

PESCADO Y PRODUCTOS PESQUEROS
Detección y recuento de Vibrio parahaemolyticus

COGUANOR NGO
35 015 h6

1. OBJETO

La presente norma tiene por objeto establecer el método para la detección y recuento de Vibrio parahaemolyticus en pescado y productos pesqueros.

2. NORMAS COGUANOR A CONSULTAR

COGUANOR NGO 4 010 Sistema Internacional de Unidades (SI).
1a. Revisión

3. TERMINOLOGIA

3.1 Vibrio parahaemolyticus. Microorganismos marinos, Gram-negativos, poli-morfos ya sea como bastones rectos o bastones curvos, con flagelo polar, y que presentan las características que se indican en el numeral 7.7, cuando se realiza el análisis de acuerdo al método descrito en esta norma.

3.2 Recuento de Vibrio parahaemolyticus en pescado y productos pesqueros. Es el número de microorganismos determinados bajo las condiciones descritas en la presente norma.

4. REACTIVOS O MATERIALES

Todos los reactivos deben ser de calidad analítica reconocida para análisis microbiológico; el agua debe ser destilada o de pureza equivalente.

4.1 Solución al 3% de cloruro de sodio. Esta solución se usa como agua de dilución y se prepara en la forma siguiente: se disuelven 30g de NaCl en 1 000 cm³ de agua destilada y se esteriliza la solución en un autoclave a 121°C durante 15 min; el pH final de esta solución debe ser 7.0.

Nota. Para ajustar el pH de cualquiera de los medios, se utilizan soluciones 1N de NaOH o de HCl, según corresponda.

4.2 Caldo de glucosa-sal-teepol (caldo GSTB), de concentración simple.

Extracto de carne	3 g
Peptona	10 g
Cloruro de sodio	30 g
Glucosa	5 g
Violeta de metilo	0.002 g
Teepol (1)	4 cm ³
Agua destilada	1 000 cm ³

(1) El reactivo Teepol es distribuido por la "Shell Chemical Co.; 110 West 51st St. New York, NY 10020, USA".

Continúa

Se disuelven los ingredientes en el agua y se distribuye el medio, en tubos de ensayo, en porciones de 10 cm³ cada una y se esteriliza en un autoclave a 121°C durante 15 min; el pH final de esta solución debe ser 7.4.

4.3 Caldo de glucosa-sal-teepol (caldo GSTB), de doble concentración.

Extracto de carne	6 g
Peptona	20 g
Cloruro de sodio	60 g
Glucosa	10 g
Violeta de metilo	0.004 g
Teepol	8 cm ³
Agua destilada	1 000 cm ³

Se disuelven los ingredientes en el agua y se distribuye en porciones de 10 cm³ cada una, en tubos de ensayo de tamaño apropiado para que puedan contener adicionalmente 10 cm³ de la muestra. Se esteriliza el medio en un autoclave a 121°C durante 15 min; el pH final del medio debe ser 7.4.

4.4 Agar de tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa (agar TCBS).

Extracto de levadura	5 g
Peptona	10 g
Sacarosa	20 g
Tiosulfato de sodio (Na ₂ S ₂ O ₃ .5H ₂ O)	10 g
Citrato de sodio (Na ₃ C ₆ H ₃ .2H ₂ O)	10 g
Colato de sodio	3 g
Bilis de buey	5 g
Cloruro de sodio	10 g
Citrato férrico	1 g
Azul de bromotimol	0.04 g
Azul timol	0.04 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 000 cm ³

Se disuelven los ingredientes en el agua, se lleva a ebullición durante 1 a 2 min y luego se distribuye en cajas de Petri; el pH final del medio debe ser 8.6. Este medio no debe esterilizarse.

Nota. El medio es distribuido comercialmente en forma deshidratada; si se adquiere en esta forma, debe prepararse siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.5 Agar triple azúcar-hierro (agar TSI).

Polipeptona	20 g
Cloruro de sodio	30 g
Lactosa	10 g
Sacarosa	10 g
Glucosa	1 g
Sulfato férrico amoniacal [Fe (NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O]	0.2 g

Tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	0.2 g
Rojo de fenol	0.025 g
Agar	13 g
Agua destilada	1 000 cm^3

Se suspenden los ingredientes sólidos en el agua destilada, se mezclan completamente, se calienta la suspensión con agitación ocasional y se hierve, aproximadamente durante 1 min, hasta que los ingredientes se disuelvan. Se distribuye el medio en tubos de ensayo, de 16 mm x 150 mm, hasta un tercio de su capacidad y se tapan en forma no hermética de manera que se mantengan condiciones aeróbicas durante su uso; se esteriliza el medio en un autoclave a una temperatura no mayor de 118°C durante 15 min y, antes que el medio se solidifique, se colocan los tubos en posición inclinada de manera de obtener fondos de 2 a 3 cm y planos inclinados de 4 a 5 cm. El pH final del medio debe ser 7.3 ± 0.2 .

4.6 Caldo de soya tripticasa (caldo TSB).

Tripticasa peptona	17.0 g
Fitona peptona	3.0 g
Cloruro de sodio	30.0 g
Fosfato dipotásico	2.5 g
Dextrosa	2.5 g
Agua destilada	1 000 cm^3

Se disuelven los ingredientes sólidos en el agua destilada mediante ebullición durante 1 a 2 min, se distribuye en tubos o frascos apropiados y se esteriliza en un autoclave a 121°C durante 15 min; el pH final del medio debe ser 7.3 ± 0.2 .

4.7 Agar de soya tripticasa (agar TSA).

Tripticasa peptona	15.0 g
Fitona peptona	5.0 g
Cloruro de sodio	30.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1 000 cm^3

Se agregan los ingredientes sólidos al agua destilada, se calienta hasta ebullición con agitación frecuente y se hierve durante 1 min; se distribuye en tubos, se esteriliza en un autoclave a 121°C durante 15 min y, antes que el medio se solidifique, se colocan los tubos en posición que permita obtener planos inclinados. El pH final del medio debe ser 7.3 ± 0.2 .

4.8 Colorantes para determinar el Gram.

4.8.1 Colorante cristal violeta de Hucker.

- Solución A. Se prepara disolviendo 2 g de cristal violeta que contenga 90% del colorante, en 20 cm^3 de alcohol etílico al 95% (v/v).
- Solución B. Se prepara disolviendo 0.8 g de oxalato de amonio en 80 cm^3 de agua destilada.
- El reactivo completo se prepara mezclando la solución A con la solución B, se deja en reposo la mezcla durante 24 h y se filtra a través de papel filtro grueso.

4.8.2 Colorante yodo de Gram.

Yodo	1 g
Yoduro de potasio	2 g
Agua destilada	300 cm ³

Se coloca el yoduro de potasio en un mortero, se agrega el yodo, y se muele durante 5 a 10 s; se agrega 1 cm³ de agua, luego 5 cm³ y finalmente 10 cm³ de agua, moliendo apropiadamente después de agregar cada porción de agua, de manera de obtener al final la completa disolución de los reactivos. Se vierte la solución en un frasco, se enjuaga el mortero y la mano del mortero con una cantidad suficiente de agua para llevar la solución a un volumen total de 300 cm³.

4.8.3 Colorante de contraste de Hucker. Se prepara una solución concentrada disolviendo 2.5 g de safranina O certificada, en 100 cm³ de alcohol etílico al 95% (v/v); para usar el colorante se diluyen previamente 10 cm³ de la solución concentrada con 90 cm³ de agua destilada.

4.9 Medio para el ensayo de movilidad (medio semisólido).

Extracto de carne	3 g
Peptona o gelisato	10 g
Cloruro de sodio	30 g
Agar	4 g
Agua destilada	1 000 cm ³

Se mezclan los ingredientes, se calientan suavemente con agitación ocasional y se dejan en ebullición durante 1 a 2 min para que se disuelvan; se distribuye el medio en porciones de 8 cm³ cada una, en envases con tapadera roscada y se tapan sin apretar la tapadera. Se esterilizan en un autoclave a 121°C durante 15 min y se almacenan con la tapadera cerrada en forma hermética. El pH final del medio debe ser 7.4 ± 0.2.

4.10 Caldo de glucosa Hugh-Leifson (caldo HLGB).

Peptona	2 g
Extracto de levadura	0.5 g
Cloruro de sodio	30 g
Glucosa	10 g
Púrpura de bromocresol	0.015 g
Agar	3 g
Agua destilada	1 000 cm ³

Se disuelven los ingredientes sólidos en el agua y se ajusta el pH a 7.4; se distribuye el medio en tubos de ensayo y se esteriliza en un autoclave a 121°C durante 15 min.

4.11 Aceite de parafina estéril.

4.12 Reactivo para el ensayo de oxidasa. Se prepara disolviendo 1 g de N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina. 2 HCl en 100 cm³ de agua destilada; el reactivo debe prepararse cada vez que se va a usar.

Nota. También puede utilizarse en forma alternativa, una solución al 1% del reactivo hidrocloreto de N, N-dimetil-p-fenilendiamina, aunque preferiblemente debe usarse el reactivo indicado en el numeral 4.12.

4.13 Medio decarboxilasa para Vibrio parahaemolyticus, (arginina dihidrolasa/lisina y ornitina decarboxilasa).

Peptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
Cloruro de sodio	30 g
Glucosa	1 g
Solución al 1.6% de púrpura de bromocresol	1 cm ³
Agua destilada	1 000 cm ³

Se mezclan los ingredientes y se ajusta el pH entre 6.7 y 6.8; se divide el caldo basal en tres porciones y se procede de la manera siguiente:

- a) A la primera porción del caldo basal se agrega L-arginina en cantidad tal que su concentración final quede al 0.5%.
- b) A la segunda porción del caldo basal se agrega L-lisina en cantidad tal que su concentración final quede al 0.5%.
- c) Se reserva la tercera porción como un control del caldo basal.

Por separado se distribuye cada medio en tubos de ensayo de 13 mm x 100 mm con tapadera roscada, colocando en cada uno una porción de 3 cm³, y se esterilizan en un autoclave a 121°C durante 10 min.

4.14 Medio nutriente de gelatina.

Cloruro de sodio	30 g
Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Gelatina	120 g
Agua destilada	1 000 cm ³

Se disuelven los ingredientes sólidos en el agua, se distribuye el medio en tubos de ensayo y se esteriliza en un autoclave a 121°C durante 12 min. El pH final del medio debe ser 7.0.

4.15 Caldo de sal tripticasa (caldo STB); véase el numeral 4.16.

Tripticasa	10 g
Extracto de levadura	3 g
Agua destilada	1 000 cm ³

Se agregan 0, 60, 80 y 100 g de NaCl por litro de caldo, para obtener respectivamente, caldos al 0, 6, 8 y 10% de NaCl-tripticasa para los ensayos de tolerancia de sal (halofilismo). Se distribuye en tubos y se esteriliza cada medio en un autoclave a 121°C durante 15 min; el pH final de cada medio debe ser 7.5.

4.16 Medio de cultivo para el ensayo de halofilismo con agitación (medio HSCM). Este medio se usa en forma alternativa al caldo STB descrito en el numeral 4.15; la elección de un método en particular dependerá de las posibilidades del laboratorio, aunque el ensayo de halofilismo con agitación es considerado el procedimiento mas sensitivo.

Tripticasa	10 g
Agua destilada	1 000 cm ³

Continúa

Se agregan 0, 60, 80 y 100 g de NaCl por litro de medio de cultivo, para obtener respectivamente medios con concentraciones al 0, 6, 8 y 10% de NaCl; el pH del medio no debe ajustarse. Se distribuye cada medio, en porciones de 25 cm³ cada una, en frascos de 50 cm³ y se esteriliza en un autoclave a 121°C durante 10 min.

4.17 Caldo de glucosa amortiguado (caldo MR-VP amortiguado).

Cloruro de sodio	30 g
Proteosa peptona	7 g
Glucosa	5 g
Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄)	5 g
Agua destilada	1 000 cm ³

Se disuelven los ingredientes sólidos en aproximadamente 800 cm³ de agua con calentamiento suave, se filtra, se enfría a 20°C y se diluye con agua a 1L; se distribuye en tubos de ensayo en porciones de 10 cm³ cada una y se esteriliza en un autoclave a 121°C durante 12 a 15 min. El pH del medio debe ser 6.9 ± 0.2.

Nota. El medio no debe calentarse por un período mayor de 30 min.

4.18 Caldo de triptofano.

Triptona	10 g
Cloruro de sodio	30 g
Agua destilada	1 000 cm ³

Se disuelven los ingredientes sólidos en el agua, se distribuye el medio en tubos de ensayo, en porciones de 5 cm³ cada una, y se esteriliza en un autoclave a 121°C durante 15 min; el pH final debe ser 6.9 ± 0.2.

4.19 Reactivos de Voges-Proskauer (VP).

4.19.1 Solución alcohólica al 5% de α-naftol. Se prepara disolviendo 5 g de α-naftol en 100 cm³ de alcohol absoluto.

4.19.2 Solución al 40% de KOH. Se prepara disolviendo 40 g de KOH en agua destilada y se completa el volumen a 100 cm³ con agua.

4.20 Reactivo de Kovacs.

p-Dimetilaminobenzaldehído	5 g
Alcohol amílico	75 cm ³
Acido clorhídrico concentrado	25 cm ³

Se disuelve el p-dimetilaminobenzaldehído en el alcohol amílico y se adiciona lentamente el ácido clorhídrico; el reactivo debe almacenarse a 4°C.

4.21 Caldo de púrpura de bromocresol.

Peptona	10 g
Extracto de carne	3 g
Cloruro de sodio	30 g
Púrpura de bromocresol	0.04 g
Agua destilada	1 000 cm ³

Se disuelven los ingredientes sólidos en el agua destilada y se divide en 5 porciones iguales procediéndose luego en la forma siguiente:

Continúa

- a) Se agrega 0.5g de celobiosa a la primera porción.
- b) Se agrega 1 g de sacarosa a la segunda porción.
- c) Se agrega 1 g de maltosa a la tercera porción.
- d) Se agrega 1 g de manitol a la cuarta porción.
- e) Se agrega 1 g de trehalosa a la quinta porción.

Se agita cada una de las porciones antes indicadas hasta disolución completa y luego se distribuyen, por separado, en porciones de 8 cm³ cada una, en tubos de ensayo de 16 mm x 150 mm que contienen tubos Durham invertidos; se esterilizan en un autoclave a 121°C durante 10 min. El pH final de los medios debe ser 7.0 ± 0.2.

4.22 Agar Wagatsuma.

Extracto de levadura	3 g
Bacto-peptona	10 g
Cloruro de sodio	70 g
Fosfato dipotásico	5 g
Manitol	10 g
Cristal violeta	0.001 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 000 cm ³

Se mezclan los ingredientes sólidos con el agua y se ajusta el pH a 8.0, sin someter el medio a esterilización; se calienta el medio utilizando vapor durante 30 min y luego se lleva a una temperatura de 50°C. Por aparte se prepara una suspensión, lavada 3 veces, de glóbulos rojos de sangre humana recién extraída y tratada con citrato (véase nota) o bien, glóbulos rojos de sangre de conejo en solución salina fisiológica; se agrega 5% en volumen de la suspensión al agar regulado a 50°C y se mezcla suavemente. Se distribuye el medio en cajas de Petri y se deja solidificar; las placas deben estar completamente secas antes de su uso el cual debe llevarse a cabo con prontitud.

Nota. Es recomendable preparar la suspensión de glóbulos rojos con sangre humana en vez de sangre de conejo.

5. APARATOS

5.1 Balanza de laboratorio, con una sensibilidad de 0.1 g.

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

5.3 Autoclave, capaz de operar a temperaturas entre 118 y 121°C.

5.4 Incubadoras, reguladas a 35°C y 42°C respectivamente.

5.5 Pipetas volumétricas, de 0.1, 1 y 10 cm³, esterilizadas.

5.6 Frascos para contener los medios de cultivo, de 50 y 500 cm³.

5.7 Tubos de ensayo, de 13 mm x 100 mm, con tapadera roscada.

Continúa

- 5.8 Tubos de ensayo, de 16 mm x 150 mm, con y sin tubos Durham invertidos.
- 5.9 Baño de agua, regulado entre 48 y 50°C.
- 5.10 Cajas de Petri, de 15 mm x 100 mm, de vidrio o de plástico, estériles.
- 5.11 Asa en punta.
- 5.12 Asa circular, de 3 mm de diámetro.
- 5.13 Agitador mecánico.
- 5.14 Instrumental de laboratorio.

6. PREPARACION DE LA MUESTRA

6.1 Se parte de una muestra representativa de por lo menos 200 g tomada en forma aséptica, envasada en un envase estéril y trasladada al laboratorio bajo condiciones adecuadas de manera de minimizar los cambios de la población microbiológica. El análisis de la muestra debe iniciarse tan pronto como sea posible luego de haberse recibido la misma; si el análisis no puede realizarse prontamente se deben almacenar las muestras entre 4 y 10°C, ya que existe menor daño de las células de Vibrio parahaemolyticus cuando la muestra está refrigerada que cuando la misma se congela.

6.2 Se pesan 50 g de la muestra en un vaso mezclador estéril; dependiendo del tipo de producto la muestra debe estar constituida en la forma siguiente:

- a) En el caso de pescados la muestra debe tomarse preferiblemente de tejidos superficiales, estómago o agallas.
- b) En el caso de mariscos, a excepción de crustáceos, la muestra debe ser el contenido interior total del animal.
- c) En el caso de crustáceos se debe analizar el animal entero si es posible o la porción central del animal incluyendo branquias y estómago.

6.3 Se agregan al vaso mezclador con la muestra, 450 cm³ de la solución al 3% de cloruro de sodio y se mezcla durante 1 min a 840 rad/s (8 000 revoluciones por minuto); esta preparación corresponde a la dilución 1:10.

6.4 Se preparan diluciones adicionales de concentraciones 1:100, 1:1 000, 1:10 000 ó diluciones mayores si fuera necesario, empleando en cada caso la solución al 3% de cloruro de sodio como diluyente.

7. PROCEDIMIENTO

7.1 En los tubos que contienen 10 cm³ del caldo GSTB de doble concentración (véase el numeral 4.3) se inoculan por triplicado, 10 cm³ de la dilución 1:10 (véase el numeral 6.3) y se incuban a 35°C toda la noche pero no más de 18 h.

7.2 En los tubos que contienen 10 cm³ del caldo GSTB de concentración simple (véase el numeral 4.2) se inoculan por triplicado, porciones de 1 cm³ de cada una de las diluciones 1:10, 1:100, 1:1 000 y 1:10 000, y se incuban a 35°C toda la noche pero no más de 18 h.

7.3 Concluidos los períodos de incubación y utilizando el asa circular de 3 mm, se siembran en estrías sobre la superficie de las placas de agar TCBS (véase el numeral 4.4), porciones individuales de cada una de las 3 diluciones más altas que muestren desarrollo en el caldo GSTB; si el desarrollo no es nítido, se siembran en estrías porciones de las tres primeras diluciones. Se incuban las placas a 35°C durante 18 h.

Continúa

7.4 Se retiran las placas de la incubadora y se observan para detectar la posible identidad de las colonias obtenidas sobre el agar TCBS, en base a lo siguiente:

7.4.1 Las colonias de Vibrio parahaemolyticus, se presentan como colonias redondas, de 2 a 3 mm de diámetro, con centros de color verde o azul.

7.4.2 Las colonias de Vibrio alginolyticus son colonias de mayor tamaño y de color amarillo.

7.4.3 Los microorganismos coliformes, proteus y enterocócicos, si están presentes, aparecen como colonias pequeñas y translúcidas.

7.5 Identificación bioquímica. Si se detectan colonias típicas o sospechosas de Vibrio parahaemolyticus (véase el numeral 7.4.1), éstas se someten a identificación bioquímica de acuerdo a los procedimientos indicados a continuación:

Nota. Para facilitar la interpretación de las reacciones, es recomendable trabajar en forma paralela con controles de Vibrio parahaemolyticus.

7.5.1 Prueba en agar TSI.

- a) Utilizando el asa en punta se pican 2 ó más colonias típicas o sospechosas y se siembran en estrías, por separado, sobre el plano inclinado de tubos de ensayo que contengan agar TSI (véase el numeral 4.5), procediéndose luego a picar el fondo del agar.
- b) Se incuban los tubos a 35°C durante toda la noche.
- c) Concluido el período de incubación se registran como positivos para Vibrio parahaemolyticus los tubos en los cuales se produjo: un plano inclinado alcalino (color rojo) y un fondo ácido (color amarillo), no se observa producción de gas y el cultivo desarrollado sobre el plano inclinado es negativo para H₂S (agar no ennegrecido).

Nota. La reacción antes descrita es una reacción semejante a la reacción típica de Shigella.

7.5.2 Prueba en caldo TSB y en agar TSA.

7.5.2.1 Se inocula caldo TSB (véase el numeral 4.6) y agar TSA (véase el numeral 4.7) y se incuban a 35°C toda la noche.

7.5.2.2 Los cultivos obtenidos se utilizan como una fuente de inóculo para las otras pruebas de identificación, para exámenes microscópicos y para la determinación del Gram de acuerdo al procedimiento que se indica a continuación:

7.5.2.3 Identificación del Gram.

- a) Se efectúa un frote de cada cultivo (véase el numeral 7.5.2.2) y se seca al aire; luego se fija el frote con calor suave pasándolo 3 ó 4 veces rápidamente sobre la llama de un mechero Bunsen.
- b) Se tiñe el frote durante 1 min con la solución cristal violeta-oxalato de amonio, se lava brevemente con agua del chorro y se drena el agua.
- c) Se aplica durante 1 min el colorante yodo de Gram, se lava con agua del chorro y se drena el agua.
- d) Se decolora el frote con alcohol etílico al 95% (v/v) hasta que los enjuagues no tengan color azul, aproximadamente durante 30 s; alternativamente se puede sumergir el portaobjeto en el alcohol, se retira inmediatamente y luego se vuelve a sumergir en alcohol durante 10 s.

- e) Se lava rápidamente el frote con agua, se drena y se aplica el colorante de contraste de safranina durante 10 a 30 s.
- f) De nuevo se lava rápidamente con agua, se drena, se seca al aire y se examina; los organismos Gram-positivos se tiñen de color azul y los organismos Gram-negativos se tiñen de color rojo.

Nota. Algunos de los organismos Gram-negativos no se decoloran fácilmente después de la tinción con la solución cristal violeta de Hucker; para evitar esta dificultad, la solución de cristal violeta puede ser diluida hasta 10 veces antes de mezclarla con un volumen igual de la solución de oxalato de amonio.

7.5.2.4 El Vibrio parahaemolyticus es un organismo Gram-negativo, polimórfico ya sea como bastón recto o bastón curvado, que posee un flagelo polar.

7.5.3 Ensayo de movilidad.

- a) El inóculo obtenido de acuerdo al numeral 7.5.2.2 se inocula en un tubo que contiene el medio para el ensayo de movilidad (véase el numeral 4.9), picando la columna del medio a una profundidad de aproximadamente 5 mm, y se incuba a 35°C durante 24 h.
- b) Un desarrollo circular difuso a partir de la línea de la picadura se registra como ensayo positivo ya que el Vibrio parahaemolyticus es un organismo móvil.

7.6 Pruebas de identificación adicionales, (véase el numeral 7.7). Se deben realizar las pruebas adicionales que se indican a continuación con todos aquellos organismos que en las pruebas anteriores se registraron como organismos móviles, Gram-negativos, que producían un fondo ácido y un plano inclinado alcalino en agar TSI, y eran negativos para la formación de gas y la producción de H₂S.

7.6.1 Prueba en caldo de glucosa Hugh-Leifson (HLGB).

7.6.1.1 Con el asa en punta se pican 2 tubos que contienen caldo HLGB (véase el numeral 4.10), utilizando como inóculo solamente los cultivos del agar TSA (véase el numeral 7.5.2); uno de los tubos debe cubrirse con aceite de parafina estéril a una profundidad de aproximadamente 25 mm.

7.6.1.2 Se incuban a 35°C durante 2 días o durante un período mayor si fuera necesario.

7.6.1.3 La reacción se interpreta en la forma siguiente:

- a) Si el organismo cambia el color del medio en ambos tubos, de un color púrpura a un color amarillo, es un organismo fermentador de carbohidratos.
- b) Si el cambio de color del medio ocurre solamente en el tubo abierto, es un organismo que oxida los carbohidratos.

7.6.1.4. Se registran como Vibrio parahaemolyticus, los tubos en que se observe fermentación positiva de la glucosa, sin producción de gas.

7.6.2 Ensayo de la citocromo oxidasa.

- a) Se inocula el plano inclinado de un tubo que contenga agar TSA (véase el numeral 4.7) y se incuba a 35°C durante 24 h.
- b) Se dejan fluir sobre el plano inclinado 2 a 3 gotas de la solución de fenilendiamina (véase el numeral 4.12) y se observa la aparición de un color azul oscuro dentro de los 2 min siguientes, en cuyo caso se registra la reacción como positiva para Vibrio parahaemolyticus.

Continúa

7.6.3 Prueba para la arginina dihidrolasa.

- a) Se inocula el caldo de arginina dihidrolasa (véase el numeral 4.13 (a)) y el medio basal de control (véase el numeral 4.13 (c)), empleando en cada caso, una porción obtenida de los cultivos en agar TSA con el asa circular de 3 mm.
- b) Concluida la inoculación se coloca una capa de aceite mineral estéril, de 10 mm de profundidad, a cada uno de los tubos inoculados incluyendo el control, luego se tapan los tubos en forma no apretada y se incuban a 35°C durante 24 h.
- c) Se examinan los tubos cada 24 h durante 4 días, observando si el medio se torna de color amarillo debido a la producción de ácido a partir de la glucosa; cuando se produce una reacción positiva para la prueba, el medio se vuelve alcalino o de color púrpura, mientras que el control permanece ácido o de color amarillo.
- d) Se registran como Vibrio parahaemolyticus los tubos en los cuales la reacción fue negativa para la prueba de arginina dihidrolasa, es decir, el medio permanece de color amarillo.

7.6.4 Prueba para la lisina decarboxilasa.

- a) Siguiendo la técnica indicada en el numeral 7.6.3, se inocula un tubo que contenga caldo lisina decarboxilasa, (véase el numeral 4.13 (b)), se comparan las reacciones observadas en el tubo que contiene lisina con las del medio basal (control), y se registran los resultados.
- b) El Vibrio parahaemolyticus causa una reacción positiva para la lisina decarboxilasa.

7.6.5 Prueba de hidrólisis de gelatina.

- a) Usando un cultivo del agar TSA y el asa en punta, se inocula un tubo que contenga el medio nutriente de gelatina (véase el numeral 4.14).
- b) Se incuban los tubos a 35°C durante 1 a 7 días y luego se enfrían a 20°C para observar el efecto proteolítico el cual se evidencia por la licuefacción de la gelatina; antes de observar la reacción se debe verificar que el desarrollo sea lo suficiente para producir tal reacción.
- c) Se registran como positivos para Vibrio parahaemolyticus los tubos en que se observe una licuefacción rápida de la gelatina.

7.6.6. Prueba de halofilismo en caldo STB. Esta prueba es alternativa a la prueba indicada en el numeral 7.6.7, aunque se recomienda la prueba con agitación por su mayor sensibilidad.

- a) Usando un cultivo del agar TSA, se inoculan 4 tubos que contengan caldo STB al 0, 6, 8 y 10% de NaCl respectivamente (véase el numeral 4.15) y se incuban a 35°C durante 24 h.
- b) El Vibrio parahaemolyticus se desarrolla bien en las concentraciones 6 y 8% de NaCl pero no se desarrolla o se desarrolla pobremente, en las concentraciones 0 y 10% de NaCl.

7.6.7 Prueba de halofilismo con agitación, en medio HSCM.

- a) Se prepara una dilución 1:10 del cultivo obtenido en caldo TSB luego de 24h de incubación y se inoculan, por separado, porciones de 0.1 cm³ en 4 frascos de 25 cm³ que contengan el medio HSCM al 0, 6, 8 y 10% de NaCl respectivamente (véase el numeral 4.16).
- b) Se incuban los frascos a 35°C, sobre un agitador mecánico, durante 24 h.

Continúa

- c) El Vibrio parahaemolyticus se desarrolla bien en las concentraciones 6 y 8% de NaCl pero no se desarrolla en las concentraciones 0 y 10% de NaCl.

7.6.8 Prueba de desarrollo a 42°C.

- a) Usando como inóculo un cultivo de 24 h en caldo TSB se inocula, con el asa circular, un tubo del mismo caldo TSB y se incuba en un baño de agua regulado a 42°C durante 24 h.
- b) Se registran como positivos para Vibrio parahaemolyticus solamente los tubos en los cuales se observa un desarrollo abundante.

7.6.9 Prueba de Voges-Proskauer.

7.6.9.1 Con el asa circular y usando como inóculo un cultivo de 24 h en agar TSA, se inocula el medio MR-VP (véase el numeral 4.17) y se incuba a 35°C durante 2 días.

7.6.9.2 Se procede a realizar la prueba VP en la forma siguiente:

- a) Se transfiere a un tubo de ensayo, 1 cm³ del cultivo obtenido luego de 48 h de incubación.
- b) Se agrega 0.6 cm³ de la solución de α -naftol y se agita.
- c) Se agrega 0.2 cm³ de la solución al 40% de KOH y se agita; opcionalmente pueden adicionarse unos pocos cristales de creatina.
- d) Transcurridas 4 h se observan los resultados; el ensayo es positivo para la prueba si se desarrolla un color rosado de eosina.

7.6.9.3 Se registran como Vibrio parahaemolyticus, los tubos en los cuales la reacción fue negativa para la prueba VP, es decir, si no se observa coloración rosada.

7.6.10 Prueba de indol en caldo de triptofano.

- a) Usando como inóculo un cultivo en agar TSA se inocula el caldo de triptofano (véase el numeral 4.18) y se incuba a 35°C durante 24 h.
- b) Se agrega 0.5 cm³ del reactivo de Kovacs (véase el numeral 4.20) y se agita.
- c) Se registran como Vibrio parahaemolyticus los tubos en que la reacción fue positiva, es decir, aquellos en que se desarrolló una coloración rojo oscuro.

7.6.11 Reacción de fermentación en caldo púrpura de bromocresol.

- a) Usando como inóculo un cultivo en agar TSA, se inoculan cada uno de 5 tubos que contengan celobiosa, sacarosa, maltosa, manitol y trehalosa, respectivamente (véase el numeral 4.21), y se incuban a 35°C durante 4 a 5 días.
- b) Se observan los tubos para verificar si se produjo una reacción ácida, la cual se evidencia por un cambio en el color del medio de púrpura a amarillo.
- c) El Vibrio parahaemolyticus no produce una reacción ácida en celobiosa dentro de las primeras 24 h; no fermenta la sacarosa pero si fermenta la maltosa, el manitol y la trehalosa.

7.6.12 Prueba de Kanagawa.

- a) Usando un asa circular se toma una porción de un cultivo de 18 h en caldo TSB y se coloca en un punto sobre la superficie de una placa que contenga el agar Wagatsuma completamente seco (véase el numeral 4.22); en una misma placa se pueden colocar varias porciones sobre la línea de una circunferencia imaginaria.

Continúa

- b) Se incuban las placas a 35°C y se observan los resultados en un período menor de 24 h.
- c) El ensayo positivo consiste de una beta-hemólisis, es decir, una zona clara transparente de los glóbulos rojos alrededor de la colonia.
- d) Bajo ningún concepto debe considerarse como válida ninguna observación realizada después de 24 h de incubación.

Nota. La reacción positiva ha mostrado una estrecha correlación con la patogenicidad del Vibrio parahaemolyticus aislado; las células aisladas que han causado enfermedad en humanos casi siempre son Kanagawa-positivas, pero células aisladas procedentes de alimentos marinos casi siempre son Kanagawa-negativas.

7.7 Número mínimo de caracteres para la identificación de Vibrio parahaemolyticus. Para establecer en forma confiable la presunta presencia de Vibrio parahaemolyticus, se deben comprobar como mínimo las siguientes características:

- a) Morfología: Bastón curvado, esporulado, Gram-negativo.
- b) Apariencia en agar TSI: Plano inclinado alcalino, fondo ácido, sin producción de gas ni H₂S.
- c) Prueba de Hugh-Liefson: Oxidación/fermentación positiva de glucosa, sin producción de gas.
- d) Prueba de citocromo oxidasa: positiva.
- e) Prueba de arginina dihidrolasa: negativa.
- f) Prueba de lisina decarboxilasa: positiva.
- g) Prueba de halofilismo: Desarrollo negativo en 0% de NaCl, desarrollo positivo en 6 y 8% de NaCl, y desarrollo negativo o pobre en 10% de NaCl.
- h) Desarrollo a 42°C: positivo.
- i) Prueba de Voges-Proskauer: negativa.
- j) Fermentación de sacarosa: negativa.

7.9 Recuento de Vibrio parahaemolyticus. Cuando las colonias azul-verde son identificadas bioquímicamente como Vibrio parahaemolyticus (véase el numeral 7.5), se calcula el número mas probable de Vibrio parahaemolyticus, en base a la proporción de tubos positivos de 3 diluciones sucesivas (véase el numeral 7.3).

8. EXPRESION DE LOS RESULTADOS

8.1 Recuento de Vibrio parahaemolyticus. El resultado se expresa como el número mas probable (NMP) de Vibrio parahaemolyticus por gramo de muestra y se calcula a partir del número de tubos positivos de cada dilución en triplicado, considerando 3 diluciones sucesivas y empleando el Cuadro 1.

(Sigue en página 14/15).

Continúa

Cuadro 1. Número más probable de microorganismos por gramo de pescado o producto pesquero, para diluciones sucesivas de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , utilizando 3 tubos para cada dilución.

Combinación de tubos positivos			NMP por gramo	Combinación de tubos positivos			NMP por gramo	Combinación de tubos positivos			NMP por gramo
10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	
0	0	0	< 3	1	1	1	11	2	2	2	35
0	0	1	3	1	1	2	15	2	2	3	42
0	0	2	6	1	1	3	19	2	3	0	29
0	0	3	9	1	2	0	11	2	3	1	36
0	1	0	3	1	2	1	15	2	3	2	44
0	1	1	6	1	2	2	20	2	3	3	53
0	1	2	9	1	2	3	24	3	0	0	23
0	1	3	12	1	3	0	16	3	0	1	39
0	2	0	6	1	3	1	20	3	0	2	64
0	2	1	9	1	3	2	24	3	0	3	95
0	2	2	12	1	3	3	29	3	1	0	43
0	2	3	16	2	0	0	9	3	1	1	75
0	3	0	9	2	0	1	14	3	1	2	120
0	3	1	13	2	0	2	20	3	1	3	160
0	3	2	16	2	0	3	26	3	2	0	93
0	3	3	19	2	1	0	15	3	2	1	150
1	0	0	4	2	1	1	20	3	2	2	210
1	0	1	7	2	1	2	27	3	2	3	290
1	0	2	11	2	1	3	34	3	3	0	240
1	0	3	15	2	2	0	21	3	3	1	460
1	1	0	7	2	2	1	28	3	3	2	1 100
								3	3	3	≥ 2 400

Nota. Algunas veces es necesario calcular el NMP para diluciones sucesivas diferentes a las indicadas en el cuadro 1; en estos casos, se debe calcular el NMP aplicando la siguiente fórmula:

$$NMP_C = \frac{NMP_1 \times F}{100}$$

En la que:

NMP_C = Número más probable calculado para diluciones sucesivas diferentes de las diluciones sucesivas 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} .

NMP_1 = Número más probable leído en el cuadro 1 para la combinación específica de tubos positivos.

F = Valor recíproco de la concentración intermedia de la serie cuyo NMP se desea calcular.

Continúa

Ejemplo: Si al analizar una muestra se emplearon las diluciones sucesivas correspondientes a 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , y la combinación de tubos positivos correspondió a la combinación 3 2 1, se calcula el NMP_c en la forma siguiente:

- a) Se busca en el cuadro 1 el NMP_1 para la combinación 3 2 1 de tubos positivos, el cual corresponde al valor 150;
- b) Se obtiene el valor recíproco de la concentración intermedia de las diluciones sucesivas analizadas y que corresponde a 1 000, ya que la concentración intermedia de nuestro ejemplo es 10^{-3} ;
- c) Se aplica la fórmula:

$$NMP_c = \frac{150 \times 1\ 000}{100} = 1\ 500$$

9. INFORME DEL ENSAYO O ANALISIS

En el informe del análisis debe indicarse lo siguiente:

- 9.1 El método usado, el número de tubos empleados para cada dilución y el resultado obtenido en la determinación.
- 9.2 Cualquier condición no especificada en la norma, o señalada como opcional, así como cualquier circunstancia que pueda haber influido en el resultado.
- 9.3 Todos los detalles que permitan la completa identificación de la muestra.

10. CORRESPONDENCIA

Para la elaboración de la presente norma se tomaron en cuenta:

- a) "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods of the American Public Health Association, 1976"; y
- b) "Bacteriological Analytical Manual. Food and Drug Administration, Bureau of Foods Division of Microbiology, 1978"

-ULTIMA LINEA-

