

1. OBJETO

La presente norma tiene por objeto establecer el método para la detección de Salmonella en los productos de confitería.

2. CAMPO DE APLICACION

El presente método puede ser aplicado a todos los productos de confitería incluido el chocolate.

3. NORMAS COGUANOR A CONSULTAR

COGUANOR NGO 4 010 Sistema Internacional de Unidades (SI)
2a. Revisión

4. TERMINOLOGIA

4.1 Salmonella. Microorganismos que forman colonias típicas en los medios selectivos sólidos y que presentan las características bioquímicas y serológicas descritas en la presente norma.

4.2 Detección de Salmonella. Determinación de la presencia o ausencia de estos microorganismos, en una masa en particular, cuando el ensayo se realiza bajo las condiciones descritas en la presente norma.

5. PRINCIPIO DEL METODO

Para la detección de Salmonella se necesita llevar a cabo cuatro etapas sucesivas, debido a que dicho microorganismo se presenta generalmente en número reducido, algunas veces dañados y a menudo en presencia de cantidades considerables de otras enterobacterias. Dichas etapas son:

5.1 Preenriquecimiento: Por incubación de las muestras en un medio líquido no selectivo a 35°C.

5.2 Enriquecimiento: Por inoculación de dos medios líquidos selectivos con el medio de preenriquecimiento incubado, seguido por incubación a 35°C.

5.3 Aislamiento: Por inoculación de medios sólidos selectivos con los dos medios líquidos de enriquecimiento, los que, luego de incubación a 35°C, son examinados para detectar colonias que por sus características sean consideradas como presuntivas de Salmonella.

5.4 Confirmación: Realizando subcultivo de colonias presuntivas de Salmonella y determinando sus características bioquímicas y serológicas.

5. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

6.1 Recomendaciones generales. Para obtener resultados uniformes se recomienda emplear ya sea los componentes deshidratados de los medios de cultivo, de calidad uniforme y grado químico analítico, o bien, los medios deshidratados completos; si se usan medios deshidratados completos, deben ser preparados y usados como lo recomiendan los proveedores de dichos medios. El agua destilada, las sustancias orgánicas, los medios deshidratados completos o los ingredientes de los medios, deben estar libres de compuestos bacteriostáticos para Salmonella; tal condición puede verificarse empleando una cepa control de Salmonella.

6.2 Medios de cultivo.

6.2.1 Leche en polvo descremada, reconstituida. se prepara disolviendo 100g de leche en polvo descremada, en 1 litro de agua destilada y se esteriliza durante 15 min a 121°C.

6.2.2 Solución al 1% de verde brillante.

Verde brillante	1.0 g
Agua destilada, estéril	100.0 mL

Se agrega el colorante verde brillante al agua y se guarda la solución por lo menos un día en lugar oscuro, para permitir que se produzca auto-esterilización.

6.2.3 Caldo selenito cistina.

Triptona o polipeptona	5.0 g
Lactosa	4.0 g
Fosfato disódico (Na_2HPO_4)	10.0 g
Selenito de sodio (NaHSeO_3)	4.0 g
L-cistina	0.01 g
Agua destilada	1 litro

Se disuelven los ingredientes en el agua y se calienta, con agitación frecuente; se transfiere el medio asépticamente en cantidades de 10 mL a tubos de ensayo estériles, de 16 ó 20 mm por 150 mm. El caldo no debe esterilizarse sino calentarse durante 10 min en una corriente de vapor. El pH final debe ser 7.0 ± 0.2 . Este medio debe usarse el mismo día de la preparación.

6.2.4 Caldo tetracionato.6.2.4.1 Medio basal.

Polipeptona o proteosa peptona	5.0 g
Sales biliares	1.0 g
Carbonato de calcio	10.0 g
Tiosulfato de sodio pentahidratado	30.0 g
Agua destilada	1 litro

Se suspenden los ingredientes en el litro de agua, se mezcla y se lleva a ebullición; se deja enfriar a una temperatura inferior a 45°C y se almacena a 5-8°C. El pH final debe ser 8.4 ± 0.2 .

Nota. Puede quedar un ligero precipitado sin disolver.

Continúa

6.2.4.2 Solución de yodo.

Yodo	6.0 g
Yoduro de potasio	5.0 g
Agua destilada, estéril	20.0 mL

Se disuelve el yoduro de potasio en 5 mL de agua estéril, se agrega el yodo y se agita hasta disolución completa; se lleva el volumen de la solución a 20 mL con agua estéril.

6.2.4.3 Solución 0.1% de verde brillante.

Verde brillante	0.1 g
Agua destilada, estéril	100 mL

Se agrega el colorante verde brillante al agua y se guarda la solución por lo menos un día en lugar oscuro, para permitir que se produzca auto-esterilización.

6.2.4.4 Medio completo, para usar el mismo día de su preparación.

A un litro del medio basal se agregan 20 mL de la solución de yodo y 10 mL de la solución 0.1% de verde brillante. Se resuspende el precipitado con agitación suave y se transfiere asépticamente en cantidades de 10 mL a tubos de ensayo estériles de 16 ó 20 mm por 150 mm; el medio no debe calentarse después de agregar la solución de yodo.

6.2.5 Agar sulfito de bismuto (agar BS).

Polipeptona o peptona	10.0 g
Extracto de carne	5.0 g
Dextrosa	5.0 g
Fosfato disódico anhidro (Na_2HPO_4)	4.0 g
Sulfato ferroso anhidro (FeSO_4)	0.3 g
Sulfito de bismuto (indicador)	8.0 g
Verde brillante	0.025 g
Agar	20.0 g
Agua destilada	1 litro

Se mezclan los ingredientes completamente y se calientan con agitación; se hierve durante aproximadamente 1 min para obtener una suspensión uniforme y se enfría a 45-50°C. Se agita suavemente para suspender el precipitado formado y se transfiere asépticamente en cantidades de 20 mL a placas de Petri estériles. Se dejan secar las placas con las tapas parcialmente removidas, durante aproximadamente 2 h; después, se tapan las placas perfectamente. El pH final debe ser 7.6 ± 2 . El medio no debe esterilizarse y las placas deben prepararse el día antes de su uso almacenándose en un lugar oscuro a temperatura ambiente, hasta el momento de usarse. La selectividad del medio disminuye después de 48 h.

6.2.6 Agar xilosa lisina desoxicolato (Agar XLD).

Extracto de levadura	3.0 g
L-lisina	5.0 g
Xilosa	3.75 g
Lactosa	7.5 g
Sacarosa	7.5 g
Desoxicolato de sodio	2.5 g

Citrato férrico amónico	0.8 g
Tiosulfato de sodio	6.8 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar	15.0 g
Rojo fenol	0.08 g
Agua destilada	1 litro

Se disuelven los ingredientes en el agua con agitación y calentamiento suave, y se continúa el calentamiento justo hasta que se alcance el punto de ebullición; el medio no debe sobrecalentarse. Se enfría el medio a 50°C y se distribuye en cantidades de 20mL a placas de Petri; se dejan secar las placas con las tapas parcialmente removidas, durante aproximadamente 2h y después se tapan las placas perfectamente. El pH final debe ser 7.4 ± 0.2 y las placas no deben almacenarse por más de un día.

6.2.7 Agar entérico Hektoen (Agar HE).

Peptona	12.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Sales biliares	9.0 g
Lactosa	12.0 g
Sacarosa	12.0 g
Salicina	2.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Tiosulfato de sodio	5.0 g
Citrato férrico amónico	1.5 g
Azul de bromotimol	0.064 g
Fucsina ácida	0.1 g
Agar	13.5 g
Agua destilada	1 litro

Se disuelven los ingredientes en el agua con agitación, se lleva a ebullición y se hierve por no más de 1 min; el medio no debe sobrecalentarse. Se enfría el medio en el baño de agua y se transfiere asépticamente en cantidades de 20 mL a placas de Petri estériles; se dejan secar las placas con las tapas parcialmente removidas, durante aproximadamente 2 h y después se tapan las placas perfectamente. El pH final debe ser 7.6 ± 0.2 y las placas no deben almacenarse por más de un día.

6.2.8 Agar hierro/triple azúcar (agar ISI). Los medios 1 y 2 descritos en (a) y en (b), son intercambiables.

a) Medio 1.

Polipeptona	20.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Lactosa	10.0 g
Sacarosa	10.0 g
Glucosa	1.0 g
Sulfato de hierro y amonio	
[$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]	0.2 g
Tiosulfato de sodio	0.2 g
Rojo fenol	0.025 g
Agar	13.0 g
Agua destilada	1 litro

Se suspenden los ingredientes en el agua, se mezcla completamente y se calienta con agitación ocasional; se hierve durante aproximadamente 1 min para disolver los ingredientes. Se transfiere el medio a tubos de ensayo de 16 mm x 150 mm,

Continúa

hasta un tercio de su capacidad y se les coloca un tapón que permita condiciones aeróbicas. Se esteriliza el medio, a 121°C durante 15 min. Antes que se solidifique el agar se inclinan los tubos de manera de obtener planos inclinados de 5 cm y fondos de 3 cm de profundidad. El pH final debe ser 7.3 ± 0.2 .

b) Medio 2.

Extracto de carne	3.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Peptona	15.0 g
Proteosa peptona	5.0 g
Glucosa	1.0 g
Lactosa	10.0 g
Sacarosa	10.0 g
Sulfato ferroso	0.2 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Tiosulfato de sodio	0.3 g
Rojo fenol	0.024 g
Agar	12.0 g
Agua destilada	1 litro

Se prepara y distribuye el medio en la forma indicada en el inciso (a) anterior; el pH final debe ser 7.4 ± 0.2 .

6.2.9 Agar hierro lisina (agar LIA).

Gelisato o peptona	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Dextrosa	1.0 g
L-lisina	10.0 g
Citrato férrico amónico	0.5 g
Tiosulfato de sodio, anhidro	0.04 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1 litro

Se disuelven los ingredientes en el agua caliente y se distribuye el medio en cantidades de 4 mL a tubos de ensayo con tapa roscada de 13 mm x 100 mm; se esteriliza el medio, a 121°C durante 12 min y antes que se solidifique, se inclinan los tubos de manera de obtener planos inclinados de 2.5 cm y fondos de 4 cm de profundidad. El pH final debe ser 6.7 ± 0.2 .

6.2.10 Agar MacConkey.

Proteosa peptona o polipeptona	3.0 g
Peptona o gelisato	17.0 g
Lactosa	10.0 g
Sales biliares No.3 (o mezcla de sales biliares)	1.5 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Rojo neutro	0.03 g
Violeta cristal	0.001 g
Agar	13.5 g
Agua destilada	1 litro

Se suspenden los ingredientes en el agua, se calienta con agitación y se hierve durante 1 a 2 min para disolver los ingredientes; se esteriliza el medio a 121°C durante 15 min, se enfría a 45-50°C y se distribuye el medio en cantidades de 20 mL a placas de Petri estériles.

Continúa

Se secan las placas con la tapa puesta por un tiempo no menor de 2 h a temperatura ambiente; el pH final debe ser 7.1 ± 0.2 . No deben usarse las placas que estén húmedas.

6.2.11 Caldo de urea.

Urea	20.0 g
Extracto de levadura	0.1 g
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	9.1 g
Fosfato disódico (Na_2HPO_4)	9.5 g
Rojo fenol	0.01 g
Agua destilada	1 litro

Se disuelven los ingredientes en el agua destilada fría; no debe aplicarse calor. Se esteriliza el caldo por filtración a través de una membrana de $0.45 \mu\text{m}$; se distribuye el caldo asépticamente en cantidades de 1.5 a 3.0 mL a tubos estériles de 13 mm x 100 mm. El pH final debe ser 6.8 ± 0.2 .

6.2.12 Caldo de urea rápido.

Urea	20.0 g
Extracto de levadura	0.1 g
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	0.091 g
Fosfato disódico (Na_2HPO_4)	0.095 g
Rojo fenol	0.01 g
Agua destilada	1 litro

Se prepara y distribuye el caldo como se indica en el numeral 6.2.11.

6.2.13 Caldo de infusión cerebro corazón (caldo BHI).

Infusión de 200 g de cerebro de ternero	
Infusión de 250 g de corazón de res	
Proteosa peptona o gelisato	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato disódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2.5 g
Dextrosa	2.0 g
Agua destilada hasta completar	1 litro

Se disuelven los ingredientes en el agua con calentamiento suave y se distribuye el caldo en frascos o tubos; se esteriliza el caldo a 121°C durante 15 min. El pH final debe ser 7.4 ± 0.2 .

6.2.14 Caldo tripticasa soya-triptosa.

Caldo tripticasa soya (comercial, deshidratado)	15.0 g
Caldo triptosa (comercial, deshidratado)	13.5 g
Extracto de levadura	3.0 g
Agua destilada	1 litro

Se disuelven los ingredientes en el agua, con calentamiento suave y se distribuye en cantidades de 5 mL a tubos de ensayo de 16 mm x 150 mm; se esteriliza el caldo a 121°C durante 15 min. El pH final debe ser 7.2 ± 0.2 .

6.2.15 Solución salina fisiológica formalinizada.

Solución al 36-38% (m/m) de formaldehído	6.0 mL
Cloruro de sodio	8.5 g
Agua destilada	1 litro

Continúa

Se disuelve el cloruro de sodio en el agua destilada, se esteriliza la solución a 121°C durante 15 min y se deja enfriar a temperatura ambiente; finalmente se agregan los 6.0 mL de la solución de formaldehído. La solución no debe esterilizarse después de agregar la solución de formaldehído.

6.2.16 Caldo lisina descarboxilasa.

Geliso o peptona	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Glucosa	1.0 g
L-lisina	5.0 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agua destilada	1 litro

Se suspenden los ingredientes en el agua y se calienta hasta disolución completa, se distribuye el caldo en cantidades de 5 mL a tubos con tapa roscada de 16 mm x 125 mm; se esteriliza el caldo a 121°C durante 15 min, dejando la tapa de los tubos ligeramente suelta. Se cierran herméticamente las tapas durante el almacenamiento y después de la inoculación. El pH final debe ser 6.5 a 6.8.

6.2.17 Solución al 0.2% de púrpura de bromocresol.

Púrpura de bromocresol	0.2 g
Agua destilada estéril	100 mL

Se disuelve el tinte en agua destilada estéril y se completa el volumen a 100 mL con agua destilada estéril.

6.2.18 Caldo rojo fenol dulcitol.

Tripticasa o proteosa peptona No.3	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Extracto de carne (opcional)	1.0 g
Dulcitol	5.0 g
Solución al 0.25% de rojo fenol	7.2 mL
Agua destilada	1 litro

Se disuelven los ingredientes en el agua, con agitación y calentamiento suave, y se distribuye el caldo en cantidades de 2.5 mL a tubos de ensayo de 13 mm x 100 mm que contengan tubos de fermentación de 6 mm x 50 mm en posición invertida; se esteriliza el caldo a 118°C durante 10 min. El pH final debe ser 7.4 ± 0.2.

6.2.19 Caldo púrpura dulcitol.

Proteosa peptona No.3 ó geliso	
10.0 g	
Extracto de carne (opcional)	1.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Dulcitol	5.0 g
Agua destilada	1 litro

Se disuelven los ingredientes en el agua, con agitación y calentamiento suave, y se distribuye el caldo en cantidades de 2.5 mL a tubos de ensayo de 13 mm x 100 mm que contengan tubos de fermentación de 6 mm x 50 mm en posición invertida; se esteriliza el caldo a 118°C durante 10 min. El pH final debe ser 6.8 ± 0.2.

Continúa

6.2.20 Caldo triptona (triptofano).

Triptona o tripticasa	10.0 g
Agua destilada	1 litro

Se disuelve el ingrediente en el agua y se distribuye en cantidades de 5 mL a tubos de ensayo de 16 mm x 150 mm; se esteriliza el caldo a 121°C durante 15 min. El pH final debe ser 6.9 ± 0.2 .

6.2.21 Caldo cianuro de potasio (KCN).Caldo base.

Proteosa peptona No.3 o polipeptona	3.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	0.225 g
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	5.64 g
Agua destilada	1 litro

Se disuelven los ingredientes en el agua y se esteriliza el caldo a 121°C durante 15 min; se deja enfriar y se almacena a una temperatura entre 5 y 8°C. El pH final debe ser 7.6 ± 0.2 .

Solución de cianuro de potasio.

Cianuro de potasio	0.5 g
Agua destilada estéril	100 mL

Se disuelve la sal en el agua destilada estéril enfriada entre 5 y 8°C.

Medio completo.

Con una pipeta provista de perilla de llenado, se transfieren 15 mL de la solución fría de cianuro de potasio al litro de caldo base estéril y frío; no debe usarse la boca para succionar la solución de KCN. Se mezcla la solución con el caldo base y asépticamente se transfiere en cantidades de 1.0 a 1.5 mL a tubos de ensayo estériles de 13 mm x 100 mm; usando una técnica aséptica se tapan los tubos con corchos No.2, impregnados con parafina (véase nota) y se almacenan a 5-8°C por un período no mayor de 2 semanas.

Nota. Los corchos se preparan haciéndolos hervir en parafina durante 5 min y deben colocarse en los tubos de manera que se forme un sello entre el borde del tubo y el corcho pero sin que la parafina fluya hacia el medio contenido en el tubo.

6.2.22 Caldo malonato.

Extracto de levadura	1.0 g
Sulfato de amonio [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]	2.0 g
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	0.6 g
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	0.4 g
Cloruro de sodio	2.0 g
Malonato de sodio	3.0 g
Dextrosa	0.25 g
Azul de bromotimol	0.025 g
Agua destilada	1 litro

Se disuelven los ingredientes en el agua, empleando calor si fuera necesario; se distribuye el caldo en cantidades de 3 mL a tubos de ensayo de 13 mm x 100 mm y se esteriliza a 121°C durante 15 min. El pH final debe ser 6.7 ± 0.2 .

Continúa

6.2.23 Reactivo de Kovacs.

p-Dimetilaminobenzaldehído	5.0 g
Alcohol amílico normal	75.0 mL
Acido clorhídrico concentrado (d = 1.19)	25.0 mL

Se disuelve el aldehído en el alcohol amílico normal; lentamente se agrega el ácido clorhídrico y se almacena el reactivo a 4°C.

6.2.24 Solución salina fisiológica.

Cloruro de sodio	8.5 g
Agua destilada	1 litro

Se disuelve la sal en el agua, se esteriliza a 121°C durante 15 min y se enfría a temperatura ambiente.

6.2.25 Caldo rojo fenol lactosa. Se prepara en la forma indicada en el numeral 6.2.18 de la presente norma, excepto que se emplean 10 g de lactosa en lugar de los 5 g de dulcitol.

6.2.26 Caldo púrpura lactosa. Se prepara en la forma indicada en el numeral 6.2.19 de la presente norma, excepto que se emplean 10 g de lactosa en lugar de los 5 g de dulcitol.

6.2.27 Caldo rojo fenol sacarosa. Se prepara en la forma indicada en el numeral 6.2.18 de la presente norma, excepto que se emplean 10 g de sacarosa en lugar de los 5 g de dulcitol.

6.2.28 Caldo púrpura sacarosa. Se prepara en la forma indicada en el numeral 6.2.19 de la presente norma, excepto que se emplean 10 g de sacarosa en lugar de los 5 g de dulcitol.

6.2.29 Caldo MR-VP.

Peptona amortiguada	7.0 g
Glucosa	5.0 g
Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄)	5.0 g
Agua destilada	1 litro

Se disuelven los ingredientes en 800 mL de agua destilada con calor suave, se filtra, se enfría a 20°C y se diluye a 1 litro con agua destilada; se distribuye el caldo en cantidades de 10 mL a tubos de ensayo de 16 mm x 150 mm y se esteriliza a 121°C durante 12 a 15 min. El pH final debe ser 6.9 ± 0.2.

6.2.30 Solución de α-naftol. Se prepara disolviendo 5.0 g de α-naftol en 100 mL de alcohol absoluto.

6.2.31 Solución de hidróxido de potasio. Se prepara disolviendo 40 g de KOH en 80 mL de agua destilada y se diluye a 100 mL con agua destilada.

6.2.32 Creatina, en cristales.

6.2.33 Indicador rojo de metilo.

Rojo de metilo	0.10 g
Etanol, al 95% (v/v)	300 mL
Agua destilada, para completar el volumen a	500 mL

Continúa

Se disuelve el rojo de metilo en los 300 ml de etanol y se completa el volumen a 500 ml con agua destilada.

6.2.34 Agar citrato de Simmons.

Citrato de sodio, dihidratado	2.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	1.0 g
Fosfato de amonio ($NH_4H_2PO_4$)	1.0 g
Sulfato de magnesio	0.2 g
Azul de bromotimol	0.08 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1 litro

Se disuelven los ingredientes en el agua con calor suave y agitación ocasional; se lleva a ebullición durante 1 a 2 min hasta que el agar se disuelva y se distribuye el agar en tubos de 13 mm x 100 mm ó 16 mm x 150 mm, con tapa roscada, en cantidad suficiente para ocupar un tercio de la capacidad de los tubos. Se esteriliza el agar a 121°C durante 15 min y antes que se solidifique, se inclinan los tubos de manera de obtener planos inclinados de 4 a 5 cm y fondos de 3 cm de profundidad. El pH final debe ser 6.9 ± 0.2 .

6.2.35 Medio para el ensayo de movilidad (Semisólido).

Extracto de carne	3.0 g
Peptona o gelisato	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar	4.0 g
Agua destilada	1 litro

Se disuelven los ingredientes en el agua con calor y agitación, y se lleva a ebullición durante 1 a 2 min hasta que el agar se disuelva; se distribuye el medio en cantidades de 20 mL a tubos de ensayo de 20 mm x 150 mm, con tapa roscada, y se esteriliza a 121°C durante 15 min dejando la tapa de los tubos ligeramente suelta. Se enfría el medio a 45°C, se cierran completamente las tapas de los tubos y se almacenan entre 5 a 8°C. Para llevar a cabo el ensayo de movilidad se funde el medio en un baño de agua hirviendo o en un flujo de vapor, se enfría a 45°C y asépticamente se transfieren las porciones de 20 mL a placas de Petri estériles, se cubren las placas y se dejan solidificar. El pH final debe ser 7.4 ± 0.2 . Las placas deben usarse el mismo día en que se prepararon.

6.3 Sueros.

6.3.1 Varios sueros antisalmonella pueden ser obtenidos comercialmente, tales como: antisueros que contengan uno o más grupos "O" (llamados antisueros "O" mono o polivalentes), antisueros "Vi" y antisueros que contengan uno o más grupos H (llamados antisueros H mono o polivalentes). Para el uso de cada suero se deben seguir las instrucciones dadas por el fabricante. (1)

6.4 Papel indicador de pH, para medir entre 6 y 8 unidades con graduaciones no mayores de 0.4 unidades de pH.

(1) Se recomienda revisar la siguiente literatura técnica "P. R. Edwards and W. H. Ewing, 1972. Identification of Enterobacteriaceae. Burgess Publishing Company. Minneapolis, MN 55415; 3th Edition.

7. APARATOS

7.1 Balanza analítica de precisión, que aprecie 0.1 mg.

7.2 Mezclador mecánico (Licuadora), que opere a no menos de 840 rad/s (8 000 revoluciones/minuto) y a no más de 4 700 rad/s (45 000 revoluciones/minuto), con vasos mezcladores de metal o de vidrio de una capacidad apropiada, provistos de tapadera, y que sean resistentes a las condiciones de esterilización.

7.3 Autoclave.

7.4 Equipo de esterilización por filtración, por ejemplo: filtros de asbesto, filtros de membrana, o bujía filtrante de una porosidad apropiada.

7.5 Estufa de secado, horno o incubadora para secado de la superficie de las placas de agar, preferentemente a $50 \pm 5^\circ\text{C}$.

7.6 Incubadora, para mantener a 35°C el medio líquido, placas y tubos inoculados.

7.7 Incubadora o refrigeradora, regulada entre 5 y 8°C .

7.8 Baños de agua, para calentar y enfriar soluciones y medios de cultivo a temperaturas apropiadas.

7.9 Mezclador Vortex.

7.10 Frascos de boca ancha, con tapa roscada, de 500 mL.

7.11 Tubos de ensayo, con tapadera roscada, de: 13 mm x 100 mm; 16 mm x 150 mm y 20 mm x 150 mm.

7.12 Tubos de ensayo serológicos, de 10 mm x 75 mm o de 13 mm x 100 mm.

7.13 Tubos de fermentación, de 6 mm x 50 mm.

7.14 Placas de Petri.

Fondo:

Diámetro interno	90 ± 2 mm
Altura externa, mínima	18 mm

El borde de la placa debe estar en un plano paralelo a la base. El fondo de la placa debe ser plano y paralelo a la base.

Tapa:

Diámetro externo, máximo	102 mm
--------------------------	--------

Nota. Alternativamente se podrán usar placas de Petri desechables de plástico, preesterilizadas, aún con dimensiones ligeramente diferentes que las descritas anteriormente.

7.15 Pipetas graduadas, con capacidad nominal de 10 mL y 1 mL, con subdivisiones a cada 1.0 y 0.1 mL respectivamente.

7.16 Asa de inocular, de 3 mm de diámetro.

7.17 Asa en punta, de nicrón o platino-iridio.

Continúa

7.18 Instrumental de laboratorio.

7.19 Esterilización de material de vidrio e instrumental de laboratorio.

7.19.1 Todo el material de vidrio debe ser resistente a repetidas esterilizaciones.

7.19.2 Se esteriliza el material de vidrio e instrumental de laboratorio por uno de los métodos siguiente:

- a) Esterilización húmeda a no menos de 121°C durante no menos de 20 min.
- b) Esterilización seca a no menos de 170°C durante no menos de 1 h.

8. MUESTREO

8.1 Se parte de una muestra representativa de por lo menos 200g tomada en forma aséptica y envasada en un recipiente estéril.

9. PROCEDIMIENTO

9.1 Preenriquecimiento.

9.1.1 En un vaso mezclador esterilizado se pesan asépticamente 25g de la muestra; se agregan 225 mL de leche descremada reconstituida, estéril (véase el numeral 6.2.1), y se mezcla durante 2 min.

Nota. Se debe evitar el sobrecalentamiento de la muestra, por lo tanto el tiempo de mezclado no debe ser mayor de 2 min.

9.1.2 Asépticamente se transfiere la mezcla homogeneizada a un frasco esterilizado, de boca ancha, de 500 mL y se deja en reposo durante 60 min a temperatura ambiente, con la tapa perfectamente cerrada.

9.1.3 Se mezcla bien el contenido del frasco mediante un movimiento rotatorio del mismo y se determina el pH con papel indicador de pH; si es necesario, se ajusta el pH a 6.8 ± 0.2 , empleando solución 1 N de HCl o de NaOH según se requiera.

9.1.4 Se agrega 0.45 mL de la solución al 1% de verde brillante (véase el numeral 6.2.2) y se mezcla bien; con la tapa suelta un cuarto de vuelta, se incuba el frasco a 35°C durante 24 ± 2 h.

9.2 Enriquecimiento. Después del período de incubación, se aprieta la tapa del frasco y se mezcla su contenido con agitación suave; se transfieren: 1 mL de la mezcla a un tubo que contenga 10 mL del caldo selenito cistina (véase el numeral 6.2.3) y 1.0 mL de la mezcla a un tubo que contenga 10 mL de caldo tetratonato (véase el numeral 6.2.4), y se incuban ambos tubos a 35°C durante 24 ± 2 h.

9.3 Aislamiento.

9.3.1 Concluido el período de incubación, se mezclan los tubos con el mezclador Vortex y luego usando el asa circular estéril se extrae una porción del tubo con caldo selenito cistina y se siembra en estrías sobre: agar sulfito de bismuto (agar BS, véase el numeral 6.2.5); agar xilosa lisina desoxicolato (agar XLD, véase el numeral 6.2.6) y agar entérico Hektoen (agar HE, véase el numeral 6.2.7). Se repite este procedimiento con una porción extraída del tubo con caldo tetratonato.

Continúa

9.3.2 Se incuban las placas de agar XLD y agar HE a 35°C durante 24 ± 2 h y las placas de agar BS a la misma temperatura durante 48 ± 2 h; se examinan las placas para detectar la presencia de colonias sospechosas de Salmonella, caracterizadas en la forma siguiente:

- a) Agar BS. Las colonias de Salmonella pueden ser de color pardo, gris o negro, algunas veces con un brillo metálico; el medio que rodea las colonias generalmente es pardo al principio y se va tornando negro a medida que se incrementa el período de incubación, produciéndose el efecto denominado halo. Algunas especies pueden producir colonias verdes con o sin un pequeño oscurecimiento del medio que las rodea.
- b) Agar XLD. Las colonias de Salmonella son rosadas con o sin centros negros; muchos cultivos de Salmonella pueden tener centros negros, grandes y brillantes o pueden verse como colonias casi completamente negras. Excepcionalmente, unas pocas especies de Salmonella producen colonias amarillas con o sin centros negros.
- c) Agar HE. Las colonias de Salmonella son de color azul-verde o azul, con o sin centros negros; muchos cultivos de Salmonella pueden producir colonias con centros negros, grandes y brillantes o pueden verse como colonias casi completamente negras.

9.3.3 De cada una de las placas con agar selectivo, se seleccionan 2 o más colonias típicas o sospechosas de ser Salmonella y se inoculan en agar hierro/triple azúcar (agar TSI, véase el numeral 6.2.8) y en agar hierro lisina (agar LIA, véase el numeral 6.2.9), en la forma siguiente: con el asa en punta estéril, se toca ligeramente el centro de la colonia y se siembra en estriás sobre el plano inclinado del agar TSI y adicionalmente se siembra por picadura en el fondo del mismo; seguidamente, y sin flamear el asa, se siembra el agar LIA picándolo hasta el fondo dos veces y luego se siembra en estriás el plano inclinado de dicho agar.

9.3.4 Se almacenan las placas con agar selectivo, de las cuales se seleccionaron las colonias, a una temperatura comprendida entre 5 y 8°C durante 24 h adicionales con excepción de las placas con agar BS, las cuales continúan en incubación a 35°C; las placas no deben descartarse hasta obtener resultados definitivos.

9.3.5 Se incuban los tubos inoculados de agar TSI y agar LIA, a 35°C durante 24 ± 2 h y 48 ± 2 h, respectivamente; los tubos no deben cerrarse herméticamente, con el objeto de mantener condiciones aeróbicas durante la incubación y así prevenir la producción excesiva de H₂S. En el agar TSI, las colonias típicas de Salmonella producen planos inclinados alcalinos (color rojo) y fondos ácidos (color amarillo), con o sin producción de H₂S (ennegrecimiento del agar). En el agar LIA las colonias típicas de Salmonella producen reacción alcalina en el fondo del tubo (color púrpura); se deben considerar con reacción ácida (reacción negativa) únicamente los tubos cuyo fondo sea de color amarillo definido. No deben eliminarse los tubos en los que únicamente se produce decoloración del fondo, solamente en base a esta característica. La mayoría de los cultivos de Salmonella producen H₂S en el agar LIA.

9.3.6 Se vuelven a examinar las placas con agar BS, almacenadas a 35 °C durante 24h adicionales, se seleccionan nuevamente 2 ó más colonias sospechosas de ser Salmonella y se inoculan como se indica en el numeral 9.3.3; se continúa con el procedimiento indicado en los numerales 9.3.5 y 9.3.7.

9.3.7 Se retienen para confirmación bioquímica y serológica, todos los tubos con colonias presuntivas de Salmonella sobre agar TSI (plano inclinado alcalino y fondo ácido) aunque su reacción en agar LIA sea positiva (fondo alcalino) o negativa (fondo ácido); no deben excluirse los cultivos con reacción negativa en agar TSI si su reacción es típica para Salmonella en agar LIA (fondo alcalino). Solamente deben descartarse los cultivos de agar TSI negativos para Salmonella (planos inclinados ácidos y fondos ácidos) si su reacción en agar LIA es atípica para Salmonella (fondo ácido).

Nota. El agar LIA es útil para detectar S. arizonae y especies atípicas de Salmonella que utilizan lactosa y/o sacarosa.

9.3.8 Se someten a ensayos de identificación, como se indica en el numeral 9.3.9, los cultivos de agar TSI considerados como presuntamente positivos para Salmonella; si en los cultivos de agar TSI no se hubiesen producido reacciones típicas de Salmonella, se deben seleccionar colonias adicionales sospechosas desde las placas con agares selectivos y se deben inocular las mismas en agar TSI y agar LIA, en la forma indicada en el numeral 9.3.3.

9.3.9 Se deben someter a los ensayos de identificación bioquímica y serológica, indicados en el numeral 9.4, los siguientes cultivos:

- a) Tres cultivos de agar TSI presuntamente positivos para Salmonella, recuperados de la siembra en estrias sobre caldo selenito cistina y tres cultivos de agar TSI presuntamente positivos para Salmonella, recuperados de la siembra en estrias sobre caldo tetracionato.
- b) Si no se han aislado 3 cultivos presuntamente positivos para Salmonella a partir de una serie de placas de agar, se deben ensayar bioquímica y serológicamente otros cultivos del agar TSI presuntamente positivos que se hubiesen aislado. Se deben examinar un mínimo de 6 cultivos del agar TSI por cada unidad analítica de 25 g de la muestra.

9.3.10 Aislamiento de Salmonella a partir de cultivos mezclados.

9.3.10.1 Los cultivos del agar TSI que se presenten como una mezcla de cultivos se deben sembrar en estrias sobre agar MacConkey (véase el numeral 6.2.10), sobre agar HE o sobre agar XLD; se incuban las placas a 35°C durante 24 ± 2 h y se examinan para detectar la presencia de colonias sospechosas de ser Salmonella, caracterizadas en la forma siguiente:

- a) Agar MacConkey. Las colonias de Salmonella son transparentes e incoloras, algunas veces con un centro negro; las colonias de Salmonella aclaran las áreas de precipitado biliar causado por otros microorganismos que algunas veces están presentes.
- b) Agar HE, véase el numeral 9.3.2 (c).
- c) Agar XLD, véase el numeral 9.3.2 (b).

9.3.10.2 Se transfieren como mínimo 2 colonias sospechosas de ser Salmonella a tubos que contengan agar TSI y a tubos que contengan agar LIA, en la forma descrita en el numeral 9.3.3 y se continúa el procedimiento indicado desde el numeral 9.3.4.

9.4 Confirmación de colonias presuntivas de Salmonella.

9.4.1 Ensayo de ureasa para cultivos puros (convencional). Usando el asa en punta estéril, se inoculan tubos de caldo de urea (véase el numeral 6.2.11) con las colonias desarrolladas en cada cultivo del agar TSI que se clasificó como presuntamente positivo y se incuban a 35°C durante 24 ± 2 h.

Continúa

Nota. Ocasionalmente, los tubos de caldo de urea sin inocular, se tornan de color rojo púrpura (ensayo positivo) durante el período comprendido entre la preparación del caldo y la incubación del mismo, por lo tanto, se deben incluir como control durante la incubación, tubos no inoculados de caldo de urea.

9.4.2 Ensayo de ureasa para cultivos puros (rápido). Usando el asa circular estéril, se toman 2 porciones de las colonias desarrolladas en cada cultivo del agar TSI que se clasificó como presuntamente positivo y se transfieren a tubos que contengan caldo de urea rápido (véase el numeral 6.2.12); se incuban los tubos inoculados en un baño de agua regulado a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$, durante 2 h. Se retienen para ensayos adicionales todos los cultivos que tengan reacción negativa (ningún cambio de color del medio) y se descartan los cultivos con reacción positiva.

9.4.3 Ensayo serológico con suero polivalente flagelar H. Este ensayo puede realizarse en esta etapa de la prueba o más adelante como se indica en el numeral 9.4.5.3 (d); véase el numeral 9.4.4.

9.4.3.1 Se inoculan las colonias del agar TSI que dieron reacción negativa en el ensayo de ureasa, en caldo de infusión cerebro corazón (caldo BHI, véase el numeral 6.2.13) y se incuban a 35°C durante 4 a 6h, hasta que haya desarrollo visible, si el ensayo se realiza el mismo día o bien, si el ensayo se realiza el día siguiente, se inoculan las colonias en caldo tripticasa soya-triptosa (véase el numeral 6.2.14) y se incuban a 35°C durante $24 \pm 2\text{h}$; cualesquiera sea el caso, se deben adicionar 2.5 mL de la solución salina fisiológica formalinizada (véase el numeral 6.2.15) a cada 5 mL del medio inoculado.

9.4.3.2 Se seleccionan 2 de los cultivos en el medio formalinizado y se ensayan con el antisuero polivalente flagelar H para Salmonella, en la forma siguiente: en un tubo serológico de 10 mm x 75 mm o de 13 mm x 100 mm, se coloca 0.5 mL del antisuero apropiadamente diluido (véase el numeral 6.3) y se agrega 0.5 mL del antígeno que se va a ensayar; adicionalmente se prepara un control salino mezclando 0.5 ml de solución salina fisiológica formalinizada con 0.5 mL del antígeno formalinizado y se incuban ambas mezclas en un baño de agua regulado entre 48 y 50°C .

9.4.3.3 Se observa el resultado del ensayo a intervalos de 15 min y se lee el resultado final después de 1h de incubación. El resultado es positivo si hay aglutinación en la mezcla de ensayo pero no en la mezcla control y se considera negativo si no se produce aglutinación en la mezcla de ensayo ni en la mezcla control. El resultado se considera como no específico si se produce aglutinación en ambas mezclas; en este caso, se deben someter estos cultivos al ensayo de Spicer-Edwards.

9.4.4 Ensayo serológico de Spicer-Edwards. Este ensayo puede usarse como un ensayo alternativo del ensayo con suero polivalente flagelar H descrito en el numeral 9.4.3 y adicionalmente puede usarse con los cultivos que dieron resultado no específico en dicho ensayo.

9.4.4.1 Se realiza el ensayo serológico de Spicer-Edwards para antisuero flagelar H, como se indica en el numeral 9.4.3.2; se deben realizar ensayos bioquímicos adicionales (véase el numeral 9.4.5) con los cultivos que den resultados positivos en los ensayos con suero flagelar.

9.4.4.2 Si ambos cultivos en caldo formalinizado dan resultados negativos se debe llevar a cabo el ensayo serológico descrito en el numeral 9.4.3 sobre 4 cultivos adicionales desarrollados en el caldo BHI o en el caldo tripticasa soya-triptosa; si es posible, se deben obtener 2 cultivos positivos para llevar a cabo los ensayos bioquímicos adicionales (véase el numeral 9.4.5).

9.4.5 Ensayos para los cultivos negativos para la prueba de ureasa.

9.4.5.1 Caldo lisina descarboxilasa. Si el ensayo en agar LIA fue satisfactorio, no necesita ser repetido; si el resultado de dicho ensayo fue dudoso, se debe realizar una determinación final de lisina descarboxilasa, en la forma siguiente:

- a) Se inocula el caldo lisina descarboxilasa (véase el numeral 6.2.16) con una pequeña cantidad del cultivo desarrollado en agar TSI sospechoso de ser Salmonella; se cierra el tubo herméticamente y se incuba a 35°C durante 48 ± 2h con examen a intervalos de 24 h.
- b) Las especies de Salmonella causan reacción alcalina manifestada por una coloración púrpura a través de todo el medio; el ensayo es negativo si todo el medio tiene coloración amarilla. Si el medio se ve decolorado (ni rojo ni amarillo), se deben agregar algunas gotas de la solución al 0.2% de púrpura de bromocresol (véase el numeral 6.2.17) y se vuelve a examinar el tubo.

9.4.5.2 Caldo rojo fenol dulcitol o caldo púrpura dulcitol.

- a) Se inocula el caldo rojo fenol dulcitol o el caldo púrpura dulcitol (véase los numerales 6.2.18 y 6.2.19) con una pequeña cantidad del cultivo desarrollado en agar TSI sospechoso de ser Salmonella; se cierra el tubo herméticamente y se incuba a 35°C durante 48 ± 2h con examen a intervalos de 24 h.
- b) La mayoría de especies de Salmonella dan reacción positiva manifestada por la formación de gas en el tubo de fermentación y por el pH ácido del medio (amarillo); la producción solamente de ácido también debe interpretarse como una reacción positiva. El ensayo es negativo si no hay formación de gas en el tubo de fermentación y el color de todo el medio es rojo, si se usó rojo fenol como indicador, o púrpura si se usó púrpura de bromocresol como indicador.

9.4.5.3 Caldo triptona (o triptofano). Se inocula caldo triptona (véase el numeral 6.2.20) con una pequeña cantidad del cultivo desarrollado en agar TSI, se incuba a 35°C durante 24 ± 2h y se continúa con el procedimiento siguiente:

- a) Caldo cianuro de potasio (KCN). Con el asa circular estéril se transfiere una porción del cultivo desarrollado en el caldo triptona al caldo cianuro de potasio (véase el numeral 6.2.21), se calienta el borde del tubo de manera de formar un sello adecuado cuando se tape el tubo con el corcho revestido de cera, y se incuba a 35°C durante 48 ± 2 h con examen a intervalos de 24 h. La reacción es positiva si hay crecimiento manifestado por turbidez del medio; la mayoría de las especies de Salmonella no crecen en el medio KCN (ausencia de turbidez).
- b) Caldo malonato. Con el asa circular estéril se transfiere una porción del cultivo desarrollado en el agar triptona al caldo malonato (véase el numeral 6.2.22) y se incuba a 35°C durante 48 ± 2 h con examen a intervalos de 24 h (véase nota). La mayoría de las especies de Salmonella dan reacción negativa en este caldo, manifestada por un color verde en el medio o ningún cambio de color en el mismo.

Nota. Ocasionalmente, los tubos de caldo malonato sin inocular, se tornan de color azul (ensayo positivo) durante el período comprendido entre la preparación del caldo y la incubación del mismo, por lo tanto, se deben incluir como control durante la incubación, tubos no inoculados de caldo malonato.

- c) Ensayo de indol. Se transfieren 5 mL del cultivo en caldo triptona a un tubo de ensayo vacío, se agregan 0.2 a 0.3 mL del reactivo de Kovacs (véase el numeral 6.2.23) y se examina el tubo. La mayoría de los cultivos de Salmonella dan reacción negativa (ausencia de un color rojo fuerte en la superficie del medio); se registra como "±" la coloración intermedia que varíe de naranja a rosado.
- d) Ensayo para Salmonella con suero flagelar H. Si el ensayo con suero flagelar H (véase el numeral 9.4.3) o el ensayo de Spicer-Edwards (véase el numeral 9.4.4) no se han llevado a cabo, deberán realizarse en esta etapa de la prueba.
- e) Se debe descartar como Salmonella cualquier cultivo que: i) muestre reacción positiva en el ensayo de indol y negativa en el ensayo con suero flagelar H, o ii) muestre reacción positiva en el caldo KCN y negativa en el caldo lisina descarboxilasa.

9.4.6. Ensayos serológicos con suero somático O. Se deben pre-ensayar todos los antisueros para Salmonella con cultivos conocidos.

9.4.6.1 Ensayo con suero polivalente somático O.

- a) Con un lápiz de cera se marcan en el interior de una placa de Petri, dos secciones separadas de aproximadamente 1 cm x 2 cm; también pueden emplearse los portaobjetos seccionados disponibles en el comercio. Con el asa circular se toma una porción del cultivo desarrollado sobre el agar TSI incubado entre 24 y 48 h y se transfiere la mitad al extremo superior de uno de los rectángulos marcados en la placa de Petri, y la otra mitad al extremo superior del otro rectángulo; se coloca 1 gota de la solución salina (véase el numeral 6.2.24) en el extremo inferior de solo uno de los rectángulos y una gota del antisuero polivalente somático O en el extremo inferior del otro rectángulo.
- b) Con el asa en punta estéril, se emulsiona el cultivo en la solución salina y se repite el procedimiento en la sección que contiene el antisuero; se hace oscilar cada placa o portaobjetos durante 1 min y se observan las reacciones contra un fondo oscuro bajo iluminación adecuada.
- c) La reacción es positiva si se produce cualquier grado de aglutinación; los resultados del ensayo se clasifican en la forma siguiente:
- Positivo: hay aglutinación en la mezcla en ensayo pero no en el control salino.
 - Negativo: no hay aglutinación en la mezcla en ensayo ni en el control salino.
 - No específico: hay aglutinación en la mezcla en ensayo y en el control salino.

9.4.6.2 Ensayos para el grupo somático O. Siguiendo el procedimiento descrito en el numeral 9.4.6.1, se ensayan individualmente los antisueros del grupo somático O, incluyendo el antisuero Vi si estuviera disponible; se registran como positivos para el grupo O los cultivos que mostraron aglutinación con los antisueros individuales O y como negativos los cultivos que no mostraron aglutinación con dichos antisueros.

Continúa

Cuadro 1 Reacciones bioquímicas y serológicas de Salmonella. (continúa)

Ensayo o sustrato	Positivo	Negativo	Reacción de especies de <u>Salmonella</u> (1)
1. Glucosa (TSI)	Fondo amarillo	Fondo rojo	+
2. Lisina descarboxilasa (LIA)	Fondo púrpura	Fondo amarillo	+
3. H ₂ S (TSI y LIA)	Ennegrecimiento	Sin ennegrecimiento	+
4. Ureasa	Color rojo púrpura	Sin cambio de color	-
5. Caldo lisina descarboxilasa	Color púrpura	Color amarillo	+
6. Caldo rojo fenol dulcitol	Color amarillo y/o formación de gas	Sin gas ni cambio de color	+(2)
7. Caldo KCN	Crecimiento	Sin crecimiento	-
8. Caldo malonato	Color azul	Sin cambio de color	-(3)

- (1) "+" = 90% o más positivo en uno o dos días; "-" = 90% o más negativo en uno o dos días; "v" = variable.
 (2) La mayoría de los cultivos de S. arizonae son negativos.
 (3) La mayoría de los cultivos de S. arizonae son positivos.

Continúa

Cuadro 1 Reacciones bioquímicas y serológicas de Salmonella. (conclusión)

Ensayo o sustrato	Positivo	Negativo	Reacción de especies de <u>Salmonella</u> (1)
9. Ensayo de indol	Color violeta en la superficie	Color amarillo en la superficie	-
10. Ensayo de suero polivalente flagelar	Aglutinación	Sin aglutinación	+
11. Ensayo de suero polivalente somático	Aglutinación	Sin aglutinación	+
12. Caldo rojo fenol lactosa	Color amarillo y/o formación de gas	Sin gas ni cambio de color	- (3)
13. Caldo rojo fenol sacarosa	Color amarillo y/o formación de gas	Sin gas ni cambio de color	-
14. Ensayo de Voges-Proskauer	Color rosado a rojo	Sin cambio de color	-
15. Ensayo de rojo de metilo	Color rojo difuso	Color amarillo difuso	+
16. Citrato de Simmons	Crecimiento; color azul	Sin crecimiento ni cambio de color	V

(1) "+" = 90% o más positivo en uno o dos días; "-" = 90% o más negativo en uno o dos días; "V" = variable.

(2) La mayoría de los cultivos de S. arizonae son negativos.

(3) La mayoría de los cultivos de S. arizonae son positivos.

Continúa

9.4.7 Ensayos bioquímicos adicionales.

9.4.7.1 Aquellos cultivos de agar TSI que muestran reacciones típicas para Salmonella en los ensayos 1 al 11 indicados en el cuadro 1, no requieren ensayos bioquímicos adicionales sino que deben ser clasificados como Salmonella, en esta etapa de la prueba (véase el cuadro 1 en la página 18/24).

9.4.7.2 Aquellos cultivos de agar TSI que mostraron reacción positiva en el ensayo con el antisuero flagelar H pero que no tienen características bioquímicas de Salmonella, deben purificarse como se indica en el numeral 9.3.10 y volver a ensayarse con el procedimiento indicado en el numeral 9.4.

9.4.7.3 Aquellos cultivos que no mostraron reacciones típicas para Salmonella en los ensayos 1 al 11 del cuadro y que por lo tanto no clasifican como Salmonella, deben ser ensayados adicionalmente con los siguientes ensayos bioquímicos:

- a) Caldo rojo fenol lactosa o caldo púrpura lactosa. De los cultivos no clasificados, desarrollados en el agar TSI después de 24 a 48 h de incubación, se transfieren pequeñas porciones a caldo rojo fenol lactosa (véase el numeral 6.2.25) o a caldo púrpura lactosa (véase el numeral 6.2.26), se incuban a 35°C durante 48 ± 2h con examen a intervalos de 24 h. La reacción se considera positiva si hay formación de gas en el tubo de fermentación y el pH del medio es ácido (amarillo); la producción solamente de ácido también debe interpretarse como una reacción positiva. La mayoría de los cultivos de Salmonella dan reacción negativa, es decir, no hay formación de gas en el tubo de fermentación y el color de todo el medio es rojo si se usó rojo fenol como indicador, o púrpura si se usó púrpura de bromocresol como indicador. Se deben descartar por no ser Salmonella, los cultivos que muestren reacción positiva en este ensayo, excepto los que muestren planos inclinados ácidos en el agar TSI y reacción positiva en el agar LIA.
- b) Caldo rojo fenol sacarosa o caldo púrpura sacarosa. De los cultivos no clasificados, desarrollados en el agar TSI después de 24 a 48 h de incubación, se transfieren pequeñas porciones a caldo rojo fenol sacarosa (véase el numeral 6.2.27) o a caldo púrpura sacarosa (véase el numeral 6.2.28) procediéndose como se indica en el inciso (a) anterior.
- c) Caldo MR-VP. Se inocula caldo MR-VP (véase el numeral 6.2.29) con una porción pequeña de cada cultivo desarrollado en agar TSI sospechoso de ser Salmonella y se incuba a 35°C durante 48 ± 2h; seguidamente se lleva a cabo el ensayo de Voges-Proskauer, descrito a continuación, y el caldo remanente se incuba adicionalmente a 35°C durante 48 ± 2h, para realizar el ensayo del rojo de metilo.
- d) Ensayo de Voges-Proskauer (VP). Este ensayo se lleva a cabo a temperatura ambiente, en la forma siguiente: se transfiere a un tubo de ensayo, 1 mL del cultivo obtenido en (c), después de las primeras 48 h de incubación, se agrega 0.6 mL de alfa naftol (véase el numeral 6.2.30) y se agita bien; se agrega 0.2 mL de la solución al 40% de KOH (véase el numeral 6.2.31) y se agita. Para intensificar y acelerar la reacción, se agregan algunos cristales de creatina y se lee la reacción después de 4h. El ensayo se considera positivo si se desarrolla una coloración rosada o rojo rubí a través de todo el medio; la mayoría de los cultivos de Salmonella dan reacción negativa al ensayo VP, manifestada por la ausencia de coloración rosada o rojo a través del caldo.
- e) Ensayo del rojo de metilo. Se transfieren a un tubo de ensayo, 5 mL del cultivo obtenido en (c) después de 96 h de incubación, se agregan 5 a 6 gotas del indicador rojo de metilo (véase el numeral 6.2.33) y se lee la

reacción inmediatamente; la mayoría de los cultivos de Salmonella dan reacción positiva manifestada por una coloración roja difusa en el medio. Un color amarillo claro significa que la reacción es negativa. Se deben descartar como Salmonella los cultivos que mostraron reacción positiva en el ensayo con KCN y en el ensayo VP, y mostraron reacción negativa en el ensayo del rojo de metilo.

- f) Agar citrato de Simmons. Usando el asa en punta estéril se inocula el agar citrato de Simmons (véase el numeral 6.2.34) con los cultivos no clasificados del agar TSI; la inoculación debe hacerse rayando el plano inclinado del agar y picando el fondo del mismo. Se incuba a 35°C durante 96 ± 2 h; la reacción se considera positiva si hay crecimiento generalmente acompañado por un cambio de color de verde a azul. La mayoría de los cultivos de Salmonella dan reacción positiva en este ensayo; la reacción negativa se manifiesta por la ausencia de crecimiento o por un crecimiento mínimo y ningún cambio en el color.

9.4.8 Clasificación de los cultivos. Se clasifican como Salmonella los cultivos que mostraron las reacciones típicas indicadas en el cuadro 1 y se descartan por no ser Salmonella los cultivos que den los resultados indicados en cualesquiera de las subdivisiones del cuadro 2.

Cuadro 2. Criterios para descartar los cultivos que no son Salmonella

Ensayo o sustrato	Resultado
1. Ureasa	Positivo (color rojo-púrpura)
2. Ensayo de indol Ensayo con suero polivalente flagelar H Ensayo con suero flagelar Spicer-Edwards	Positivo (color violeta en la superficie) Negativo (no hay aglutinación) Negativo (no hay aglutinación)
3. Lisina descarboxilasa Caldo KCN	Negativo (color amarillo) Positivo (crecimiento)
4. Caldo rojo fenol lactosa	Positivo (color amarillo y/o formación de gas) (1),(2)
5. Caldo rojo fenol sacarosa	Positivo (color amarillo y/o formación de gas) (2)
6. Caldo KCN Ensayo de Voges-Proskauer Ensayo del rojo de metilo	Positivo (crecimiento) Positivo (color rosado a rojo) Negativo (color amarillo difuso)

(Véase las llamadas del cuadro en página 22/24)

Continúa

- (1) Se deben ensayar en forma adicional los cultivos que dan reacción positiva en el caldo malonato, para determinar si son Salmonella arizonae.
- (2) No se deben descartar los cultivos positivos, si los mismos mostraron reacciones típicas de Salmonella en el agar LIA; se deben realizar ensayos adicionales para determinar si son especies de Salmonella.

9.4.8.1 Si ninguno de los cultivos de agar TSI, después de realizada la serie de ensayos bioquímicos, muestra la presencia de Salmonella, se deben llevar a cabo los ensayos bioquímicos indicados en el numeral 9.4.5, en los cultivos remanentes de agar TSI que dieron reacción negativa en el ensayo de ureasa y que corresponden a la misma porción de 25 g de muestra.

9.4.9 Identificación genérica presuntiva de Salmonella empleando juegos comerciales de reactivos. Como una alternativa del sistema convencional de ensayos bioquímicos en tubos de ensayo, pueden usarse cualesquiera de los siguientes juegos de reactivos ya preparados comercialmente ("commercial kits"): API, Enterotubo o Minitek, para la identificación genérica presuntiva de Salmonella en alimentos; se debe elegir el juego de reactivos que demuestre una correlación adecuada con el sistema convencional empleado en el laboratorio. Los juegos de reactivos ya preparados comercialmente no deben usarse como sustitutos de los ensayos serológicos indicados en la presente norma.

9.4.9.1 La inoculación de cada unidad así como el período y temperatura de incubación, deben hacerse de acuerdo a las instrucciones dadas por el fabricante respectivo del juego de reactivos ya preparados; para la identificación presuntiva se deben clasificar los cultivos como Salmonella o no Salmonella, de acuerdo a los diagramas de flujo y cuadros que provea el fabricante.

9.4.9.2 Para la confirmación de los cultivos identificados presuntivamente como Salmonella, deben llevarse a cabo los ensayos serológicos:

1) Con suero somático O y 2) con suero polivalente flagelar H o con suero flagelar H de Spicer-Edwards; la clasificación final de los cultivos debe hacerse en la forma siguiente:

- a) Se deben confirmar como Salmonella aquellos cultivos que clasifiquen como presuntivo para Salmonella con el juego de reactivos bioquímicos y muestren reacciones positivas en ambos ensayos serológicos.
- b) Se deben descartar los cultivos que clasifiquen como no Salmonella de acuerdo a los criterios establecidos por el fabricante del juego de reactivos bioquímicos, empleado en la prueba.

9.4.10 Tratamiento para los cultivos que mostraron reacción negativa en los ensayos con suero flagelar H. Si las reacciones bioquímicas de algunos cultivos negativos al suero flagelar H, sugieren fuertemente que los cultivos son Salmonella, el resultado serológico negativo puede deberse a organismos no móviles o a un desarrollo insuficiente del antígeno flagelar; en estos casos se procede en la forma siguiente:

9.4.10.1 Se inocula el medio para el ensayo de movilidad (véase el numeral 6.2.35) con una pequeña porción del cultivo desarrollado en agar TSI; la inoculación debe hacerse picando una vez el medio, a 10 mm de la orilla de la placa y a 2 ó 3 mm de profundidad; no debe picarse el medio hasta el fondo de la placa o inocular cualquier otra porción. Se incuba el medio inoculado a 35°C durante 24 h.

9.4.10.2 Si los organismos han migrado 40 mm o más, se procede en la forma siguiente: con el asa circular se toma una porción del cultivo que migró más lejos y se transfiere a caldo tripticasa soya-triptosa; se repite el ensayo serológico con suero polivalente flagelar H descrito en el numeral 9.4.3 ó el ensayo serológico de Spicer-Edwards descrito en el numeral 9.4.4.

9.4.10.3 Si los cultivos son no móviles después de las primeras 24 h de incubación; se deben incubar a 35°C durante 24 h adicionales y si aún no se produce movimiento, se incuban hasta 5 días a 25°C; se deben clasificar los

cultivos como no móviles si los ensayos antes descritos aún dan reacción negativa.

9.4.10.4 Alternativamente, los cultivos de reacción serológica negativa pero con reacciones bioquímicas típicas para Salmonella, deberían ser enviados a un centro de referencia reconocido para su tipificación definitiva.

9.5 Confirmación definitiva. Se considera una práctica recomendable, enviar los cultivos con reacciones típicas de Salmonella y los cultivos presuntivos de Salmonella, a un centro de referencia reconocido para su tipificación definitiva; dicho envío debe ser acompañado de toda la información posible concerniente a los cultivos y debe realizarse siguiendo las instrucciones especificadas por el centro de referencia elegido.

10. EXPRESION DE LOS RESULTADOS

Los resultados se expresan de acuerdo a las siguientes posibilidades:

- a) Si ningún cultivo muestra resultados bioquímicos y serológicos, típicos de Salmonella, se informará: "No se encontró Salmonella en 25g del producto examinado";
- b) Si uno o más cultivos muestran resultados positivos para Salmonella, pero sin que haya confirmación definitiva de los mismos, se informará: "Se encontró Salmonella presuntiva en 25 g del producto examinado";
- c) Si uno o más cultivos muestran resultados positivos para Salmonella y los mismos tienen confirmación definitiva, se informará: "Se encontró Salmonella en 25 g del producto examinado";
- d) Si se realizó tipificación serológica, se informará: "La Salmonella identificada pertenece a los siguientes tipos...".

11. INFORME DEL ENSAYO O ANALISIS

En el informe del análisis debe indicarse lo siguiente:

- 11.1 Los resultados del análisis, como se indica en el capítulo 10.
- 11.2 El método de ensayo haciendo referencia a esta norma.
- 11.3 El nombre del centro de referencia que llevó a cabo la confirmación definitiva, cuando corresponda.
- 11.4 Todos los detalles necesarios que permitan la completa identificación de la muestra.

Continúa

CORRESPONDENCIA

Para la preparación de la presente norma se han tenido en cuenta los siguientes documentos:

- a) "FDA Bacteriological Analytical Manual, Chapter 7. Isolation and Identification of Salmonella Species; 6th Edition, Published and Distributed by Association of Official Analytical Chemists, USA, 1984";
- b) "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, Chapter 26 Salmonella; Second Edition, Marvin L. Speck, Editor; American Public Health Association, Washington, D.C. 1984";
- c) Métodos 46 115 a 46 128 y 46 133 a 46 135 descritos en "Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists, AOAC; 14th Edition, 1984".

-ULTIMA LINEA-