



PROTOCOLOS

**ANÁLISIS
MICROBIOLÓGICO
EN LA INDUSTRIA
ALIMENTARIA**

¿Cómo de importante son los métodos de referencia en el control de alimentos?

Muchos de los alimentos que no se someten a un análisis microbiológico se convierten en un riesgo para la salud, debido a que pueden ocasionar un amplio rango de enfermedades. Las enfermedades diarreicas, por ejemplo, son la primera causa de muerte en niños y la segunda en adultos y en muchos casos está relacionado con la ingesta de un alimento contaminado. Es por esto que se hace necesario el establecimiento de criterios microbiológicos, que aseguren la inocuidad de los alimentos y protejan la salud del consumidor.

El desarrollo de **criterios para el control microbiológico de alimentos** implica, entre otros aspectos, fijar el método analítico a emplear para asegurar el cumplimiento de estos criterios. Dichos métodos, desarrollados por organismos como ISO o CEN, pueden ser considerados como métodos de referencia, y a menudo son de difícil implantación y aplicación en los laboratorios de análisis.

En la actualidad, la estrategia en el desarrollo y actualización de estos **métodos ISO** pretende la mejora de los mismos gracias a la simplificación e incorporación de nuevas tecnologías de modo que puedan ser empleados de forma rutinaria en los laboratorios de control de alimentos.

El empleo de métodos normalizados para la realización de análisis microbiológicos es una herramienta mediante la cual los laboratorios disponen de **métodos de ensayo reconocidos internacionalmente**, contribuyendo de este modo a la obtención de resultados comparables, sin renunciar a que el resultado sea fiable de forma que se garantice la calidad y seguridad de los alimentos sometidos a control.

Es por ello que es cada vez más frecuente que dichos métodos normalizados sean tomados como referencia tanto por organismos de acreditación como para establecer criterios microbiológicos (Reglamentos UE 2073/2005 y 1441/2007) donde se **contemplan como métodos de referencia las normas internacionales desarrolladas en los Comités ISO y CEN**.

Desde **Condalab** queremos ayudar a los distintos laboratorios de control de calidad poniendo a su disposición toda la gama de medios de cultivo bajo **formulaciones ISO** así como sus distintos **procedimientos de análisis**.



Índice

RECuento DE MICROORGANISMOS MESÓFILOS _____	05
Procedimiento según ISO 4833:2013	
RECuento DE MOHOS Y LEVADURAS _____	06
Procedimiento según ISO 21527:2008	
DETECCIÓN SALMONELLA SPP _____	07
Procedimiento según ISO 6579:2017	
DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE LISTERIA SPP _____	09
Procedimiento según ISO 11290:2017	
DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE CAMPYLOBACTER SPP _____	11
Procedimiento según ISO 10272:201	
DETECCIÓN DE CRONOBACTER SPP _____	13
Procedimiento según ISO 22964:2017	
RECuento DE BACILLUS CEREUS PRESUNTIVOS _____	14
Procedimiento según ISO 7932:2004	
DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE ENTEROBACTERIAS _____	15
Procedimiento según ISO 21528:2017	
RECuento DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS _____	16
Procedimiento según ISO 7937:2004	

DETECCIÓN Y RECUENTO DE <i>ESTAFILOCOCOS COAGULASA-POSITIVO</i> _____	17
Procedimiento según ISO 6888	
DETECCIÓN DE <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i> PATÓGENAS _____	19
Procedimiento según ISO 10273:2017	
DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE <i>SHIGELLA SPP</i> _____	20
Procedimiento según ISO 21567:2004	
DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> _____	21
Procedimiento según ISO 7251:2005 / ISO 16649:2015	
RECUENTO DE COLIFORMES TOTALES _____	23
Procedimiento según ISO 4832:2006	
DETECCIÓN DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> O157 _____	24
Procedimiento según ISO 16654:2001	
DETECCIÓN DE <i>VIBRIO SPP</i> _____	25
Procedimiento según ISO 21872:2007	
DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE OTROS MICROORGANISMOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA _____	26
Procedimiento según ISO 15213:2003 / ISO 13720:2010 / ISO 6611:2004 / ISO 15214:1998	

Recuento de Microorganismos Mesófilos

Procedimiento según ISO 4833:2013

Introducción

Las bacterias son consideradas la principal causa de las enfermedades provocadas por el consumo de alimentos contaminados. Si el alimento empieza a alterarse y cambia de color, textura o consistencia, es signo de deterioro y posible contaminación. Para crecer, las bacterias necesitan:

- Nutrientes como carbono, nitrógeno, hidrógeno y fósforo (entre otros) que encuentran disponibles en los alimentos.
- Agua como elemento fundamental, ya que en ausencia de esta el crecimiento bacteriano se detiene.
- Un pH adecuado, que oscila alrededor de un valor neutro (6 – 7). A pH más bajos o altos, el crecimiento bacteriano se detiene.

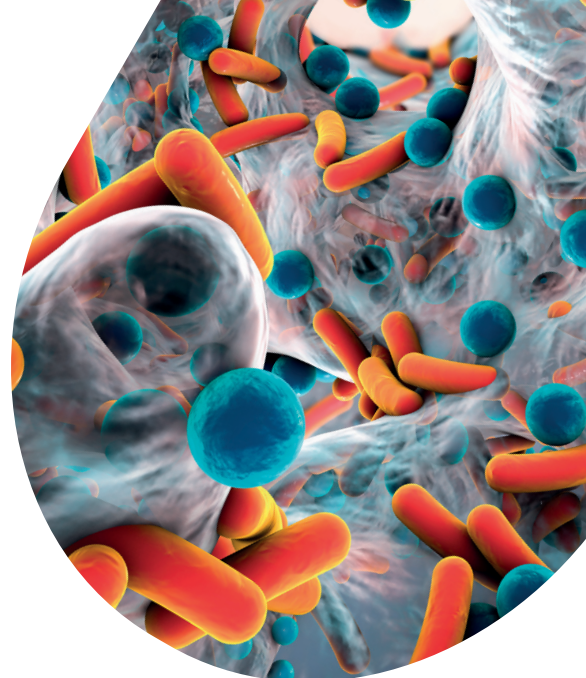
El análisis de este grupo de bacterias incluye a todos los microorganismos capaces de desarrollarse en presencia de oxígeno a una temperatura comprendida entre 20°C y 45°C. El recuento de microorganismos aerobios mesófilos, en las condiciones establecidas, estima la microflora total del producto pero sin especificar e identificar el tipo de microorganismo.

Bibliografía

AFSA, 2001. *Evaluation of microbiological methods for detection and for enumeration of microbiological contaminants in food. Final report Contract SMT4/CT96 2098. Coordination by Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. AFSSA, France, February 2001.*

ISO 4833-1:2013. *Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Part 1: Colony-count at 30 degrees C by the pour plate technique.*

ISO 4833-2:2013. *Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Part 2: Colony-count at 30 degrees C by the surface plate technique.*



Método

SUSPENSIÓN INICIAL

Véase la norma **ISO 6887-1** específica para el producto que se analice

MEDIO PARA RECuento

1 ml de muestra diluida en Agar para Métodos Estándar (PCA) (**CAT. 1056**) Incubación: 30 °C ± 1 °C // 72 ± 3 h

Para el análisis de productos lácteos el medio de cultivo debe llevar 1 g/l de leche desnatada en polvo: Agar Métodos Estándar con Leche en Polvo (CAT. 1033)

NOTA: *Para esta normativa, se distinguen dos métodos: siembra en profundidad (4833-1) y en superficie (4833-2). Ambas establecen el mismo protocolo de trabajo pero advierten que para determinadas matrices pueden obtenerse resultados distintos según la parte de la norma utilizada.

Recuento de Mohos y Levaduras

Procedimiento según ISO 21527 1:2008

Introducción

Los alimentos que presentan hongos en su superficie pueden tener toxinas en su interior, constituyendo un riesgo debido a que pueden causar reacciones alérgicas. Cuando los hongos aparecen en la superficie de un alimento, sus raíces ya han invadido buena parte del producto. Los hongos viven en la materia vegetal o animal y contienen esporas que pueden ser transportadas por el aire, el agua o los insectos

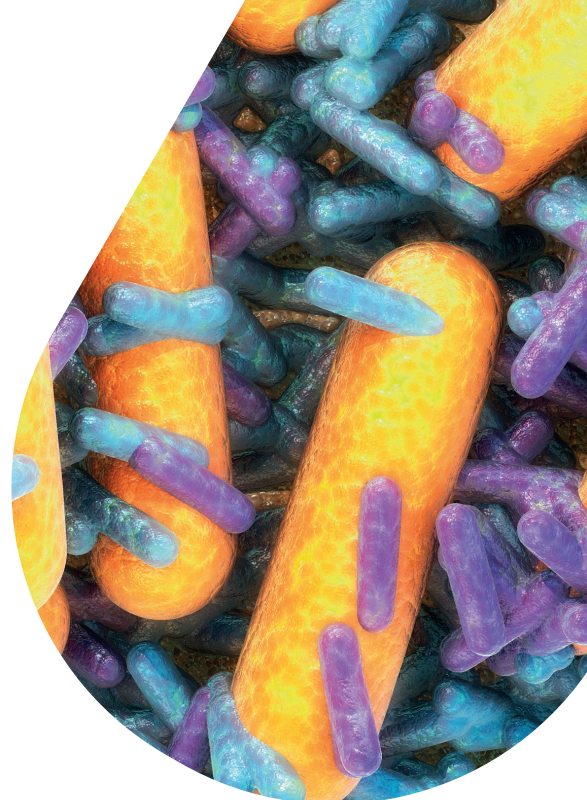
Los hongos se encuentran sobre todo en alimentos como la fruta, verdura, pan húmedo o quesos. Pueden diferenciarse distintos tipos en función de cómo se comportan. *Aspergillus* o *Penicillium* son algunos de los hongos más frecuentes encontrados. Los filamentos que forman, las hifas, producen enzimas que descomponen las moléculas más duras. En condiciones adecuadas (temperaturas cálidas y humedad), los hongos producen micotoxinas, sustancias con capacidad para provocar enfermedades y que aparecen sobre todo en cereales y frutos secos.

Bibliografía

VALERIE T., MICHAEL T.S., PHILIP B., MISLIVEC, HERBERT A.K. AND RUTH B. BAM: *Yeast, Molds and Mycotoxins*. US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.

ISO 21527-1:2008. *Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of yeast and molds. Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95*.

ISO 21527-2:2008. *Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of yeast and molds. Part 1: Colony count technique in products with water activity less than or equal 0,95*.



PRODUCTOS CON ACTIVIDAD DE AGUA > 0,95 (ISO 21527-1)

SUSPENSIÓN INICIAL

Excepto para preparaciones de muestras específicas (ISO 6887-1), se recomienda la dilución en Agua Peptonada Tamponada (CAT. 1402)

MEDIO PARA RECUENTO

0,1 ml de muestra diluida en Agar Rosa Bengala + Cloranfenicol + Dicloran (Agar DRBC) (CAT. 1160)
Incubación: 25 °C ± 1 °C // 5 días

PRODUCTOS CON ACTIVIDAD DE AGUA ≤0,95 (ISO 21527-2)

SUSPENSIÓN INICIAL

Véase la norma ISO 6887-1 específica para el producto que se analice. Excepto para preparaciones de muestras específicas, se recomienda la dilución en Agua Peptonada Tamponada (CAT. 1402)

MEDIO PARA RECUENTO

0,1 ml de muestra diluida en Agar Glicerol Dicloran (DG 18) (CAT. 1161) Incubación: 25 °C ± 1 °C // 5 – 7 días

Detección *Salmonella spp*

Procedimiento según ISO 6579:2017

Introducción

Salmonella es una familia de microorganismos muy diversa, que incluye unos 2.300 serotipos distintos. Se estima que esta familia de bacterias es la causa de millones de hospitalizaciones en el mundo (1,2 millones solo en EEUU), pero este número aumentaría hasta 30 veces si se tuviesen en cuenta aquellas infecciones que no llegan a diagnosticarse, ya que comúnmente puede causar como una proceso diarreico normal.

Este grupo de bacterias se presenta en forma de bacilo gram-negativo (ya que pertenecen al enorme grupo de las Enterobacterias), son anaerobios facultativos y móviles mediante flagelos. Son fermentadoras de glucosa pero no de lactosa y no producen ureasa.

Salmonella está presente en los intestinos de personas y animales, en carnes crudas, aves de corral, huevos y leche sin pasteurizar. La temperatura óptima de crecimiento de esta bacteria es de 30 °C a 37 °C, de ahí que sea especialmente importante adoptar medidas de prevención en los meses más calurosos del año, que es cuando crece de forma considerable el riesgo.

Bibliografía

AFSA, 2001. *Evaluation of microbiological methods for detection and for enumeration of microbiological contaminants in food. Final report Contract SMT4/CT96 2098. Coordination by Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. AFSSA, France, February 2001.*

ISO 6579-1:2017. *Microbiology of the food chain – Horizontal Method for detection and enumeration and Serotyping of Salmonella - Part 1: Detection of Salmonella spp.*

ISO 6887-1:2017. *Microbiology of the food chain – Preparation on test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.*



Método

PRE-ENRIQUECIMIENTO

25 g de muestra + 225 ml de Agua Peptonada Tamponada (CAT. 1402)
Incubación: 34 °C a 38 °C – 18 ± 2h

Para muestras ambientales de la fase primaria de producción o heces, sembrar directamente en Agar MRSV

ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO

0,1 ml + 10 ml Caldo Rappaport Soja (Vassiliadis) (CAT. 1174) o Medio Semisólido Modificado Rappaport Vassiliadis (MSRV) (CAT. 1376)
Incubación: 41,5 °C ± 1 °C – 24 ± 3h

Atención: al incubar la placa de MRSV no invertir la placa

ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO

1 ml + 10 ml Caldo Muller-Kauffmann con Verde Brillante y Novobiacina (MKTTN) (CAT. 1173)
Incubación: 37 °C ± 1 °C – 24 ± 3h

ASLAMIENTO SELECTIVO

Agar XLD (Agar Xilosa Lisina Desoxicolato) (CAT. 1274)
Incubación: 41,5 °C ± 1 °C – 24 ± 3h

ASLAMIENTO SELECTIVO

Como medio secundario elegir entre:
Agar Salmonella Shigella (Agar SS) (CAT. 1064)
Agar Entérico Hektoen (CAT. 1030)
Agar Verde Brillante Modificado (CAT. 1143)
Agar Bismuto Sulfito (Wilson Blair) (CAT. 1011)
Agar Cromogénico Salmonella (CAT. 1122)

Para lectura de resultados y selección de colonias sospechas, consultar ficha técnica de los distintos productos. A continuación, seleccionar una única sospecha para propagación en medio de cultivo no selectivo. Si sale negativo, testar 4 colonias sospechas marcadas anteriormente

ASLAMIENTO EN AGAR NO SELECTIVO

Agar Nutritivo (CAT. 1060) o Agar Nutritivo Enriquecido con Cloruro Sódico (CAT. 1355). Incubación: 34-38 °C – 24 ± 3h

CONFIRMACIÓN

Realizar test bioquímico y serológico a las colonias crecidas en el agar no selectivo.

El test bioquímico constará de:

- Agar Hierro y Triple de Azúcar (TSI) (CAT. 1172)
- Agar Urea Christensen (CAT. 2000)
- Medio para la Descarboxilación de la Lisina (CAT. 1176)
- β-galactosidasa (opcional)
- Reacción del Indol (opcional)

NOTA:

*Según Anexo D de la ISO 6579-1:2017, para la detección de subespecies entéricas (*S. typhi* y *S. paratyphi*) se debe:

- 1.- Añadir como enriquecimiento selectivo el Caldo Selenito Cistina (CAT. 1220)
- 2.- Como medio selectivo secundario ha de seleccionarse el Agar Bismuto Sulfito (Wilson Blair) (CAT. 1011)

Detección y enumeración de *Listeria spp*

Procedimiento según ISO 11290:2017

Introducción

Al género *Listeria* pertenecen bacterias gram-positivas con morfología de bacilo. Es un género que comprende únicamente 6 especies, siendo *Listeria monocytogenes* la que alcanza mayor importancia debido a que es una especie patógena presente en alimentos de consumo humano.

L. monocytogenes es la causante de la listeriosis (toxiinfección alimentaria con una mortalidad cercana al 30%). Es una bacteria gram-positiva, de muy pequeño tamaño, catalasa positiva y no esporulada. Es anaerobia facultativa, siendo capaz de crecer en un amplio rango de temperaturas (1 °C a 45 °C) y en una alta concentración de sales. Además, es un microorganismo flagelado y por tanto móvil, lo que aumenta aún más su patogenicidad.

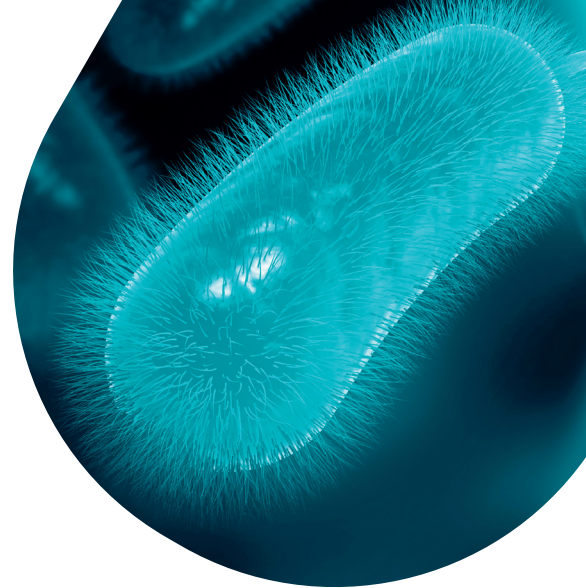
Se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y es muy común encontrarla en las plantas de procesados de alimentos, donde su capacidad de sobrevivir a tan amplio rango de temperaturas hace que sea, quizás, uno de los microorganismos más importantes a controlar en la industria.

Bibliografía

KATHARIOUS S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. J. Food Prot. 2002; 65: 1881-1829.

ISO 11290-1. *Microbiology of the food chain – Horizontal Method for detection and enumeration of Listeria monocytogenes and Listeria spp - Part 1: Detection Method.*

ISO 11290-2. *Microbiology of the food chain – Horizontal Method for detection and enumeration of Listeria monocytogenes and Listeria spp - Part 2: Enumeration Method.*



1 - MÉTODO DE DETECCIÓN (ISO 11290-1)

ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO PRIMARIO

25 g/ml de muestra + 225 ml de Base de Caldo Listeria 1/2 Fraser (CAT. 1183 + 6050)
Incubación: 30 °C ± 1 °C – 24 + 2h

Puede pasarse directamente a sembrar en el Agar Selectivo ALOA sin pasar por enriquecimiento selectivo secundario

ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO SECUNDARIO

0,1 ml de cultivo primario + 10 ml de Base de Caldo Listeria Fraser (CAT.1182 + 6050) / Incubación: 37 °C ± 1 °C – 24 ± 2h

AISLAMIENTO SELECTIVO

Agar Cromogénico para Listeria de Acuerdo a Ottaviani y Agosti (ALOA) (CAT. 1345) y Suplementos (6031 + 6040)
Incubación: 37 °C ± 1 °C – 24/48 ± 2h

AISLAMIENTO SELECTIVO

Como medio secundario elegir entre: Agar para Listeria Oxford (CAT. 1133 + 6003) Agar para Listeria Palcam (CAT. 1141 + 6004)

La lectura de colonias sospecha de *Listeria monocytogenes* en el agar ALOA: colonias azul-verdoso con halo opaco (considerar también en las que no aparezcan para *Listeria spp*). Para lectura de colonias en agar secundario, temperaturas y tiempos de incubación, consultar distintas fichas técnicas

AISLAMIENTO EN AGAR NO SELECTIVO

Para ello elegir entre: Agar Nutritivo (CAT. 1060), Agar Nutritivo Enriquecido con Cloruro Sódico (CAT. 1355), Agar Sangre N° 2 (CAT. 1328), Agar TSYEA (Tryptone Soy Yeast Extract Agar) (CAT. 1398) o Caldo TSYEB (Tripton Soja Extracto de Levadura)(CAT. 1339)
Incubación: Según especificación. Consultar ficha técnica

CONFIRMACIÓN L. MONOCYTOGENES

- Microscopía
- Actividad Hemolítica – Agar Sangre N° 2 (CAT. 1328)
- Caldo para la Utilización de Carbohidratos (CAT. 1342)
- Catalasa (opcional)
- Motilidad (opcional)
- CAMP test (opcional)

CONFIRMACIÓN LISTERIA SPP

- Microscopía
- Catalasa
- Motilidad (opcional)
- Reacción Voges-Proskauer (opcional)

2 - MÉTODO DE ENUMERACIÓN (ISO 11290-2)

SUSPENSIÓN INICIAL

X g/ml de muestra + 9 x g/ml de diluyente según ISO 6887

En el caso de que la enumeración se realice con la misma muestra que la detección, deben utilizarse los Caldo Listeria 1/2 Fraser (CAT. 1183) y Caldo Listeria Fraser (CAT. 1182) en las mismas proporciones arriba indicadas

AISLAMIENTO SELECTIVO

Agar Cromogénico para Listeria de Acuerdo a Ottaviani y Agosti (ALOA) (CAT. 1345) y Suplementos (6031 + 6040) Incubación: 37 °C ± 1 °C

La lectura de colonias sospecha de *Listeria monocytogenes* en el agar ALOA: colonias azul-verdoso con halo opaco (considerar también en las que no aparezcan para *Listeria spp*).

AISLAMIENTO EN AGAR NO SELECTIVO

Para ello elegir entre: Agar Sangre N° 2 (CAT. 1328) o Agar TSYEA (Tryptone Soy Yeast Extract Agar) (CAT. 1398) / Incubación: 37 °C ± 1 °C.

CONFIRMACIÓN L. MONOCYTOGENES

- Microscopía
- Actividad Hemolítica – Agar Sangre N° 2 (CAT. 1328)
- Caldo para la Utilización de Carbohidratos (CAT. 1342)
- Catalasa (opcional)
- Motilidad (opcional)
- CAMP test (opcional)

CONFIRMACIÓN LISTERIA SPP

- Microscopía
- Catalasa
- Motilidad (opcional)
- Reacción Voges-Proskauer (opcional)

Detección y enumeración de *Campylobacter spp*

Procedimiento según ISO 10272:2017

Introducción

Los microorganismos del género *Campylobacter* son bacilos gram-negativos, con forma de coma o espiral curvada, móviles mediante un flagelo unipolar o bipolar y microaerófilos.

Son bacterias termofílicas, teniendo su desarrollo óptimo a temperaturas entre 42-43 °C. Son además el origen más frecuente de gastroenteritis en el hombre.

La Organización Mundial de la Salud (OMS 2011) considera que, a nivel mundial, *Campylobacter* es una de las principales causas de enfermedades diarreicas transmitidas por alimentos. La mayor parte de los casos de campilobacteriosis están asociados al consumo de alimentos, principalmente carne de aves, por lo que esta bacteria representa un problema de seguridad alimentaria de primer orden.

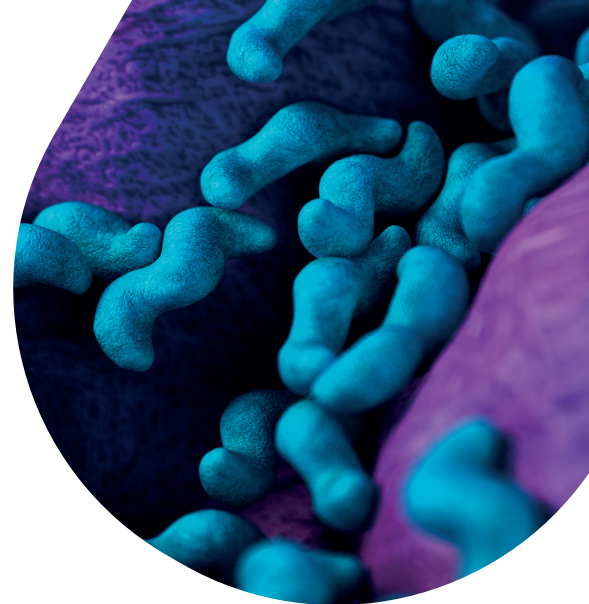
Bibliografía

AESAN (2012). *Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) con relación a las medidas de control para reducir la presencia de Campylobacter spp. en carne fresca de aves (pollo)*. Revista del Comité Científico, N° 16: 21-55.

OMS (2011) *Campylobacter*. Nota descriptiva núm. 255. Octubre de 2011.

UNE-ENISO 10272-1:2017. *Microbiology of the food chain – Horizontal Method for detection and enumeration of Campylobacter spp. Part 1: Detection Method*.

UNE-ENISO 10272-2:2017. *Microbiology of the food chain – Horizontal Method for detection and enumeration of Campylobacter spp. Part 2: Colony Count Technique*.



1 - DETECCIÓN POR ENRIQUECIMIENTO: muestras con baja carga de *Campylobacter* y bajo nivel de microflora acompañante (Ej. productos cocinados o congelados)

ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO

10 ml/g de muestra + 90 ml de Caldo Bolton para Enriquecimiento Selectivo (CAT. 1441 + CAT. 6070) / Incubación en atmósfera microaeróbica: 37 °C – 4h/6h y después 41,5 °C – 44h ± 2h

ASLAMIENTO PRESUNTIVO

Agar *Campylobacter* Exento de Sangre (CCDA) (CAT. 1129 + CAT. 6053) Incubación en atmósfera microaeróbica: 41,5 °C – 44h ± 2h

A su vez ha de sembrarse en un medio selectivo secundario y en las mismas condiciones de incubación. Uno de los medios aceptados por ISO es el Agar *Campylobacter* (Preston) (CAT. 1131 + CAT. 6019)

LECTURA DE RESULTADOS

Las colonias típicas se presentan de color grisáceo, a menudo con brillo metálico. Suelen ser planas y con aspecto húmedo, con tendencia a difundirse. Otras morfologías también pueden aparecer

CONFIRMACIÓN

A las colonias sospechas crecidas en el Agar CCDA, realizar:

- Siembra en Base de Agar Columbia (CAT. 1104) Incubación en atmósfera microaeróbica a 41,5 °C – 24/48h
- Examinar la morfología y movilidad en microscopio: bacilos curvos, flagelados y móviles
- Estudio de crecimiento aeróbico a 25 °C: crecimiento negativo en Agar Columbia (CAT. 1104) en condiciones aeróbicas durante 44± 4h
- Actividad Oxidasa (+)

2 - DETECCIÓN POR ENRIQUECIMIENTO: muestras con baja carga de *Campylobacter* y alto nivel de microflora acompañante (ej. carne o leche cruda)

ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO

10 ml/g de muestra + 90 ml de Caldo Preston para *Campylobacter* (CAT. 2166 + CAT. 6081) / Incubación en atmósfera microaeróbica: 41,5 °C – 44h ± 2h

ASLAMIENTO PRESUNTIVO

Agar *Campylobacter* Exento de Sangre (CCDA) (CAT. 1129 + CAT. 6053) Incubación en atmósfera microaeróbica: 41,5 °C – 44h

LECTURA DE RESULTADOS

Las colonias típicas se presentan de color grisáceo, a menudo con brillo metálico. Suelen ser planas y con aspecto húmedo, con tendencia a difundirse. Otras morfologías también pueden aparecer

CONFIRMACIÓN

A las colonias sospechas crecidas en el Agar CCDA, realizar:

- Siembra en Base de Agar Columbia (CAT. 1104) Incubación en atmósfera microaeróbica a 41,5 °C – 24/48h
- Examinar la morfología y movilidad en microscopio: bacilos curvos, flagelados y móviles
- Estudio de crecimiento aeróbico a 25 °C: crecimiento negativo en Agar Columbia (CAT. 1104) en condiciones aeróbicas durante 44± 4h
- Actividad Oxidasa (+)

3 - DETECCIÓN POR SIEMBRA DIRECTA: muestras con alta carga de *Campylobacter* (ej. heces, carne cruda de ave de corral)

ASLAMIENTO PRESUNTIVO

Agar *Campylobacter* Exento de Sangre (CCDA) (CAT. 1129 + CAT. 6053) Incubación en atmósfera microaeróbica: 41,5 °C – 44h ± 2h

A su vez ha de sembrarse en un medio selectivo secundario y en las mismas condiciones de incubación. Uno de los medios aceptados por la ISO es el Agar *Campylobacter* (Preston) (CAT. 1131 + CAT. 6019)

LECTURA DE RESULTADOS

Las colonias típicas se presentan de color grisáceo, a menudo con brillo metálico. Suelen ser planas y con aspecto húmedo, con tendencia a difundirse. Otras morfologías también pueden aparecer

CONFIRMACIÓN

A las colonias sospechas crecidas en el Agar CCDA, realizar:

- Siembra en Base de Agar Columbia (CAT. 1104) Incubación en atmósfera microaeróbica a 41,5 °C – 24/48h
- Examinar la morfología y movilidad en microscopio: bacilos curvos, flagelados y móviles
- Estudio de crecimiento aeróbico a 25 °C: crecimiento negativo en Agar Columbia (CAT. 1104) en condiciones aeróbicas durante 44± 4h
- Actividad Oxidasa (+)



Detección de *Cronobacter spp*

Procedimiento según ISO 22964:2017

Introducción

Las bacterias pertenecientes al género *Cronobacter* son bacilos gram-negativos, anaerobios facultativos, oxidasa negativos y catalasa positivos. Son generalmente móviles y presentan la capacidad de producir gran variedad de ácidos provenientes de multitud de carbohidratos distintos. De hecho, dicha cualidad es utilizada en la etapa de confirmación del método.

La especie más conocida de este género es *Cronobacter sakazakii*. Dicha especie está considerada en la actualidad un patógeno emergente causante de meningitis severas en lactantes. Estos procesos pueden llegar a cursar con un porcentaje de mortalidad comprendido entre el 40-80 %.

Bibliografía

Fiedemann M., *Enterobacter sakazakii* in food and beverage (other than infant formula and milk powder). Int. J. Food Microbiol. 2007; 116:1-10.

ISO 22964:2017. *Microbiology of the food chain. Horizontal method for the detection of Cronobacter spp.*

Center of Disease Control and Prevention. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powered infant formula. JAMA, 2002; 287:2204 - 2205.



Método

SUSPENSIÓN INICIAL

- 10 ml/g de muestra + 90 ml de Agua Peptonada Tamponada (CAT. 1402) / Incubación: 38 °C – 24 ± 2h

ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO

- 0,1 ml muestra pre-enriquecida + 10 ml de Caldo Selectivo Cronobacter (CSB) (CAT. 2143) / Incubación: 41,5 °C – 24 ± 2h

AISLAMIENTO SELECTIVO PRESUNTIVO

- Agar Cromogénico para Aislamiento de Cronobacter (CCI) (CAT. 1446) / Incubación: 41,5 °C – 24 ± 2h

LECTURA DE RESULTADOS

- Las colonias sospechas de *Cronobacter sakazakii* son de pequeño tamaño (1 – 3 mm) y se presentan en un color azul o azul verdoso

Colonias blancas, blancas con el centro verde, grises o negras, así como colonias pigmentadas amarillas o rojas no corresponden a especies del género *Cronobacter*

AISLAMIENTO EN AGAR NO SELECTIVO

- Siembra en estrías en Agar Soja y Trypticaseína (TSA) (CAT. 1068) Incubación: 34-38 °C - 21 ± 3h

CONFIRMACIÓN BIOQUÍMICA

- Prueba de la Oxidasa (-)
- Ensayo enzimático a - glucosidasa
- Caldo Lisina Descarboxilasa(-) (CAT. 1208)
- Medio para la Descarboxilación de L-Ornitina (CAT. 2149)
- Medio de fermentación de carbohidratos
- Rojo Metilo (opcional)
- Voges-Proskauer (opcional)

Recuento de *Bacillus Cereus* presuntivos

Procedimiento según ISO 7932:2004

Introducción

Bacillus cereus es un bacilo gram-positivo, anaeróbico facultativo, formador de esporas no deformantes. Son además catalasa positivos, fermentadores de glucosa y sacarosa, así como de salicina y glicerol. Además, producen lecitinasas que luego pueden utilizarse como indicador para establecer su presencia.

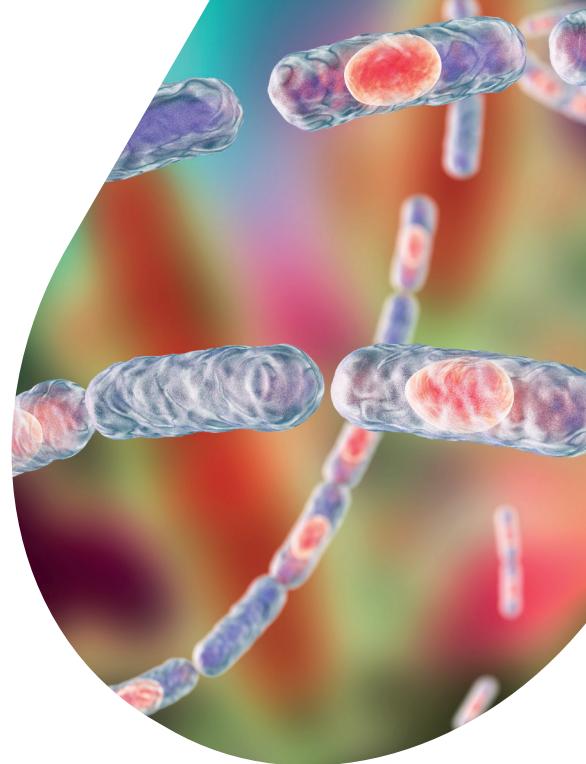
Este microorganismo se encuentra ampliamente distribuido y puede encontrarse en una gran variedad de alimentos, principalmente en productos deshidratados como galletas, caldos, cereales y té. Presenta un amplio rango de temperaturas para su crecimiento, lo que hace que sea una bacteria muy resistente al procesamiento de alimentos. Si a esto le añadimos su capacidad de esporular, hace que sea una bacteria de crítico análisis para cualquier empresa de la industria alimentaria.

Bibliografía

MOSSELI, D.A.A. KOOPMAN, M.J, JONGERIUS, E. *Enumeration of Bacillus cereus in Foods*. 1967. *Appli. Microbiol.*, 1 5; 650-653.

ISO 7932:2014. *Microbiology of the food chain – Horizontal method for enumeration of presumptive Bacillus cereus. Colony Count technique at 30 °C.*

ISO 6887-1:2017. *Microbiology of the food chain – Preparation on test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.*



Método

SUSPENSIÓN INICIAL

Véase la norma ISO 6887-1 específica para el producto que se analice.

AISLAMIENTO SELECTIVO

Agar Selectivo para *Bacillus Cereus* (MYP) (CAT. 1343) y Suplementos (CAT. 6021 + 5152) / Incubación: 30 °C // 18 – 48h

Las colonias sospecha de *Bacillus cereus* presuntivo se presentan de color rosa rodeadas por la presencia de un precipitado

Si las placas están sobrecrecidas y no se pueden seleccionar colonias bien aisladas, realizar una purificación en Agar Selectivo para *Bacillus Cereus* (MYP) (CAT. 1343) de 5 colonias presuntivas

CONFIRMACIÓN

Actividad Hemolítica – Base de Agar Sangre N° 2 (CAT. 1328) / Incubación: 30 °C // 24 ± 2 h

Detección y enumeración de *Enterobacterias*

Procedimiento según ISO 21528:2017

Introducción

La familia de las Enterobacterias engloba alrededor de 30 géneros formados por unas 100 especies bacterianas distintas. Este grupo se caracteriza por ser bacterias gram-negativas, con morfología mayoritariamente de bacilos aunque también pueden encontrarse cocos y formas pleomórficas. Los miembros de este grupo forman parte de la microbiota del intestino aunque también pueden aislarse de otros órganos humanos, de plantas y de animales.

El recuento total de enterobacterias se utiliza como Indicador tanto de contaminación fecal como de buenas prácticas de fabricación. Es por ello, un elemento que nos indica la calidad de los productos alimentarios procesados. Recuentos elevados de dicho índice señalarían un proceso de fabricación deficiente o una posible contaminación posterior del producto final, implicando un riesgo higiénico-sanitario para el consumidor.

Bibliografía

MOSSELL, D.A.A. *Media for Enterobacteriaceae*. 1985. Int. J. Food. Microbiol. 2:27-35

ISO 21528-1:2017. *Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae. Part 1: Detection of Enterobacteriaceae*.

ISO 21528-2:2017. *Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae. Part 2: Colony-count technique*.



Método

SUSPENSIÓN INICIAL

- 10 ml/g de muestra + 90 ml de Agua Peptonada Tamponada (CAT. 1402) / Incubación: 38 °C – 18 ± 2h

AISLAMIENTO SELECTIVO PRESUNTIVO

- Agar Bilis y Rojo Violeta con Glucosa (VRBG) (CAT. 1092) / Incubación: 37 °C – 24 ± 2h

LECTURA DE RESULTADO

- Las colonias sospechas de *Enterobacteriaceae* presentan un color rosa rojizo o púrpura, pudiendo presentar o no halos de precipitación

Si se presenta más de una morfología de colonia, seleccionar una de cada tipo para aislamiento no selectivo en la siguiente etapa. En el caso de que no aparezcan colonias esperadas, seleccionar las de color blanquecino para confirmación

AISLAMIENTO EN AGAR NO SELECTIVO

- Siembra en estrías en Agar Nutritivo Enriquecido con Cloruro Sódico (CAT. 1355) Incubación: 37 °C – 24 ± 2h

CONFIRMACIÓN

- Prueba de la Oxidasa (-)
- Fermentación de la glucosa: tubos incluyendo 1 cm de Medio Glucosa OF (CAT. 2150) y creando una atmósfera anaeróbica con aceite mineral estéril (+)

Recuento de *Clostridium Perfringens*

Procedimiento según ISO 7937:2004

Introducción

Clostridium perfringens es un bacilo gram-positivo anaeróbico, aunque aerotolerante en determinadas ocasiones. Es también uno de los patógenos bacterianos más ampliamente distribuidos en el ambiente gracias a su capacidad de formar esporas, y se encuentra comúnmente formando parte de la microflora del intestino de humanos y animales.

Esta bacteria puede ser detectada en una amplia gama de alimentos crudos, como resultado de contaminación de la tierra o de materia fecal. Puede encontrarse en carnes crudas, pescados, sopas y salsas deshidratadas, leche, gelatina, pasta, harina, soja, vegetales crudos y especias.

Las toxiinfecciones causadas por *C. perfringens* (debido a la liberación de endotoxinas) se asocian comúnmente a platos cárnicos cocinados, aves, alimentos secos o pre-cocidos, y, en menor frecuencia, a los vegetales. En aquellas cepas termorresistentes, el calor de la cocción proporciona el choque térmico necesario para la activación y germinación de las esporas. Además, dicha cocción reduce los niveles de oxígeno proporcionando un ambiente óptimo para el crecimiento de las células vegetativas.

Bibliografía

ISO 7937:2004. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of Clostridium perfringens – Colony-count technique.*



Método

SUSPENSIÓN INICIAL

Véase la norma **ISO 6887** o **8261** específica para el producto que se analice

AISLAMIENTO SELECTIVO

Agar T.S.C. (Triptosa Sulfito Cicloserina) (**CAT. 1029** + **CAT. 6020**) Incubación en anaerobiosis: 37 °C – 20 ± 2h

LECTURA DE RESULTADO

Se seleccionan para recuento con un número inferior a 150 colonias

CONFIRMACIÓN

Se escogen una de las dos técnicas descritas a continuación:

MÉTODO A

No requiere purificación de la colonia

- Medio de Tioglicolato (**CAT. 1533**). Incubación en anaerobiosis 37 °C – 18/24h
- Caldo Lactosa Sulfito (**CAT. 1009**) Incubación en anaerobiosis a 46 °C – 18/24h

MÉTODO B

Requiere colonias características bien aisladas, en caso contrario, se siembran 5 colonias características en Medio de Tioglicolato (**CAT. 1533**)

- Medio Nitrito Movilidad (**CAT. 1565**) Incubación en anaerobiosis 37 °C – 24h
- Medio Lactosa Gelatina (**CAT. 1526**) Incubación en anaerobiosis a 46 °C – 18/24h

LECTURA DE RESULTADOS

Se consideran positivas colonias características con producción de gas y la presencia de precipitado negro

LECTURA DE RESULTADOS

Se consideran positivas colonias no móviles, reductoras intensas de nitrito, fermentadoras de lactosa y licuadoras de la gelatina

Detección y recuento de *Estafilococos Coagulasa-Positivo*

Procedimiento según ISO 6888:2003

Introducción

Los estafilococos son cocos gram-positivos, catalasa positivos, inmóviles y que crecen en condiciones de aerobiosis. El género *Staphylococcus* posee alrededor de 30 especies, de las cuales destacan *S. aureus*, *S. saprophyticus* y *S. epidermidis*.

El más patógeno de todos ellos es *Staphylococcus aureus*, que típicamente causa infecciones de la piel, aunque también puede causar neumonías, endocarditis y osteomielitis. En general se los asocia con la formación de abscesos. Algunas cepas elaboran toxinas que causan gastroenteritis, síndrome de la piel escaldada y síndrome de shock tóxico.

Otra característica que aumenta la patogenicidad de los estafilococos es su capacidad de coagular la sangre gracias a la producción de coagulasas. *S. aureus* coagulasa positivo se encuentra entre los patógenos más ubicuos y peligrosos para el ser humano, tanto por su virulencia como por su capacidad para desarrollar resistencia a los antibióticos.

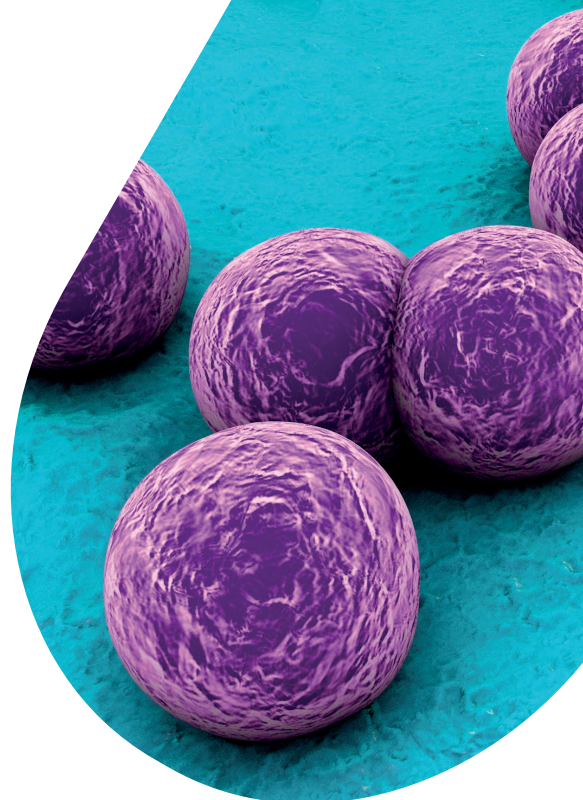
Esta ubicuidad junto con su virulencia, hace imprescindible su detección en alimentos con el objetivo de garantizar la seguridad del consumidor.

Bibliografía

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

ISO 6888-2:1999/2003. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species). Part 2: Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium.*

ISO 6888-3:2003. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species). Part 3: Detection and MPN technique for low numbers.*



ENUMERACIÓN: PROCEDIMIENTO SEGÚN ISO 6888-1

SUSPENSIÓN INICIAL

Véase la norma **ISO 6887-1** específica para el producto que se analice

AISLAMIENTO SELECTIVO PRESUNTIVO

Agar Baird Parker (**CAT. 1100 + 5129**) / Incubación: 35 o 37 °C – 24 ± 2h. Reincubación tras marcaje de las colonias características: 35 o 37 °C – 24 ± 2h

LECTURA DE RESULTADOS

Las colonias características son negras o grises, brillantes y convexas, rodeadas de una zona clara con posible presencia de anillo opalescente

CONFIRMACIÓN

- Siembra en Caldo Infusión Cerebro Corazón (**CAT. 1331**). Incubación 35 o 37 °C – 24 ± 2h
- Ensayo de la coagulasa (+)

ENUMERACIÓN: PROCEDIMIENTO SEGÚN ISO 6888-2**SUSPENSIÓN INICIAL**

Véase la norma **ISO 6887-1** específica para el producto que se analice

AISLAMIENTO SELECTIVO

Agar Baird Parker (**CAT. 1319 + CAT. 6024**)
Incubación: 35 o 37 °C – 24 ± 2h
Reincubación tras marcaje de las colonias características: 35 o 37 °C – 24 ± 2h

LECTURA DE RESULTADOS

Las colonias características son negras, grises o blancas, rodeadas de un halo de precipitación indicando actividad coagulasa

CONFIRMACIÓN

No requiere, ya que la actividad coagulasa se detecta con el RPF

DETECCIÓN Y NMP: PROCEDIMIENTO SEGÚN ISO 6888-3**SUSPENSIÓN INICIAL**

Véase la norma **ISO 6887** o **8261** específica para el producto que se analice

ENRIQUECIMIENTO

0,1 ml suspensión inicial +
9 ml Caldo Giolitti-Cantoni
(**CAT. 1287**)
Incubación: 37 °C – 24 ± 2h

ENRIQUECIMIENTO

10 ml suspensión inicial + 10
Caldo Giolitti-Cantoni Doble
concentración (**CAT. 1287**)
Incubación: 37 °C – 24 ± 2h

AISLAMIENTO SELECTIVO

Agar Baird Parker (**CAT. 1100 + CAT. 5129**) o
Agar Baird Parker + RPF (**CAT. 1319 + CAT. 6024**)
Incubación: 37 °C – 24 ± 2h y 48 ± 2h

CONFIRMACIÓN

Solo si se usa el método Baird-Parker para recuento:

- Siembra en Caldo Infusión Cerebro Corazón (**CAT. 1331**). Incubación 35 o 37 °C – 24 ± 2h
- Ensayo de la coagulasa (+)



Detección de *Yersinia enterocolitica* patógenas

Procedimiento según ISO 10273:2017

Introducción

Yersinia enterocolitica es una bacteria gram-negativa, oxidasa negativa, no esporulada y anaerobia facultativa. Es capaz de crecer en un amplio rango de temperaturas (desde -1 °C hasta los 40 °C) y presenta una cápsula con factores antifagocitarios, lo que aumenta su patogenicidad.

Su capacidad de multiplicarse en alimentos a bajas temperaturas, así como en los productos envasados al vacío, son los principales motivos que más preocupación generan dentro de la industria alimentaria. La mayor parte de los brotes que se detectan están asociados con el consumo de carne, de leche y de derivados lácteos no pasteurizados.

A pesar de que son diversos los alimentos procedentes de animales que pueden ser portadores de *Y. enterocolitica*, es el ganado porcino el que se infecta más que cualquier otra especie animal.

Bibliografía

TENNANT S.H, GRANT T.H and ROBINS-BROWNE R.M. *Pathogenicity of Yersinia enterocolitica biotype 1A*. FEMS Immun. Medical Microbiol. 2003, 38 pp 127-137.

BOTTONE E.J, *Yersinia enterocolitica. Overview and epidemiologic correlates*. Microbes Infec. 1999, 1 (4) pp. 323-333.

ISO 10273:2017. *Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection of pathogenic Yersinia enterocolitica*.



Método

ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO PRIMARIO

X ml/g de muestra + 9X ml de Caldo Peptona Sorbitol y Sales Biliares (PSB) (CAT. 1298) / Incubación: 25 °C ± 1 °C – 44 ± 4h

ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO SECUNDARIO

10 ml de suspensión inicial en Caldo Modificado Minerales Glutamato (MMGB) (CAT. 1365 + CAT. 6051) Incubación: 25 °C ± 1 °C – 44 ± 4h

Tratamiento Alcalino (4,5 ml KOH) durante 20 ± 5 S

AISLAMIENTO SELECTIVO

Agar Selectivo para *Yersinia* (CIN) (CAT. 1126 + CAT. 6033) Incubación: 30 °C ± 1 °C – 24 ± 2h

LECTURA DE RESULTADOS

Las colonias características son de tamaño pequeño y circulares. Presentan una zona central con el borde bien definido de color rojo oscuro. A su alrededor se observa una zona translúcida o transparente

DETERMINACIÓN ESPECIES PATOGENICAS

- Prueba de la ureasa (+): (CAT. 2000)
- Agar Bilis Esculina(-): (CAT.1031)
- Plásmido pYV (+)
- Detección de la pirazinamidasa (-)

CONFIRMACIÓN BIOQUÍMICA

- Caldo Lisina Descarboxilasa(-): (CAT. 1208)
- Deshidrolasa de arginina (-)
- Agar de Fenilalanina: (CAT. 1040)
- Fermentación de carbohidratos:
 - Sacarosa (+)
 - Sorbitol (+)
 - Ramnosa (-)
 - Melibiosa (-)
- Agar Citrato de Simmons(-): (CAT. 1014)

Detección y enumeración de *Shigella* spp

Procedimiento según ISO 21567:2004

Introducción

El género *Shigella* está formado por bacilos gram-negativos inmóviles, anaerobios facultativos no esporulados, pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. Presentan actividad bioquímica reducida con actividad citocromo-oxidasa negativa y fermentación de glucosa sin producción de gas.

Es una bacteria altamente enteroinvasiva; su hábitat es el colon y el principal reservorio es el humano, aunque se ha aislado también en otros primates superiores. Las especies de *Shigella* son muy sensibles a cambios de temperatura y a condiciones ambientales desfavorables. Sin embargo, son tolerantes a pH bajos, por lo que unas pocas bacterias pueden soportar la acidez del estómago y luego colonizar el tracto digestivo. Esta facultad, sumada a que son infectivas a bajas dosis, contribuye a su patogenicidad.

La contaminación de los alimentos con *Shigella* puede provenir del contacto directo o indirecto con materia fecal de personas infectadas, a través de aguas contaminadas, plagas (moscas), o por falta de higiene y buenas prácticas del manipulador durante su preparación.

Bibliografía

PASCUAL ANDERSON, M^o R. (1992) *Microbiología Alimentaria*. Díaz de Santos, S.A. Madrid.

ATLAS, R.M., L.C. PARK (1993) *Handbook of Microbiological Media for the examination of Food*. CRC Press Inc. Boca Ratón.

ISO 21567:2004. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Shigella spp.*



Método

ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO

X ml/g de muestra + 9X ml de Caldo Shigella (CAT. 2078). Incubación en anaerobiosis: $41,5 \pm 1$ °C – 16/20h

1 AISLAMIENTO SELECTIVO (baja selectividad)

Agar Macconkey (CAT. 1052)
Incubación: 37 ± 1 °C – 20/24h

2 AISLAMIENTO SELECTIVO (media selectividad)

Agar XLD (Agar Xilosa Lisina Desoxicolato) (CAT. 1274)
/ Incubación: 37 ± 1 °C – 20/24h

3 AISLAMIENTO SELECTIVO (alta selectividad)

Agar Entérico Hektoen (CAT. 1030)
Incubación: 37 ± 1 °C – 20/24h

LECTURA DE RESULTADOS

Para la identificación de colonias características de *Shigella* consultar la ficha técnica de cada medio de cultivo

PURIFICACIÓN DE LAS COLONIAS SOSPECHA

Siembra en estrías en Agar Nutritivo (CAT. 1060)
Incubación: 37 ± 1 °C – 20/24h

CONFIRMACIÓN BIOQUÍMICA

- Agar Hierro y Triple de Azúcar (TSI) (Consultar lectura): (CAT. 1172)
- Agar Nutritivo Semisólido (-): (CAT. 2046)
- Agar Urea (-): (CAT. 2000)
- Medio para la Descarboxilación de la Lisina: (CAT. 1176)
- Descarboxilación de la L-ornitina (+/- según spp)
- Caldo de Cultivo Triptófano (+/- según spp): (CAT. 1237)
- Detección β -galactosidasa (+/- según spp)
- Fermentación de azúcares (según spp)
- Agar Diferencial Acetato (complementario) – crecimiento muy bajo: (CAT. 1192)

CONFIRMACIÓN SEROLÓGICA

- Diferenciación antigénica
- Pruebas de aglutinación

Detección y enumeración de *Escherichia Coli*

Introducción

Se trata de un microorganismo perteneciente a la familia de las Enterobacteriaceae. Es un bacilo gram-negativo, móvil, no esporulado. Además es lactosa positivo y oxidasa negativo.

Escherichia coli se puede distinguir de los demás coliformes por su capacidad para producir indol a partir de triptófano o por la producción de la enzima β -glucuronidasa. Estas características son aprovechadas para el aislamiento selectivo y la confirmación en distintos procesos de análisis como veremos a continuación.

Además es una bacteria ubicua en el intestino de los seres humanos y animales de sangre caliente. Debido a esta alta presencia en el tracto intestinal y heces, es un microorganismo indicador de malas prácticas higiénicas o contaminación fecal durante la manipulación de alimentos.

Bibliografía

ISO 7251:2005. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive Escherichia coli. Most probable number technique.*

ISO 16649-1:2001. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive Escherichia coli. Part 1: Colony-count technique at 44 degrees C using membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta D-glucuronide.*

ISO 16649-2:2001. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive Escherichia coli. Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta D-glucuronide.*

ISO 16649-3:2001. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive Escherichia coli. Part 3: Detection and most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta D-glucuronide.*



1 - PROCEDIMIENTO SEGÚN ISO 7251:2005 Detección y enumeración mediante número más probable

SUSPENSIÓN INICIAL

Véase la norma **ISO 6887** o **8261** específica para el producto que se analice

ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO

1 ml de suspensión inicial + 9 ml de Caldo Lauril Sulfato (Caldo Lauril Triptosa - LTB) (**CAT. 1310**) y 10 ml suspensión inicial + 90 ml de Caldo Lauril Sulfato (Caldo Lauril Triptosa - LTB) doble concentración (**CAT. 1310**) Incubación: 37 °C – 24 ± 2h

AISLAMIENTO SELECTIVO

Medio EC ISO (**CAT. 1522**)
Incubación: 44 °C – 24/48 ± 2h

PRODUCCIÓN DE INDOL

Inocular tubos de Agua Peptonada (Agua Triptona) (**CAT. 1403**) después de la incubación del medio selectivo
Incubación: 44 °C – 48 ± 2h

LECTURA DE RESULTADOS

Crecimiento revelado por turbidez y presencia de gas en medio EC y color rojo en la producción de indol revelan la presencia de *E. coli*

NOTA 1: Para la enumeración bajo el método del NMP (Número Más Probable), utilizar 3 tubos por cada dilución. En algunos casos, según la matriz, pueden requerirse 5 tubos (consultar normativa).

2 - PROCEDIMIENTO SEGÚN ISO 16649-1:2001 Recuento de colonias a 44 °C mediante el uso de membranas

SUSPENSIÓN INICIAL

Véase la norma **ISO 6887-1** o norma específica para el producto que se analice

ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO

Sobre una membrana en placas de Agar MMG añadir 1 ml de la suspensión inicial. Secar 15 min a t° ambiente / Incubación: 37 °C – 4 ± 1h

AISLAMIENTO SELECTIVO

Transferir membrana a Agar TBX Cromogénico (Tryptona Bilis X-Glucurónido) (**CAT. 1151**)
Incubación: 44 °C – 18/24 h

3 - PROCEDIMIENTO SEGÚN ISO 16649-2:2001 Recuento de colonias a 44 °C

SUSPENSIÓN INICIAL

Véase la norma **ISO 6887-1** o norma específica para el producto que se analice

AISLAMIENTO SELECTIVO

Agar TBX Cromogénico (Tryptona Bilis X-Glucurónido) (**CAT. 1151**) / Incubación: 44 °C – 18/24 h

NOTA 2: El técnico debe decidir entre la parte 16649-1 de la normativa o la 16649-2, teniendo en cuenta que el primer método está desarrollado para cuándo en la muestra existan células con un alto índice de estrés.

4 - PROCEDIMIENTO SEGÚN ISO 16649-3:2015 Detección y recuento mediante técnica del NMP

SUSPENSIÓN INICIAL

Véase la norma **ISO 6887-1** o norma específica para el producto que se analice

ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO

Añadir una proporción de muestra/suspensión inicial en Caldo Modificado Minerales Glutamato (MMGB) (**CAT. 1365**) a concentración sencilla (1:9) y doble (1:1).
Incubación: 37 ± 1 °C – 24 ± 2h

AISLAMIENTO SELECTIVO

Sembrar en Agar TBX Cromogénico (Tryptona Bilis X-Glucurónido) (**CAT. 1151**)
Incubación: 44 °C – 22 ± 2h

NOTA 3: Para la enumeración bajo el método del NMP (Número Más Probable), utilizar 3 tubos por cada dilución, que luego se utilizarán para el NMP. En algunos casos, según la matriz, pueden requerirse 5 tubos (consultar normativa).



Recuento de Coliformes totales

Procedimiento según ISO 4832:2006

Introducción

Los coliformes totales son las Enterobacterias lactosa-positivas y constituyen un grupo de bacterias que se definen más por las pruebas usadas para su aislamiento que por criterios taxonómicos. Pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y se caracterizan por su capacidad para fermentar la lactosa con producción de ácido y gas, más o menos rápidamente, en un periodo de 48 horas y con una temperatura de incubación comprendida entre 30-37 °C.

Son bacilos gram-negativos, aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados. Del grupo "coliforme" forman parte varios géneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, etc. Se encuentran en el intestino del hombre y de los animales, pero también en otros ambientes: como agua, suelo, plantas, cáscara de huevo, etc.

Dado que es difícil distinguir entre coliformes existentes y nuevas contaminaciones, se admite que todas las apariciones de coliformes son nuevas contaminaciones mientras no se demuestre lo contrario.

Bibliografía

COWELL and MORISETTI. J. Sci. Food Agric. 20, 1969, pp. 573

ISO 4832:2006. *Microbiology of food and animal feeding – Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms – Most probable number technique*

ISO 4832:2006. *Microbiology of food and animal feeding – Horizontal method for the enumeration of coliforms – Colony-count technique.*



Método

SUSPENSIÓN INICIAL

Véase la norma **ISO 6887** o **8261** específica para el producto que se analice

AISLAMIENTO SELECTIVO

1 ml de suspensión inicial en Agar Bilis Rojo Violeta con Lactosa (VRBL) (**CAT. 1093**)
Incubación: 30/37 °C – 24 ± 2h

LECTURA DE RESULTADO

Seleccionar placas con menos de 150 UFC para enumeración. Las colonias características son de color morado, en ocasiones rodeadas de un halo rojizo de precipitación

CONFIRMACIÓN

Para colonias no típicas, inocular en Caldo Bilis Verde Brillante 2% (**CAT. 1228**)
Incubación: 30/37 °C – 24 ± 2h

Detección de *Escherichia Coli* O157

Procedimiento según ISO 16654:2001

Introducción

Escherichia coli de serotipo O157 es una bacteria gram-negativa con forma de bastón. La "O" en el nombre se refiere al antígeno presente en la pared celular (antígeno somático) que presentan estas bacterias. Es una cepa enterohemorrágica y causa intoxicaciones alimentarias debido a la producción de una enterotoxina citotóxica llamada verotoxina.

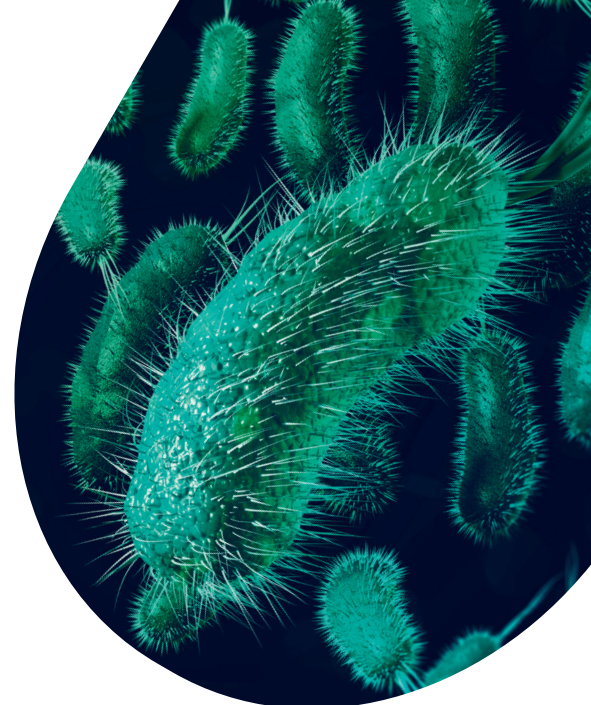
La mayor incidencia de la enfermedad ha estado asociada con el consumo de carne de vacuno picada contaminada e insuficientemente cocinada. El contacto de una persona a otra en las familias y las guarderías también es una vía importante de transmisión. La infección también puede ocurrir después de beber leche cruda y después de nadar o beber agua contaminada por contacto con excrementos animales, aguas fecales o de alcantarillado.

Bibliografía

ZADIK P.M, CHAPMAN P.A and SIDONS C.A. *J. Med. Microbiol.*, 39, 1993, pp. 155-158

DOYLE M.P. and SCHOENI J.L. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 1987, pp 2394-2396

ISO 16654:2001. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Escherichia coli O157*



Método

ENRIQUECIMIENTO

X g/ml de muestra + 9X ml de Caldo Soja Trypticaseína Modificado con Novobiocina (mTSB) (CAT. 1292). Homogenización e Incubación 6 h y a continuación 41,5 °C – 12/18 h

SEPARACIÓN INMUNOMAGNÉTICA (IMS)

Durante 6 horas y posteriormente, tras 12/18 h de incubación

AISLAMIENTO SELECTIVO

50 µl de partículas magnéticas resuspendidas en Agar Macconkey con Sorbitol (CT-SMAC) (CAT. 1099 + CAT. 6064) Incubación: 37 °C – 18/24 h

AISLAMIENTO SELECTIVO

50 µl de partículas magnéticas resuspendidas en Agar Cromogénico *E. coli* O157:H7 (CAT. 1588 + CAT. 6064) Incubación: 37 °C – 18/24 h

PURIFICACIÓN COLONIAS

Siembra en Agar Nutritivo (CAT. 1060) Incubación: 37 °C – 18/24 h

CONFIRMACIÓN BIOQUÍMICA

Formación de Indol: Caldo de Cultivo Tryptófano (CAT. 1237) + Reactivo de Kovac (CAT. 5205)

IDENTIFICACIÓN SEROLÓGICA

Solo para aquellas colonias indol-positiva

Detección de *Vibrio spp*

Procedimiento según ISO 21872:2007

Introducción

Las bacterias del género *Vibrio* son bacilos gram-negativos, con células en forma de coma. *Vibrio* es oxidasa positiva, anaeróbica facultativa, y no forma esporas. Todas las especies del género son móviles, generalmente con un flagelo polar único.

Varias de las especies de *Vibrio* son patógenas, provocando enfermedades del tracto digestivo, en especial *V. cholerae*, el agente que provoca el cólera, *V. parahaemolyticus* causante de diarrea inflamatoria autolimitada y *V. vulnificus*, que se transmite a través de la ingesta de marisco.

La infección por vibrio se origina en la mayoría de los casos a través del consumo de marisco crudo o mal cocido. Son bacterias que crecen de manera natural en ambientes marinos, ya sea en agua salada o en estuarios, donde hay una mezcla de agua marina y agua dulce. Esta presencia acuática hace que los alimentos más relacionados con las especies del género *Vibrio* sean los productos de la pesca.

Bibliografía

ISO 21872-1. *Microbiology of the food chain – Horizontal method for the Vibrio spp. – Part 1: Detection of potentially enteropathogenic Vibrio parahaemolyticus, Vibrio cholerae and Vibrio vulnificus.*



Método

ENRIQUECIMIENTO PRIMARIO

25 g/ml de muestra + 225 ml de Agua Peptonada Alcalina (CAT. 2155).
Incubación (producto fresco): 41,5 °C ± 1 – 6 ± 1 h
Incubación (otros): 37 °C ± 1 – 6 ± 1 h

ENRIQUECIMIENTO SECUNDARIO

1 ml de muestra + 10 ml de Agua Peptonada Alcalina (CAT. 2155) / Incubación (*V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*) 41,5 °C ± 1 – 6 ± 1 h.
Incubación (*V. vulnificus*) 37°C ± 1 – 6 ± 1 h

ASLAMIENTO SELECTIVO

1 µl del cultivo incubado sobre Agar TCBS (CAT. 1074).
Incubación: 37 °C ± 1 – 24 h ± 3 h

La normativa marca también un segundo medio selectivo a elección por parte del laboratorio

CONFIRMACIÓN BIOQUÍMICA

- L-lysina descarboxilasa en medio salino
- Arginina Dirolasa en medio salino
- Detección de β-galactosidasa
- Detección de indol
- Halotolerancia

Para lectura de resultados, consultar normativa

Detección y enumeración de otros microorganismos en la industria alimentaria

RECuento DE BACTERIAS SULFITO REDUCTORAS EN CONDICIONES ANAERÓBICAS (ISO 15213:2003)

SUSPENSIÓN INICIAL

Véase la norma **ISO 6887** o **8261** específica para el producto que se analice (proporción 1:9)

ASLAMIENTO SELECTIVO

1 ml de la dilución inicial sobre Agar Sulfito de Hierro (**CAT. 1559**) / Incubación para bacterias termófilas: 50 °C ± 1 – 24/48 h / Incubación para bacterias mesófilas: 37 °C ± 1 – 24/48 h

CONFIRMACIÓN BIOQUÍMICA

- Test de respiración
- Test de esporulación

RECuento DE BACTERIAS LÁCTICAS (ISO 15214:1998)

SUSPENSIÓN INICIAL

Véase la norma **ISO 6887-1** específica para el producto que se analice

ASLAMIENTO SELECTIVO

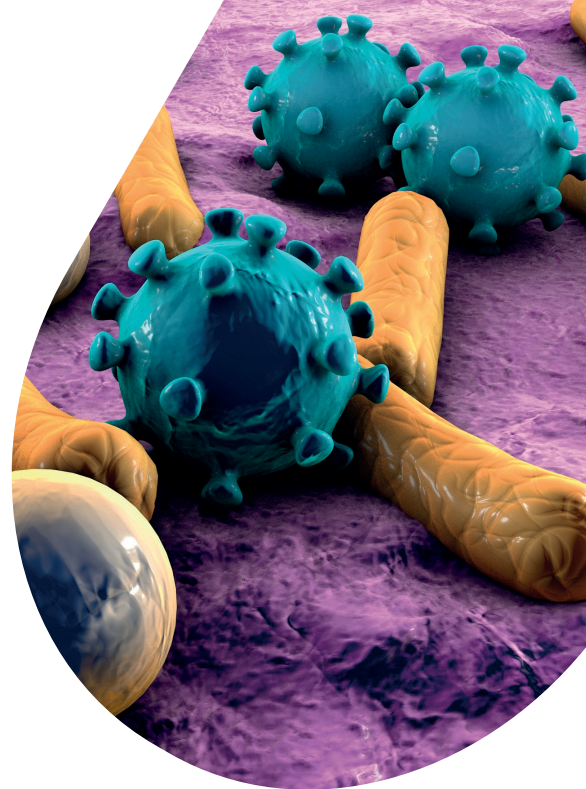
1 ml de la dilución inicial sobre placas de Agar MRS de Bajo pH (**CAT. 1433**) / Incubación: 30 °C – 72 h ± 3 h

Bibliografía

ISO 15213:2003. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions.*

ISO 13720:2010. *Meat and meat products. Enumeration of presumptive Pseudomonas spp.*

ISO 6611:2004//IDF 94. *Milk and milk products – Enumeration of colony-forming units of yeast and/or molds – Colony-count technique at 25 °C.*



RECuento DE MOHOS Y LEVADURAS EN PRODUCTOS LÁCTEOS (ISO 6611:2004)

SUSPENSIÓN INICIAL

Véase la norma **ISO 8261** específica para el producto que se analice

ASLAMIENTO SELECTIVO

1 ml de la dilución inicial sobre placas de Medio OGA (Agar Glucosa Oxitetraciclina) (**CAT. 1527 + CAT. 6018**) / Incubación: 25 °C ± 1 – 5 días

La normativa también ofrece el medio Agar Cloranfenicol (Agar YGC)(**CAT. 1301**) como medio de aislamiento selectivo

PSEUDOMONAS SPP PRESUNTAS EN CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS (ISO 13720:2010)

SUSPENSIÓN INICIAL

Véase la norma **ISO 6887** o **8261** específica para el producto que se analice

ASLAMIENTO SELECTIVO

0,1 ml de la dilución inicial sobre placas de Agar para Pseudomonas CFC (**CAT. 1356 + CAT. 6036**) / Incubación: 25 °C ± 1 – 44 h ± 4 h

CONFIRMACIÓN BIOQUÍMICA

- Prueba de la oxidasa (+)



Condalab

Inspired by knowledge

export@condalab.com | www.condalab.com