La productividad alcanzará un límite mínimo definido (ver la norma específica correspondiente o el Anexo B).

Para métodos cuantitativos la razón de productividad $P_R(1)$ se determina como sigue:

$$P_R = N_S / N_O$$

Donde

N_S : es el total de colonias contadas obtenidas en el medio de cultivo a probar (obtenidas a partir de una o más placas);

N_O : es el total de colonias contadas obtenidas en el medio de cultivo de referencia definido obtenidas a partir de una o más placas, y será ≥ 100 ufc.

NOTA La Razón de Productividad de un medio no selectivo es al menos 0,7 para microorganismos que pueden crecer fácilmente en este medio. La P_R de microorganismos control positivo en un medio selectivo debe ser al menos 0,1. Estos valores son generalmente alcanzables, sin embargo criterios menos rigurosos pueden ser aceptados para ciertas combinaciones de medios y microorganismos de prueba (ver la correspondiente la norma específica o el Anexo B).

Para métodos semicuantitativos, los recuentos de sectores consecutivos de una placa inoculada por la técnica ecométrica son sumados para obtener el índice de crecimiento G_i , el cual varía de acuerdo al medio de cultivo. Es por ello importante compararlos con índices anteriores y o con el G_i de un medio de referencia para garantizar que las variaciones no son excesivas. El rango esperado de variaciones para cada medio de cultivo puede ser establecido también una vez que se haya adquirido suficiente experiencia del método.

Evaluaciones cualitativas se llevarán a cabo visualmente por asignación de los resultados del crecimiento.

4.2.3.3 Selectividad

Para evaluar cuantitativamente la selectividad, los medios de cultivo selectivos y el medio de referencia se inoculan con un inóculo adecuado (5.2.1.2) con el microorganismo de prueba definido usando un dispositivo apropiado. La selectividad tiene que alcanzar valores definidos (ver la norma específica correspondiente o el Anexo B).

El Factor de Selectividad $S_F(2)$, se calcula como sigue:

$$S_F = D_O - D_S$$

Donde

D_O : es la dilución más alta que muestra crecimiento de al menos 10 colonias en el medio de referencia;

D_S : es la dilución más alta que muestra un crecimiento comparable en el medio de prueba.

| S_F , D_O y D_S están expresadas en unidades de \log_{10} .

NOTA El S_F de los microorganismos control negativo en un medio selectivo debe ser al menos 2. Este valor es generalmente alcanzable. Sin embargo, criterios menos rigurosos pueden ser aceptados para ciertas combinaciones de los medios y los microorganismos de prueba (ver la norma específica correspondiente o el Anexo B).

Para métodos semicuantitativos y cualitativos el crecimiento de la(s) cepa(s) control negativo, será inhibido parcial o totalmente.

4.2.4 Características bioquímicas y fisiológicas (selectividad y especificidad)

La morfología de la colonia y las características diagnósticas junto con el grado de selectividad deben ser establecidas para obtener una imagen completa del desempeño de un medio.

Las características esenciales de la especificidad serán definidas y alcanzadas. Para medios diferenciales la calidad de las características bioquímicas/fisiológicas de lo(s) microorganismo(s) control positivo y el grado de inhibición de los microorganismos control negativo deben ser determinados con un conjunto apropiado de cepas de prueba.

4.2.5 Prueba de características antimicrobianas

La acción antimicrobiana de los antibióticos depende de sus características de difusión en el agar y de cualquier efecto antagonista de los componentes presentes. Los medios para probar presencia o ausencia de sustancias antimicrobianas en muestras de alimentos deben ser seleccionados conforme a los métodos de referencia.

4.3 Evaluación del desempeño e interpretación de los resultados

Un lote de medio de cultivo es satisfactorio si todos los microorganismos de prueba usados se comportan según las especificaciones dadas. Esto será aceptado si son conocidos los criterios de calidad general y microbiológicos.

5 Métodos a usar en las pruebas de desempeño de los medios de cultivo

5.1 General

Ejemplos de métodos de prueba cuantitativos, semi-cuantitativos y cualitativos para los medios de cultivos sólidos y líquidos están descritos. En la mayoría de los casos en el laboratorio usuario, se definirán los requisitos de las pruebas de desempeño de un lote de medio de cultivo mediante técnicas semi-cuantitativas y cualitativas.

Para casos especiales, por ejemplo, evaluación de un nuevo medio o de un nuevo productor, etc., los métodos de prueba cuantitativos serán ejecutados por el laboratorio usuario.

Se asume la familiaridad con las técnicas microbiológicas generales y por eso los métodos no se ofrecen con detalles exhaustivos.

Los microorganismos de prueba apropiados se listan en el Anexo B (ver además NC-ISO 11133-1).

NOTA Existe la intención en el futuro, que las normas individuales nuevas y revisadas para la detección o enumeración de microorganismos específicos o grupos de microorganismos describan los microorganismos de prueba relevantes a ser usados, de conjunto con los criterios de aceptación para cada medio de cultivo.

En los medios líquidos las interacciones que guían al crecimiento exitoso de los microorganismos son más complejas, de aquí que los métodos para probar el desempeño que se definen son menos rigurosos que para los medios sólidos.

Para el aislamiento exitoso de los microorganismos control positivo en un método de múltiples fases, por ejemplo, detección de **Salmonella**, varias interacciones complejas tienen lugar en cada etapa de crecimiento. Aquí debe establecerse una prueba control usando muestras apropiadas, cultivo y materiales de referencia, de modo que se demuestre la productividad o la selectividad, respectivamente, del método completo. Esto además es para demostrar que cada componente del medio se ajusta al propósito.

5.2 Microorganismos de prueba

Las cepas de referencia control positivo apropiadas (productividad) y los microorganismos que control negativo (selectividad) para cada medio de cultivo, se ofrecen en el Anexo B. los microorganismos de prueba apropiados deben reunir los requerimientos dados en 5.2.2 de la NC-ISO 11133-1:2012, ejemplo: cepas robustas, cepas con crecimiento escaso, bioquímicamente no reactivas o dañadas.

La guía para la preservación y el mantenimiento de las cepas de referencia se ofrecen en el Anexo B o en la NC-ISO 11133-1.

5.2.1 Preparación del cultivo de trabajo

Los cultivos de trabajo se prepararán en un caldo no selectivo como un cultivo puro en fase estacionaria a partir del cultivo de reserva de referencia.

Diferentes técnicas pueden usarse, pero estas garantizarán la pureza del inóculo, así como su estandarización lo cual permite su uso en una etapa posterior.

NOTA El inóculo congelado puede usarse si se puede demostrar que el microorganismo puede sobrevivir en el periodo elegido.

5.2.1.1 Cultivo de trabajo para probar la productividad

Para pruebas cuantitativas de medios en placa, se usa para los microorganismos buscados, un nivel de inóculo de aproximadamente 10^2 ufc.

Para pruebas semi-cuantitativas o cualitativas de medios en placa, se necesita un nivel de inóculo de 10^3 - 10^4 ufc

Para pruebas de productividad de medios líquidos, se usa un nivel de inóculo de 10 -100 ufc.

5.2.1.2 Cultivo de trabajo para pruebas de selectividad

Para las pruebas de selectividad de los medios de cultivo, se inocula en la placa o tubo de medio una suspensión de microorganismo que no sea objeto de estudio, que contenga de 10^4 a 10^6 ufc.

5.2.1.3 Condiciones de incubación

Incuba los medios de cultivo inoculados de acuerdo con las condiciones descritas en la norma correspondiente y con las dadas en las tablas del Anexo B.

5.3 Métodos para medios de cultivo sólidos

5.3.1 Método cuantitativo en placa

5.3.1.1 General

Este es un método general apropiado para la mayoría de los medios de cultivo sólidos. El mismo podría no ser apropiado para probar algunos tipos de mohos.

5.3.1.2 Procedimiento

- Use cultivos de trabajo como se describe en 5.2.1
- Seleccione un número apropiado de placas representativas de cada lote para ser probadas y garantice que la superficie de cada placa esté adecuadamente seca. Las placas de los medios de referencia deben prepararse de forma similar (ver 4.4.4 de NC-ISO 11133-1:2012).
- Extienda en la superficie de las placas de prueba y de referencia un inóculo del cultivo de trabajo diluido para obtener recuentos que caigan dentro de los límites dados en 5.2.1.

NOTA 1 También pueden usarse el método de Miles-Misra modificado de goteo en la superficie y otros sistemas de goteo o un plaqueador espiral.

NOTA 2 El método de placa vertida puede ser usado para medios de cultivo que se utilizan normalmente para la enumeración en esta forma.

- Incubar las placas bajo condiciones apropiadas como se define en las normas individuales.
- Contar las colonias presentes en cada placa o a partir de cada gota según corresponda. Evaluar el tamaño y la apariencia de las colonias.

5.3.1.3 Cálculos

Basados en el volumen extendido en las placas y en el factor de dilución, se puede calcular el conteo promedio en el medio. En el caso de los medios inoculados por goteo se debe considerar el número de gotas y su volumen.

5.3.1.4 Interpretación de resultados

Para interpretar los resultados, se debe calcular la Razón de Productividad P_R (4.2.3.2), y donde corresponda el Factor de Selectividad S_F (4.2.3.3).

5.3.2 Método semi-cuantitativo de estriado basado en la ecometría

5.3.2.1 General

El método de estrías es apropiado para pruebas de desempeño de los medios de cultivo sólidos y líquidos, pero el método es solamente semi-cuantitativo. Los índices de crecimiento son, por tanto, solo indicativos y estos pueden ser solamente considerados como una prueba suplementaria para medios de cultivos sólidos.

Cuando se use este método los medios de cultivo probados deben secarse en el mismo grado y todo el procedimiento debe ser estandarizado de forma tal que los resultados de diferentes lotes puedan ser comparados.

5.3.2.2 Procedimiento

- Se preparan las placas de agar como de costumbre, con aproximadamente 15 ml de agar. Los medios que normalmente son usados por la técnica de placa vertida, por ejemplo, Agar para Conteo en Placa (ACP), pueden ser también evaluados inoculando en la superficie de los medios sólidos.
- Use cultivos de trabajo como se describe en 5.2.1.
- Las placas se estrían como se muestra en la Figura 1 usando un asa de 1 μ l. Se trazan cuatro líneas paralelas con el asa, a intervalos de aproximadamente 0.5 cm, sobre el sector A. El estriado se repite para los sectores B y C y terminan en el sector D con una línea simple. Puede usarse una plantilla debajo de la placa para facilitar un estriado seguro.
- Se usa el tiempo de incubación y las temperaturas definidas en los métodos estándar.

NOTA Solo debe ser sumergida en el cultivo el círculo, no el alambre, del asa. El asa debe llenarse completamente con el cultivo. El exceso de líquido debe eliminarse presionando tres veces la parte más ancha del asa contra el borde del contenedor. Cuando se estríen las placas, el ángulo entre el asa y la superficie de agar debe ser de 20 ° a 30 °. La presión del asa en la superficie del agar y la rapidez del estriado deben ser constantes todo el tiempo. Debe evitarse sumergir el asa en el cultivo cuando hay presencia de espuma y/o burbujas en la superficie del caldo.

Normalmente se usa una misma asa para estriar los sectores de A a D, sin flamear el asa entre las estrías. En algunos casos, cuando se espera un índice de crecimiento menor G_1 para demostrar diferencias claras, podría ser apropiado cambiar o esterilizar el asa entre los sectores de estría A y B.

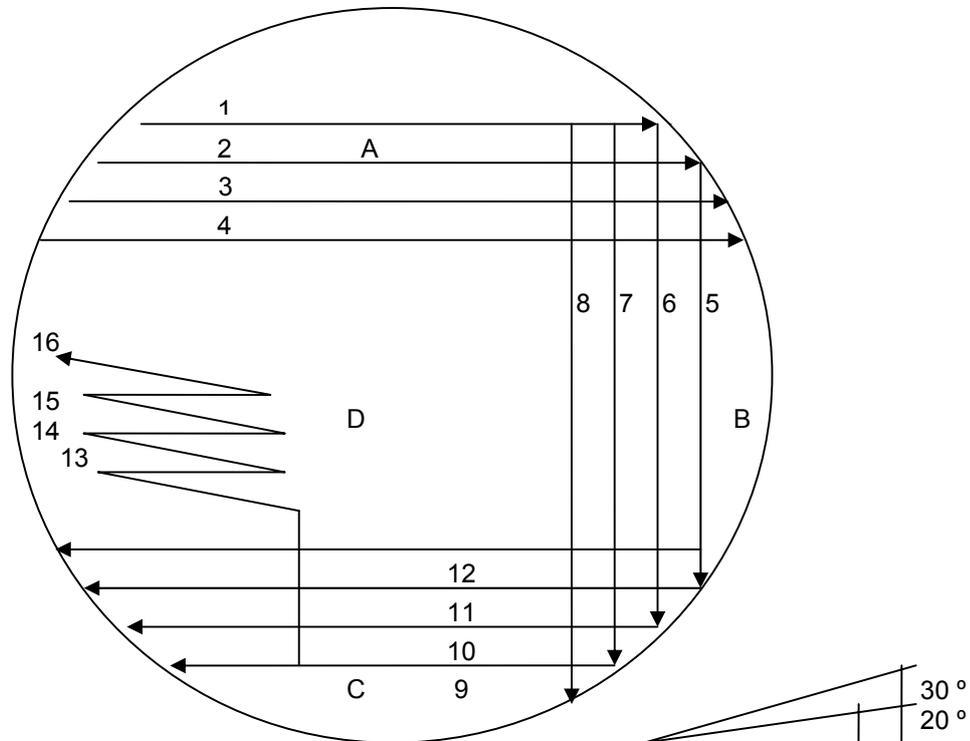


Figura 1 — Patrón de inoculación por el método de estriado modificado y ángulo del asa

5.3.2.3 Cálculo

Después de la incubación se evalúa la apariencia, tamaño de la colonia e intensidad de crecimiento y se calcula el índice de crecimiento G_i . Cada línea de estriado que muestra crecimiento se registra con 1. El máximo resultado por placa es 16. La estría se registra como 0.5, si el crecimiento solo abarca la mitad de su longitud. Una estría sin crecimiento con escaso crecimiento (menos de la mitad de su longitud), se registra como 0. Los resultados se suman para obtener el G_i . Por ejemplo, si el crecimiento se obtuvo en los sectores A y B y en la mitad del sector C el G_i obtenido debería ser 10.

5.3.2.4 Interpretación de resultados

El índice de crecimiento G_i ofrecido por una cepa objeto de estudio debe ser al menos 6, para concluir que el medio es aceptable. En el caso de un medio no selectivo el G_i normalmente es mayor.

Además, el crecimiento de la cepa objeto de estudio será el típico, y el crecimiento de las cepas no objeto de estudio será parcial o completamente inhibido.

5.3.3 Método de estriado cualitativo

5.3.3.1 General

El método es apropiado para la evaluación del desempeño adicional de los medios de cultivo sólidos.

El método es solamente cualitativo y los resultados por lo tanto solamente son indicativos.

5.3.3.2 Procedimiento

- Las placas con medio sólido se preparan de la manera usual, con aproximadamente 15 ml de agar. Los medios usados normalmente para la técnica de placa vertida, por ejemplo, Agar para Conteo en Placa (ACP), pueden ser evaluados también por siembra en la superficie en los medios solidificados.
- Use los cultivos de trabajo como se describe en 5.2.1.
- Los microorganismos de prueba se estrían en líneas rectas paralelas con un asa de 1 µL en la superficie del medio de prueba. Algunos microorganismos pueden estriarse en la misma placa sin cruzarse.

NOTA Pueden usarse otras técnicas de estriado estandarizadas.

- Se usan los tiempos y temperaturas de incubación establecidos en los métodos normalizados.

5.3.3.3 Interpretación de resultados

El crecimiento en las placas se evalúa después de la incubación como:

- 0 corresponde a cero crecimiento
- 1 corresponde a crecimiento débil, y
- 2 corresponde a buen crecimiento.

Los microorganismos objeto de estudio deberán registrar 2 y tener apariencia, tamaño y morfología de la colonia típicas. El crecimiento de las cepas no objeto de estudio será parcial o completamente inhibido (0 ó 1).

5.4 Métodos para medios de cultivo líquidos

5.4.1 General

Para determinar la productividad de un medio líquido se usará un inóculo apropiado. Los métodos cuantitativos, semi-cuantitativos y cualitativos descritos abajo evalúan la productividad y la selectividad. Los métodos propuestos registran la cantidad de crecimiento después de la incubación adecuada, por plaqueo o estriado a partir de los medios líquidos en medios sólidos y enumerando las unidades formadoras de colonias (ufc) o calculando puntos a partir del medio

líquido. Para los métodos cualitativos en medios líquidos las reacciones características se evalúan visualmente.

5.4.2 Método de dilución cuantitativa para microorganismos objeto y no objeto de estudio

El método es también apropiado para la evaluación de nuevos medios de cultivo o diluentes.

5.4.2.1 Procedimiento

- Seleccione un adecuado número de tubos o porciones de 10 ml de cada lote de medio de cultivo para ser probado.
- Inoculación de los microorganismos objeto de estudio: Inocule el caldo de prueba y el caldo de referencia para cada organismo de prueba con un número bajo (ejemplo: 10 ufc a 100 ufc en cada tubo, para la preparación del inóculo vea 5.2.1) y mezcle.
- Inoculación de los microorganismos no objeto de estudio: Inocule el caldo de prueba y el caldo de referencia para cada organismo de prueba con un número más alto (>1000 ufc en cada tubo, para la preparación del inóculo vea 5.2.1) y mezcle.
- Inoculación de los microorganismos objeto y no objeto de estudio como un cultivo mixto: Inocule el caldo de prueba y el caldo de referencia para cultivos de prueba mezclados con un número bajo de microorganismos objeto de estudio (ejemplo: 10 ufc a 100 ufc para todo tubo, para la preparación del inóculo vea 5.2.1) y en el mismo tubo con un mayor número de microorganismos no objeto de estudio (>1000 ufc en cada tubo, para la preparación del inóculo vea 5.2.1) y mezcle.
- Inoculación de los microorganismos objeto y no objeto de estudio en diluentes y medios de transporte: Inocule los diluentes con los microorganismos de prueba (ejemplo: 10 ufc a 100 ufc en cada tubo, para la preparación del inóculo vea 5.2.1) y mezcle.
- Se usan los tiempos y temperaturas de incubación establecidos en los métodos normalizados.

Los diluentes deben incubarse por 45 min. a temperatura ambiente y entonces pasar a placa. Los medios de transporte deben incubarse a una temperatura y tiempo apropiados acorde al uso normal y luego pasar a placa.

- Extraiga una alícuota o si es necesario una dilución a partir de cada caldo después del paso de incubación y extienda a una placa de medio sólido no inhibitorio, como se describe en 5.3.1.

NOTA 1 Pueden usarse el método modificado de goteo en superficie de Miles-Misra, otros sistemas de goteo o un plaquador espiral para obtener colonias contables en las placas.

NOTA 2 Para cultivos de prueba mezclados, deben hacerse extensiones cuando sea posible en medios sólidos no selectivos en placas, lo cual permite la diferenciación de los microorganismos en el cultivo mezclado (ejemplo, Agar para Conteo en Placa con MUG para conteo de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*). Cuando no sea posible distinguir cultivos mezclados en agar no selectivo, deben usarse medios sólidos selectivos cuyo desempeño haya sido probado anteriormente.

5.4.2.2 Lectura, cálculo e interpretación de resultados

Después de la incubación las colonias de los microorganismos objeto y no objeto de estudio se cuentan, en el caso de los cultivos mezclados, distinguiendo los tipos diferentes. El cálculo y la interpretación se harán en función del objetivo del examen:

- a) interpretación comparativa entre el caldo de referencia y el caldo de prueba usando P_R y S_F como se describe en 4.2.3.2 y 4.2.3.3:
 - para microorganismos objeto de estudio P_R no será < 0.1 (la diferencia en el crecimiento no excede un orden de magnitud);
 - para microorganismos no objeto de estudio S_F alcanzará al menos 2;
 - en cultivos mezclados el crecimiento de microorganismos objeto de estudio no será inhibida por los microorganismos no objeto de estudio, o sea los microorganismos objeto de estudio deberán ser siempre la población dominante;
- b) para otros casos, es más apropiado, la obtención de recuentos mínimos fijos para microorganismos objeto de estudio y conteos máximos para microorganismos no objeto de estudio:
 - Los microorganismos objeto de estudio alcanzarán de 10^6 ufc/ml a 10^8 ufc/ml;
 - Los microorganismos no objeto de estudio no excederán 10^4 ufc/ml en caldo selectivo.
- c) Para diluentes y medios de transporte no se requieren números altos ni reducidos de los organismos control positivo y negativo. El número de microorganismos después de la incubación en ese medio deberá estar dentro del ± 50 % del conteo inicial

NOTA La calidad de un medio líquido con respecto a las propiedades de crecimiento óptimo se indica más apropiadamente en la fase de crecimiento inicial. El estudio de la longitud de la fase log y el crecimiento en la fase log inicial, ofrecen la información más sensible con respecto a la productividad y la selectividad de los microorganismos objeto de estudio y no objeto de estudio, respectivamente, en los caldos de prueba y de referencia. Por lo tanto, si sólo están siendo buscadas pequeñas diferencias en la calidad de los medios, el estriado desde los medios líquidos hacia las placas debe hacerse después de un corto periodo de incubación de, por ejemplo, 6 h ó 12 h.

5.4.3 Método semi-cuantitativo de simple tubo para microorganismos objeto de estudio, no objeto de estudio y cultivos mixtos

5.4.3.1 Procedimiento

- Seleccione un número apropiado de tubos o porciones de 10 ml de cada lote a ser probado (vea 4.2.2).
- Inoculación de organismos objeto de estudio y no objeto de estudio como un cultivo mixto: Inocule un tubo de caldo de prueba con aproximadamente 10 ufc a 100 ufc de microorganismos objeto de estudio y en el mismo tubo inocule con un número más alto de microorganismos no objeto de estudio (> 1000 ufc para todos los tubos) y mezcle.

- Inoculación de organismos no objeto de estudio: Inocule un tubo de caldo de prueba por microorganismo con un número más alto (> 1000 ufc) y mezcle.
- Se usan los tiempos y temperaturas de incubación establecidos en los métodos normalizados.
- Extraiga 10 µl a partir del cultivo mezclado y estríe en una placa con medio selectivo específico para el microorganismo objeto de estudio.
- Extraiga una asada (10 µl) a partir del cultivo de microorganismo no objeto de estudio y estríe en una placa con medio no selectivo (ejemplo, ATS).
- Incube ambas placas bajo condiciones apropiadas por un tiempo adecuado, como se indica en las normas individuales.

5.4.3.2 Cálculo e interpretación de resultados

En la prueba de medios líquidos, la productividad del caldo es satisfactoria si al menos crecen en la placa con agar selectivo, 10 colonias del microorganismo objeto de estudio

La selectividad del caldo de prueba líquido es satisfactoria si no hay crecimiento (o crecen menos de 10 ufc) de los microorganismos no objeto de estudio, en la placa con agar no selectivo.

5.4.4 Método cualitativo de simple tubo

5.4.4.1 General

El método es adecuado para probar el desempeño de medios de cultivo líquidos. El método es sólo cualitativo y los resultados por lo tanto solamente son indicativos. Los medios turbios, como el caldo tetrionato, no pueden ser probados por este método.

5.4.4.2 Procedimiento

- para las pruebas de desempeño de los medios de cultivo líquidos los cultivos de trabajo se inoculan directamente en el medio que está siendo probado, usando un asa de 1 µl;
- se usan los tiempos y temperaturas de incubación establecidos en los métodos normalizados.

5.4.4.3 Interpretación de resultados

La evaluación cualitativa se llevará a cabo visualmente asignando puntos de crecimiento, desde 0 hasta 2.

Para tubos y frascos

- 0 corresponde a cero turbiedad
- 1 corresponde a muy ligera turbiedad
- 2 corresponde a buena turbiedad

La puntuación de un microorganismo objeto de estudio deberá ser 2.

NOTA 1 A veces el crecimiento de los microorganismos sólo puede observarse como una agregación/depósito celular en la base del tubo o frasco. En este caso se puede mejorar la evaluación e interpretación, agitando cuidadosamente.

NOTA 2 Otras características tales como formación de gas, cambio de color, etc. pueden evaluarse por este método.

6 Documentación de los resultados de los ensayos

6.1 Información proporcionada por el productor

El productor o suministrador de los medios de cultivo proporcionará, a solicitud, las características microbiológicas específicas del crecimiento y la información general en relación con el lote específico de medio de cultivo, vea 4.1.1 de NC-ISO 11133-1:2012.

6.2 Trazabilidad

Todos los datos de la evaluación de rutina del desempeño se documentarán de forma apropiada y se mantendrán por un periodo de tiempo suficiente de acuerdo con el sistema de calidad que se emplee. Se recomienda el uso de cartas control para documentación y evaluación de los resultados de los ensayos (vea Anexo A).

Anexo A
(informativo)

Ejemplo de carta para el registro de los resultados de los ensayos de los medios de cultivo preparados por el laboratorio usuario

Tabla A.1 — Ejemplo de una carta control

Carta del control interno de la calidad de los medios de cultivo				
medio de cultivo		volumen preparado	fecha de plaqueado	número de lote
medio deshidratado (y código):	proveedor	lote	cantidad	fecha/firma
suplemento	proveedor	lote	cantidad	fecha/firma
Detalles de proceso:				
Control de calidad de los parámetros físicos				
valor de pH esperado	pH medido	calidad confirmada Si__ No:__	defectos:	fecha/ firma
la cantidad de llenado esperada y/o el espesor de la capa:	observada:	calidad confirmada Si__ No:__	defectos:	fecha/ firma
color esperado	observada:	calidad confirmada Si__ No:__	defectos:	fecha/ firma
transparencia esperada / presencia de partículas ópticas	observada:	calidad confirmada Si__ No:__	defectos:	fecha/ firma
estabilidad del gel esperado/ consistencia/ humedad	observada:	calidad confirmada Si__ No:__	defectos:	fecha/ firma
Contaminación microbiana				
No. de placas o tubos probados:	resultado:	calidad confirmada Si__ No:__	No. de placas o tubos contaminados	fecha/ firma
Incubación:				

Crecimiento Microbiano- Productividad				
Cepas:	criterios	resultados	calidad confirmada Si__ No:__	fecha/ firma
Incubación:				
Medio de referencia:				
Crecimiento Microbiano- Selectividad				
Cepas:	criterios	resultados	calidad confirmada Si__ No:__	fecha/ firma
Incubación:				
Medio de referencia:				
Crecimiento Microbiano- Especificidad				
Cepas:	criterios	resultados	calidad confirmada Si__ No:__	fecha/ firma
Incubación:				
Medio de referencia:				
Liberación del lote				
Detalles de almacenamiento		Liberación del lote Si__ No__		fecha/ firma

Anexo B
(informativo)

Los microorganismos de prueba recomendados para los medios de cultivo más usados (se brinda información del medio de cultivo, las condiciones de incubación, los microorganismos de prueba, el número de colección de organismos de prueba, y las reacciones esperadas)

Las tablas se han establecido B.1 a B.6 teniendo en cuenta las cepas control usadas en la Farmacopea Europea y las recomendaciones de la Farmacopea en la microbiología de alimentos para los medios de cultivo (la comisión de trabajo de ICMSF). Éstos criterios serán incluidos en las normas específicas cuando sean preparadas o revisadas en el futuro (nueva norma o revisión). Un lote validado de medios de cultivo es un lote de medios de cultivo que ha mostrado un desempeño satisfactorio. Es permitido el uso de cepas similares de otras colecciones de referencia (por ejemplo: NCTC, CIP...). Todos los medios citados se describen dentro de EN y normas de ISO.

Tabla 1 — Medios selectivos para recuento de microorganismos

Medio	Tipo	Micro-organismos	Norma	Función	Incubación	Cepas control	Medio de referencia	Método de control	Criterios	Reacciones características
Baird - Parker	S ^{a)}	Estafilococo s coagulasa positivos	ISO 6888-1	Productividad	24 h -48 h/ 37°C	S. aureus ATCC 6538 S.aureusATCC 25923 ^{b)}	TSA	Cuantitativo	PR ≥ 0,5	Colonias negro/gris con halo claro (reacción de aclaramiento de la yema de huevo)
				Selectividad	48 h/ 37°C	E. coli ATCC 25922 ó 8739 ^{b)}	-	Cualitativo	Inhibición total	
				Especificidad	24 h -48 h/ 37°C	S. epidermidis ATCC 12228 ^{b)}	-	Cualitativo	-	Colonias negro/gris sin reacción de aclaramiento de la yema de huevo
RPFA	S	Estafilococo s coagulasa positivos	ISO 6888-2	Productividad	24 h -48 h/ 37°C	S.aureus ATCC 6538 ó 6538 P S. aureus ATCC 25923 ^{b)}	TSA	Cuantitativo	PR≥ 0,5	Colonias negro/gris con halo de opacidad
				Selectividad	48 h/ 37°C	E. coli ATCC 25922 ó 8739 ^{b)}	-	Cualitativo	Inhibición total	-
				Especificidad	24 h -48 h/ 37°C	S.epidermidis ATCC 12228 ^{b)}	-	Cualitativo	-	Colonias negro/gris sin halo de opacidad
				Selectividad	3-5 días/ 25°C	E. coli ATCC 25922 or 8739 ^{b)} B. subtilis ATCC 6633	-	Cualitativo	Inhibición total	
				Especificidad						

Tabla 1 — Medios selectivos para recuento de microorganismos (continuación)

Medio	Tipo	Micro-organismos	Norma	Función	Incubación	Cepas control	Medio de referencia	Método de control	Criterios	Reacciones características
MRS	S	Bacterias ácido láctica	ISO 15214	Productividad	72 h/ 30°C	L. sake ATCC 15521 ^{b)} Ped. damnosus ATCC 29358 Lc. lactis ATCC 19435 ^{b)}	Lote de medio MRS ya validado	Cuantitativo	PR≥ 0,5	Colonias características según cada especie
				Selectividad	72 h/ 30°C	E.coli ATCC 25922 u 8739 ^{b)} B. cereus ATCC 11778	-	Cualitativo	Inhibición total	-
MYP	S	Bacillus cereus	ISO 7932 (NCh3116)	Productividad	24 h - 48 h/ 30°C	B. cereus ATCC 11778 ^{b)}	TSA	Cuantitativo	PR≥ 0,7	Colonias rosa con halo de precipitación
				Selectividad	48 h/ 37°C	E. coli ATCC 25922 u 8739 ^{b)}	-	Cuantitativo	Inhibición total	-
				Especificidad	48 h/ 37°C	B. subtilis ATCC 6633 ^{b)}	-		-	Colonias amarillas sin halo de precipitación
Oxford	S	Listeria monocytogenes	ISO 11290 (NCh2657/2)	Productividad	48 h/ 37°C	L. monocyt. 1/2a ATCC 19111 L. monocyt. 4b ATCC 13932 ^{b)}	TSA	Cuantitativo	PR≥ 0,5	Colonias de gris a negro con halo negro
				Selectividad	48 h/ 37°C	E. coli ATCC 25922 u 8739 ^{b)} E. faecalis ATCC 29212 u 19433 C. albicans ATCC 10231	-	Cualitativo	Inhibición total	-

Tabla 1 — Medios selectivos para recuento de microorganismos (continuación)

Medio	Tipo	Micro-organismos	Norma	Función	Incubación	Cepas control	Medio de referencia	Método de control	Criterios	Reacciones características
PALCAM	S	Listeria monocytogenes	ISO 11290 (NCh2657/2)	Productividad	48 h/ 37°C	L. monocyt. 1/2a ATCC 19111 L. monocyt. 4b ATCC 13932 ^{b)}	TSA	Cuantitativo	PR ≥ 0,5	Colonias gris-verdosas a negro con halo negro
				Selectividad	72 h/ 30°C	E. coli ATCC 25922 u 8739 ^{b)} E. faecalis ATCC 29212 ó 19433	-	Cualitativo	Inhibición total	-
TS(C)	S	Clostridium perfringens	ISO 7937 (NCh3061)	Productividad	20 h/ 37°C atmósfera anaerobia	Cl. perfringens ATCC 13124 Cl. perfringens ATCC 12916	Lote de medio TS(C) ya validado	Cuantitativo	PR ≥ 0,7	Colonias negras
				Selectividad TSC	20 h/ 37°C atmósfera anaerobia	E. coli ATCC 25922 u 8739	-	Cualitativo	Inhibición total	-
				Especificidad TS			-	Cualitativo	-	Colonias blancas
VRBG	S	Enterobacterias	ISO 7402 ISO 8523	Productividad	24 h/ 37°C	E. coli ATCC 25922 u 8739 ^{b)} S. typhimurium ATCC 14028	TSA	Cuantitativo	PR ≥ 0,5	Colonias de rosado a rojo con o sin halo de precipitación
				Selectividad	24 h/ 37°C	E. faecalis ATCC 29212 ó 19433 ^{b)}	-	Cualitativo	Inhibición total	-

Tabla 1— Medios selectivos para recuento de microorganismos (continuación)

Medio	Tipo	Micro-organismos	Norma	Función	Incubación	Cepas control	Medio de referencia	Método de control	Criterios	Reacciones características
VRBL	S	Coliformes	ISO 4832	Productividad	24 h/ 30°C	E. coli ATCC 25922 u 8739 ^{b)}	TSA	Cuantitativo	PR≥ 0,5	Colonias púrpura con o sin halo de precipitación
				Selectividad	24 h/ 30°C	E. faecalis ATCC 29212 ó 19433 ^{b)}	-	Cualitativo	Inhibición total	-
				Especificidad	24 h/ 30°C	Ps. aeruginosa ATCC 27853	-	Cualitativo	-	Colonias de incolores a beige
CT-SMAC	S	Escherichia coli O157	ISO 16654	Productividad	24 h/ 37°C	E. coli O 157:H7 ATCC 43894 ó 43895 ^{b)} (no tóxicas)	TSA	Cuantitativo	PR≥ 0,5	Colonias transparentes con un aspecto amarillento pálido - marrón y un diámetro de aproximadamente 1 mm
				Selectividad	24 h/ 37°C	S.aureus ATCC 6538 ó 25923 ^{b)}	-	Cualitativo	Inhibición total	-
				Especificidad	24 h/ 37°C	E. coli ATCC 11775 ó 25922 ^{b)}	-	Cualitativo	-	Colonias rosadas
BGBL B	L ^{c)}	Coliformes	ISO 4831	Productividad	24 h - 48 h/ 30°C	E. coli ATCC 25922 u 8739 ^{b)} C. freundii ATCC 43864	-	Semi-cuantitativo	Turbidez 2+ Gas en 1/3 de la campana Durham	Producción de gas y turbidez
				Selectividad	24 h - 48 h/ 30°C	E. faecalis ATCC 29212 ó 19433 ^{b)}	-	Cualitativo	Ausencia de crecimiento	-

Tabla 1— Medios selectivos para recuento de microorganismos (continuación)

Medio	Tipo	Micro-organismos	Norma	Función	Incubación	Cepas control	Medio de referencia	Método de control	Criterios	Reacciones características
LST	L	Coliformes	ISO 4831	Productividad	24 h - 48 h/ 30°C	E. coli ATCC 25922 u 8739 ^{b)} C. freundii ATCC 43864	-	Semi- cuantitativo	Turbidez 2+ Gas en 1/3 de la campana Durham	Producción de gas y turbidez
				Selectividad	-	E. faecalis ATCC 29212 ó 19433 ^{b)}	-	Cualitativo	Ausencia de crecimiento	-
EC	L	Escherichia coli	ISO 7251	Productividad	24 h - 48 h/ 44°C	E. coli ATCC 25922 u 8739 ^{b)}	-	Semi- cuantitativo	Turbidez 2+ Gas en 1/3 de la campana Durham	Producción de gas y turbidez
				Selectividad	24 h - 48 h/ 44°C	Ps. aeruginosa ATCC 27853 ^{b)}	-	Cualitativo	Ausencia de crecimiento	-
a) S = medio sólido. b) Cepas a emplear por el laboratorio usuario (mínimo). c) L = medio líquido. NOTA - Para los medios de cultivo sólidos es posible también utilizar un método en placa semicuantitativo.										

Tabla 2— Medios no selectivos para recuento de microorganismos

Medio	Tipo	Micro-organismos	Norma	Función	Incubación	Cepas control	Medio de referencia	Método de control	Criterios	Reacciones características
PCA	S ^{a)}	Flora total	ISO 4833	Productividad	72 h/ 30°C	E. coli ATCC 25922 ó 8739 ^{b)} S. aureus ATCC 6538 ó 6538P B. subtilis ATCC 6633 ^{b)}	TSA	Cuantitativo	PR ≥ 0,7	-
a) S = medio sólido b) Cepas a emplear por el laboratorio usuario (mínimo)										

Tabla 3—Medios de enriquecimiento selectivos

Medio Ver Anexo E	Tipo	Micro-organismos	Norma	Función	Incubación	Cepas control	Medio de referencia	Método de control	Criterios	Reacciones características
EE	L ^{a)}	Enterobacterias	ISO 7402 ISO 8523	Productividad	24 h/ 37°C	E. coli ATCC 25922 u 8739 ^{b)} o S. typhimurium ATCC 14028	-	Semi-cuantitativo	>10 col. en VRBG	Colonias de rosado a rojo con o sin halo de precipitación
Half-Fraser	L	Listeria monocytogenes	ISO 11290-1	Selectividad	24 h/ 37°C	+ E. faecalis ATCC 29212 ó 19433 ^{b)}	-	Semi-cuantitativo	Inhibición total	-
				Productividad		E. coli ATCC 25922 ó 8739 ^{b)}	-	Semi-cuantitativo	Inhibición total en TSA	
				Selectividad		E. faecalis ATCC 29212 ó 19433			<100 colonias en TSA	

Tabla 3— Medios de enriquecimiento selectivos (continuación)

Medio	Tipo	Micro-organismos	Norma	Función	Incubación	Cepas control	Medio de referencia	Método de control	Criterios	Reacciones características
Fraser	L	Listeria monocytogenes	ISO 11290-1	Productividad	48 h/ 37°C	L. monocyt. 1/2a ATCC 19111 o L. Monocyt. 4b ATCC 13932 ^{b)} + E. coli ATCC 25922 ó 8739 ^{b)} +E.faecalis ATCC 29212 ó 19433 ^{b)}	-	Semi-cuantitativo	>10 col. en Oxford o PALCAM	Colonias de gris a negro con halo negro
				Selectividad	24 h - 48 h/ 37°C	E. coli ATCC 25922 u 8739 ^{b)} E. faecalis ATCC 29212 ó 19433	-	Semi-cuantitativo	Inhibición total en TSA <100 colonias en TSA	-
ITC	L	Yersinia enterocolitica	ISO 10273	Productividad	48 h/ 25°C	Y. enterocolitica ATCC 23715 ó 9610 ^{b)} + E. coli ATCC 25922 ó 8739 ^{b)} +Ps. aeruginosa ATCC 27853 ^{b)}	-	Semi-cuantitativo	>10 col. en CIN o SSDC	Colonias características según cada medio (ver norma)
				Selectividad	48 h/ 25°C	Ps. aeruginosa ATCC 27853 ^{b)} P. mirabilis ATCC 29906	-	Semi-cuantitativo	Inhibición total en TSA	-
Park & Sanders	L	Campylobacter	ISO 10272	Productividad	Ver norma	C. coli ATCC 43478* o C.jejuni ATCC 33291 ó 29428* +E. coli ATCC 25922 u 8739 ^{b)} +P. mirabilis ATCC 29906 ^{b)}	-	Semi-cuantitativo	>10 col. en medio Karmali u otro medio elegido	Colonias características según cada medio (ver norma)

Tabla 3—Medios de enriquecimiento selectivos (continuación)

Medio	Tipo	Micro-organismos	Norma	Función	Incubación	Cepas control	Medio de referencia	Método de control	Criterios	Reacciones características
				Selectividad	Ver norma	E. coli ATCC 25922 u 8739 ^{b)} P. mirabilis ATCC 29906	-	Semi-cuantitativo	Inhibición total en TSA	-
Preston	L	Campylobacter	ISO 10272	Productividad	18 h/ 42°C	C. coli ATCC 43478 ^{b)} o C. jejuni ATCC 33291 ó 29428 ^{b)} + E. coli ATCC 25922 u 8739 ^{b)} +P. mirabilis ATCC 29906 ^{b)}	-	Semi-cuantitativo	>10 col. en medio Karmali u otro medio elegido	Colonias características según cada medio (ver norma)
				Selectividad	18 h/ 42°C	E. coli ATCC 25922 u 8739 ^{b)} P.mirabilis ATCC 29906	-	Semi-cuantitativo	Inhibición total en TSA	-

Tabla 3 — Medios de enriquecimiento selectivos (continuación)

Medio	Tipo	Micro-organismos	Norma	Función	Incubación	Cepas control	Medio de referencia	Método de control	Criterios	Reacciones características
PSB	L	Yersinia enterocolitica	ISO 10273	Productividad	3-5 días/ 25°C	Y. enterocolitica ATCC 23715 ó 9610 ^{b)} + E. coli ATCC 25922 ó 8739 ^{b)} +Ps. aeruginosa ATCC 27853 ^{b)}	-	Semi-cuantitativo	>10 col. en CIN o SSDC	Colonias características según cada medio (ver norma)
				Selectividad	3-5 días/ 25°C	Ps. aeruginosa ATCC 27853 ^{b)} P.mirabilis ATCC 29906	-	Semi-cuantitativo	Inhibición total en TSA	-
MKTTn	L	Salmonella	ISO 6579	Productividad	24 h/ 37°C	S. typhimurium ATCC 14028 ^{b)} o S. enteritidis ATCC 13076 ^{b)} +E.coli ATCC 25922 u 8739 ^{b)} +Ps. aeruginosa ATCC 27853 ^{b)}	-	Semi-cuantitativo	>10 col. en XLD u otro medio de elección	Colonias características según cada medio (ver norma)
				Selectividad	24 h/ 37°C	E. coli ATCC 25922 u 8739 ^{b)} E.faecalis ATCC 29212 ó 19433	-	Semi-cuantitativo	Inhibición total en TSA <10 col. en TSA	-
RVS	L	Salmonella	ISO 6579	Productividad	24 h/ 41,5°C	S. typhimurium ATCC 14028 ^{b)} o S. enteritidis ATCC 13076 ^{b)} +E. coli ATCC 25922 u 8739 +Ps.aeruginosa ATCC 27853	-	Semi-cuantitativo	>10 col. en BGA u otro medio de elección	Colonias características según cada medio (ver norma)
				Selectividad	24 h/ 41,5°C	E.coli ATCC 25922 u 8739 ^{b)}	-	Semi-cuantitativo	Inhibición total en TSA	
						E.faecalis ATCC 29212 ó 19433			<10 col. en TSA	

a) L= medio líquido
b)Cepas a emplear por el laboratorio usuario (mínimo)

Tabla 4 — Medios de enriquecimiento no selectivos

Medio	Tipo	Micro-organismos	Norma	Función	Incubación	Cepas control	Medio de referencia	Método de control	Criterios	Reacciones características
BHI	L ^{a)}	Staphylococcus	ISO 6888	Productividad	24 h/ 37°C	S. aureus ATCC 25923 ^{b)}	-	Cualitativo	Turbidez de 1 a 2	-
Brucella	L	Campylobacter	ISO 10272	Productividad	2-5 días/ 25°C	C. coli ATCC 43478 C. jejuni ATCC 33291 ó 29428 ^{b)}	-	Cualitativo	Turbidez de 1 a 2	
Peptona salina	L	Líquidos de dilución	ISO 6887	Diluyente	45 min/ 20°C-25°C	E. coli ATCC 25922 ó 8739 ^{b)} S. aureus ATCC 25923	TSA	Cuantitativo	± 50% col./T0 (±50% del recuento original)	-
Thioglicolato	L	Clostridium perfringens	ISO 7937 (NCh3061)	Productividad	24 h/ 37°C	Cl. perfringens ATCC 13124 ^{b)}	-	Cualitativo	Turbidez de 1 a 2	-
TSYEB	L	Listeria monocytogenes	ISO 11290	Productividad	24 h/ 25°C	L. monocyt. 1/2 a ATCC 19111 L. monocyt. 4b ATCC 13932 ^{b)}	-	Cualitativo	Turbidez de 1 a 2	-
<p>a) = L medio líquido</p> <p>b) Cepas a emplear por el laboratorio usuario 8mínimo)</p>										

Tabla 5 — Medios de aislamiento selectivos

Medio	Tipo	Microorganismos	Norma	Función	Incubación	Cepas control	Medio de referencia	Método de control	Criterios	Reacciones características
Butzler modificado CCDA Karmali Preston Skirrow	S ^{a)}	Campylobacter	ISO 10272	Productividad	24 h - 72 h/ 42°C	C. coli ATCC 43478 C. jejuni ATCC 33291 ó 29428 ^{b)}	-	Cualitativo	Buen crecimiento (2)	Colonias características según cada medio (ver norma)
				Selectividad	24 h - 72 h/ 42°C	E. coli ATCC 25922 u 8739 ^{b)}	-	Cualitativo	Inhibición total o parcial (0-1)	Colonias no características
						S. aureus ATCC 25923			Inhibición total (0)	-
CIN SSDC	S	Yersinia enterocolitica	ISO 10273	Productividad	24 h/ 30°C	Y. enterocolitica ATCC 23715 ó 9610 ^{b)}	-	Cualitativo	Buen crecimiento (2)	Colonias características según cada medio (ver norma)
				Selectividad	24 h/ 30°C	E. coli ATCC 25922 u 8739 ^{b)}	-	Cualitativo	Inhibición total o parcial (0-1)	Colonias no características
						S. aureus ATCC 25923			Inhibición total (0)	-
Agar verde brillante (BGA)	S	Salmonella	12824/ ISO 6579	Productividad	24 h - 48 h/ 37°C	S. typhimurium ATCC 14028 ^{b)} S. enteritidis ATCC 13076	-	Cualitativo	Buen crecimiento (2)	Colonias características según cada medio (ver norma)
				Selectividad	24 h - 48 h/ 37°C	E. coli ATCC 25922 u 8739 ^{b)}	-	Cualitativo	Inhibición total o parcial (0-1)	Colonias no características
						E. faecalis ATCC 29212 ó 19433			Inhibición total (0)	
c) S= medio líquido a) Cepas a emplear por el laboratorio usuario 8mínimo)										

Tabla 6 — Medios de aislamiento no selectivos

Medio	Tipo	Microorganismos	Norma	Función	Incubación	Cepas control	Medio de referencia	Método de control	Criterios	Reacciones características
Agar nutritivo	S ^{a)}	Enterobacteriaceae	ISO 7402 ISO 8523		24 h/ 37°C	E. coli ATCC 25922 u 8739 ^{c)}	-	Cualitativo	Buen crecimiento (2)	-
		Salmonella	12824 ISO 6579		24 h/ 37°C	S. typhimurium ATCC 14028 ^{c)}				
		Yersinia enterocolitica	ISO 10273		24 h/ 30°C	Y. enterocolitica ATCC 23715 ó 9610 ^{c)}				
Agar TSYE A	S	Listeria monocytogenes	EN ISO 11290	Productividad	24 h/ 37°C	L. monocyt. 1/2a ATCC 1911 ó L. Monocyt. 4b ATCC 13932 ^{b)}	-	Cualitativo	Buen crecimiento (2)	-

a) S = Medio sólido.

b) Cepas a emplear por el laboratorio (mínimo).

c) Cepas de libre elección según el método utilizado.

Bibliografía

- [1] 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 6887-1:1999).
- [2] ISO 8261, Milk and milk products – General guidance for the preparation of the test samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examination (ISO 8261:2001.)
- [3] 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/FDIS 6887-2:2003)
- [4] 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/FDIS 6887-3:2003)
- [5] 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/FDIS 6887-4:2003)
- [6] *ISO 7218:2007, Microbiología de alimentos de consumo humano y animal – Requerimientos generales y reglas para los exámenes microbiológicos*
- [7] *NC-ISO 2859-1:2003, Procedimiento de muestreo para la inspección por atributos. Parte 1: Esquemas de muestreo indexado por el nivel de calidad aceptable (nca) para la inspección lote a lote.*
- [8] Corry JEL, Curtis GDW, Baird RM, 1995., Culture Media for Food Microbiology. London: Elsevier Science, Volume 34.
- [9] Anon. 1998., Int. J. Food Microbiol. **45**, 65.