

PESCADO Y PRODUCTOS PESQUEROS

Análisis microbiológico. Detección de Salmonella

1. OBJETO

La presente norma tiene por objeto establecer el método para la detección de Salmonella en pescados, crustáceos (tales como camarones, cangrejos, langostinos y langosta), y otros productos pesqueros.

2. NORMAS COGUANOR A CONSULTAR

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

3. REACTIVOS O MATERIALES

Los medios, tanto de cultivo como para las pruebas bioquímicas, se encuentran en el comercio ya listos para usar o bien, en forma deshidratada; es importante que se sigan todas las instrucciones dadas por el fabricante para el uso adecuado de los medios.

3.1 Caldo Lactosado

Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Lactosa	5 g
Agua destilada	1 000 cm <sup>3</sup>

Se disuelven los ingredientes en el agua mediante calentamiento a  $65^{\circ}\text{C}$ , se distribuye en porciones de  $225\text{ cm}^3$  en frascos de  $500\text{ cm}^3$  de capacidad, y se esterilizan en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 min. El pH final debe ser aproximadamente  $6,9 \pm 0,2$ .

### 3.2 Caldo Selenito-Cistina

Triptona o polipeptona	5 g
Lactosa	4 g
Selenito ácido de sodio ( $\text{Na}_2\text{HSeO}_3$ )	4 g
Fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	10 g
L - Cistina	0,01 g
Agua destilada	$1\ 000\text{ cm}^3$

Se calienta todo hasta ebullición y se ajusta el pH final a  $7,0 \pm 0,2$ . Se distribuye en tubos de ensayo estériles de  $16\text{ mm} \times 150\text{ mm}$  en porciones de  $10\text{ cm}^3$  y se calienta en corriente de vapor durante 10 min; no se debe esterilizar en autoclave. El medio no es estéril por lo que se debe usar el mismo día que se prepara.

### 3.3 Caldo Tetratiónato

#### 3.3.1 Caldo Tetratiónato base

Polipeptona	5 g
Sales biliares	1 g
Carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ )	10 g
Tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	30 g
Agua destilada estéril	$1\ 000\text{ cm}^3$

Se mezcla el medio completamente y se calienta hasta ebullición; se enfría a  $45^{\circ}\text{C}$  y se almacena a  $5-8^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.3.2 Solución de Iodo-Ioduro de potasio (I-KI)

Ioduro de potasio	5 g
Iodo resublimado	6 g
Agua destilada, estéril	$20\text{ cm}^3$

Se disuelven en  $5\text{ cm}^3$  de agua estéril los 5 g de ioduro de potasio, se agregan los 6 g de iodo resublimado y se diluye a  $20\text{ cm}^3$  con el agua destilada estéril.

Continúa

**3.3.3 Solución de Verde Brillante**

Colorante verde brillante	0,1 g
Agua destilada, estéril	100 cm <sup>3</sup>

Se disuelve el colorante en agua y se diluye a 100 cm<sup>3</sup>.

**3.3.4 Preparación del medio.** Se prepara el día que va a ser usado, agregando 20 cm<sup>3</sup> de la solución de I-KI y 10 cm<sup>3</sup> de la solución de verde brillante a 1 litro de caldo base. Se vuelve a suspender el precipitado mediante agitación suave y asépticamente se distribuye en tubos de ensayo esterilizados (de 20 mm x 150 mm ó de 16 mm x 150 mm), colocando 10 cm<sup>3</sup> en cada tubo. No se debe calentar el medio después de agregar las soluciones de Iodo-Ioduro y de verde brillante.

**Nota.** El medio base puede ser preparado con o sin verde brillante, distribuido en porciones de 10 cm<sup>3</sup>, esterilizado en autoclave a 121 °C y almacenado hasta que se va a usar; en el momento de usar el medio se le agrega la solución de I-KI en cantidad apropiada, y también la solución de verde brillante si ésta no hubiese sido agregada en el momento de la preparación.

**3.4 Agar Sulfito de Bismuto (Wilson & Blair)**

Polipeptona (o peptona)	10 g
Extracto de carne	5 g
Glucosa (dextrosa)	5 g
Fosfato disódico	4 g
Sulfato ferroso	0,3 g
Sulfito de bismuto (indicador)	8 g
Verde brillante	0,025 g
Agar	20 g
Agua destilada	1 000 cm <sup>3</sup>

Se mezclan completamente todos los ingredientes, se calienta con agitación y se hierve durante 1 min para obtener una suspensión uniforme; el precipitado resultante no se disuelve. Se enfría a 45-50 °C, se suspende el precipitado mediante agitación suave y se vierten porciones de 20 cm<sup>3</sup> en placas de petri de 15mm x 100 mm; se dejan secar las placas durante 2h con las tapas parcialmente removidas y luego se cierran. El pH final debe ser 7,6 ± 0,2. No se debe esterilizar; se prepara un día antes de usar y se guarda en la oscuridad.

**3.5 Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD)**

Extracto de levadura	3,00 g
L-lisina	5,00 g
Xilosa	3,75 g
Lactosa	7,50 g

Sacarosa	7,50 g
Desoxicolato de sodio	2,50 g
Citrato férrico amoniacal	0,80 g
Tiosulfato de sodio	6,80 g
Cloruro de sodio	5,00 g
Agar	15,00 g
R rojo de fenol	0,08 g
Agua destilada	1 000,00 cm <sup>3</sup>

Se hierve el medio para disolver todos los ingredientes completamente; no se debe sobrecalentar. Se enfría el medio a 50°C y se vierte en placas tan rápidamente como sea posible. El pH final debe ser  $7,4 \pm 0,2$ .

Nota. El sobrecalentamiento del medio puede causar precipitación lo cual no impide que las reacciones sean satisfactorias aunque las colonias pueden ser ligeramente mas pequeñas.

### 3.6 Agar Entérico Hektoen (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 ferrico amoniacal	1,5 g
Azul de bromatímol	0,064 g
Acido fucsínico	0,1 g
Agar	13,5 g
Agua destilada	1 000 cm <sup>3</sup>

Se suspenden los ingredientes en el agua destilada y se mezcla completamente; se calienta hasta ebullición con agitación frecuente y se hierve durante no mas de 1 min; no se debe sobrecalentar. Se enfría a 50-55°C y se vierten porciones de 20 cm<sup>3</sup> en placas de petri de 15 mm x 100 mm; se dejan secar las placas durante aproximadamente 2h con las tapas parcialmente removidas y luego se cierran. El pH final debe ser  $7,6 \pm 0,2$ . No se debe esterilizar.

Nota. Las placas se pueden preparar un día antes o el mismo día que se van a usar.

3.7 Agar triple azúcar hierro (agar TSI)

Polipeptona	20,00 g
Cloruro de sodio	5,00 g
Lactosa	10,00 g
Sacarosa	10,00 g
Glucosa	1,00 g
Sulfato férrico amoniaca! $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,20 g
Tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )	0,20 g
Rojo de fenol	0,025 g
Agar	13,00 g
Agua destilada	1 000,00 $\text{cm}^3$

Se suspenden los ingredientes en 1000  $\text{cm}^3$  de agua destilada, se mezcla completamente, se calienta con agitación ocasional y se hierve aproximadamente 1 min hasta que los ingredientes se disuelvan. Se llenan tubos de 16 mm x 150 mm hasta un tercio de su capacidad y se tapan en forma tal que se mantengan las condiciones aeróbicas durante su uso. Se esteriliza el medio en autoclave a una temperatura no mayor de 118°C durante 15 min; antes que se solidifique el medio, se colocan los tubos en una posición inclinada de manera que se formen fondos de 2 a 3 cm y planos inclinados de 4 a 5 cm. El pH final debe ser  $7,3 \pm 0,2$ .

3.8 Agar Lisina Hierro (agar LIA) (Edwards & Fife)

Gelisato o peptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
Glucosa	1 g
L-lisina	10 g
Citrato férrico amoniaca!	0,5 g
Tiosulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )	0,04 g
Purpura de bromocresol	0,02 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 000 $\text{cm}^3$

Se calienta el medio hasta que se disuelvan los ingredientes, se distribuye en porciones de 4  $\text{cm}^3$  en tubos de ensayo de 13 mm x 100 mm, se tapan los tubos de manera que se mantengan las condiciones aeróbicas durante su uso y se esterilizan en autoclave a 121°C durante 12 min. Antes que se solidifique el medio, se colocan los tubos en una posición inclinada de manera que se formen fondos de 4,0 cm y planos inclinados de 2,5 cm. El pH final debe ser  $6,7 \pm 0,2$ .

3.9 Agar MacConkey

Proteosa peptona o polipeptona	3 g
Peptona o gelisato	17 g

Lactosa	10 g
Mezcla de sales biliares	1,5 g
Cloruro de sodio	5 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal violeta	0,001 g
Agar	13,5
Agua destilada	1 000 cm <sup>3</sup>

Se ponen en suspensión los ingredientes del medio y se mezcla hasta que esté homogeneizado, se calienta con agitación ocasional y se hierve durante 1 a 2 min hasta que los ingredientes se disuelvan. Se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 min, se enfría a 45-50 °C y se vierten porciones de 20 cm<sup>3</sup> a placas de Petri de 15 mm x 100 mm; se dejan enfriar las placas tapadas durante no menos de 2h. No se deben usar placas húmedas. El pH final debe ser 7,1 ± 0,2.

### 3.10 Caldo de urea

Urea	20 g
Extracto de levadura	0,1 g
Fosfato de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	9,1 g
Fosfato disódico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	9,5 g
Rojo de fenol	0,01 g
Agua destilada	1 000 cm <sup>3</sup>

Se disuelven los ingredientes en el agua destilada, pero sin calentar. Se esteriliza mediante filtración a través de un filtro retenedor de bacterias y luego se distribuye asepticamente en porciones de 1,5 a 3,0 cm<sup>3</sup> en tubos de ensayo estériles de 13 mm x 100 mm. El pH final debe ser 6,8 ± 0,2.

### 3.11 Caldo de urea, rápido

Urea	20 g
Extracto de levadura	0,1 g
Fosfato monopotásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,091 g
Fosfato disódico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0,095 g
Rojo de fenol	0,01 g
Agua destilada	1 000 cm <sup>3</sup>

Se disuelven los ingredientes en el agua destilada, pero sin calentar. Se esteriliza mediante filtración a través de un filtro retenedor de bacterias y luego se distribuye asepticamente en porciones de 1,5 a 3,0 cm<sup>3</sup> en tubos de ensayo esterilizados de 13 mm x 100 mm. El pH final debe ser 6,8 ± 0,1.

3.12 Caldo de Infusión Cerebro-Corazón (BHI)

Infusión de cerebro de ternero	200 g
Infusión de corazón de res	250 g
Proteosa peptona o gelisato	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	2,5 g
Dextrosa	2 g
Agua destilada	1 000 $\text{cm}^3$

Se disuelven los ingredientes en el agua destilada, calentando suavemente si fuera necesario. Se distribuye el caldo en frascos o botellas para almacenar y se esteriliza en autoclave a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 min. El pH final debe ser  $7,4 \pm 0,2$ .

3.13 Caldo Tripticasa Soya-Triptosa. Se puede usar indistintamente una de las 3 fórmulas siguientes:3.13.1 Fórmula a partir de ingredientes deshidratados

Caldo Tripticasa Soya (producto comercial deshidratado)	15 g
Caldo Triptosa (producto comercial deshidratado)	13,5 g
Extracto de levadura	3,0 g
Agua destilada	1 000 $\text{cm}^3$

3.13.1.1 Se mezclan los ingredientes sólidos, se disuelve todo en el agua destilada y se calienta suavemente, si fuera necesario, hasta completa disolución. Se distribuye en porciones de  $5 \text{ cm}^3$  en tubos de 16 mm de diámetro y se esteriliza en autoclave a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 min. El pH final debe ser  $7,2 \pm 0,2$ .

3.13.2 Fórmula para Caldo Tripticasa Soya

Tripticasa peptona	17,0 g
Fitona peptona	3,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Fosfato ácido dipotásico	2,5 g
Dextrosa	2,5 g
Extracto de levadura	3,0 g
Agua destilada	1 000 $\text{cm}^3$

Se prepara en igual forma como se indica en 3.13.1.1

Continúa

**3.13.3 Fórmula para Caldo Triptosa**

Bacto-triptosa	20,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Bacto-dextrosa	1,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Agua destilada	1 000 cm <sup>3</sup>

Se prepara en igual forma como se indica en 3.13.1.1

Nota. El analista tiene la opción de usar cualquiera de las fórmulas 3.13.1, 3.13.2 ó 3.13.3 o bien, una combinación de volúmenes iguales de las fórmulas 3.13.2 y 3.13.3, ya que cualquiera de estas es satisfactoria para el cultivo de Salmonella destinado a pruebas serológicas de antígeno flagelar. Sin embargo, alguna literatura técnica indica que es preferible usar la fórmula 3.13.1 o bien, la combinación de las fórmulas 3.13.2 y 3.13.3.

**3.14 Solución Salina Fisiológica Formalinizada**

Solución al 36-38% de formaldehído	6 cm <sup>3</sup>
Cloruro de sodio	8,5 g
Agua destilada	1 000 cm <sup>3</sup>

Se disuelven 8,5 g de NaCl en el litro de agua destilada, se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min, se deja enfriar a temperatura ambiente y luego se agregan los 6 cm<sup>3</sup> de la solución al 36-38% de formaldehído. No se debe esterilizar después de agregar el formaldehído.

**3.15 Antisuero Polivalente Flagelar (H) para Salmonella****3.16 Antisuero Flagelar (H) de Spicer - Edwards****3.17 Caldo Lisina Decarboxilasa (Falkow)**

Gelato o peptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
Glucosa	1 g
L-lisina	5 g
Púrpura de Bromocresol	0,02 g
Agua destilada	1 000 cm <sup>3</sup>

Se calienta todo hasta que se disuelva, se distribuye en porciones de 5 cm<sup>3</sup> en tubos de ensayo, con tapa atornillada, de 16mm x 125 mm y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min, con la tapa floja. Inmediatamente después de esterilizados se aprieta la tapa antes de guardar

Continúa



los tubos; obviamente, después de la inoculación se aprieta la tapa nuevamente. El pH debe ser 6,5 - 6,8.

3.18 Solución al 0,2% de púrpura de bromocresol. Usando agua destilada estéril se disuelve 0,2 g del colorante púrpura de bromocresol y se diluye a 100 cm<sup>3</sup>.

3.19 Caldo Rojo Fenol Dulcitol

Tripticasa o proteasa peptona No. 3	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Extracto de carne (opcional)	1 g
Rojo fenol (6 7,2 cm <sup>3</sup> de solución al 0,25% de rojo fenol)	0,018 g
Agua destilada	1 000 cm <sup>3</sup>

3.19.1 Se disuelven 5 g de dulcitol en este caldo base, se distribuye en porciones de 2,5 cm<sup>3</sup> en tubos de ensayo de 13 mm x 100 mm que contienen tubos de fermentación invertidos de 6 mm x 50 mm. Se esterilizan en autoclave a 118°C durante 10 min. El pH final debe ser 7,3 ± 0,2.

Nota. Alternativamente, se pueden disolver los ingredientes del caldo base, omitiendo el carbohidrato, en 800 cm<sup>3</sup> de agua con calentamiento y agitación ocasional; luego se distribuye en porciones de 2,0 cm<sup>3</sup> en tubos de ensayo de 13 mm x 100 mm que contienen tubos de fermentación invertidos. Se esterilizan en autoclave a 118°C durante 15 min y se dejan enfriar. Por aparte, se disuelve el carbohidrato en 200 cm<sup>3</sup> de agua y se esteriliza por filtración a través de un filtro retenedor de bacterias, y asépticamente, se agrega a cada tubo de caldo esterilizado, previamente enfriado a una temperatura menor de 45°C, 0,5 cm<sup>3</sup> de la solución estéril de carbohidrato y se mezcla cuidadosamente. El pH final debe ser 7,4 ± 0,2.

3.20 Caldo Base Púrpura con 0,5% de Dulcitol

Proteosa peptona No.3	10 g
Extracto de carne	1 g
Cloruro de sodio	5 g
Púrpura de bromocresol	0,015 ó 0,010 g
Agua destilada	1 000 cm <sup>3</sup>

Se prepara en la misma forma indicada en 3.19.1 con la excepción que el pH final debe ser 6,8 ± 0,2.

3.21 Caldo Triptofano. Se prepara disolviendo 10 g de triptofano en 1000 cm<sup>3</sup> de agua destilada, se distribuye en porciones de 5 cm<sup>3</sup> en tubos de ensayo y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min. El pH final debe ser 6,9 ± 0,2.

Continúa

3.22 Caldo Cianuro de Potasio (caldo KCN)

Proteosa peptona No. 3 o polipeptona	3 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0,225 g
Fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	5,64 g
Agua destilada	1 000 $\text{cm}^3$

Se disuelven los ingredientes y se esteriliza en autoclave el frasco con el medio a 121 °C durante 15 min; se enfría y se refrigera a 5-8 °C. El pH final debe ser  $7,6 \pm 0,2$ . Por aparte, se disuelven 0,5 g de cianuro de potasio en 100  $\text{cm}^3$  de agua destilada estéril enfriada a 5-8 °C y, usando una pipeta con bulbo estéril o una jeringa estéril y, sin utilizar succión bucal, se transfieren asépticamente 15  $\text{cm}^3$  de la solución fría de KCN a un litro del caldo base estéril frío, o bien 1,5  $\text{cm}^3$  de solución de KCN a 100  $\text{cm}^3$  de caldo base. Se mezcla completamente con agitación suave y asépticamente se distribuye en porciones de 1 a 1,5  $\text{cm}^3$  en tubos de ensayo estériles de 13 mm x 100 mm; mediante técnica aséptica se tapan inmediatamente los tubos con corchos No.2 impregnados con parafina.

Nota 1. Los corchos se preparan haciéndolos hervir en parafina durante 5 min.

Nota 2. Los corchos se colocan en los tubos de manera que la parafina no fluya hacia el caldo pero que sí forme un buen sello entre el borde del tubo y el corcho.

Nota 3. El medio almacenado a 5-8 °C generalmente es estable durante 2 semanas.

3.23 Caldo Malonato

Sulfato de amonio ( $\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 g
Fosfato dipotásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	0,6 g
Fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0,4 g
Cloruro de sodio	2 g
Malonato de sodio	3 g
Glucosa	0,25 g
Azul de bromotimol	0,025 g
Agua destilada	1 000 $\text{cm}^3$

Se disuelven todos los ingredientes, calentando si fuera necesario; luego se distribuye en porciones de 3  $\text{cm}^3$  en tubos de ensayo de 13 mm x 100 mm y se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 min. El pH final debe ser  $6,7 \pm 0,2$ .

3.24 Reactivo Kovacs

p-Dimetilaminobenzaldehido	5 g
Alcohol amílico	75 $\text{cm}^3$
Acido clorhídrico concentrado	25 $\text{cm}^3$

Se disuelve el p-Dimetilaminobenzaldehído en el alcohol amílico y lentamente se agrega el ácido clorhídrico; se almacena a 4°C.

3.25 Solución Salina Fisiológica (estéril). Se prepara disolviendo 8,5 g de cloruro de sodio en 1000 cm<sup>3</sup> de agua destilada, se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 min y se guarda a temperatura ambiente.

3.26 Antisuero Polivalente Somático (0) para Salmonella

3.27 Antisueros del Grupo Somático (0) para Salmonella; incluyendo el antisuero Vi

3.28 Antisuero Somático del Grupo D para Salmonella

3.29 Antisuero Somático del Grupo C, para Salmonella

3.30 Caldo Rojo Fenol Lactosa. Se prepara en la forma indicada en 3.19.1 pero utilizando 10 g de lactosa en vez de los 5 g de dulcitol.

3.31 Caldo Púrpura Lactosa

3.31.1 Caldo base

Proteosa peptona No. 3	10 g
Extracto de carne	1 g
Cloruro de sodio	5 g
Púrpura de bromocresol	0,15 ó 0,020 g
Agua destilada	1 000 cm <sup>3</sup>

3.31.2 Se disuelven 10 g de lactosa en este caldo base, se distribuye en porciones de 2,5 cm<sup>3</sup> en tubos de ensayo de 13 mm x 100 mm, que contienen tubos de fermentación invertidos de 6 mm x 50 mm, y se esterilizan en autoclave a 118°C durante 10 min. El pH final debe ser 6,8 ± 0,2.

3.32 Caldo Rojo Fenol Sacarosa. Se prepara en la forma indicada en 3.19.1 pero utilizando 10 g de sacarosa en vez de los 5 g de dulcitol.

3.33 Caldo Púrpura Sacarosa. Se prepara en la forma indicada en 3.31.2 pero utilizando 10 g de sacarosa en vez de los 10 g de lactosa.

3.34 Caldo Glucosa-Tamponado (caldo MR-VP)

Proteosa peptona	7 g
Glucosa	5 g
Fosfato dipotásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	5 g
Agua destilada	1 000 cm <sup>3</sup>

Se disuelven los ingredientes en  $800 \text{ cm}^3$  de agua con calentamiento suave, se filtra, se enfría a  $20^\circ\text{C}$  y se diluye a un litro. Se distribuye en porciones de  $10 \text{ cm}^3$  en tubos de ensayo y se esteriliza en autoclave a  $121^\circ\text{C}$  durante 12 a 15 min; la exposición máxima al calor deberá ser de 30 min o menos. El pH final debe ser  $6,9 \pm 0,2$ .

3.35 Solución de  $\alpha$ -naftol. Se prepara disolviendo 5 g de  $\alpha$ -naftol en  $100 \text{ cm}^3$  de alcohol absoluto.

3.36 Solución al 40% de KOH. Se prepara disolviendo 40 g de KOH en agua destilada y se lleva a un volumen final de  $100 \text{ cm}^3$ .

3.37 Creatina

3.38 Indicador Rojo de Metilo. Se prepara disolviendo 0,10 g de rojo de metilo en  $300 \text{ cm}^3$  de alcohol etílico al 95% (v/v) y se lleva a un volumen final de  $500 \text{ cm}^3$  con agua destilada.

3.39 Agar Citrato de Simmon

Citrato de sodio	2,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Fosfato dipotásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	1,0 g
Fosfato de amonio ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ )	1,0 g
Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ )	0,2 g
Azul de bromotimol	0,08 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	$1\ 000,0 \text{ cm}^3$

Se disuelven los ingredientes calentando suavemente y con agitación ocasional, se hierve durante 1 a 2 min hasta que los ingredientes se disuelvan.

Se distribuye en tubos de ensayo de 13 mm ó 16 mm x 150 mm, llenándolos hasta un tercio de su capacidad y se taponan o atornillan las tapas de manera tal que se mantengan las condiciones aeróbicas durante su uso. Se esteriliza en autoclave a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 min y, antes que el medio se solidifique, se colocan los tubos en posición inclinada de manera que se formen fondos de 2 ó 3 cm de profundidad respectivamente, según el diámetro del tubo, y planos inclinados adecuados de 4 ó 5 cm respectivamente. El pH final debe ser  $6,9 \pm 0,2$ .

3.40 Medio para la prueba de movilidad (medio semisólido)

Extracto de carne	3 g
Peptona o gelisato	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	4 g
Agua destilada	$1\ 000 \text{ cm}^3$

Se disuelven los ingredientes calentando suavemente con agitación ocasional, se hierve durante 1 a 2 min para disolución completa; se distribuye en porciones de  $8 \text{ cm}^3$  en envases con tapa atornillada cerrando ésta en forma floja. Se esteriliza en autoclave a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 min, se cierra la tapa herméticamente y se almacena. El pH final debe ser  $7,4 \pm 0,2$ .

3.41 Papel indicador de pH, para valores entre 6 y 8 con graduaciones a cada 0,4 unidades de pH, por cambio de color.

#### 4. APARATOS

4.1 Balanza analítica de precisión, que aprecie 0,1 mg.

4.2 Balanza de laboratorio, de 2000 g de capacidad, que aprecie 0,1 g

4.3 Mezclador mecánico, (licuadora), capaz de desarrollar una velocidad de 838 rad/s (8000 rpm)

4.4 Vaso mezclador, esterilizado

4.5 Agitador de tubos, tipo Vortex

4.6 Frascos de boca ancha con tapa atornillada, de  $500 \text{ cm}^3$ , u otro envase apropiado.

4.7 Cucharas estériles, para transferir muestras de alimentos.

4.8 Incubadoras, reguladas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  y  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ , respectivamente.

4.9 Mechero, Fischer o Bunsen

4.10 Pipetas esterilizadas, de 1 y  $1,1 \text{ cm}^3$  con graduaciones a cada  $0,01 \text{ cm}^3$

4.11 Pipetas esterilizadas, de 5;10; y  $11,0 \text{ cm}^3$  con graduaciones a cada  $0,1 \text{ cm}^3$

4.12 Asa circular, de aproximadamente 3 mm de diámetro, de alambre de nícrón

4.13 Asa en punta o aguja para inocular, de alambre de nícrón

4.14 Varilla de vidrio estéril, para rayado en estrías

4.15 Placas de petri esterilizadas, de vidrio o de plástico, de 15 mm x 100 mm.

4.16 Tubos de ensayo esterilizados, de 16 mm x 150 mm y de 20 mm x 150 mm.

4.17 Tubos de ensayo serológicos, de 10 mm x 75 mm ó de 13 mm x 100 mm.

4.18 Baños de agua, regulados a  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ; a  $48-50^\circ\text{C}$  y a  $100^\circ\text{C}$

Continúa

4.19 Lámpara, para observar reacciones serológicas

4.20 Autoclave

4.21 Instrumental de laboratorio

## 5. PREPARACION DE LA MUESTRA

Si la muestra corresponde a producto congelado se debe descongelar una porción apropiada, en la forma más rápida posible, colocando la muestra a una temperatura inferior a 45°C durante 15 min o menos, o bien durante toda la noche a una temperatura entre 2 y 5°C.

## 6. PROCEDIMIENTO

### 6.1 Siembra en medio de enriquecimiento no selectivo

6.1.1 En forma aséptica se pesan 25g de la muestra y se transfieren asépticamente al vaso mezclador esterilizado; se agregan 225 cm<sup>3</sup> de caldo lactosado estéril (véase 3.1) y se mezcla durante 2 min a 838 rad/s (8 000 revoluciones por minuto).

6.1.2 Se transfiere asépticamente la mezcla homogeneizada a un frasco de boca ancha esterilizado (véase 4.6), se aprieta la tapa del frasco y se deja en reposo durante 60 min a temperatura ambiente; luego se mezcla bien con movimiento rotatorio, se abre asépticamente, se determina el pH con papel indicador (véase 3.41) y se ajusta el mismo a  $6,8 \pm 0,2$  si fuera necesario.

6.1.3 Se tapa completamente el frasco, se mezcla bien, luego se afloja la tapa dándole solo 1/4 de giro y se coloca en la incubadora a 35°C durante  $24 \pm 2$ h.

### 6.2 Siembra en medios de enriquecimiento selectivos

6.2.1 Se retira la muestra de la incubadora, se cierra herméticamente la tapa del frasco y se agita suavemente; con una pipeta estéril se transfiere 1 cm<sup>3</sup> de la mezcla a un tubo que contenga 10 cm<sup>3</sup> de caldo selenito-cistina (véase 3.2) previamente esterilizado y se incuba a 35°C durante  $24 \pm 2$ h.

6.2.2 Por aparte se inocula 1 cm<sup>3</sup> de la mezcla en otro tubo que contenga 10 cm<sup>3</sup> de caldo tetracionato (véase 3.3) y también se incuba a 35°C durante  $24 \pm 2$ h.

### 6.3 Aislamiento de Salmonella

6.3.1 Con el asa circular de 3 mm se toma una porción del cultivo en caldo selenito-cistina y se siembra sobre la superficie de cada una de las siguientes placas con agar selectivo: a) agar sulfito de bismuto (véase 3, 4); b) agar xilosa lisina desoxicolato (véase 3.5); y c) agar entérico Hektoen (véase 3.6); la siembra debe efectuarse por estrias para obtener colonias separadas.

Continúa

6.3.2 Por aparte se hacen las mismas siembras con porciones del caldo tetrationato.

6.3.3 Se incuban las 6 placas a  $35^{\circ}\text{C}$  durante  $24 \pm 2\text{h}$ ; transcurrido el período de incubación se examinan las placas para detectar la presencia de colonias presuntivas de Salmonella, basándose en las siguientes características:

a) Agar sulfito de bismuto. Las colonias típicas de Salmonella, tienen una coloración que va desde color castaño oscuro a un color negro azabache, algunas veces con un brillo metálico. El medio circundante es generalmente castaño al principio pero después puede tornarse negro conforme avanza el período de incubación, produciendo el efecto llamado "halo". Algunas cepas pueden producir colonias verdes con o sin formación de un ligero halo.

Nota: Si en las placas con agar sulfito de bismuto no se desarrollan colonias típicas o presuntivas de Salmonella ni ningún otro desarrollo, se las debe incubar durante 24h adicionales y luego se examinan nuevamente.

b) Agar xilosa lisina desoxicolato. Colonias de color rosado con o sin un centro negro; muchos cultivos de Salmonella pueden tener centros negros, grandes y brillantes, o pueden presentarse como colonias casi completamente negras. Cultivos de Salmonella lactosa-positiva pueden producir colonias amarillas con o sin centros negros.

c) Agar entérico Hektoen. Colonias con una coloración azul verdoso a azul, con o sin centros negros; muchos cultivos de Salmonella pueden tener centros negros, grandes y brillantes o pueden presentarse como colonias casi completamente negras. En forma no típica unos pocos cultivos de Salmonella producen colonias amarillas con o sin centros negros.

6.3.4 De cada placa con agar selectivo, se seleccionan dos o más colonias típicas o presuntivas de Salmonella, si están presentes, y se inoculan en agar TSI (véase 3.7) y en agar LIA (véase 3.8), en la forma indicada a continuación: utilizando el asa en punta, previamente esterilizada, se toca suavemente el centro mismo de la colonia seleccionada y se inocula el agar TSI rayando la superficie inclinada y luego picando el fondo del medio; a continuación, y sin flamear el asa, se inocula el agar LIA picando 2 veces el fondo.

Nota. La descarboxilación de la lisina es una reacción estrictamente anaeróbica, por lo cual es necesario que el plano inclinado del agar LIA tenga un fondo profundo (aproximadamente 4 cm)

6.3.5 Se incuban los tubos de agar TSI a  $35^{\circ}\text{C}$  durante  $24 \pm 2\text{h}$ , y los tubos de agar LIA a la misma temperatura durante  $48 \pm 2\text{h}$ ; los tubos deben taparse en forma floja para mantener las condiciones aeróbicas durante la incubación con el objeto de prevenir la producción excesiva de  $\text{H}_2\text{S}$ .

6.3.6 Los cultivos típicos de Salmonella en el agar TSI producen un plano inclinado alcalino de color rojo y un fondo ácido de color amarillo, con o sin producción de  $\text{H}_2\text{S}$  (la producción de  $\text{H}_2\text{S}$  se evidencia por un ennegrecimiento del agar). En el agar LIA los cultivos típicos de Salmonella producen una reacción alcalina de color púrpura en el fondo del tubo; solamente cuando el fondo del tubo presenta una clara coloración amarilla se debe considerar ésta como una reacción ácida negativa.

Nota. Los cultivos en agar LIA que producen cambios de color en el fondo del tubo no deben ser eliminados solamente por este hecho, ya que muchos cultivos de Salmonella producen H<sub>2</sub>S en dicho agar.

6.3.7 Se vuelven a examinar las placas con agar sulfito de bismuto, incubadas durante 24 h adicionales (48 h en total), véase nota al numeral 6.3.3 (a), y se lleva a cabo el procedimiento descrito desde 6.3.4 a 6.3.6 inclusive.

6.3.8 Se separan todos los cultivos en agar TSI y en agar LIA que presenten un desarrollo presuntamente positivo para Salmonella (véase 6.3.6), y se ensayan para una identificación bioquímica.

Nota 1. No se deben excluir los cultivos que se presenten como negativos para Salmonella en el agar TSI, si su reacción en agar LIA es típica de Salmonella; dichos tubos deben tratarse como cultivos presuntamente positivos y deben ser sometidos a ulteriores ensayos de identificación bioquímicas.

Nota 2. El agar LIA es particularmente útil en la detección de Salmonella arizonae y cepas no características de Salmonella que utilizan lactosa y/o sacarosa.

6.3.9 Se deben realizar ensayos de identificación bioquímica e identificación serológica en la forma siguiente:

- a) En tres cultivos presuntivos en agar TSI obtenidos a partir del caldo selenito, y en tres cultivos presuntivos en agar TSI obtenidos a partir de caldo tetracionato.
- b) Si no se han aislado tres cultivos presuntamente positivos en agar TSI a partir de una serie de placas con agar selectivo, se deben ensayar, tanto bioquímica como serológicamente, otros cultivos presuntamente positivos en agar TSI que se hayan podido aislar. Se deben examinar como mínimo 6 cultivos en agar TSI por cada 25 g de muestra ensayada. Si el agar TSI no diera reacción típica de Salmonella, se deben seleccionar colonias adicionales a partir del agar selectivo que no dió cultivos presuntamente positivos.

## 6.4 Identificación de Salmonella

### 6.4.1 Cultivos mezclados

6.4.1.1 Si los cultivos en agar TSI (véase 6.3.4) se desarrollan como cultivos mezclados, se debe inocular el cultivo en la superficie de placas que contengan agar MacConkey (véase 3.9) o agar entérico Hektoen (véase 3.6) o bien, agar xilosa lisina desoxicolato (véase 3.5).

6.4.1.2 Se incuban las placas a 35°C durante 24 ± 2h y luego se examinan las placas para detectar la presencia de colonias presuntivas de Salmonella, basándose en las siguientes características:

- a) Agar MacConkey. Colonias típicas aparecen transparentes e incoloras, algunas veces con un centro oscuro.

Continúa



- b) Agar entérico Hektoen, véase 6.3.3 (c)
- c) Agar xilosa lisina desoxicolato, véase 6.3.3 (b)

6.4.1.3 Si se desarrollan colonias presuntivas de Salmonella, se seleccionan como mínimo 2 colonias y se inoculan tubos conteniendo agar TSI y agar LIA con plano inclinado, en la forma descrita en 6.3.4 y se continúa con el procedimiento descrito a partir de 6.3.5 en adelante.

#### 6.4.2 Cultivos puros

##### 6.4.2.1 Prueba de ureasa (convencional)

- a) Con un asa en punta esterilizada se inoculan tubos que contienen caldo de urea (véase 3.10) con cada cultivo presuntamente positivo desarrollado en agar TSI.
- b) Se incuban los tubos a 35 °C durante  $24 \pm 2$  h y luego se examinan: la reacción es positiva cuando el caldo de urea toma coloración rojo púrpura y es negativa cuando el caldo permanece sin cambio de color.

Nota. Ya que tubos no inoculados de caldo de urea desarrollan ocasionalmente una coloración rojo púrpura (ensayo positivo) durante el reposo, se debe incubar un tubo no inoculado de este caldo como un control.

- c) Se descartan los tubos que dieron reacción positiva y se conservan los tubos con reacción negativa para ensayos adicionales.

##### 6.4.2.2 Prueba de ureasa opcional (rápida)

- a) Con un asa circular de 3 mm se transfieren a tubos que contienen caldo de urea rápido (véase 3.11), 2 porciones de cada cultivo presuntamente positivo desarrollado en agar TSI.
- b) Se incuban los tubos en el baño de agua a  $37 \pm 0,5$  °C durante 2h, y se examinan: los tubos en que no hubo cambio de coloración, corresponden a reacción negativa.
- c) Se descartan los tubos con reacción positiva y se conservan los tubos con reacción negativa para ensayos adicionales.

6.4.2.3 Prueba serológica de antígeno flagelar (H). Si los cultivos presuntamente positivos en agar TSI son muy numerosos y se considera necesario reducir este número antes de proceder con otros ensayos bioquímicos, se debe realizar una prueba serológica separatoria con antígeno flagelar (H). A estas alturas del procedimiento, esta prueba separatoria ("screening test"), es opcional; si únicamente se tienen relativamente pocos cultivos presuntamente positivos, se procede directamente como se indica en 6.4.2.5, en caso contrario se procede en la forma siguiente:

6.4.2.3.1 El cultivo de cada agar TSI que resultó negativo con la prueba de ureasa (véase 6.4.2.1 y 6.4.2.2) se inocula en un tubo conteniendo 5 cm<sup>3</sup> de uno de los siguientes caldos de cultivo:

Continúa

- a) Caldo de infusión cerebro-corazón (véase 3.12), se incuba a 35°C durante 4 a 6 h, hasta que ocurra un desarrollo visible; este cultivo es para realizar la prueba en el mismo día, o bien
- b) Caldo de tripticasa soya-triptosa (véase 3.13), se incuba a 35°C durante 24 ± 2 h; este cultivo es para realizar la prueba al día siguiente.

6.4.2.3.2 A cada tubo incubado según el paso anterior, se agregan 2,5 cm<sup>3</sup> de la solución salina fisiológica formalinizada (véase 3.14)

6.4.2.3.3 Se seleccionan dos cultivos de caldo formalinizado y se ensayan con antisuero polivalente flagelar (H) para Salmonella, en la forma siguiente:

- a) En un tubo de ensayo serológico (véase 4.17) se coloca 0,5 cm<sup>3</sup> del antisuero apropiadamente diluido
- b) Se agregan 0,5 cm<sup>3</sup> del antígeno que se está ensayando (6.4.2.3 (b)).
- c) Se prepara un control salino mezclando 0,5 cm<sup>3</sup> de la solución salina fisiológica formalinizada con 0,5 cm<sup>3</sup> del antígeno.
- d) Se incuban las mezclas en el baño de agua regulado a 48-50°C durante 1 h; se observa cada mezcla a intervalos de 15 min y se lee el resultado final transcurrida la hora de incubación.
  - El resultado es positivo si se produce aglutinación en la mezcla de ensayo pero no en el control;
  - El resultado es negativo si no hay aglutinación en la mezcla de ensayo ni en el control; y
  - Se designa como resultado no específico cuando tanto en la mezcla de ensayo como en el control se produce aglutinación; los cultivos que dan un resultado no específico, se deben ensayar con antisuero Spicer-Edwards, véase 6.4.2.4.

6.4.2.4 Prueba serológica de Spicer-Edwards. Esta prueba puede ser usada en reemplazo de la prueba serológica de antígeno flagelar (H) (prueba separatoria o "screening test"); también puede ser usada en aquellos cultivos que sometidos a la prueba serológica de antígeno flagelar (H) dieron resultado no específico.

- a) La prueba se realiza en la forma indicada en 6.4.2.3.3 (a) a (d), usando antisuero flagelar (H) Spicer-Edwards en reemplazo del antisuero polivalente flagelar (H) para Salmonella.
- b) Cada tubo que resulte positivo para esta prueba debe someterse a los ensayos bioquímicos adicionales indicados en 6.4.2.5.1, 6.4.2.5.2 y 6.4.2.5.3.

Continúa

- c) Si ambos cultivos de caldo formalinado son negativos se debe realizar ensayos serológicos en cuatro cultivos adicionales. Si es posible, se obtienen dos cultivos positivos para ensayos bioquímicos adicionales; véase 6.4.2.5.1, 6.4.2.5.2 y 6.4.2.5.3.
- d) Si todos los cultivos en TSI que dieron prueba negativa a la ureasa, dan también resultados negativos para la prueba serológica flagelar (H); se deben realizar en cada uno de ellos, las pruebas bioquímicas adicionales indicadas en 6.4.2.5.1, 6.4.2.5.2 y 6.4.2.5.3.

6.4.2.5 Cultivos con resultado negativo en la prueba de ureasa. Estos cultivos se deben someter a las siguientes pruebas bioquímicas y serológicas adicionales.

6.4.2.5.1 Caldo de lisina decarboxilasa, (véase 3.17)

- a) Se inocula el caldo con una pequeña cantidad del cultivo desarrollado en el agar TSI que resultó presuntivo para Salmonella
- b) Se tapa el tubo en forma hermética y se incuba a 35°C durante  $96 \pm 2$ h, pero examinándolo a intervalos de 24 h.
- La Salmonella causa una reacción alcalina, evidenciada por una coloración púrpura en todo el medio.
  - La prueba es negativa cuando todo el medio toma coloración amarilla.
  - Si el medio se presenta coloreado pero no en rojo ni en amarillo, se agregan unas gotas de la solución al 0,2% de púrpura de bromocresol (véase 3.18) y se vuelven a leer las reacciones de los tubos.

6.4.2.5.2 Caldo rojo fenol dulcitol, (véase 3.19) o caldo base púrpura con 0,5% de dulcitol, (véase 3.20)

- a) Se inocula el caldo con una pequeña cantidad del cultivo desarrollado en el agar TSI
- b) Se tapa el tubo en forma floja y se incuba a 35°C durante  $48 \pm 2$ h, pero haciendo un primer examen después de 24h.
- La mayoría de los cultivos de Salmonella dan prueba positiva evidenciada por la formación de gas en el interior del tubo de fermentación y un medio de pH ácido y color amarillo. La producción únicamente de ácido ya se interpreta como una reacción positiva.
  - La prueba negativa se reconoce por la falta de formación de gas en el interior del tubo de fermentación y un medio de color rojo cuando se usa rojo fenol como indicador, o de color púrpura cuando se usa púrpura de bromocresol como indicador.

6.4.2.5.3 Caldo triptofano, (véase 3.21)

- a) Se inocula el caldo con una pequeña cantidad del cultivo desarrollado en el agar TSI

Continúa

b) Se incuba a 35°C durante  $24 \pm 2$ h y luego se procede en la forma siguiente:

i) Caldo KCN, (véase 3.22)

Con el asa circular de 3 mm se transfiere una porción del cultivo desarrollado en el caldo triptofano al caldo KCN. Se calienta el borde del tubo con el objeto de obtener un buen selló cuando el tubo sea tapado con el corcho recubierto con parafina; se incuba a 35°C durante  $48 \pm 2$ h pero haciendo un primer examen después de 24h.

Se interpreta el resultado como positivo cuando hay turbidez del medio; la mayoría de las cepas de Salmonella no se desarrollan en este medio lo cual se evidencia por la falta de turbidez.

ii) Caldo malonato, (véase 3.23)

Con el asa circular de 3 mm se transfiere una porción del cultivo desarrollado en el caldo triptofano al caldo malonato. Se incuba a 35°C durante  $48 \pm 2$ h pero haciendo un primer examen después de 24h; la mayor parte de los cultivos de Salmonella dan un resultado negativo evidenciado por un color verde o por ningún cambio de color en el medio.

Nota. Ya que tubos no inoculados de caldo malonato desarrollan ocasionalmente una coloración azul (ensayo positivo) durante el reposo, se debe incubar un tubo no inoculado de este caldo como un control.

iii) Prueba de Indol

Se transfieren  $5 \text{ cm}^3$  del cultivo en caldo de triptofano luego del período de incubación, a un tubo de ensayo vacío y se agrega 0,2 a  $0,3 \text{ cm}^3$  del reactivo Kovacs (véase 3.24); la mayor parte de los cultivos de Salmonella dan un resultado negativo evidenciado por la ausencia de color rojo oscuro en la superficie del caldo. Los resultados intermedios con una coloración que varía de naranja a rosada se registran como  $\pm$ .

6.4.2.6 Si anteriormente no se llevó a cabo la prueba serológica de antígeno flagelar (H) (véase 6.4.2.3), ni la prueba serológica de Spicer-Edwards (véase 6.4.2.4), como pruebas separatorias ("screening test"), entonces en este momento se pueden llevar a cabo cualquiera de estas dos pruebas serológicas.

6.4.2.7 Se deben descartar como Salmonella negativo cualquier cultivo que muestre cualquiera de las dos posibilidades indicadas a continuación:

- a) Un resultado positivo para la prueba de Indol (6.4.2.5.3 (b) iii), y un resultado negativo para la prueba serológica de antígeno flagelar (H) (6.4.2.3 y 6.4.2.4) o bien,
- b) Un resultado positivo para la prueba con KCN (6.4.2.5.3 (b) i), y un resultado negativo para la prueba con lisina decarboxilasa (6.4.2.5.1)

6.4.2.8 Pruebas serológicas de antígeno somático (O). Se pre-ensayan todos los antisueños para Salmonella con cultivos conocidos.

6.4.2.8.1 Prueba de antígeno polivalente somático (O)

- a) Con un lápiz de cera se marcan 2 secciones rectangulares de 1 cm x 2 cm cada una, en el interior de una placa de petri.
- b) Utilizando el asa circular de 3 mm se toma una porción, equivalente a la mitad de su sección circular, del cultivo desarrollado en agar TSI luego de 24 a 48 h de incubación, y se coloca sobre la placa en la porción más alta de cada sección rectangular marcada con el lápiz.
- c) Se agrega una gota de solución salina (véase 3.25) en la parte inferior de solo una de las secciones y se emulsifica el cultivo en la solución salina con el asa circular esterilizada o con el asa en punta esterilizada.
- d) Se agrega 1 gota del antisuero polivalente somático (O) para Salmonella a la otra sección solamente, y se mezcla con el asa previamente esterilizada.
- e) Se mueven las mezclas con un movimiento hacia atrás y hacia adelante durante 1 min y luego se observan contra un fondo oscuro y con buena iluminación; se considera como reacción positiva cualquier grado de aglutinación.
- f) Se clasifican los resultados de esta prueba como se indica a continuación:
  - Positiva: aglutinación en el antisuero pero no en el control salino
  - Negativa: ni el antisuero ni el control salino presentan aglutinación
  - No específica: aglutinación tanto en el antisuero como en el control salino; en este caso se deben realizar ensayos bioquímicos y serológicos adicionales

6.4.2.8.2 Pruebas para los grupos de antígenos somáticos (O)

- a) Se procede en la misma forma descrita anteriormente en 6.4.2.8.1 (a) a (f) con la diferencia que en vez del antisuero polivalente somático (O) para Salmonella, se usan antisueños individuales del grupo somático (O), incluyendo el antisuero Vi si estuviera disponible.
- b) Los cultivos que dan una aglutinación positiva con cualquier antisuero somático (O) individual, se registran como positivos para ese grupo.
- c) Los cultivos que no reaccionan con ningún antisuero somático (O) individual, se registran como negativos para ese grupo.

6.4.2.8.3 Pruebas para el antígeno somático (O) Vi. Los cultivos que anteriormente dieron reacción de aglutinación positiva para el antisuero Vi se pueden ensayar en la forma siguiente para una identificación más completa.

- a) En 1 cm<sup>3</sup> de solución salina fisiológica (véase 3.25) se suspende y emulsifica suficiente cantidad del cultivo desarrollado sobre el plano inclinado de agar TSI para hacer una suspensión espesa; se coloca la suspensión en un baño de agua hirviendo durante 20 a 30 min y luego se deja enfriar.
- b) Se ensaya nuevamente la suspensión calentada, en la forma indicada en 6.4.2.8.1 (a) a (f) pero usando antisueros somáticos del grupo D, C<sub>1</sub> y V<sub>i</sub>.
- c) Los cultivos V<sub>i</sub> positivos que reaccionan con antisuero del grupo somático D son probablemente Salmonella typhi, y los cultivos V<sub>i</sub> positivos que reaccionan con el antisuero del grupo somático C<sub>1</sub> son probablemente Salmonella paratyphi C. Para que estos cultivos sean clasificados como Salmonella sp. deben tener las características de Salmonella descritas en la tabla 1.
- d) Los cultivos calentados V<sub>i</sub> positivos los cuales no reaccionan con ningún suero somático individual pero de nuevo reaccionan con antisuero V<sub>i</sub> no son Salmonella.

Tabla 1. Reacciones bioquímicas y serológicas de Salmonella

Ensayo o sustrato	Positiva	Negativa	Reacción de Salmonella (1)
Glucosa TSI	Fondo amarillo	Fondo rojo	+
H <sub>2</sub> S TSI	Ennegrecimiento	No ennegrecimiento	+
Ureasa	Color púrpura-rojo	Ningún cambio de color	-
Caldo lisina decarboxilasa	Color púrpura	Color amarillo	+
Caldo rojo fenol dulcitol	Gas; color amarillo	Gas ausente; ningún cambio de color	+(2)
Caldo KCN	Turbidez	Sin turbidez	-
Caldo malonato	Color azul	Ningún cambio de color	-(3)
Prueba de Indol	Superficie color violeta	Superficie color amarilla	-
Ensayo flagelar polivalente	Aglutinación	Sin aglutinación	+
Ensayo somático polivalente	Aglutinación	Sin aglutinación	+
Caldo rojo fenol lactosa	Gas; color amarillo	Gas ausente; ningún cambio de color	-(3)

Continúa

Tabla 1. Reacciones bioquímicas y serológicas de *Salmonella* (conclusión)

Ensayo o sustrato	Positiva	Negativa	Reacción de <i>Salmonella</i> (1)
Caldo rojo fenol sacarosa	Gas; color amarillo	Gas ausente; ningún cambio de color	-
Prueba Voges-Proskauer	Color rosado a rojo	Ningún cambio de color	-
Prueba rojo de metilo	Color rojo difuso	Color amarillo difuso	+
Citrato de Simmon	Crecimiento; color azul	Sin crecimiento; ningún cambio de color	v (4)

(1) + = 90% o más positiva en uno o dos días

(1) - = 90% o más negativa en uno o dos días

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

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

(4) = Variable

6.4.2.9 Ensayos bioquímicos adicionales. Si un cultivo no pudo ser identificado ya sea como *Salmonella* o como *Salmonella*-negativo, sobre la base de los ensayos bioquímicos y serológicos precedentes (véase Tabla 1), se efectúan uno o más de los siguientes ensayos bioquímicos adicionales.

6.4.2.9.1 Caldo rojo fenol lactosa (véase 3.30) o caldo púrpura lactosa (véase 3.31)

a) Se inocula el caldo con una pequeña cantidad de cultivo desarrollado en el agar TSI, incubado de 24 a 48 h, que no se pudo identificar.

b) Se incuba a 35°C durante 48 ± 2h, pero haciendo un primer examen a las 24h.

- La reacción positiva se evidencia por la producción de ácido con coloración amarilla y producción de gas en el interior del tubo de fermentación; la producción únicamente de ácido ya se interpreta como una reacción positiva. La mayoría de los cultivos de *Salmonella* dan reacción negativa a esta prueba.

- La reacción negativa se evidencia por la no formación de gas en el interior del tubo de fermentación y por un medio de color rojo cuando se usa indicador rojo fenol, o un medio de color púrpura cuando se usa púrpura de bromocresol como indicador; la mayoría de los cultivos de *Salmonella* dan reacción negativa a esta prueba.

c) Se descartan como *Salmonella*-negativo los cultivos que dieron reacción positiva a la prueba de lactosa exceptuando:

- Los cultivos que dieron planos inclinados ácidos en el agar TSI y reacciones positivas en el agar LIA;

Continúa

- Los cultivos que dieron reacciones positivas en el caldo malonato.

Nota. Se deben efectuar ensayos ulteriores sobre estos cultivos para determinar si ellos corresponden a Salmonella arizonae.

#### 6.4.2.9.2 Caldo rojo fenol sacarosa (véase 3.32) o caldo púrpura sacarosa (véase 3.33)

- Se sigue el procedimiento descrito en 6.4.2.9.1 (a) y (b)
- Se descartan como Salmonella negativos los cultivos que dieron reacción positiva a la prueba de sacarosa, excepto aquellos que dieron plano inclinado ácido en el agar TSI y reacción positiva en el agar LIA.

6.4.2.9.3 Caldo glucosa tamponado (caldo MR-VP), (véase 3.34). Se inocula el medio con una pequeña cantidad de cada cultivo que no pudo ser identificado como presuntivo para Salmonella en el agar TSI, y se incuba a 35°C durante 48 ± 2h. Luego se realiza la prueba de Voges-Proskauer (prueba VP) en la forma siguiente:

- A un tubo de ensayo se transfiere 1 cm<sup>3</sup> del cultivo incubado 48 h, se agregan 0,6 cm<sup>3</sup> de solución de α-naftol (véase 3.35) y se agita bien.
- Se agregan 0,2 cm<sup>3</sup> de solución al 40% de KOH (véase 3.36) y se agita; opcionalmente se adicionan unos pocos cristales de creatina para acelerar la reacción y se lee el resultado luego de 4h.
  - La prueba es positiva si se desarrolla un color rosado a rojo rubí a través del medio.
  - La prueba es negativa si no se desarrolla una coloración rosada a rojo rubí a través del medio; la mayoría de los cultivos de Salmonella dan una reacción negativa a esta prueba
- Se incuban los remanentes del medio MR-VP a 35°C durante 48h adicionales, y luego se lleva a cabo la prueba del rojo de metilo indicada a continuación.
- Prueba del rojo de metilo. A los remanentes del medio MR-VP incubados durante 96h, se les agregan 5 a 6 gotas del indicador rojo de metilo (véase 3.38) y se leen los resultados inmediatamente.
  - La prueba es positiva si se desarrolla un color rojo difuso en el medio; la mayoría de los cultivos de Salmonella dan un resultado positivo a esta prueba.
  - La prueba es negativa si se desarrolla un claro color amarillo en el medio.
- Se descartan como Salmonella negativos los cultivos que dan un ensayo positivo para la prueba con KCN y para la prueba VP, y un resultado negativo para la prueba de rojo de metilo.

#### 6.4.2.9.4 Agar citrato de Simmon, (véase 3.39)

- Empleando un asa en punta que contenga cultivo no identificado en agar TSI, se inocula el agar citrato de Simmon rayando el plano inclinado y picando el fondo del tubo.



b) Se incuba a 35°C durante  $96 \pm 2$ h, pero se examina a intervalos de 24h.

- La prueba es positiva si hay crecimiento del cultivo, generalmente acompañado de un cambio de color del verde al azul; la mayoría de los cultivos de Salmonella son citrato-positivos.
- La prueba es negativa si no hay crecimiento del cultivo ni cambio de color

6.4.2.10 Tratamiento de los cultivos que dieron un resultado negativo con la prueba de antígeno flagelar (H). Si las reacciones bioquímicas de un determinado cultivo negativo para el antígeno flagelar (H), son tales que se considera firmemente como Salmonella presuntiva, siendo posible que la aglutinación flagelar negativa haya sido causada por organismos no móviles o por un desarrollo insuficiente del antígeno flagelar, entonces se procede como sigue:

#### 6.4.2.10.1 Prueba de movilidad

- a) Usando una pequeña cantidad del cultivo desarrollado en agar TSI, se inocula el medio para la prueba de movilidad (véase 3.40) en una placa de Petri, picándolo solo una vez aproximadamente a 10 mm del borde de la placa y a una profundidad de 2 a 3 mm; no se debe picar el fondo de la placa o inocular ninguna otra porción.
- b) Se incuba a 35°C durante 24h, se examina la placa y si los organismos han migrado 40 mm o más, se procede a un nuevo ensayo como se indica a continuación.
  - i) Con el asa circular se transfiere una porción del cultivo que migró más lejos, al caldo tripticasa soya-triptosa, véase 3.13; y
  - ii) Se repite la prueba serológica de antígeno polivalente flagelar (H), (véase 6.4.2.3) o bien la prueba serológica de Spicer-Edwards, (véase 6.4.2.4)
- c) Si los cultivos no son móviles después de las primeras 24h, se los incuba a 35°C durante un período adicional de 24h y si aún no hay movilidad, se los incuba hasta 5 días a 25°C; se clasifican los cultivos como no móviles si aún después de los ensayos anteriores el resultado es negativo.
- d) Se recomienda enviar el cultivo a un laboratorio de referencia para su tipificación definitiva.

## 7. EXPRESION DE LOS RESULTADOS

Los resultados se expresan de acuerdo a las siguientes posibilidades:

7.1 Si después de realizar las diferentes operaciones descritas en la presente norma no se detecta Salmonella, se informará en la forma siguiente: "No se encontró Salmonella en 25 g de material examinado."

Continúa

7.2 Si se detecta Salmonella, se informará en la forma siguiente: "Se encontró Salmonella en 25 g de material examinado".

7.3 Si se realizó tipificación serológica, se informará en la forma siguiente: "La Salmonella identificada pertenece a los siguientes tipos.....".

## 8. INFORME DEL ENSAYO

En el informe del ensayo debe indicarse lo siguiente:

8.1 Los métodos usados y el resultado final.

8.2 Cualquier condición no especificada en esta norma o señalada como opcional, así como cualquier circunstancia que pueda haber influido en el resultado.

8.3 El nombre exacto del centro de referencia que ayudó a identificar las cepas de Salmonella, si las hubo.

8.4 Todos los detalles necesarios que permitan la completa identificación de la muestra.

## 9. CORRESPONDENCIA

Para la preparación de la presente norma se ha tenido en cuenta lo siguiente :

- a) El método "Aislamiento e Identificación de Salmonella", descrito en el "Bacteriological Analytical Manual, Food and Drug Administration, Bureau of Foods, Division of Microbiology", Agosto 1978; y
- b) Los métodos 46.054 a 46.067 descritos en "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists", 13a. Edición 1980.