



DOCUMENTO GENERAL

Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

METODOLOGÍA DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS DE PATÓGENOS HUMANOS EN LOTES DE PRODUCCIÓN DE PRODUCTOS MICROBIANOS DE CONTROL DE PLAGAS

Tabla de contenidos


1. Ámbito de aplicación:.....	4
2. Métodos para la identificación de coliformes y <i>Escherichia coli</i>	4
2.1 Método Técnica Petrifilm AOAC Official Method 991.14.	4
2.2 Protocolos descritos para la identificación de coliformes, coliformes fecales y <i>Escherichia coli</i> por el procedimiento de BAM de la FDA.	6
3. Métodos para la detección de <i>Listeria monocytogenes</i> en PMCP	13
3.1 Método screening VIDAS® <i>L. monocytogenes</i> Xpress (VIDAS® LMX) o Vidas® LMO.....	13
3.2 Identificación rápida alternativa.....	14
3.3 Identificación de <i>L. monocytogenes</i> por el procedimiento de BAM de la FDA	14
3.4 Enumeración (optativo).....	21
4. Métodos de detección de <i>Salmonella</i> en PMCP.....	23
4.1 Método Screening VIDA EASY SLM AFNOR BIO 12/16-09/05.....	23
4.2 Método ISO6579:2002 de detección y cuantificación de <i>Salmonella</i> ssp.26	
5. Métodos para detección de <i>Shigella</i> spp.	40
5.1 Método de detección rápida de <i>Shigella</i> sp. mediante PCR	40
5.2 Aislamiento e identificación de las presuntas colonias de aislados de <i>Shigella</i> mediante sistema API®20E.....	42
5.3 Protocolos descritos para la identificación de <i>Shigella</i> spp. por el procedimiento de BAM de la FDA.....	42
6. Método de detección de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	49
6.1 Fundamento.....	49
6.2 Reactivos y medios de cultivos.....	49
6.3 Instrumental.....	50
6.4 Cepas de referencia para la evaluación de <i>P. aeruginosa</i>	50
6.5 Procedimientos.....	50
6.7 Cuantificación de <i>P. aeruginosa</i>	53



DOCUMENTO GENERAL

Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

7. Métodos para la detección de <i>Vibrio</i> spp.	55
7.1 Cepas de referencia:	55
7.2 Método de detección rápida de muestras de PMCP	55
7.3 Protocolos descrito por BAM de la FDA para la identificación de <i>Vibrio</i> spp.	57
7.4 Procedimiento para la detección de <i>V. cholerae</i>	58
7.5 Detección por PCR de <i>V. cholerae</i>	61
7.6 Protocolos descrito por BAM de la FDA para la identificación de <i>V. parahaemolyticus</i>	62
7.7 Identificación por PCR multiplex de <i>V. parahaemolyticus</i>	65
7.8 Protocolos descrito por BAM de la FDA para la identificación de <i>V. vulnificus</i>	66
8. Métodos para la detección <i>Staphylococcus aureus</i> en PMCP	70
8.1 Justificación	70
8.2 Método detección rápida de <i>S. aureus</i> en muestras de PMCP.....	70
8.3 Procedimiento	70
8.4 Protocolos descrito por BAM de la FDA para la identificación de <i>S. aureus</i>	71
9. Medios de cultivos y reactivos	75

	DOCUMENTO GENERAL
	Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

1. **Ámbito de aplicación:**

El objetivo de este instructivo es describir protocolos de estándar internacional para la detección e identificación de patógenos humanos en PMCP en el marco de la Resolución Exenta del Servicio N° 9.074 de 2018.

La **detección de patógenos humanos generará el rechazo del PMCP** para garantizar la seguridad y calidad del producto que se empleará en la producción vegetal.

2. **Métodos para la identificación de coliformes y *Escherichia coli***

El procedimiento de diagnóstico a utilizar por el laboratorio puede ser uno, o más de uno, de los siguientes métodos:

- a. Método Técnica Petrifilm AOAC Official Method 991.14.
- b. Metodología de detección y cuantificación descrita en el capítulo 4 del Manual de Análisis Bacteriológico (BAM) de la FDA.

2.1 Método Técnica Petrifilm AOAC Official Method 991.14.

2.1.1 Fundamento


La placa de 3M Petrifilm ® Recuento de *E.coli* y Coliformes (EC), constituyen un sistema listo para usar que contiene elementos nutritivos de Violeta Rojo Bilis (V.R.B.), un agente gelificante soluble en agua, un indicador de la actividad glucuronidasa (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucuronido) (BCIG) y un indicador de tetrazolio que facilita la enumeración de colonias.

2.1.2 Reactivos y soluciones

- a. Tampón fosfato o fosfato de solución de fosfato Butterfield
- b. Placa de 3M Petrifilm ® Recuento de *E.coli* y Coliformes (placa Petrifilm EC)

2.1.3 Instrumental

- a. Balanza granataria
- b. Estufa de cultivo 35°±1°C
- c. Agitador de tubos o vortex
- d. Autoclave para medios, tampones y material limpio
- e. Autoclave para descontaminación
- f. Agitador orbital o Stomacher dependiendo del tamaño de la muestra
- g. Agitador
- h. Refrigerador
- i. Gabinete de Bioseguridad
- j. Congelador
- k. Microscopio
- l. Aplicador Petrifilm®
- m. Contador de colonias o equivalente

	DOCUMENTO GENERAL
	Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

2.1.4 Cepas de referencia para la evaluación de *E. coli*

Se utilizarán como estándares cepas ATCC o de colecciones de referencia de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Enterobacter aerogenes*, las cuales deben ser mantenidas y utilizadas de acuerdo con lo señalado en la Norma Chilena 2726.

2.1.5 Procedimiento

- a. El muestreo debe ser realizado a 5 lotes de producción.
- b. Pesar 50 g de PMCP
- c. Añadir 450 mL de tampón fosfato y homogenizar en agitador orbital o Stomacher por 2 min. Si hay disponibles <50 g de muestra, pese la porción que sea equivalente a la mitad de la muestra y agregue un volumen suficiente de diluyente estéril para hacer unas diluciones seriadas (1:10).
- d. Colocar la placa Petrifilm para Recuento de *E.coli* y coliformes, en una superficie plana.
- e. Levantar el film superior y colocar 1 mL de la muestra o su dilución en el centro del film inferior.
- f. Bajar con cuidado el film superior sobre la muestra evitando que se formen burbujas de aire.
- g. Colocar el aplicador con la cara lisa hacia abajo en el centro de la placa.
- h. Presionar ligeramente el centro del aplicador para distribuir la muestra uniformemente.
- i. Distribuir el inóculo por toda el área de crecimiento del Petrifilm antes de que se forme el gel.
- j. Sacar el aplicador y dejar la placa en reposo durante al menos un minuto para que el gel se solidifique.
- k. Por cada dilución existente sembrar una o dos placas.
- l. Incubar las placas en posición horizontal, cara arriba, en pilas de hasta 20 placas.
- m. Incubar las placas Petrifilm EC para lectura de *E. coli* durante 48 h \pm 4 h a 35°C \pm 1°C.

2.1.6 Resultados e interpretación

- a. El recuento de las placas Petrifilm EC puede hacerse en un contador estándar de colonias o equivalente. No contar las colonias desarrolladas sobre la zona blanca ya que no están bajo la influencia selectiva del medio. No contar las burbujas presentes debidas a artefactos.
- b. Para obtener el recuento de *E.coli* confirmados, se deben enumerar las colonias azules a rojo-azuladas asociadas a gas atrapado, independientemente del tamaño o intensidad de color. Las colonias azules sin gas no se cuentan como *E. coli*.
- c. Las colonias rojas y asociadas a burbujas de gas corresponden a Coliformes, por lo tanto no deberán ser consideradas dentro del recuento final de *E.coli*.
- d. El área de crecimiento circular del Petrifilm es aproximadamente de 20 cm². Pueden realizarse estimaciones en placas que contengan más de 150 colonias contando el número de colonias en uno o más cuadrados representativos y obteniendo el promedio. Multiplicar dicho número por 20 para obtener el recuento total por placa.
- e. Las placas Petrifilm EC con una cantidad de colonias muy numerosa para contar tienen una o más de las siguientes características: muchas colonias pequeñas, muchas burbujas de gas y un oscurecimiento del color del gel, ya que las altas

Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

concentraciones de *E.coli* causarán que el área de crecimiento se vuelva azul mientras que altas concentraciones de coliformes (no *E.coli*) causarán que el área de crecimiento se torne de un rojo oscuro.

- f. Si se requiere, las colonias pueden aislarse para una posterior identificación. Levantar el film superior y seleccionar la colonia del gel. Proceder al análisis siguiendo los métodos estándar.
- g. Si no es posible realizar el recuento después de terminada la incubación, las placas pueden conservarse en congelación a temperaturas bajo o igual a los -15°C por un máximo de una semana, para efectuar el conteo. Esto es sólo para casos de emergencia, no se debe establecer como procedimiento rutinario.
- h. El cálculo del recuento y la expresión de los resultados se realiza de la siguiente forma:
 - i. Seleccionar las placas que presenten un rango de conteo entre 15 – 150 colonias,
 - j. En caso de realizar diluciones en duplicado se deben promediar el número de colonias encontradas en ambas placas de la misma dilución y multiplicar por el inverso de la dilución. En caso de realizar sólo una placa en diluciones consecutivas, registrar el número de colonias de cada dilución, multiplicar por el inverso de la dilución y luego determinar el promedio del recuento bacteriano entre ambas diluciones.
 - k. Para el Recuento de *E. coli* los valores se informarán de acuerdo al número entero obtenido sin cambios y sin aproximaciones (ejemplo: 333, 90, 16 etc.).
 - l. En el caso de valores obtenidos sobre o bajo el rango deben ser informados como Recuento Estimado en Placa (RESP).
 - m. En caso de recuentos incontables se informará como muy numeroso para contar (MNPC).
 - n. En caso de no obtener desarrollo en las placas se debe informar de acuerdo al límite de detección de la técnica:

< 1 UFC/g o 1 UFC/mL → Muestras en dilución directa (10^0).

< 10 UFC/g o 10 UFC/mL → Muestras en dilución 10^{-1} .

2.2 Protocolos descritos para la identificación de coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli* por el procedimiento de BAM de la FDA.

2.2.1 Fundamento

Inicialmente *E. coli* se empleó como indicador de contaminación fecal debido a que esta especie es abundante en las heces humanas y animales y no se encuentra generalmente en otros nichos. Aunque el concepto de usar *E. coli* como un indicador indirecto de riesgo para la salud era sólido, su empleo fue complicado en la práctica debido a la presencia de otras bacterias entéricas como *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter* que también pueden fermentar la lactosa y son similares a *E. coli* en características fenotípicas, por lo que no se distinguen fácilmente. Como resultado, el término "coliforme" fue acuñado para describir este grupo de bacterias entéricas. Coliforme no es una clasificación taxonómica, sino una definición de trabajo utilizada para describir un grupo de bacterias anaeróbicas facultativas Gram negativas que fermentan la lactosa para producir ácido y gas a 35°C dentro de 48h de incubación. En 1914, el Servicio de Salud Pública de EE. UU. adoptó la denominación de coliformes como un estándar de importancia sanitaria.

Aunque los coliformes eran fáciles de detectar, su asociación con la contaminación fecal era cuestionable porque algunos coliformes se encuentran naturalmente en muestras ambientales. Esto condujo a la introducción del término coliformes fecales como indicador de contaminación.

La coliforme fecal, es un subconjunto de coliformes totales que crece y fermenta la lactosa a una temperatura de incubación elevada, por lo tanto, también se conoce como coliformes termotolerantes. Los análisis de coliformes fecales se realizan a 45,5 ° C para las pruebas de alimentos. El grupo de coliformes fecales consiste principalmente en *E. coli*, pero algunas otras bacterias entéricas como *Klebsiella* también pueden fermentar la lactosa a estas temperaturas y, por lo tanto, pueden considerarse coliformes fecales. La inclusión de *Klebsiella* spp. en la definición de coliformes fecales disminuyó la correlación de este grupo con la contaminación fecal. Como resultado, *E. coli* ha resurgido como un indicador, en parte facilitado por la introducción de métodos más nuevos que pueden identificarla rápidamente.

Actualmente, se utilizan los 3 criterios como indicadores, pero en diferentes aplicaciones. La detección de coliformes se usa como un indicador de la calidad sanitaria del agua o como un indicador general de la condición sanitaria en el entorno de procesamiento de alimentos. Los coliformes fecales siguen siendo el indicador estándar de elección para los mariscos y las aguas de cosecha de mariscos; y *E. coli* se usa para indicar contaminación fecal reciente o procesamiento insalubre. Casi todos los métodos empleados para detectar *E. coli*, coliformes totales o coliformes fecales son métodos de enumeración que se basan en la fermentación de lactosa.

2.2.2 Medios y reactivos

La descripción de la composición de los medios de cultivos o reactivos está en la sección 9.

- a. Caldo de verde brillante-bilis-lactosa (BGLB), 2%
- b. Caldo de lauril triptosa (LST)
- c. Caldo de lactosa
- d. Caldo EC
- e. Agar eosina-azul de metileno (L-EMB) de Levine
- f. Caldo de triptona
- g. Caldo MR-VP
- h. Caldo de citrato de Koser
- i. Agar de conteo (AC) (métodos estándar)
- j. Tampón fosfato o fosfato de solución de fosfato Butterfield.
- k. Reactivo de Kovacs
- l. Reactivos Voges-Proskauer
- m. Kit de reactivos de tinción de Gram
- n. Indicador rojo de metilo
- o. Agar bilis rojo violeta (VRBA)
- p. Agar VRBA-MUG
- q. Medio EC-MUG
- r. Caldo de lauril triptosa MUG (LST-MUG)
- s. Diluyente de peptona, 0.5%

2.2.3 Equipos y materiales

- a. Baño de agua con sistema de circulación para mantener la temperatura de 44,5 ± 0,2 °C. El nivel del agua debe estar por encima de los tubos sumergidos.
- b. Termómetro de inmersión, 1-55 °C, aproximadamente 55 cm de largo, con subdivisiones de 0,1 °C, certificado por el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST), o equivalente.
- c. Incubadora, 35 ± 1,0 °C.
- d. Balanza con capacidad > 2 kg y sensibilidad de 0,1 g.
- e. Pipetas graduadas estériles, 1,0 y 10,0 mL.

- f. Utensilios estériles para el manejo de muestras
- g. Botellas de dilución de vidrio de borosilicato, con tapa rosca de polietileno y con revestimientos de teflón.
- h. Contador de colonias de Quebec, o equivalente, con lupa
- i. Luz UV de onda larga [~ 365 nm], que no exceda los 6 W.
- j. Medidor de pH

2.2.4 Cepas de referencia para la evaluación de *E. coli*

Se utilizarán como estándares cepas ATCC o de colecciones de referencia de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Enterobacter aerogenes*, las cuales deben ser mantenidas y utilizadas de acuerdo con lo señalado en la Norma Chilena 2726.

2.2.5 Procedimientos

2.2.5.1 NMP: prueba de presunción para coliformes fecales y *E. coli*

- a. Pesar 50 g o medir 50 mL de PMCP.
- b. Añadir 450 mL de tampón fosfato y homogenizar en agitador orbital o Stomacher por 2 min. Si hay disponibles <50 g o mL de muestra, medir la porción que sea equivalente a la mitad de la muestra y agregar un volumen suficiente de diluyente estéril para hacer una dilución 1:10. Preparar diluciones decimales con tampón fosfato estéril.
- c. Agitar todas las suspensiones 25 veces en arco de 30 cm o mezclar mediante vortex durante 7 s. Emplear al menos 3 a 5 diluciones consecutivas, inocular una alícuota de 1 mL de cada dilución a 3 a 5 tubos con caldo LST (o caldo lactosa) para realizar un análisis de número más probable (NMP). Para una mejor precisión, usar una pipeta de 1 mL o 5 mL para la inoculación. No usar pipetas que entreguen un volumen <10% de su capacidad total; p.ej. una pipeta de 10 mL para administrar 0,5 mL. Mantenga la pipeta en ángulo para que su borde inferior descansa contra el tubo. No deben transcurrir más de 15 minutos desde el momento en que se mezcla la muestra hasta que todas las diluciones se inoculan en los medios apropiados.
- d. Incubar los tubos con LST a $35 \pm 0,5$ °C. Examinar los tubos y registrar las reacciones a las 24 ± 2 h en busca de gas, es decir, desplazamiento del medio en el vial de fermentación o efervescencia cuando los tubos se agitan suavemente.
- e. Volver a incubar los tubos con gas negativo durante 24 h adicionales y examinar y registrar las reacciones nuevamente a las 48 ± 3 h.
- f. Realizar una prueba de confirmación en todos los presuntos tubos positivos (de gas).

2.2.5.2 NMP- Prueba para la confirmación de coliformes

- a. Transferir una suspensión con el asa bacteriológica de cada tubo de caldo LST (o de lactosa gaseoso) a un tubo de caldo BGLB, evitando la formación de una película en el asa.
- b. Incubar los tubos BGLB a $35 \pm 0,5$ °C y examinar la producción de gas a las 48 ± 3 h.
- c. Calcular el número más probable (NMP) de coliformes basado en la proporción de gasificación en los tubos LST para 3 diluciones consecutivas. Para la determinación de NMP consultar la Tabla 15 ó 16 descrita en el documento "Metodología de recuento de agentes microbianos de control de plagas y de contaminantes biológicos en productos microbianos de control de plagas", código D-RIS-RAI-PA-003.

2.2.5.3 NMP-prueba confirmada para coliformes fecales y *E. coli*

- a. De cada tubo de caldo de gas LST o lactosa de la prueba presuntiva. Transferir con el asa bacteriológica de cada suspensión a un tubo de caldo EC.
- b. Incubar los tubos de EC a 44.5 °C por 24 ± 2 h y examinar la producción de gas. Si es negativo, vuelva a incubar y examinar nuevamente a las 48 ± 2 h.
- c. Utilizar los resultados de esta prueba para calcular el NMP de coliformes fecales. Para continuar con el análisis de *E. coli*, proceder con el siguiente método.

2.2.5.4 Pruebas para la identificación de *E. coli*


- a. Agitar suavemente cada tubo con caldo EC positivo para gasificación.
- b. Tomar un inóculo de caldo EC con el asa bacteriológica y sembrar en una placa de agar L-EMB. Incubar durante 18-24 h a 35 ± 0,5 °C.
- c. Examinar las placas para detectar colonias sospechosas de *E. coli*. Estas presentan un centró oscuro y plano, con o sin brillo metálico.
- d. Transferir hasta 5 colonias sospechosas de cada placa de agar L-EMB a tubos de agar tendido de AC, incubar durante 18-24 h a 35 ± 0,5 °C.
- e. La identificación de cualquiera de las 5 colonias como *E. coli* es suficiente para considerar que el tubo EC es positivo; por lo tanto, no todos los 5 aislamientos pueden necesitar ser probados.

2.2.5.5 Análisis de la actividad metabólica de las colonias crecidas en AC

- a. Tinción de Gram

Todos los cultivos que aparezcan como bacilos Gramnegativos deben someterse a las pruebas IMViC (prueba de indol (I), prueba de rojo de metilo (M), prueba de Voges Proskauer (V) y utilización de citrato (C)) que se indica a continuación y también volver a inocularse en LST para confirmar la producción de gas.

- b. Producción de indol (I)
 - Inocular el tubo de caldo de triptona e incubar 24 ± 2 h a 35 °C ± 0,5 °C.
 - Evaluar la producción de indol agregando 0,2 a 0,3 mL de reactivo de Kovacs.
 - La apariencia de color rojo en la capa superior indica una reacción positiva.
- c. Compuestos reactivos Voges-Proskauer (V)
 - Inocular el tubo de caldo MR-VP e incubar 48 ± 2 h a 35 °C ± 0,5 °C.
 - Transferir 1 mL a un tubo de 13 × 100 mm.
 - Añadir 0,6 mL de solución de α-naftol y 0,2 mL de KOH al 40%, agitar.
 - Agregar algunos cristales de creatina. Agitar y dejar reposar 2 h.
 - La prueba es positiva si se desarrolla el color rosa eosina.
- d. Compuestos reactivos con rojo de metilo (M)
 - Después de la prueba de VP agregue 5 gotas de solución de rojo de metilo.
 - Incube el tubo MR-VP a 35 °C ± 0,5 °C por 48 ± 2 h.
 - El color rojo que se origina luego de la incubación es una prueba positiva. El color amarillo es una reacción negativa.
- e. Citrato (C)
 - Inocular el medio citrato de Koser teniendo la precaución de evitar turbidez detectable.
 - Incubar durante 96 h a 35 °C ± 0,5 °C.
 - El desarrollo de una turbidez distintiva es indicativo de una reacción positiva.
- f. Gas de lactosa

	DOCUMENTO GENERAL
	Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

- Inocular un tubo de LST e incubar a $35 \pm 0,5$ °C por 48 ± 2 h.
- La producción de gas (desplazamiento del medio al interior del vial) o la efervescencia después de una agitación suave es una reacción positiva.


2.2.6 Interpretación

Todos los cultivos que presenten las tres características que se mencionan a continuación son considerados *E. coli* (Figura 7):

- a. Fermentan lactosa con producción de gas a 35 °C dentro de un periodo de 48 h.
- b. Son Gram negativas no formadoras de esporas.
- c. Dan patrones IMViC de ++ -- (biotipo 1) o +- -- (biotipo 2) para producción de indol, compuestos reactivos V, compuestos reactivos rojo de metilo y citrato.
- d. Calcule el NMP de *E. coli* (Tabla 15 ó 16 descrita en el documento "Metodología de recuento de agentes microbianos de control de plagas y de contaminantes biológicos en productos microbianos de control de plagas", código D-RIS-RAI-PA-003) en función de la proporción de tubos EC positivos en 3 o 5 diluciones sucesivas que contienen *E. coli*.
- e. Alternativamente, en lugar de realizar la prueba IMViC, emplear API20E o el ensayo bioquímico VITEK automatizado para identificar el organismo como *E. coli*. Utilizar los cultivos crecidos en agar tendido de AC y realizar estos ensayos según lo descrito por el fabricante.
- f. En caso de no obtener desarrollo en las placas se debe informar de acuerdo al límite de detección de la técnica, ej: < 1 UFC/g o 1 UFC/mL.

2.2.7 Método del medio sólido – Determinación coliformes

- a. Preparar el agar bilis rojo violeta (VRBA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- b. Enfriar a 48 °C antes de usar.
- c. Preparar, homogeneizar y realizar diluciones seriadas de la muestra de forma decimal como se describe en la sección 2.2.5.1 para obtener colonias aisladas cuando se coloquen en placas.
- d. Transferir 1 mL de cada dilución a las placas de Petri.
- e. Verter 10 mL de VRBA templado a 48 °C en placas, agitar las placas para mezclar y dejar que se solidifique.
- f. Para evitar el crecimiento de la superficie y la propagación de colonias, superponer 5 mL de VRBA y dejar solidificar. Si es necesaria potenciar el crecimiento, vierta una capa basal de 8-10 mL de agar de soja tréptico templado a 48 °C. Agitar las placas para mezclar.
- g. Incubar a temperatura ambiente durante $2 \pm 0,5$ h. Luego, superponer con 8-10 mL de VRBA derretido y enfriado. Posteriormente, dejar solidificar.
- h. Invertir las placas solidificadas e incubar 18-24 h a 35 °C.
- i. Examinar las placas con lupa y con iluminación. Contar las colonias de color rojo púrpura de 0,5 mm o más de diámetro y rodeadas por la zona de ácidos biliares precipitados. Las placas deben tener 25-250 colonias. Para confirmar que las colonias son coliformes, elegir al menos 10 colonias representativas y transfíralas a un tubo de caldo BGLB. Incubar los tubos a 35 °C. Examinar a las 24 y 48 h para producción de gas.

	DOCUMENTO GENERAL
	Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

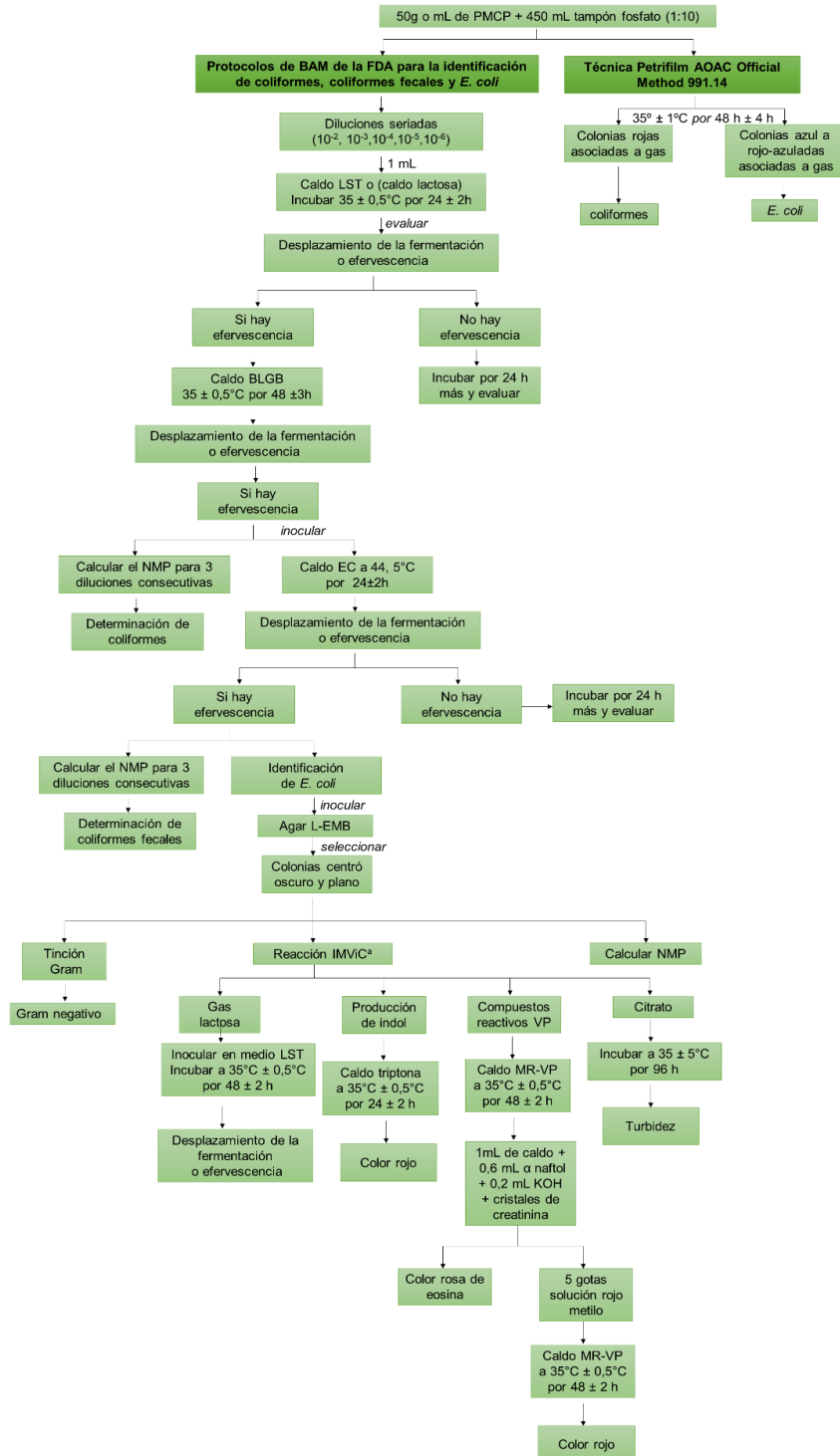
2.2.8 Consideraciones

- a. Si el tubo BGLB con gas positivo muestra una película, realice una tinción de Gram para asegurarse de que la producción de gas no se deba a bacilos grampositivos fermentadores de lactosa.
- b. Determinar el número de coliformes por gramo o mililitro multiplicando el número de colonias sospechosas por el porcentaje confirmado en BGLB por el factor de dilución. Alternativamente, las colonias de *E. coli* se pueden distinguir entre las colonias de coliformes en VRBA agregando 100 µg de 4-metil-umbeliferil-β-D-glucurónido (MUG) por mL superficialmente en la placa VRBA. Después de la incubación, observe la fluorescencia azulada alrededor de las colonias bajo luz UV de onda larga.

Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

Figura 7. Matriz experimental para la detección de *E. coli* empleando la metodología de la FDA.

^a Dan patrones IMViC de ++ -- (biotipo 1) o -+ -- (biotipo 2) para producción de indol, compuestos reactivos V, compuestos reactivos rojo de metilo y citrato.



3. Métodos para la detección de *Listeria monocytogenes* en PMCP

El procedimiento de diagnóstico a utilizar por el laboratorio puede ser uno, o más de uno, de los siguientes métodos:

- a. Método screening VIDAS® *L. monocytogenes* Xpress (VIDAS® LMX) y posterior aislamiento y confirmación de la identidad del patógeno.
- b. Método screening VIDAS® LMO 2 y confirmación bioquímica y posterior aislamiento y confirmación de la identidad del patógeno.
- c. Metodología de detección descrita en el capítulo 4 del Manual de Análisis Bacteriológico (BAM) de la FDA.

3.1 Método screening VIDAS® *L. monocytogenes* Xpress (VIDAS® LMX) o Vidas® LMO

3.1.1 Fundamento

El ensayo VIDAS *L. monocytogenes* Xpress (LMX) y VIDAS® LMO es un inmunoensayo enzimático diseñado para su uso en el instrumento VIDAS automatizado (consulte el manual del operador) para detectar antígenos de *Listeria* mediante el método ELFA (Ensayo fluorescente ligado a enzimas).

3.1.2 Soluciones y reactivos para VIDAS® LMX

- a. Caldo LMX
- b. Suplemento de LMX para Kit VIDAS LMX
- c. Caldo Fraser (VIDAS® LMO)

3.1.3 Soluciones y reactivos para VIDAS® LMO

- a. Kit VIDAS® LMO
- b. Caldo Fraser

3.1.4 Equipos

- a. Balanza digital entre el rango de los 250g y 2.500g.
- b. Estufa de cultivo 37°±1°C.
- c. Estufa de cultivo 41,5°±1°C.
- d. Baño de agua termoregulado 48-50°C y 95-100°C.
- e. Agitador de tubos o vortex.
- f. Autoclave para medios, tampones y material limpio.
- g. Autoclave para descontaminación.
- h. Agitador orbital o Stomacher dependiendo del tamaño de la muestra.
- i. Refrigerador.
- j. Gabinete de Bioseguridad.
- k. Congelador.
- l. Sistema automatizado VIDAS® o Minividas.
- m. Bloque calefactor VIDAS®: Heat and Go (opcional)
- n. Impresora asociada al equipo VIDAS.

3.1.5 Cepas de referencia

- a. *Listeria monocytogenes* ATCC 19115
- b. *Listeria innocua* ATCC 33090
- c. *Listeria seeligeri* ATCC 35967
- d. *Listeria ivanovii* ATCC 19119
- e. *Rhodococcus equi* ATCC 6930

f. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 o ATCC 49444

3.1.6 Procedimiento

- a. Seguir el procedimiento descrito en el instructivo o manual del Kit Vidas® LMX o Vidas® LMO y del sistema automatizado VIDAS® o del mini VIDAS®.
- b. Todos los resultados positivos emitidos por el test VIDAS®, se consideran como presuntivos y deben ser confirmados. Para ello se debe hacer el aislamiento del patógeno mediante un procedimiento de enriquecimiento y aislamiento en agar selectivo, para posteriormente ser identificado por métodos de identificación rápida o por el método tradicional.
- c. Un control positivo y un control negativo se incluyen en cada caja de reactivos VIDAS®. Los controles deben ser analizados inmediatamente después de la apertura de una nueva caja, con el fin de garantizar la ausencia de alteración de los reactivos. También es necesario comprobar cada calibración mediante el uso de estos controles. El equipo sólo podrá comprobar los valores de control identificados con C1 y C2. No se podrán validar los resultados si los valores de control desvíasen de los valores esperados.

3.2 Identificación rápida alternativa

Los aislados purificados pueden identificarse rápidamente mediante el uso de kits comerciales o PCR en tiempo real. Siguiendo las instrucciones del fabricante para la inoculación y la interpretación. A continuación, se mencionan los kits que se pueden emplear:

- a. API *Listeria* (bioMérieux) que requiere una prueba adicional de β -hemólisis (sección 3.3.7.1) para la identificación final del aislado. La prueba CAMP es opcional (sección 3.3.7.2).
- b. Sistema de identificación de *Listeria* Micro-ID (Remel, Lenexa, KS) que requiere una prueba CAMP adicional y una prueba de β -hemólisis.
- c. Tarjeta Vitek 2 Automatic Gram Positive (bioMérieux), que requiere una prueba CAMP adicional y una prueba de β -hemólisis.
- d. PCR en tiempo real, que requiere una prueba adicional de β -hemólisis. La prueba CAMP es opcional.

Los métodos rápidos alternativos de AOAC para la detección de *L. monocytogenes* se pueden usar para confirmar la identificación. Dependiendo del kit, los aislamientos pueden identificarse en cultivo puro o de OXA u otros agares de aislamiento selectivo. Los aislamientos purificados identificados como *Listeria monocytogenes* por estas pruebas deben conservarse para referencia regulatoria.

3.3 Identificación de *L. monocytogenes* por el procedimiento de BAM de la FDA

3.3.1 Fundamento

La enumeración de *L. monocytogenes* en muestras positivas PMCP se realiza en agares selectivos diferenciales de *L. monocytogenes* junto con la enumeración de NMP.

3.3.2 Medios y reactivos

La descripción de la composición de los medios de cultivos o reactivos está en la sección 9.

- a. Caldo de enriquecimiento de *Listeria* tamponado (BLEB)
- b. Monoclorhidrato de acriflavina
- c. Ácido nalidíxico (sal de sodio)

- d. Cicloheximida
- e. Natamicina (pimaricina)
- f. Caldo Dey-Engley (D-E)
- g. Medio Oxford (OXA)
- h. Agar PALCAM
- i. Agar MOX
- j. Agar de cloruro de litio-feniletanol-moxalactama (LPM) (S24) con esculina y hierro añadidos
- k. R&F *Listeria monocytogenes* Medio de recubrimiento cromogénico (R&F Laboratories, Downers Grove, IL)
- l. Agar ALOA.
- m. Agar cromogénico para *Listeria* (Oxoid Ltd, Basingstoke, Inglaterra)
- n. Rapid 'L.mono (BioRad Laboratories Inc.)
- o. CHROMagar *Listeria* (CHROMagar, París, Francia)
- p. Agar tripticasa de soja con extracto de levadura al 0.6% (TSAYE)
- q. Agar Sangre de Oveja
- r. Solución de peróxido de hidrógeno, 3% para prueba de catalasa
- s. Kit de tinción de Gram
- t. Medio de prueba de motilidad (MTM)
- u. Trypticase caldo de soja con extracto de levadura al 0.6% (TSBYE)
- v. Base de caldo de fermentación de carbohidratos púrpura, que contiene soluciones al 0,5% de dextrosa, esculina, maltosa, ramnosa, manitol y xilosa
- w. Solución salina fisiológica, 0.85%
- x. Tampón de anticuerpo fluorescente (FA) (Difco)
- y. Sueros de tipificación de *Listeria* tipo 1 (Difco cat. # 223031) y tipo 4 (Difco cat. # 223041)
- z. *Listeria* Antiser Set (Denka Seiken producto # 294616)
- aa. Opcional: medio de reducción de nitrato

3.3.3 Equipos y materiales

- a. Hisopo estéril
- b. Balanza para pesar la muestra a 0,1 g
- c. Incubadoras, 30 y 35 °C
- d. Baño de agua, 80 ± 2 °C
- e. Microscopio de contraste de fase con objetivo de fase de inmersión en aceite (100 ×)
- f. Frascos, matraces o Stomacher y bolsas
- g. Mezclador Vortex

3.3.4 Procedimiento de enriquecimiento y aislamiento

- a. Incubar 25 g o mL de PMCP homogeneizados en 225 mL de medio BLEB suplementado con piruvato a 30 °C, durante 4 h.
- b. Agregar asepticamente los tres agentes antimicrobianos selectivos esterilizados por filtración (0,22 µm) para lograr concentraciones finales de 10 mg/L de acriflavina, 40 mg/L de cicloheximida y 50 mg/L de ácido nalidíxico sódico en el medio BLEB suplementado con piruvato.
- c. Mezclar el enriquecimiento con aditivos y continuar la incubación a 30 °C durante el resto del período de enriquecimiento de 24 a 48 h.
- d. A las 24 y 48 h, inocular los medios BLEB en un agar selectivo que se mencionan en las secciones 5.3.3.5 y 5.3.3.6
- e. Incubar las placas hasta 48 h. Revisar las placas a las 24 h y 48 h.

3.3.5 Agares selectivos de *Listeria* a base de esculina

- a. **Agar Oxford (OXA)** Después de 24 h de incubación a 35 °C, las colonias típicas de especies de *Listeria* tienen aproximadamente 1 mm de diámetro, presentan un color de gris a negro rodeadas por un halo negro. Después de 48 h de incubación, las colonias típicas de especies de *Listeria* tienen aproximadamente 2-3 mm de diámetro, muestran una coloración negra con un halo negro y centro hundido.
- b. **PALCAM** Las condiciones de incubación y la apariencia de las colonias de especies de *Listeria* son las mismas que para el agar Oxford, excepto que el color de la placa de fondo es rojo.
- c. **Agar Oxford modificado (MOX)** Las condiciones de incubación y la apariencia de las colonias de especies de *Listeria* son las mismas que para el agar Oxford.
- d. **LPM fortificado con esculina y Fe³⁺**. Incubar a 30 °C. La apariencia típica de la colonia de especies de *Listeria* es similar al agar Oxford.

3.3.6 Agares cromogénicos para la detección de *L. ivanovii* y *L. monocytogenes*

- a. **Medio de recubrimiento cromogénico R&F *Listeria monocytogenes* (R&F LMCPM)** Incubar las placas a 35 °C. *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* producen una colonia de 1-3 mm de diámetro, lisa, convexa, azul / verde con un pequeño halo azul / verde. Todas las demás especies de *Listeria* producen una colonia blanca convexa lisa de 1-2 mm sin halo. Las colonias típicas de *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* se pueden distinguir utilizando un medio confirmatorio comercial o mediante los métodos de identificación descritos en la sección 3.3.7.
- b. **RAPID' L. mono agar:** Incubar las placas a 37 °C. *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* producen una colonia azul/verde, lisa, convexa, de 1-3 mm de diámetro. Adicionalmente, un halo amarillo rodeará a las colonias de *L. ivanovii*. Sin embargo, el halo amarillo puede ser obvio en áreas de crecimiento al menos moderado. El masivo crecimiento de *L. ivanovii* podría convertir toda la placa en amarilla. Además, se debe tener precaución con diferenciar *L. monocytogenes* de *L. ivanovii* porque los microorganismos que componen el PMCP puede cambiar el color de ciertas áreas de este agar a amarillo, y esto podría hacer que *L. monocytogenes* aparezca como *L. ivanovii*. Todas las demás especies de *Listeria* producen una colonia blanca convexa lisa de 1-2 mm con o sin halo amarillo.
- c. **Agar *Listeria* según Ottaviani y Agosti (ALOA), o agar oxoide cromogénico de *Listeria* (OCLA):** Incubar las placas a 37 °C, todas las especies de *Listeria* aparecen como colonias azules / verdes de 1-3 mm de diámetro. Además, *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* tienen un halo blanco opaco que rodea la colonia.
- d. **CHROMagar *Listeria*:** las condiciones de incubación y la apariencia de las colonias de *Listeria* son las mismas que para ALOA, excepto que el color de la placa de fondo es azul claro.
- e. Para los métodos rápidos aprobados, use el agar de aislamiento selectivo recomendado por el fabricante, pero el uso auxiliar de agar cromogénico. *L. monocytogenes-L. ivanovii* también se recomienda.

En los agares R&F LMCPM como en el RAPID'L. mono, las especies de *Listeria* con actividad PI-PLC (fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol), *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*, aparecerán de color azul verdoso y todas las demás especies de *Listeria* no desarrollarán el color azul verdoso y permanecerán de aspecto blanco. En el caso de ALOA y CHROMagar, la presencia de una especie de *Listeria* basada en una actividad específica de la enzima β -glucosidasa es detectada por el cromógeno, por lo tanto, todas las especies de *Listeria* aparecerán de color azul verdoso en estos agares. La actividad de fospoholipasa específica para *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* está determinada por el halo blanco opaco adicional que rodea la colonia.

3.3.7 Procedimiento de identificación

- a. Seleccionar hasta 5 colonias típicas de agar no cromogénico y sembrar por agotamiento en agar TSAYE para la obtención de colonias aisladas. Incubar las placas a 30 ° C durante 24-48 h. Seleccionar hasta 2 colonias típicas si usa agares cromogénicos diferenciales para *L. monocytogenes*-*L. ivanovii*. Las placas se pueden incubar a 35 °C si las colonias no se utilizarán para las observaciones de motilidad de montaje húmedo
- b. Identificar los aislados purificados del crecimiento en la placa TSAYE mediante las siguientes pruebas clásicas. Alternativamente, se pueden utilizar kits de pruebas bioquímicas rápidas o análisis de PCR para confirmar los aislamientos a nivel de especie (sección 3.2).

3.3.7.1 Hemólisis

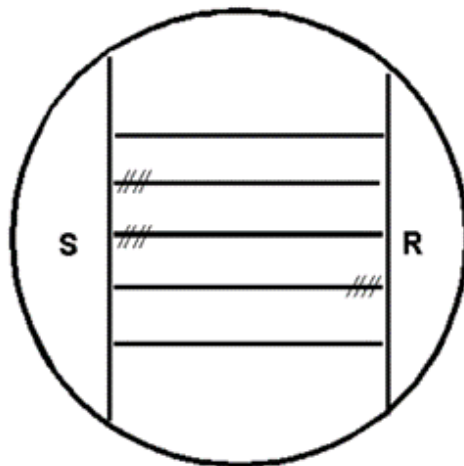
- a. Sembrar un inóculo proveniente de la colonia TSAYE al 5% de agar sangre de oveja (verificar la humedad del medio agar antes de usar).
- b. Dibujar una cuadrícula de 20-25 espacios en el fondo de la placa. Pinchar un inóculo por espacio de cuadrícula.
- c. Al inocular se debe pinchar lo más cerca posible del fondo de la capa de agar, sin tocar el fondo de la capa de agar fracturando el agar.
- d. Inocular los controles positivos (*L. ivanovii* y *L. monocytogenes*) y el control negativo (*L. innocua*).
- e. Incubar durante 24-48 h a 35 ° C.
- f. Examinar las placas de agar sangre de cultivo iluminando la zona trasera de la placa.
- g. *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* producen un ligero halo alrededor de la inoculación. *L. innocua* no muestra zona de hemólisis, mientras que *L. ivanovii* produce un halo claro bien definido alrededor de la inoculación.
- h. Si se observó un cultivo mixto en la placa TSAYE, repita la prueba de hemólisis con una colonia aislada.
- i. En el caso de obtener resultados incuestionables realizar la prueba CAMP.

3.3.7.2 Prueba CAMP

Resolver reacciones cuestionables mediante la prueba Christie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP). Las cepas de prueba CAMP están disponibles en colecciones de cultivos, incluida la American Type Culture Collection (ATCC).

- a. Sembrar "suavemente" *Staphylococcus aureus* β -hemolítico (cepa de la FDA ATCC 49444 (CIP 5710; NCTC 7428) o ATCC 25923) y *Rhodococcus equi* (ATCC 6939; NCTC 1621) verticalmente en agar sangre de oveja.
- b. Separar las cepas de prueba horizontalmente entre las rayas de *S. aureus* y *R. equi* sin tocarlas por completo. Incubar la placa de 24 a 48 h a 35 °C. La Figura 8 muestra la disposición de las rayas de cultivo en una placa CAMP.
- c. Examinar las placas para detectar hemólisis. La hemólisis de *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* se incrementa cerca del crecimiento de *S. aureus*. La hemólisis de *L. ivanovii* se incrementa cerca de la raya de *R. equi*. Otras especies no son hemolíticas y no reaccionan en esta prueba (Tabla 19).
- d. Alternativamente, se puede sembrar un cultivo de *S. aureus* cerca de *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* en placas de agar de sangre de oveja para incrementar la hemólisis de estas últimas. Discos impregnados con la β -lisina de *S. aureus* (REMEL, Lenexa, KS) también puede ser empleados.

Figura 8. Prueba CAMP para *Listeria monocytogenes*. Patrón de inoculación de la placa de agar de sangre de oveja. Las líneas horizontales representan las inoculaciones de 5 cepas de prueba. Las líneas verticales representan la inoculación de rayas de *S. aureus* (S) y *R. equi* (R). Las líneas sombreadas indican (solo en forma de diagrama) las líneas de mejor hemólisis.



3.3.7.3 Motilidad

- Elegir una colonia típica de TSAYE y examinarla con un soporte húmedo, utilizando solución salina al 0,85% para suspender el medio y el objetivo de inmersión en aceite del microscopio de contraste de fase.
- Listeria* spp. son bacilos delgados y pequeños con una ligera motilidad giratoria.
- Siempre se debe comparar con cultivos conocidos.
- Cocos, bacilos grandes o con motilidad rápida para nadar no son *Listeria* spp.
- Alternativamente, pinchar el tubo de MTM (composición en la sección 9) desde un inóculo proveniente de TSAYE. Incubar hasta 7 días a temperatura ambiente (20-25 °C). Observar diariamente hasta que el patrón de crecimiento del aislado sea obvio. *Listeria* es móvil, dando un patrón de crecimiento en forma de paraguas.

3.3.7.4 Catalasa

Detectar síntesis de catalasa colocando parte una colonia en una gota de peróxido de hidrógeno al 3%. Las especies de *Listeria* son catalasas positivas.

3.3.7.5 Tinción de Gram

- Crece de 16 a 24 h de placas TSAYE.
- Todas las *Listeria* spp. son bacilos pequeños, Grampositivos; sin embargo, con cultivos más antiguos, la reacción de tinción de Gram puede ser variable y también las células pueden aparecer esferoidales. Las células tienen tendencia a empalmarse en frotis de manchas gruesas. Esto puede conducir a un falso rechazo como difterioide.

3.3.7.6 Fermentación de carbohidratos

- Para realizar el análisis de fermentación elegir una colonia sospechosa de ser *Listeria* proveniente del medio TSBYE. Este cultivo puede mantenerse a 4 °C durante varios días y usarse repetidamente como inóculo.

- b. Inocular el medio cultivo púrpura suplementado con 0,5% de carbohidratos (dextrosa, esculina, maltosa, ramnosa, manitol y xilosa) y otros medios de prueba depositados en tubos Durham.
- c. Incubar a 35 ° C durante 7 días.
- d. Las reacciones positivas se indicarán mediante la producción de ácido y los medios que se vuelven de color amarillo sin producción de gas.
- e. Todas las especies de *Listeria* deben ser positivas para dextrosa, esculina y maltosa (Tabla 19). Todas las *Listeria* spp. excepto *L. grayi* debe ser manitol negativo. Si la pigmentación del aislado en OXA, PALCAM, MOX o LPM más esculina / Fe³⁺ es inequívoca, la prueba de esculina puede omitirse.
- f. Consultar la Tabla 19 para las interpretaciones de los resultados.

Tabla 19. Diferenciación de especies de *Listeria*

	Manitol	Rhamnosa	Xilosa	Virulencia ^a	β-hemólisis ^b	Hemólisis incrementada con <i>S. aureus</i> (S)	Hemólisis incrementada con <i>R. equi</i> (R)
<i>L. monocytogenes</i>	-	+ ^c	-	+	+	+	- ^d
<i>L. ivanovii</i> ^e	-	-	+	+	+	-	+
<i>L. innocua</i>	-	V ^f	-	-	-	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-	-	-
<i>L. seeligeri</i>	-	-	+	-	+ ^g	+	-
<i>L. grayi</i> ^h	+	V	-	-	-	-	-

^a Prueba de ratón

^b Inoculación en agar sangre de oveja

^c Algunas cepas de linaje III de *L. monocytogenes*, que se asocian principalmente con la listeriosis animal, son ramnosa negativas.

^d Las cepas raras son S + y R +. La reacción R + es menos pronunciada que la de *L. ivanovii*.

^e Las cepas de fermentación de ribosa se clasifican como *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* y ribosa no fermentadores como *L. ivanovii* subsp. *londiniensis*.

^f V, biotipos variables, más del 10% de las cepas para esta característica.

^g Las cepas débilmente hemolíticas de *L. seeligeri* pueden parecer no hemolíticas.

^h Incluye dos subespecies: *L. grayi* subsp. *murrayi* reduce el nitrato *L. grayi* subsp. *grayi* no reduce el nitrato.

3.3.8 Pruebas opcionales

Las especies de *Listeria* dan negativo para la producción de indol, oxidasa, ureasa y H₂S a partir de compuestos orgánicos de azufre y dan positivo para rojo de metilo y Voges-Proskauer. Estas pruebas no permiten discriminar con cepas del género *Brochothrix*, que

está filogenéticamente estrechamente relacionado con *Listeria*. Esta última se distingue de *Listeria* por su incapacidad para crecer a 35 ° C y por su falta de motilidad.

3.3.8.1 Prueba de patogenicidad de ratones inmunocomprometidos

- a. Las pruebas clásicas para la patogenicidad de *Listeria* son la prueba de conjuntivitis de Anton (conejos), la inoculación de ratones y la inoculación de huevos embrionados. Se recomienda la prueba de ratón inmunocomprometida, que utiliza una inyección intraperitoneal (i.p.), debido a su sensibilidad mejorada. La confirmación de la patogenicidad animal de *L. monocytogenes* opcional para los aislados de PMCP. Un aislado debe identificarse como *L. monocytogenes* si cumple con todos los demás criterios descritos en este capítulo. Para obtener mayor información de la prueba de patogenicidad consultar la página web de la FDA.
- b. Los datos bioquímicos y de patogenicidad se resumen en la Tabla 19. Toda la recopilación de datos debe completarse antes de determinar las identidades de las especies. Existen cepas atípicas de *Listeria* que podrían confundir la identificación. Algunos aislamientos de *L. monocytogenes* y *L. welshimeri* son negativos a la ramnosa. Algunos aislamientos de *L. seeligeri* tienen una reacción hemolítica muy débil y pueden confundirse con especies no hemolíticas. A veces se aíslan cepas de *Listeria* aberrantes que son extremadamente difíciles de especiar.

3.3.8.2 Subtipificación de aislados de *L. monocytogenes* (requerido)

- a. Los aislados confirmados de *L. monocytogenes* deben tipificarse serológica y genéticamente.
- b. Mecanografía serológica. La serología es útil cuando se abordan consideraciones epidemiológicas. La mayoría de los aislados de *L. monocytogenes* obtenidos de pacientes, alimentos y el medio ambiente son de tipo 1 o 4. Más del 90% de los aislados de *L. monocytogenes* se pueden serotipar con sueros disponibles comercialmente. Sin embargo, todas las especies de *Listeria* no patógenas, excepto *L. welshimeri*, comparten uno o más antígenos somáticos con *L. monocytogenes*. Por lo tanto, el serotipado solo sin una caracterización completa del aislamiento no es adecuado para la identificación de *L. monocytogenes*.
- c. Utilizar sueros comerciales (Difco Type 1 cat # 223031 y Type 4 cat # 223041) para caracterizar los aislamientos como tipo 1, tipo 4 o no tipo 1 o 4 (tipos 3, 5, 6, etc.) como mínimo.
- d. Usar un cultivo TSBYE para inocular el caldo de triptosa.
- e. Incubar durante 24 h a 35 ° C, a cuya temperatura se reduce la expresión del antígeno del flagelo (H).
- f. Sembrar en agar inclinado de agar triptosa e incubar durante 24 h a 35 ° C.
- g. Lavar el agar inclinado en un total de 3 ml de tampón de anticuerpo fluorescente Difco (FA).
- h. Transferir a un tubo estéril de 16 × 125 mm con tapa de rosca.
- i. Calentar en un baño de agua a 80 ° C durante 1 h.
- j. Sedimentar las células por centrifugación a 1600 g durante 30 min.
- k. Retirar 2,2-2,3 ml de líquido sobrenadante y resuspender el sedimento en el resto del tampón.
- l. Seguir las recomendaciones del fabricante para la dilución y aglutinación de sueros.
- m. Se puede realizar una caracterización serológica completa (producto Denka Seiken # 294616). Los cultivos puros de aislamientos de *L. monocytogenes* deben cultivarse durante 24 a 35 ° C en agar no selectivo como el agar BHI. El crecimiento de la colonia luego se resuspende, se inactiva por calor y se prueba la aglutinación según lo recomendado por el fabricante de antisueros.

3.4 Enumeración (optativo)

Si una muestra de PMCP da positivo para *L. monocytogenes*, use una porción de reserva de muestra para enumerar. La enumeración se realiza utilizando una combinación de NMP y recubrimiento directo.

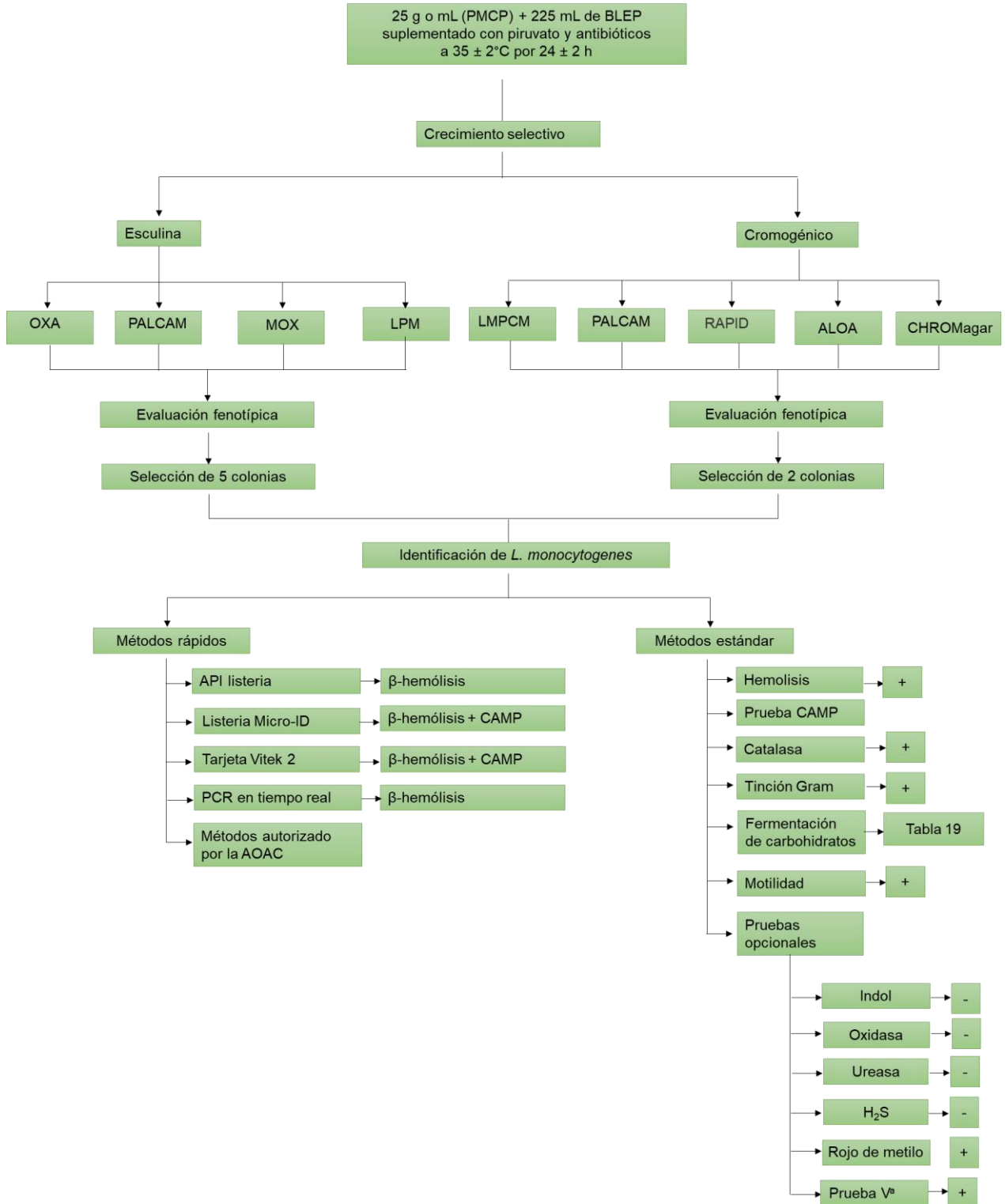
3.4.1 Procedimiento de NMP

- a. Preparar un homogenizado de una cantidad de 25 g de muestra de PMCP en 225 mL de BLEB precalentado con o sin piruvato y sin adición de agentes selectivos.
- b. Preparar 4 tubos y 3 diluciones usando diluciones que entreguen el equivalente a 10, 1, 0,1 y 0,01 g de muestra por alícuota en cada dilución respectiva.
- c. Incubar las doce alícuotas como se describe en procedimiento de enriquecimiento y aislamiento (sección 3.3.4).
- d. A las 48 h sembrar cada alícuota como se describe en las secciones siguientes a la anterior seguido de aislamiento y confirmación.
- e. Interprete los resultados en función del número de tubos confirmados con *L. monocytogenes* empleando la Tabla 15 ó Tabla 16 descrita en el documento "Metodología de recuento de agentes microbianos de control de plagas y de contaminantes biológicos en productos microbianos de control de plagas", código D-RIS-RAI-PA-003.
- f. Si todos los tubos de NMP son positivos para *Listeria*, realice el recuento de diluciones seriadas en placa.

3.4.2 Procedimiento de recubrimiento directo

- a. Preparar una resuspensión de 25 g de PMCP en 225 mL de BLEB sin piruvato ni agentes selectivos. Realice otra dilución 10 veces más diluida.
- b. Siembre directamente 100 µL de homogenizado de PMCP preparado en el paso anterior en 3 a 5 placas de uno de los agares cromogénicos diferenciales de *L. monocytogenes*. Para la distribución homogénea del inóculo emplee asa de Drigalsky.
- c. Si las colonias en las placas son demasiado numerosas para contarlas, use una muestra de reserva, realice diluciones en serie adicionales de 10 veces y proceda con la siembra directa.
- d. Confirmar 5 colonias representativas por placa.

Figura 9. Matriz experimental para la detección de *L. monocytogenes*, Prueba Voges-Proskauer



4. Métodos de detección de *Salmonella* en PMCP

El procedimiento de diagnóstico a utilizar por el laboratorio puede ser uno, o más de uno, de los siguientes métodos:

- a. Método Screening VIDA EASY SLM AFNOR BIO 12/16-09/05 y confirmación bioquímica y serológica.
- b. Método ISO6579:2002 de detección y cuantificación descrita en el capítulo 5 del Manual de Análisis Bacteriológico (BAM) de la FDA.

4.1 Método Screening VIDA EASY SLM AFNOR BIO 12/16-09/05

4.1.1 Fundamentos

El sistema VIDAS es un inmunoensayo enzimático diseñado para su uso en el instrumento VIDAS automatizado (consulte el manual del operador) para detectar antígenos de *Salmonella* mediante el método ELFA (Ensayo fluorescente ligado a enzimas).

4.1.2 Soluciones y reactivos

- a. Agua Peptonada Tamponada. (ISO 6579:2002)
- b. Caldo SX2. Ref 42. 121. Biomerieux.
- c. Tubos tapa rosca (10 mL).
- d. Botella Shott (500 mL)
- e. Kit VIDAS *Salmonella* SLM fecha vigente.
- f. Agar SM2 chromID *Salmonella*

5.4.1.3 Equipamiento

- a. Balanza digital entre el rango de los 250 g y 2.500 g.
- b. Estufa de cultivo $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$.
- c. Estufa de cultivo $41,5^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$.
- d. Baño de agua termoregulado 48-50 °C y 95-100 °C.
- e. Agitador de tubos o vortex.
- f. Autoclave para medios, tampones y material limpio.
- g. Autoclave para descontaminación.
- h. Agitador orbital o Stomacher dependiendo del tamaño de la muestra.
- i. Refrigerador.
- j. Gabinete de Bioseguridad.
- k. Congelador.
- l. Sistema automatizado VIDAS® o Minividas.
- m. Bloque calefactor VIDAS®: Heat and Go (opcional)
- n. Impresora asociada al equipo VIDAS.

4.1.4 Cepas de referencias

Además de los cultivos de control positivo (*Salmonella* típica), se recomiendan 3 cultivos de *Salmonella* adicionales para ayudar en la selección de la morfología atípica de la colonia de *Salmonella* en agares selectivos. Estos cultivos son una *S. diarizonae* positiva a la lactosa, H₂S positiva (ATCC 12325) y una *S. abortus* equi negativa a la lactosa, H₂S negativa (ATCC 9842); o una *S. diarizonae* positiva para lactosa, negativa para H₂S (ATCC 29934). Estas cepas pueden obtenerse de la American Type Culture Collection (ATCC).

4.1.5 Procedimiento

- a. Preparación de la muestra y pre-enriquecimiento no selectivo

- b. En primera instancia las muestras (25 g o mL) se deben pesar/medir en una balanza calibrada/material volumetrico certificado.
- c. Agregar asépticamente agua peptonada tamponada (APT) estéril en una relación 1:1.
- d. La resuspensión se homogeniza en agitador orbital o Stomacher, dependiendo del volumen de la muestra, por 15-20min.
- e. Traspasar 30mL a un frasco estéril y adicionarle 30 mL de APT como caldo de preenriquecimiento.
- f. Incubar el caldo de pre-enriquecimiento (APT) a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 16–22hrs.
- g. Se deben utilizar frascos diferentes para cada análisis de *Salmonella* spp. y *E. coli*.
- h. Para este tipo de análisis no se utilizarán contramuestras.
- i. Cabe señalar, que una vez realizado el paso anterior, se debe sembrar en forma paralela una cepa *Salmonella* spp H₂S negativa y otra H₂S positiva, cada una en tubos con 10 mL de APT, como control positivo del método.

4.1.6 Enriquecimiento selectivo

- a. Transferir $0,1\pm 0,02$ mL desde el frasco con APT con la muestra incubada, a un tubo con 10 mL de Caldo SX2.
- b. Finalmente continuar con la siembra de las cepas controles (*Salmonella* spp. H₂S negativa y H₂S positiva), ambas en cada tubo de enriquecimiento respectivo.
- c. Incubar a $41,5\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 22–26 horas.

4.1.7 Introducción de los datos de la tarjeta MLE

- a. Cuando se abra un nuevo lote, las especificaciones (o datos de la curva base de calibración) deben ser introducidos en el sistema (VIDAS® o mini VIDAS®) con la ayuda de la tarjeta de lote patrón MLE (ficha de especificaciones) incluida en cada caja. Si esta operación no se efectúa antes de comenzar los tests, el sistema no podrá editar los resultados. Estas especificaciones se introducen sólo una vez para cada lote.
- b. Es posible introducir las especificaciones manualmente o de forma automática gracias a la tarjeta MLE.

4.1.8 Calibración

- a. Se debe calibrar el equipo utilizando el estándar suministrado en la caja. La calibración debe efectuarse con cada nuevo lote que se abra, después de introducir las especificaciones del lote patrón. Además, se debe efectuar una recalibración cada 14 días.
- b. Esta operación permite ajustar la curva de calibración a cada aparato y a la eventual evolución del reactivo en el tiempo.
- c. El estándar, identificado por S1, será analizado por duplicado (ver Manual de Utilización). El valor del calibrador debe estar comprendido en los límites de RFV ("Relative Fluorescent Value") fijados. Si no es así, la media no será memorizada: Repetir una calibración.

4.1.9 Realización del test

- a. Sacar únicamente los reactivos necesarios, dejarlos 30 minutos a temperatura ambiente antes de su utilización.
- b. Utilizar un cartucho "SLM" y un "cono SLM" para cada muestra, control o estándar a analizar. Verificar que la bolsa de conos haya sido bien cerrada después de cada utilización.
- c. Teclar o seleccionar "SLM" sobre el sistema para introducir el código del test.

- d. El estándar identificado obligatoriamente por "S1", debe analizarse por duplicado. Si el control positivo tiene que analizarse, se identificará por "C1" y si tiene que analizarse el control negativo, se identificará por "C2".
- e. Homogeneizar bien el estándar, los controles y las muestras a analizar, con un mezclador tipo vortex.
- f. Es indispensable inactivar las muestras al Baño-María o bloque calefactor VIDAS durante 15 minutos antes de realizar el test VIDAS® EASY SLM.
- g. Transferir 1-2 ml del caldo SX2 incubado a un tubo. Cierre el tubo. Hierva durante 15 ± 1 minutos a $95 - 100$ °C. Enfríe el tubo. Agite el caldo hervido y transfiera 0,5 mL al pocillo de la muestra del cartucho VIDAS®.
- h. Si usa el bloque calefactor VIDAS Heat & Go, transferir 0,5 mL (500µL) del caldo.
- i. SX2 al pocillo de la muestra del cartucho VIDAS. Caliente durante 15 ± 1 minutos, quite el cartucho del bloque, deje enfriar durante 10 minutos.
- j. Mantener el caldo SX2 sin inactivar a $2-8$ °C por si fuera necesario llevar a cabo una confirmación.
- k. El Caldo SX2 no hervido/calentado puede conservarse por 72 horas a $2-8$ °C. El test VIDAS y la confirmación de resultados positivos debe realizarse dentro de las 72 horas siguientes a la finalización de la incubación del caldo selectivo a $41,5 \pm 1$ °C.
- l. Coloque los pocillos y los conos en el equipo VIDAS siguiendo el orden de identificación creado en la pantalla del equipo.
- m. Efectúe el test VIDAS de acuerdo a las indicaciones de operación del equipo de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
- n. Conserve el registro de resultados del equipo. Todos los resultados positivos deben ser confirmados a partir del caldo SX2.
- o. Dispensar 500 µL de estándar, muestra y controles en el pocillo de muestra del cartucho.
- p. Colocar en el sistema los conos y los cartuchos.
- q. Verificar bien la concordancia de los códigos (colores y letras) entre el cono y el cartucho.
- r. Lanzar el análisis (ver Manual de Utilización). Todas las etapas están controladas automáticamente por el sistema. Los resultados se obtienen en aproximadamente 45 minutos.
- s. Al finalizar el análisis, retirar los conos y los cartuchos del sistema utilizando guantes estériles desechables. Eliminar los conos y cartuchos utilizados en un recipiente apropiado, resguardando las normas de bioseguridad.

4.1.10 Resultados e interpretación

- a. Una vez finalizado el test, los resultados son analizados automáticamente por el sistema.
- b. El equipo efectúa dos medidas de fluorescencia en la cubeta de lectura para cada muestra analizada.
- c. La primera lectura mide el ruido de fondo de la cubeta de substrato antes de ponerse en contacto con el cono.
- d. La segunda lectura se efectúa después de la incubación del substrato con la enzima del interior del cono.
- e. El RFV (Relative Fluórese Value) se calcula mediante la diferencia entre la lectura del ruido de fondo y la lectura del resultado final. Este cálculo aparece en la hoja de resultados.
- f. El RFV obtenido para cada muestra es interpretado por el sistema VIDAS® de la siguiente manera:

$$\text{Valor del test} = \frac{\text{RFV muestra}}{\text{RFV estándar}}$$

RFV estándar

g. Umbral e interpretación de los resultados:

Valor del test	Interpretación
$< 0,23$	negativo
$\geq 0,23$	positivo

i. Se imprime una hoja de resultados sobre la cual figuran:

- El tipo de ensayo realizado.
- La identificación de la muestra.
- La fecha y la hora.
- El número de lote y fecha de caducidad del kit.
- El RFV, el valor del test y el resultado con su interpretación por muestra.

Un resultado con un valor de test inferior al umbral indica que la muestra no contiene antígenos de *Salmonella*, o contiene antígenos de *Salmonella* en una concentración por debajo del umbral de detección.

Un resultado con un valor del test superior o igual al valor umbral indica que la muestra contiene antígenos de *Salmonella*.

Todos los resultados positivos emitidos por el test VIDAS®, se consideran como presuntivos y deben ser confirmados por el método tradicional de cultivo, de acuerdo a lo señalado en la Tabla 20.

Los resultados no válidos pueden aparecer cuando la lectura del ruido de fondo es superior a un umbral pre-determinado (indicando una contaminación del sustrato). En este caso, repetir el ensayo con la muestra inactivada o el reactivo en cuestión (S1, C1 o C2). Ver el manual del usuario para información complementaria.

4.1.11 Control de calidad

- a. Un control positivo y un control negativo se incluyen en cada caja de reactivos VIDAS® *Salmonella*.
- b. Los controles deben ser analizados inmediatamente después de la apertura de una nueva caja, con el fin de garantizar la ausencia de alteración de los reactivos.
- c. También es necesario comprobar cada calibración mediante el uso de estos controles. El equipo sólo podrá comprobar los valores de control identificados con C1 y C2
- d. No se podrán validar los resultados si los valores de control desvíasen de los valores esperados.
- e. Es responsabilidad del usuario garantizar que el control de calidad se realiza conforme a la legislación local en vigor.

4.2 Método ISO6579:2002 de detección y cuantificación de *Salmonella* ssp.

4.2.1 Fundamento

El aislamiento de *Salmonella* de alimentos y otras muestras ambientales mediante el método de cultivo convencional se basa en el enriquecimiento previo no selectivo de un

Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

volumen definido de la muestra, seguido de un paso de enriquecimiento selectivo, empleando medios selectivos, para luego realizar la confirmación bioquímica y serológica de colonias sospechosas. En los últimos años, varias agencias reguladoras, como la asociación de químicos analíticos oficiales, la agencia de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), el servicio de seguridad e inspección de alimentos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) y la Organización Internacional de Normalización (ISO) han estandarizado diferentes métodos de detección de *Salmonella* basándose en sus propiedades físicas y bioquímicas únicas.

4.2.2 Medios y reactivos

La descripción de la composición de los medios de cultivos o reactivos está en la sección 9.

- a. Caldo de lactosa
- b. Leche descremada en polvo (reconstituida)
- c. Caldo de selenita cistina (SC)
- d. Caldo de tetrionato (TT)
- e. Medio Rappaport-Vassiliadis (RV). El medio RV debe estar hecho de sus ingredientes individuales. Las formulaciones comerciales no son aceptables.
- f. Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)
- g. Agar entérico de Hektoen (HE)
- h. Agar sulfito de bismuto (BS)
- i. Triple azúcar agar de hierro (TSI)
- j. Caldo de triptona (triptófano)
- k. Trypticase (tríptico) caldo de soja
- l. Trypticase caldo de soja y triptosa
- m. Caldo MR-VP
- n. Agar citrato de Simmons
- o. Caldo de urea
- p. Caldo de urea (rápido)
- q. Caldo de malonato
- r. Agar lisina de *hierro* (LIA) (Edwards y Fife)
- s. Caldo de lisina descarboxilasa
- t. Medio de prueba de motilidad (semisólido)
- u. Caldo de cianuro de potasio (KCN)
- v. Caldo de carbohidrato rojo de fenol
- w. Caldo de carbohidratos púrpura
- x. Agar MacConkey
- y. Caldo de nutrientes
- z. Caldo de infusión de cerebro y corazón (BHI)
- aa. Solución de papaína, 5%
- bb. Solución de celulasa, 1%
- cc. Base de agar sangre de triptosa
- dd. Caldo de enriquecimiento universal
- ee. Caldo de enriquecimiento universal (sin citrato de amonio férrico)
- ff. Agua de peptona tamponada
- gg. Caldo Dey-Engley
- hh. Sulfito de potasio en polvo, anhidro
- ii. Solución de cloro, 200 ppm, que contiene 0,1% de dodecil sulfato de sodio
- jj. Etanol, 70%
- kk. Reactivo de Kovacs

- ll. Voges-Proskauer (VP) reactivos de prueba
- mm. Cristales de fosfato de creatina
- nn. Solución de hidróxido de potasio, 40%
- oo. Solución de hidróxido de sodio 1 N
- pp. Ácido clorhídrico 1 N
- qq. Solución de tinte verde brillante, 1%
- rr. Solución de colorante púrpura de bromocresol, 0.2%
- ss. Indicador rojo de metilo
- tt. Agua destilada estéril
- uu. Tergitol Aniónico 7
- vv. Triton X-100
- ww. Solución salina fisiológica, 0.85% (estéril)
- xx. Solución salina fisiológica formalizada
- yy. Antisuero somático polivalente de *Salmonella*
- zz. Antisuero flagelar polivalente de *Salmonella*
- aaa. Antiseros del grupo somático de *Salmonella*: A, B, C1, C2, C3, D1, D2, E1, E2, E3, E4, F, G, H, I, Vi y otros grupos, según corresponda.
- bbb. *Salmonella* Spicer-Edwards antisuero flagelar
- ccc. Agua de peptona tamponada modificada

4.2.3 Equipos y materiales

- a. Frascos estériles de 500 mL de boca ancha, tapas roscas, matraces Erlenmeyer estériles de 500 mL, vasos de precipitados estériles de 250 mL, embudos de vidrio o papel estériles del tamaño apropiado y, opcionalmente, recipientes de capacidad adecuada para acomodar muestras compuestas.
- b. Asa de Drigalsky.
- c. Balanza, con pesas; 2000 g de capacidad, sensibilidad de 0,1 g
- d. Balanza, con pesas; 120 g de capacidad, sensibilidad de 5 mg
- e. Incubadora 35 ± 2 °C.
- f. Incubadora refrigerada o refrigerador de laboratorio, 4 ± 2 °C
- g. Baño de agua, 49 ± 1 °C.
- h. Baño de agua, circulante, termostáticamente controlado, 43 ± 0,2 °C
- i. Cucharas estériles u otros instrumentos apropiados para transferir muestras de PMCP.
- j. Placas Petri de cultivo estériles, 15 × 100 mm, vidrio o plástico.
- k. Pipetas estériles, 1 mL, con graduaciones de 0,01 mL; 5 y 10 mL, con graduaciones de 0,1 mL.
- l. Aguja de inoculación y asa bacteriológica (aproximadamente 3 mm de diámetro), de nicrom, platino-iridio, alambre de cromo o plástico estéril.
- m. Tubos de ensayo o cultivo estériles, 16 × 150 mm y 20 × 150 mm; tubos serológicos, 10 × 75 mm o 13 × 100 mm.
- n. Gradillas para tubos de cultivos.
- o. Vortex
- p. Tijeras estériles, tijeras grandes, bisturí y pinzas
- q. Lámpara (para observar reacciones serológicas)
- r. Mechero Fisher o Bunsen
- s. Papel de prueba de pH (rango de pH 6-8) con graduaciones máximas de 0,4 unidades de pH por cambio de color.
- t. Medidor de pH
- u. Bolsas de plástico, 28 × 37 cm, estériles, con cinta sellable.

- v. Vasos de plástico, 4 L, autoclavables, para sostener bolsas de plástico durante la agitación e incubación.
- w. Esponjas no bactericidas (Nasco cat # B01299WA), o equivalente.
- x. Hisopos.

4.2.4 Cepas de referencias

Además de los cultivos de control positivo (*Salmonella* típica), se recomiendan 3 cultivos de *Salmonella* adicionales para ayudar en la selección de la morfología atípica de la colonia de *Salmonella* en agares selectivos. Estos cultivos son una *S. diarizonae* positiva a la lactosa, H₂S positiva (ATCC 12325) y una *S. abortus equi* negativa a la lactosa, H₂S negativa (ATCC 9842); o una *S. diarizonae* positiva para lactosa, negativa para H₂S (ATCC 29934). Estas cepas pueden obtenerse de la American Type Culture Collection (ATCC).

4.2.5 Procedimiento

4.2.5.1 Pretratamiento de la muestra

- a. Pesar 25 g o mL de muestra de cada lote en un frasco estéril de boca ancha con tapa rosca (500 mL) u otro recipiente apropiado.
- b. Añadir 225 mL de caldo de soja tripticasa estéril. Mezcle bien para formar una suspensión suave.
- c. Dejar reposar a temperatura ambiente por 60 ± 5 minutos
- d. Mezclar mediante agitación y determinar el pH con papel pH.
- e. Ajustar el pH, si es necesario, a 6,8 ± 0,2, mezclando bien antes de determinar el pH final. Afloje la tapa del recipiente 1/4 de vuelta e incube 24 ± 2 h a 35 °C.

4.2.6 Aislamiento de *Salmonella*

- a. Transferir 0,1 mL de mezcla a 10 mL de medio selenito cistina (SC).
- b. Transferir 1 mL de la mezcla a 10 mL de caldo de tetrionato (TT).
- c. Aplicar vortex a los caldos de cultivos.
- d. Incubar caldo SC y TT a 35 ± 2,0 °C por 24 ± 2 h.
- e. Aplicar vortex al caldo TT y sembrar con asa bacteriológica (3 mm de diámetro) 10 µl del caldo TT en agar sulfito de bismuto (BS), agar desoxicolato de xilosa lisina (XLD) y agar entérico Hektoen (HE). Preparar las placas de agar BS el día antes de la siembra y guardarlas en la oscuridad a temperatura ambiente.
- f. Aplicar vortex al caldo SC y repetir el procedimiento 5.4.2.6.e.
- g. Incubar las placas 24 ± 2 h a 35 °C.
- h. Examinar las placas en busca de colonias que puedan ser *Salmonella*.

4.2.7 Morfología de *Salmonella* spp. en agar selectivo HE, XLD y BS

- a. Agar entérico Hektoen (HE). Las cepas de *Salmonella* sp. típicas presentan colonias de azul verdoso a azul con o sin centros negros. Muchos cultivos de *Salmonella* pueden producir colonias con grandes centros negros brillantes o pueden aparecer como colonias casi completamente negras (Figura 10A). Sin embargo, las cepas de *Salmonella* sp. atípicas presentan un color azul a verde (Figura 10B).
- b. Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD). Las cepas de *Salmonella* sp. típicas presentan colonias rosadas con o sin centros negros. Muchos cultivos de *Salmonella* pueden producir colonias con grandes centros negros brillantes o pueden aparecer como colonias casi completamente negras (Figura 10C). En cambio, las cepas de *Salmonella* sp. atípicas presentan un color amarillo opaco (Figura 10D).
- c. Agar sulfito de bismuto (BS). Colonias marrones, grises o negras; a veces tienen un brillo metálico. El medio circundante generalmente es marrón al principio, pero puede

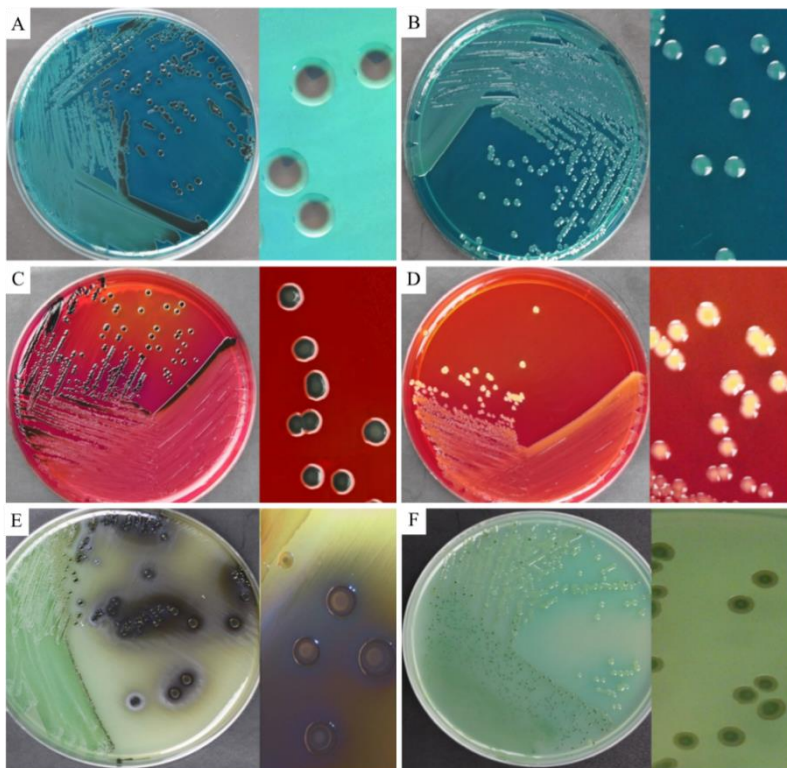
Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

volverse negro a tiempo con una mayor incubación, produciendo el llamado efecto halo (Figura 10E). Por otra parte, las colonias de las cepas de *Salmonella* sp. atípicas se observan de color verdes con poco o ningún oscurecimiento del medio circundante (Figura 10F).

4.2.8 Selección de colonias por morfología

- Seleccionar 2 o más colonias de *Salmonella* de cada placa de agar de medio selectivo después de 24 ± 2 h de incubación. En ausencia de las colonias típicas de *Salmonella* en los cultivos HE y XLD, seleccione 2 o más colonias de *Salmonella* atípicas.
- Si no se observa colonias en el agar BS incube por 24 ± 2 h más.
- Después de 48 ± 2 h de incubación en agar BS, seleccione 2 o más colonias típicas.
- En ausencia de colonias de *Salmonella* típicas o sospechosas, sembrar colonias de *Salmonella* atípicas de la siguiente manera:
- Pinchar con una aguja ligeramente el centro de la colonia e inocular el tubo con agar inclinado TSI mediante un pinchazo en el fondo y en zig-zag (o estría) en la superficie. Sin flamear, inocular el agar inclinado LIA pinchando dos veces el fondo del agar para luego sembrar la superficie del agar. Dado que la reacción de descarboxilación de lisina es estrictamente anaeróbica, el agar tendido de LIA deben tener un extremo profundo (4 cm).
- Incubar los cultivos de TSI y LIA a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 h. Tapar los tubos sin apretar para mantener las condiciones aeróbicas mientras se evita la producción excesiva de H_2S .

Figura 10. Crecimiento de cepas de *Salmonellas* spp. en agar selectivo. A-B, crecimiento en agar HE de *Salmonella* sp. típica y atípica, respectivamente. C-D, crecimiento en agar XLD de *Salmonella* sp. típica y atípica, respectivamente. E-F, crecimiento en agar BS de *Salmonella* sp. típica y atípica, respectivamente.

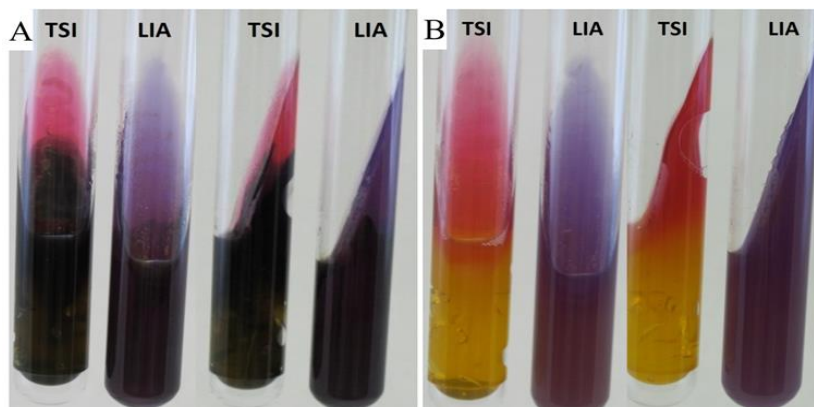


4.2.9 Detección de *Salmonella* en medios selectivos TSI y LIA

- a. La cepa típica de *Salmonella* en medio TSI produce una coloración roja en la superficie del agar (reacción alcalina) y una coloración amarilla en el extremo del agar (reacción ácida), con o sin producción de H₂S (ennegrecimiento del agar), Figura 11.
- b. En LIA, la cepa típica de *Salmonella* produce una coloración púrpura en el extremo del tubo (reacción alcalina), Figura 11. Considerar solo el color amarillo distintivo en el extremo del tubo como reacción ácida (negativa). No eliminar los cultivos que producen decoloración en el extremo del tubo. La mayoría de los cultivos de *Salmonella* producen H₂S en LIA (Figura 11). Algunos cultivos que no son de *Salmonella* producen una reacción rojo ladrillo en los cultivos LIA.
- c. Todos los cultivos que dan un extremo alcalino en LIA, independientemente de la reacción de TSI, deben conservarse como posibles aislados de *Salmonella* y enviarse a pruebas bioquímicas y serológicas.
- d. Los cultivos que presentan un crecimiento ácido en el extremo ácido en LIA y TSI y un crecimiento alcalino en la superficie del agar inclinado de LIA deben considerarse potenciales aislamientos de *Salmonella* y se deben someter a pruebas bioquímicas y serológicas.
- e. Los cultivos que den un crecimiento ácido en el extremo de agar LIA y TSI y un crecimiento ácido en la superficie de agar tendido TSI pueden descartarse por no ser *Salmonella*.
- f. Evaluar los cultivos de TSI presuntamente positivos como se indica a continuación, para determinar si son especies de *Salmonella*, incluida *S. arizonae*.
- g. Si los cultivos de TSI no presentan reacciones típicas para *Salmonella* (superficie del agar inclinado alcalino y extremo ácido), seleccionar adicionales colonias sospechosas de la placa de medio selectivo e inocular en agar tendido de TSI y LIA como se describió previamente.
- h. Aplicar pruebas de identificación bioquímica y serológica a:
 - i. Tres presuntos cultivos TSI obtenidos desde placas estriadas desde medio RV y tres presuntos cultivos de TSI agar provenientes desde caldo TT.
 - ii. Si no se aíslan 3 cultivos TSI presuntamente positivos de un conjunto de placas de agar, pruebe otros cultivos de agar TSI presuntamente positivos. Examine un mínimo de 6 cultivos TSI por cada unidad analítica de 25 g.

Figura 11. Crecimiento de cepas de *Salmonellas* sp. en medio agar TSI y LIA. A. Cepas de *Salmonella* sp. productoras de H₂S. B. Cepas de *Salmonellas* sp. productoras de H₂S.

Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas



4.2.10 Identificación de *Salmonella*

a. Análisis de cultivos mezclados

Proceder a sembrar los cultivos que parecieran estar mezclados en agar MacConkey, agar HE o agar XLD. Incubar las placas 24 ± 2 h a 35 °C. Examinar las placas para detectar la presencia de colonias sospechosas de ser *Salmonella*.

Evaluación del fenotipo:

- Agar MacConkey. Las colonias típicas aparecen transparentes e incoloras, a veces con el centro oscuro. Las colonias de *Salmonella* eliminarán áreas de bilis precipitada causada por la presencia de otros microorganismos presentes.
- Agar entérico Hektoen (HE).
- Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD). Transferir al menos 2 colonias sospechosas de ser *Salmonella* al agar tendido TSI y LIA como se describe en el punto 4.2.9 y luego continúe con la sección 4.2.10b para la interpretación de datos.

b. Análisis de cultivos puros

i. Prueba de ureasa (convencional)

Con una aguja estéril, inocular el crecimiento de cada cultivo en agar inclinado TSI presumiblemente positivo en tubos de caldo de urea. Dado que ocasionalmente, los tubos no inoculados de caldo de urea se vuelven rojo púrpura (prueba positiva), incluya el tubo no inoculado de este medio como control. Incubar 24 ± 2 h a 35 °C.

ii. Prueba de ureasa opcional (rápida)

Transferir dos veces un asa bacteriológica de 3 mm de diámetro a cada cultivo inclinado TSI presumiblemente positivo a tubos de caldo de urea. Incubar por 2 h en baño de agua a 37 ± 0.5 °C. Deseche todos los cultivos que muestren una prueba positiva. Conserve para estudio adicional todos los cultivos que den prueba negativa (sin cambio en el color del medio).

iii. Prueba flagelar polivalente serológica (H)

- 1) Seleccionar los cultivos en agar TSI que hayan dado negativos para la prueba de ureasa.
- 2) Inocular los cultivos seleccionados en caldo BHI e incubar 4-6 h a 35 °C hasta que se produzca un crecimiento visible (para analizar el mismo día); o en caldo

Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

de tripticasa soja-triptosa e incubar 24 ± 2 h a 35 °C (para analizar al día siguiente).

- 3) Agregar 2,5 mL de solución salina fisiológica formalizada a 5 mL de cualquier cultivo de caldo.
- 4) Procedimiento BD DIFCO Antisero H™. Seleccione 2 cultivos de caldo formalizados y pruebe con antiseros flagelares (H) polivalentes de *Salmonella* según las instrucciones del fabricante. Coloque 0,5 mL de antisuero flagelar (H) polivalente de *Salmonella* adecuadamente diluido en un tubo de ensayo serológico de 10×75 mm o 13×100 mm. Agregar 0,5 mL de antígeno a analizar. Preparar el control de solución salina mezclando 0,5 mL de solución salina fisiológica formalizada con 0,5 mL de antígeno formalizado. Incubar las mezclas en baño de agua a $48-50$ °C. Observar a intervalos de 15 min y leer los resultados finales en 1 h. Clasificar los resultados del test de la siguiente forma:
 - **Positivo:** aglutinación en la mezcla de prueba y sin aglutinación en el control.
 - **Negativo:** sin aglutinación en la mezcla de prueba y sin aglutinación en el control.
 - **No específico:** aglutinación tanto en la mezcla de prueba como en el control. Pruebe los cultivos con los antiseros Spicer-Edwards.
- 5) Procedimiento del Statens Serum Institute. Realizar la prueba flagelar polivalente (H) utilizando el antisuero flagelar polivalente de *Salmonella* del Statens Serum Institute. La *Salmonella* se cultiva durante la noche en un medio agar no selectivo. Agregue una pequeña gota de antisuero (aprox. 20 μ L) en un portaobjetos de vidrio o placa de Petri de plástico (15×100 mm). Transferir el cultivo usando un asa de inoculación de varias colonias a la gota de antisuero y mezclar bien. La cantidad de cultivo debería ser suficiente para dar una turbidez lechosa. Incline el portaobjetos o la placa de Petri durante 5-10 segundos. Clasificar los resultados del test de la siguiente forma:
 - **Positivo:** se ve como aglutinación visible.
 - **Negativo:** se ve como turbidez lechosa homogénea. Una aglutinación tardía o débil debe considerarse negativa. La solución salina fisiológica (0,85%, pH 7,4) se usa como control negativo y debe ser negativa.

iv. Prueba serológica de Spicer-Edwards

Utilizar esta prueba como alternativa a la prueba de flagelar polivalente (H). También se puede usar con cultivos que dan aglutinación inespecífica en la prueba de flagelar polivalente (H). Realizar la prueba de antiseros flagelar (H) de Spicer-Edwards.

Realizar pruebas bioquímicas adicionales en cultivos que den resultados de prueba flagelares positivos. Si ambos cultivos de caldo formalizados son negativos, realice pruebas serológicas en 4 cultivos de caldo adicionales. Si los cultivos TSI son ureasa negativa y presentaron resultados negativos en la prueba flagelar polivalente serológica.

v. Prueba de cultivos negativos a ureasa

1. Caldo de lisina descarboxilasa
 - Si la prueba de LIA fue satisfactoria, no es necesario repetirla. Utilizar el caldo de lisina descarboxilasa para la determinación final de la lisina descarboxilasa si el cultivo produce una reacción dudosa de LIA.

Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

- Inocular el caldo con una pequeña cantidad de crecimiento del cultivo de TSI inclinado sospechoso de ser *Salmonella* sp. Volver a colocar la tapa herméticamente e incubar 48 ± 2 h a 35°C , pero examinar intervalos de 2 h.
 - Las especies de *Salmonella* causan una reacción alcalina indicada por el color púrpura en todo el medio. La prueba negativa está indicada por el color amarillo en todo el medio. Si el medio aparece descolorido (ni morado ni amarillo) agregar unas gotas de colorante púrpura de bromocresol al 0,2% y volver a leer las reacciones del tubo.
2. Caldo de fenol rojo o base de caldo morado con 0,5% de dulcitol
- Inocular el caldo con una pequeña cantidad de crecimiento del cultivo de TSI. Colocar la tapa sin apretar e incubar a 35°C . Examinar cada 24 h hasta completar las 48 h de cultivo.
 - La mayoría de las especies de *Salmonella* dan una prueba positiva, indicada por la formación de gas en el vial de fermentación interna y el pH ácido (amarillo) del medio. La producción de ácido debe interpretarse como una reacción positiva.
 - La prueba negativa se indica por la ausencia de formación de gas en el vial de fermentación interna y el color rojo (con rojo fenol como indicador) o púrpura (con púrpura de bromocresol como indicador) en todo el medio.
3. Caldo de triptona (o triptófano)
- Inocular el caldo con un pequeño crecimiento del cultivo de agar TSI. Incubar 24 ± 2 h a 35°C y proceder de la siguiente manera:
 - Transferir cultivo de caldo de triptófano (24 h de incubación) mediante un asa de 3 mm de al caldo cianuro de potasio (KCN). Caliente el borde del tubo para que se forme un buen sellado cuando el tubo se tape con corcho recubierto de cera.
 - Incubar a 35°C . Examinar después de 24 h hasta completar las 48 h.
 - Interprete el crecimiento (indicado por la turbidez) como positivo. La mayoría de las especies de *Salmonella* no crecen en este medio, como lo indica la falta de turbidez.
4. Caldo malonato
- Transferir con el asa bacteriológica (3 mm de diámetro) desde el caldo de triptona de 24 h de incubación a caldo malonato. Debido a que los tubos no inoculados de caldo malonato se vuelven azules (prueba positiva) al pararse, incluya el tubo no inoculado de este caldo como control.
 - Incubar a 35°C y examinar cada 24 h hasta completar las 48 h de cultivo. La mayoría de los cultivos de especies de *Salmonella* dan una prueba negativa (color verde o sin cambios) en este caldo.
5. Prueba de indol
- Transferir 5 mL de cultivo de caldo de triptófano de 24 h a un tubo de ensayo vacío.
 - Añadir 0,2-0,3 mL de reactivo Kovacs.
 - La mayoría de los cultivos de *Salmonella* dan resultados negativos (falta de color rojo intenso en la superficie del caldo). Registre tonos intermedios de naranja y rosa como \pm .
- c. Pruebas serológicas flagelares (H) para *Salmonella*

Si la prueba de flagelar polivalente (H) o la prueba de tubo de ensayo flagelar (H) de Spicer-Edwards aún no se ha realizado, cualquiera de las pruebas se puede realizar aquí.

Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

i. Análisis de resultados

Los cultivos que muestren prueba de indol positiva y prueba flagelar serológica negativa (H) negativa, o prueba de KCN positiva y prueba de lisina descarboxilasa negativa se descartan por no ser *Salmonella*.

d. Pruebas serológicas somáticas (O) para *Salmonella*

i. Prueba somática polivalente (O)

- Con un lápiz de cera, marque 2 secciones de aproximadamente 1 × 2 cm cada una en el interior de la placa de Petri de vidrio o plástico (15 × 100 mm). Se pueden usar portaobjetos seccionados disponibles comercialmente. Emulsionar 3 mm de cultivo en bucle de 24-48 h de TSI inclinado o, preferiblemente, base de agar sangre de triptosa (sin sangre) con 2 mL de solución salina al 0,85%. Agregar 1 gota de suspensión de cultivo a la porción superior de cada sección rectangular marcada con crayón. Agregar 1 gota de solución salina a la parte inferior de una sección solamente. Agregar 1 gota de antisuero somático polivalente de *Salmonella* (O) a otra sección solamente. Con una aguja o asa de transferencia estéril limpia, mezclar la suspensión de cultivo con solución salina para una sección y repetir para otra sección que contenga antisuero. Inclinar las mezclas en movimiento de ida y vuelta durante 1 minuto y observe contra el fondo oscuro con buena iluminación. Considere cualquier grado de aglutinación como reacción positiva. Clasificar los resultados de la prueba de somática polivalente (O) de la siguiente manera:
 - **Positivo:** aglutinación en la mezcla de prueba; sin aglutinación en el control salino.
 - **Negativo:** sin aglutinación en la mezcla de prueba; sin aglutinación en el control salino.
 - **No específico:** aglutinación en mezclas de prueba y control. Realice más pruebas bioquímicas y serológicas como se describe en la Identificación de Enterobacteriaceae de Edwards y Ewing.

ii. Pruebas grupales somáticas (O)

Realizar el ensayo como se describe en la sección prueba somática polivalente, más arriba, usando antisueros somáticos (O) grupales individuales, incluido Vi, si está disponible, en lugar de antisuero somático polivalente (O) de *Salmonella*. Registrar cultivos que den aglutinación positiva con antisuero somático (O) individual como positivo para ese grupo. Registrar los cultivos que no reaccionan con el antisuero somático (O) individual como negativos para ese grupo.

e. Pruebas bioquímicas adicionales

Clasificar como *Salmonella* sp. aquellos cultivos que exhiben reacciones típicas de *Salmonella* sp. para las pruebas 1-11, que se muestran en la Tabla 20. Si un cultivo TSI de 25 g de unidad analítica se clasifica como *Salmonella* sp., no es necesario realizar más pruebas de otros cultivos TSI de la misma unidad analítica de 25 g. Los cultivos que contienen antígenos demostrables de *Salmonella* como se muestra en la prueba positiva de *Salmonella* flagelar (H) pero no tienen características bioquímicas de *Salmonella* deben purificarse.

Realizar las siguientes pruebas adicionales en cultivos que no dan reacciones típicas de *Salmonella* para las pruebas 1-11 en la Tabla 20 y que, en consecuencia, no clasifican como *Salmonella*.

Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

- i. Caldo de lactosa rojo fenol o caldo de lactosa púrpura
 - Inocular el caldo con una pequeña cantidad de cultivo proveniente del agar TSI.
 - Incubar a 35 °C por 48 ± 2 h y examinar cada 24 h.
 - Positivo - producción de ácido (amarillo) y producción de gas en vial de fermentación interna. Considerar la producción de ácido solo como reacción positiva.
 - La mayoría de los cultivos de *Salmonella* dan resultados negativos, observándose ausencia de formación de gases en el vial de fermentación interna y rojo (con rojo fenol como indicador) o púrpura (con púrpura de bromcresol como indicador) en todo el medio.
 - Desechar como no *Salmonella*, cultivos que dan pruebas positivas de lactosa, excepto los cultivos que presenten una reacción ácida en el extremo del agar inclinado y reacciones positivas en LIA, o cultivos que den reacciones positivas en caldo de malonato. Realizar más pruebas en estos cultivos para determinar si son *S. arizonae*.
- ii. Caldo de sacarosa roja de fenol o caldo de sacarosa púrpura
Seguir el procedimiento descrito para la evaluación anterior. Descartar los cultivos que dan pruebas positivas de sacarosa, excepto aquellos que de ácidos en TSI y reacciones positivas en LIA.
- iii. Caldo MR-VP
 - Inocular el medio con una pequeña cantidad de crecimiento de cada cultivo de TSI sospechoso de contener *Salmonella*. Incubar 48 ± 2 h a 35 °C.
 - Realizar la prueba Voges-Proskauer (VP) a temperatura ambiente de la siguiente manera: transferir 1 mL de cultivo de 48 h a medio de cultivo MR-VP e incubar otras 48 h adicionales a 35 °C. Luego de la incubación, añadir 0,6 mL de α-naftol y agitar bien. Añadir 0,2 mL de solución de KOH al 40% y agitar. Para intensificar y acelerar la reacción, agregar algunos cristales de creatina. Leer los resultados después de 4 h; El desarrollo de color rojo rosado a rubí en todo el medio es una prueba positiva. La mayoría de los cultivos de *Salmonella* son VP negativos, indicados por la ausencia de desarrollo de color rosado a rojo en todo el caldo.
 - Realizar prueba de rojo de metilo de la siguiente manera: a 5 mL de caldo MR-VP de 96 h, agregar 5-6 gotas de indicador de rojo de metilo. Leer los resultados de inmediato. La mayoría de los cultivos de *Salmonella* dan una prueba positiva, indicada por un color rojo difuso en el medio. Un color amarillo distintivo es prueba negativa.
 - Descartar los cultivos que dan pruebas positivas de KCN y VP y prueba negativa de rojo de metilo.
- iv. Agar citrato de Simmons
Inocular este agar, usando una aguja que contenga el crecimiento de la inclinación del agar TSI no clasificado. Inocular rayando la inclinación y apuñalando el trasero. Incubar 96 ± 2 h a 35 °C. Leer los resultados de la siguiente manera:
 - **Positivo:** presencia de crecimiento, generalmente acompañado de un cambio de color de verde a azul. La mayoría de los cultivos de *Salmonella* son citrato positivo.
 - **Negativo:** sin crecimiento o muy poco crecimiento y sin cambio de color.

v. Clasificación de los cultivos

- Clasificar, como *Salmonella*, los cultivos que tienen patrones de reacción de la Tabla 20.
- Descartar los cultivos que dan resultados enumerados en cualquier subdivisión de la Tabla 21.
- Realizar pruebas adicionales descritas en la Identificación de Enterobacteriaceae de Edwards y Ewing para clasificar cualquier cultivo que no esté claramente identificado como *Salmonella* por el esquema de clasificación en la Tabla 20 o no se elimina por no ser *Salmonella* por las reacciones de prueba en la Tabla 21.
- Si ninguno de los 2 cultivos de TSI realizados mediante pruebas bioquímicas confirma el aislamiento como *Salmonella*, realice pruebas bioquímicas en los cultivos de TSI negativos a ureasa restantes de los mismos 25 g unidad analítica.

Tabla 20. Reacciones bioquímicas y serológicas

Nº	Ensayo o sustrato	Resultados		Reacción de <i>Salmonella</i> spp. ^a
		Positivo	Negativo	
1	Glucosa (TSI)	Amarillo mantequilla	Rojo mantequilla	+
2	Lisina descarboxilasa (LIA)	Purpura	Amarillo mantequilla	+
3	H ₂ S (TSI y LIA)	Ennegrecimiento	No ennegrecimiento	+
4	Ureasa	Rojo-púrpura	No hay cambio de color	-
5	Caldo lisina descarboxilasa	Púrpura	amarillo	+
6	Caldo fenol rojo ducitol	Color amarillo y gas	No gas, no cambio de color	+ ^b
7	Caldo KNC	Crecimiento	Sin crecimiento	-
8	Caldo malonato	Color azul	No hay cambio de color	- ^c
9	Prueba indol	Color rojo en la superficie	Color amarillo en la superficie	-
10	Prueba flagelar polivalente	Aglutinación	No hay aglutinación	-
11	Prueba somática polivalente	Aglutinación	No hay aglutinación	+
12	Caldo lactosa rojo fenol	Color amarillo y/o gas	Sin cambio de color, ni producción de gas	- ^c
13	Caldo sacarosa rojo fenol	Color amarillo y/o gas	Sin cambio de color, ni producción de gas	-
14	Prueba Voges-Proskauer	Rosado a rojo	Sin cambio de color	-
15	Prueba rojo de metilo	Color rojo difuso	Amarillo difuso	+
16	Prueba citrato Simmons	Crecimiento, color azul.	Sin crecimiento y cambio de color	v

^a 90% o más positivo en 1 o 2 d, -, 90% o más negativo en 1 o 2 d, v: variable, ^b Prueba mayoritariamente negativa para *S. arizonae*, ^c Prueba mayoritariamente positiva para *S. arizonae*.

Tabla 21. Criterio para descartar cultivo de *Salmonella*

Nº	Prueba o sustrato	Resultado
1	Ureasa	Positiva (color rojo púrpura)
2	Prueba indol	Positivo (color rojo en la superficie)
	Prueba polivalente flagelar	Negativo (sin aglutinación)
	Prueba indol	Positivo (color rojo en la superficie)
	Prueba flagelar Spicer-Edwards	Negativo (sin aglutinación)
3	Lisina descarboxilasa y caldo KCN	Negativo (color amarillo) y positivo (crecimiento)
4	Caldo lactosa rojo fenol	Positivo (color amarillo y/o gas) ^{a,b}
5	Caldo sacarosa rojo fenol	Positivo (color amarillo y/o gas) ^b
6	Caldo KCN	Positivo (crecimiento)
7	Prueba Voges-Proskauer	Positivo (color rosado a rojo)
8	Prueba rojo de metilo	Negativo (color amarillo difuso)

^a Adicionalmente debe presentar una prueba positiva en caldo de malonato para determinar si corresponde a *S. arizonae*. ^bNo desechar los cultivos de caldo positivos si los cultivos de LIA correspondientes producen reacciones típicas de *Salmonella*; realice más pruebas para determinar si son especies de *Salmonella*.

f. Resumen de los métodos de identificación de *Salmonella*

- Confirmación serológica: Realizar prueba serológica somática (O) de *Salmonella* y la prueba flagelar serológica de *Salmonella* (H) o la prueba flagelar (H) de Spicer-Edwards. La confirmación serológica siempre debe combinarse con la confirmación bioquímica (Tabla 20).
- Confirmación bioquímica: además del sistema de evaluación de análisis bioquímico convencional, se puede utilizar un sistema de identificación comercial mediante análisis bioquímicos (ej. API 20E, Enterotube II, Enterobacteriaceae II (AOAC OMA 978.24), MICRO-ID (AOAC OMA 989.12) o Vitek 2 GN (AOAC OMA 2011.17)). La elección de un sistema comercial se debe basar en la demostración de la correlación entre el sistema comercial y el sistema convencional descrito en esta sección de identificación. Los kits bioquímicos comerciales no deben usarse como un sustituto de las pruebas serológicas.
- Prueba de confirmación de PCR en tiempo real: confirmación de aislados de *Salmonella* por qPCR en tiempo real, disponible en la web de la FDA.
- Prueba de confirmación de amplificación isotérmica mediada por bucle (*Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) confirmation test*, LAMP): confirmación de aislados de *Salmonella* por LAMP, disponible en la web de la FDA.
- Prueba de confirmación ANSR® de *Salmonella* (método AOAC OMA 2013.14): utilizando un ensayo de amplificación de ácido nucleico isotérmico basado en la

tecnología de reacción de amplificación de enzimas de corte (NEAR) para la identificación y confirmación de *Salmonella*.

- Método de biotipador MALDI de Bruker (método OO AOAC 2017.09): utilizando espectrometría de masa (MS) de desorción / ionización por láser asistida por matriz (MALDI-TOF) para la identificación y confirmación de bacterias.
- Todos los kits comerciales enumerados anteriormente han sido validados por un tercero y han sido validados los métodos de validación microbiológica de la AOAC o ISO DIS 16140-6 (EN).
- Otros métodos de confirmación instrumental validados por las Pautas de validación de métodos microbiológicos de la FDA, Apéndice J de AOAC o ISO DIS 16140-6 son aceptables si están aprobados para su uso por el Subcomité de validación de métodos de microbiología de la FDA.

g. Interpretación de resultados y toma de decisiones

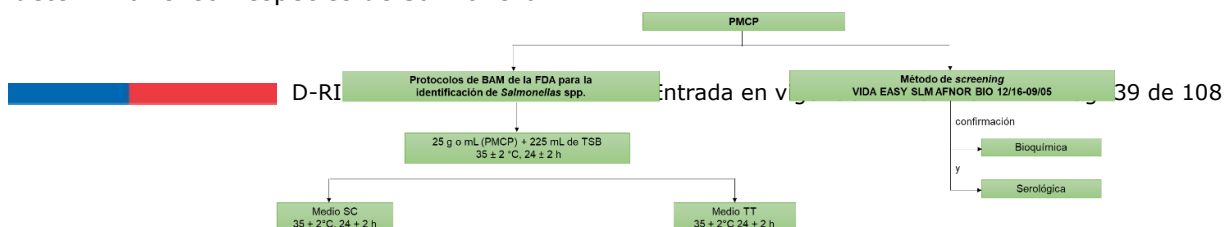
- Informe como *Salmonella* aquellos cultivos clasificados como *Salmonella* por confirmación serológica y bioquímica, o por uno de los métodos indicados en el punto anterior.
- Deseche los cultivos no confirmados como *Salmonella* por serología, y uno de los métodos restantes.
- Para los cultivos que tienen una confirmación conflictiva por los métodos anteriores, clasifíquelos de acuerdo con las pruebas adicionales especificadas anteriormente, o pruebas adicionales según lo especificado por Edwards y Ewing, o envíelas al laboratorio de tipificación de referencia para la identificación y serotipificación.


h. Tratamiento de cultivos con prueba flagelar negativa (H)

En el caso de que un cultivo presente pruebas bioquímicas positivas para *Salmonella*, pero muestre un resultado negativo para la prueba de aglutinación flagelar, se tendrá que inocular el medio de prueba de motilidad, usando una pequeña cantidad de inóculo del medio TSI. Introducir el inóculo aproximadamente 10 mm desde el borde de la placa hasta una profundidad de 2-3 mm. No apuñalar al fondo de la placa ni inocular ninguna otra porción. Incubar 24 h a 35 °C. Si los organismos han migrado 40 mm o más, vuelva a realizar la prueba aglutinación flagelar de la siguiente manera: Transferir inóculo (proveniente de la zona más alejada del punto de inoculación) con el asa bacteriológica de 3 mm al caldo de tripticasa soja-triptosa. Repetir las pruebas serológicas flagelar polivalente (H) o Spicer-Edwards. Si los cultivos no son móviles después de las primeras 24 h, incubar a 35 °C por 24 h adicionales. Si todavía no es móvil, incuba hasta 5 días más a 25 °C. Clasificar el cultivo como no móvil si las pruebas anteriores siguen siendo negativas. Si se sospecha que el cultivo flagelar (H) negativo es una especie de *Salmonella* debido a sus reacciones bioquímicas, se deberá realizar su identificación molecular y/o serotipado.

Figura 12. Matriz experimental para la detección de *Salmonella* spp. ^a, colonia típica. ^b, colonia atípica. ^c, +, 90% o más positivo en 1 o 2 días. ^d, -, 90% o más negativo en 1 o 2 días, ^e, prueba mayoritariamente negativa para *S. arizonae*, ^f, prueba mayoritariamente positiva para *S. arizonae*.

^f, Adicionalmente debe presentar una prueba positiva en caldo de malonato para determinar si corresponde a *S. arizonae*. ^g, No desechar los cultivos de caldo positivos si los cultivos de LIA correspondientes producen reacciones típicas de *Salmonella*; realice más pruebas para determinar si son especies de *Salmonella*.



	DOCUMENTO GENERAL
	Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

5. Métodos para detección de *Shigella* spp.

El procedimiento de diagnóstico a utilizar por el laboratorio puede ser uno, o más de uno, de los siguientes métodos:

- Método de detección rápida de muestras de PMCP mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e identificación de presuntas aislados de *Shigella* mediante el sistema API® 20E.
- Método de detección descrito en el capítulo 6 del Manual de Análisis Bacteriológico (BAM) de la FDA.

5.1 Método de detección rápida de *Shigella* sp. mediante PCR

Este protocolo se describe en el Compendio de Métodos Analíticos de Health Canada MFPL-26.

Después del enriquecimiento de muestras PMCP en caldo *Shigella* con novobiocina, se toma una alícuota de cultivo para someterla a un procedimiento de (PCR). Esta reacción amplifica un fragmento de 629 pares de bases (pb) dentro de los plásmidos de 220 Kpb y ADN cromosómico de *Shigella* spp. Los oligonucleótidos (partidores) utilizados en la PCR no son específicos para *Shigella* spp., también amplifican el mismo apicon para *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC).

5.1.1 Cepas de referencias

Se utilizarán como estándares las cepas *Shigella sonnei* (ATCC 29930), *Shigella flexneri* (ATCC 29903), *Shigella dysenteriae* (ATCC 13313) o *Shigella boydii* (ATCC 8700). Estas deben incluirse como control positivo y ser mantenidas y utilizadas de acuerdo con lo señalado en la Norma Chilena 2726. Las cepas de trabajo obtenidas a partir de dichas cepas ATCC, serán utilizadas para el control del método de ensayo. Para el control de calidad de los medios de cultivo, podrán utilizarse las cepas ATCC recomendadas por el fabricante, tanto para controles positivos como controles negativos.

5.1.2 Procedimiento

a. Extracción de ADN

- Pesar asépticamente 25 g o mL de muestra de PMCP en 225 mL de TSYE que contiene 0,5 g/mL de novobiocina.
- Mantener la suspensión 10 minutos a temperatura ambiente y agitar periódicamente.
- Verter el sobrenadante en un matraz Erlenmeyer estéril de 500 mL y ajustar el pH a $7,0 \pm 0,2$ con NaOH estéril 1 N o HCl 1 N.
- Incubar el enriquecimiento de la muestra a 35-37 ° C por 20-24 h.
- Transferir 100 µL de la muestra (cultivo o caldo enriquecido) a 900 µL de agua libre de nucleasa (para un volumen total de 1 mL) en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL estéril.
- Centrifugar a 4 °C durante 3 minutos a 9000 -13.000 x g.
- Retire el sobrenadante y resuspender el sedimento en 1 mL de solución estéril Tween-20 al 1%.
- Aplicar vortex a alta velocidad durante 10 segundos.
- Centrifugar a 4 °C durante 3 minutos a 9.000- 13.000 x g.
- Retirar el sobrenadante, agregar 200 µL de matriz InstaGene matriz® al sedimento.
- Agitar en vórtex durante al menos 10 segundos.
- Transferir el tubo a un bloque calefactor o baño e incube a 56 °C durante 15 a 30 minutos.

Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

- Mezclar el contenido agitando en vórtex durante 10 segundos y coloque el tubo en un bloque calefactor a 100 °C o baño de agua hirviendo, durante 8 minutos.
- Enfriar en hielo. Agitar durante 10 segundos, luego centrifugar a 4 °C durante 3 minutos a 9.000-13.000 x g.
- Proceder con la amplificación por PCR o almacenaje a - 20 °C hasta que sea necesario.

b Reacción de PCR

- Realizar la reacción de amplificación del marcador *ipaH* con los siguientes componentes: 5 µL de DNA, 2,5 mM de MgCl₂, 200 µMol de dNTPs, 1 µMol de cada partidor (*ipaH*-F (5'-GTT CCT TGA CCG CCT TTC CGA TAC CGT C-3') y *ipaH*-R (5'-GCC GGT CAG CCA CCC TCT GAG AGT AC-3'), 2,5 U de Taq polimerasa, tampón para la Taq polimerasa 1 X, 2% de tween 20 y agua Millipura libre de nucleasas para obtener un volumen final de reacción de 50 µL.
- Realizar el siguiente perfil de amplificación del gen *ipaH* consiste en una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, seguido de 45 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95°C por 15 s, temperatura de hibridación de 45°C durante 20s y una extensión a 72 °C por 70s) y una extensión final a 72 °C por 5 min.

c Electroforesis del producto de PCR

- Analizar el producto de PCR (o amplicón) mediante electroforesis en gel de agarosa. Si es necesario, los amplicones se pueden almacenar a 4 °C hasta el análisis.
- Preparar un gel de agarosa al 2,0% (p/v) en tampón 0,5 X TBE (Tris-Borate-EDTA). La agarosa se puede disolver agitando en una placa caliente o en el microondas durante 1 a 2 minutos usando alta potencia.
- Asegúrese de que la agarosa esté completamente disuelta (es decir, líquido transparente sin partículas en suspensión).
- Enfriar la agarosa y agregar 2 µL de solución de bromuro de etidio (10 mg / ml) por 40 mL de agarosa. Mezcle suavemente evitando la formación de burbujas.
- Verter en una bandeja de gel evitando la formación de burbujas o atrapamiento de burbujas.
- Agregar un peine bien formado y permita que el gelifique durante aproximadamente 20 a 30 min.
- Preparar muestras para electroforesis: en tubos limpios de microcentrifuga, mezclar 4 µL de tampón de carga (5x) con 25 µL de producto de PCR.
- Cuando el gel de agarosa se haya gelificado, retirar el peine de la bandeja, colocar la bandeja con gel en el aparato de electroforesis y llene el depósito con tampón TBE 0,5 X para cubrir el gel con tampón para una profundidad de 4 mm.
- Cargar 10 µL de los productos de PCR junto con tampón de carga en los pocillos del gel. Incluir una muestra de marcador de tamaño molecular de ADN (p. Ej., ADN de escalera de 100 pb) y controles positivos.
- Realizar la electroforesis a 100 V por aproximadamente 50 minutos o hasta que el frente de banda se haya extendido a una distancia de aproximadamente dos tercios de la longitud del gel.
- Retirar el gel de la bandeja y visualizar las bandas de ADN mediante la exposición a la luz ultravioleta (onda corta) utilizando un transiluminador. Los geles se pueden fotografiar para facilitar el análisis y para fines de mantenimiento de registros.

d. Análisis de resultados

- El amplicón generado a partir de *Shigella* spp. presenta un tamaño de 629 pb. Por lo tanto, una prueba de PCR positiva producirá un fragmento de ADN de 629 pb que aparecerá como una banda intensa en un gel de agarosa teñido con agente intercalante fluorescente.
- Debe aparecer una banda de 629 pb para los controles positivos. Ausencia de una banda de control positivo invalida la prueba y las muestras deben volver a analizarse.
- Cualquier banda correspondiente al amplicón de 629 pb que aparezca en el control de reactivos indica problemas de contaminación. Las muestras deben ser reanalizadas utilizando un nuevo lote de reactivos.
- Cualquier muestra testada que presente una banda distinta a 629 pb se considera presunta positiva.
- La complementación de los resultados bioquímicos permitirá la identificación de los aislados de *Shigella*, Figura 13.

5.2 Aislamiento e identificación de las presuntas colonias de aislados de *Shigella* mediante sistema API®20E

5.2.1 Enriquecimiento de *Shigella sonnei*

- a. Pesar asépticamente 25 g de muestra de PMCP en 225 mL de caldo *Shigella* suplementado con novobiocina (0,5 µg / mL).
- b. Mantener la suspensión 10 minutos a temperatura ambiente y agitar periódicamente.
- c. Verter el sobrenadante en un matraz Erlenmeyer estéril de 500 mL.
- d. Ajustar el pH, si es necesario, a $7,0 \pm 0,2$ con NaOH 1 N estéril o HCl 1 N.
- e. Colocar el matraz en el frasco anaeróbico, insertar la bolsa / bolsita generadora de gas anaeróbico (use el número recomendado por el fabricante del frasco anaeróbico, de acuerdo con el volumen del frasco).
- f. Insertar un indicador anaeróbico y apretar la tapa.
- g. Incubar los frascos a 44,0 °C en una incubadora de aire forzado durante 20h.
- h. Enriquecimiento de otras especies de *Shigella*. Proceder como se indica arriba, pero utilizar novobiocina a 3,0 µg/ml e incuba anaeróbicamente a 42,0 °C en una incubadora de aire forzado.
- i. Agitar la suspensión del cultivo de enriquecimiento y sembrar en una placa de agar selectivo SS (Biomérieux), seleccionar las presuntas colonias según las descripciones del fabricante (este debe ser igual que el crecimiento que se observa con las cepas controles).
- j. Realizar la identificación con el método comercial API®20E.

5.2.2 Control de calidad

Un análisis de un control positivo y un control negativo se deben incluir cuando se abre un nuevo kit de reacciones de API®20E, con el fin de garantizar la ausencia de alteración de los reactivos.

No se podrán validar los resultados si los valores del control se desvían de los valores esperados.

5.3 Protocolos descritos para la identificación de *Shigella* spp. por el procedimiento de BAM de la FDA

5.3.1 Medios de cultivos

La descripción de la composición de los medios de cultivos o reactivos está en la sección 9.

- a. Caldo de *Shigella* con novobiocina

- b. Trypticase caldo de extracto de levadura de soja (TSYE)
- c. Agar MacConkey
- d. Agar triple hierro de azúcar (TSI)
- e. Caldo de urea
- f. Medio de prueba de motilidad (semisólido)
- g. Caldo de cianuro de potasio (KCN)
- h. Caldo de malonato
- i. Caldo de triptona (triptófano), 1%
- j. Caldo MR-VP
- k. Agar citrato de Christensen
- l. Agar para infusión de ternera
- m. Caldo púrpura de bromocresol suplementado con los siguientes carbohidratos, cada uno a un nivel de 0.5%: adonitol, salicina, ramnosa, glucosa, inositol, lactosa, manitol, rafinosa, sacarosa, xilosa, dulcitol y glicerol.
- n. Agar acetato
- o. Caldo de mucate
- p. Caldo de control de mucate
- q. Medio basal descarboxilasa (lisina, Falkow)
- r. Medio basal descarboxilasa (ornitina)

5.3.2 Reactivos y tinciones

- a. Reactivo de Kovacs
- b. Reactivos de prueba Voges-Proskauer
- c. Solución de hidróxido de sodio 1 N
- d. Ácido clorhídrico 1 N
- e. Indicador rojo de metilo
- f. Solución salina fisiológica, 0.85% (estéril)
- g. Novobiocina
- h. Antiseros polivalentes de *Shigella* para los grupos A, A1, B, C, C1, C2, D y Alkalescens-Dispar biotipos 1-4
- i. Reactivos de tinción de Gram
- j. Agarosa
- k. Azul de bromofenol (por ejemplo, un colorante de seguimiento en el tampón de carga)
- l. dNTP.
- m. DNA Ladder 100 bp (o equivalente)
- n. Bromuro de etidio u otro agente intercalante de ácidos nucleicos
- o. Sal disódica de EDTA
- p. KCl
- q. Aceite mineral (si es necesario para algunos tipos de termocicladores).
- r. MgCl₂
- s. Sacarosa.
- t. Tampón de PCR 10X (concentrado)
- u. Taq ADN polimerasa
- v. Cianol de xileno
- w. Tris [hidroximetil] aminometano (por ejemplo, base Trizma® de Sigma)
- x. Agua libre de ADNasa ARNasa
- y. InstaGene matriz® (BioRad)

5.3.3 Equipos y materiales

- a. Lo mismo que para *Salmonella*
- b. Incubadoras de aire forzado, mantenidas a 42.0 ± 0.3 °C y 44.0 ± 0.3 °C

- c. Tarro anaeróbico
- d. Bolsa / bolsita generadora de gas anaeróbico
- e. Indicador anaeróbico
- f. Termociclador para PCR convencional
- g. Cámara de electroforesis
- h. Transiluminador

5.3.4 Cepas de referencias

- a. Se utilizarán como estándares las cepas *Shigella sonnei* (ATCC 29930), *Shigella flexneri* (ATCC 29903), *Shigella dysenteriae* (ATCC 13313) o *Shigella boydii* (ATCC 8700) deben incluirse como control positivo. Las cuáles serán mantenidas y utilizadas de acuerdo con lo señalado en la Norma Chilena 2726.
- b. Las cepas de trabajo obtenidas a partir de dichas cepas ATCC, serán utilizadas para el control del método de ensayo. Para el control de calidad de los medios de cultivo, podrán utilizarse las cepas ATCC recomendadas por el fabricante, tanto para controles positivos como controles negativos.

5.3.5 Procedimiento

5.3.5.1 Método de cultivo convencional

- a. Pesar asépticamente 25 g o mL de muestra de PMCP en 225 mL de caldo *Shigella* suplementado con novobiocina (0,5 µg / mL).
- b. Mantener la suspensión 10 minutos a temperatura ambiente y agitar periódicamente.
- c. Verter el sobrenadante en un matraz Erlenmeyer estéril de 500 mL.
- d. Ajustar el pH, si es necesario, a $7,0 \pm 0,2$ con NaOH 1 N estéril o HCl 1 N.
- e. Colocar el matraz en el frasco anaeróbico, insertar la bolsa / bolsita generadora de gas anaeróbico (use el número recomendado por el fabricante del frasco anaeróbico, de acuerdo con el volumen del frasco),
- f. Insertar un indicador anaeróbico y apretar la tapa.
- g. Incubar los frascos a 44 °C en una incubadora de aire forzado durante 20 h.
- h. Agitar la suspensión del cultivo de enriquecimiento y sembrar en una placa de agar MacConkey.
- i. Incubar 20 h a 35 ° C.

Enriquecimiento de otras especies de *Shigella*. Proceda como se indica arriba, pero utilizar novobiocina a 3,0 µg/ml e incube anaeróbicamente a 42 °C.

5.3.5.2 Aislamiento y caracterización fisiológica

- a. Examinar las placas de agar MacConkey. Las colonias de *Shigella* son ligeramente rosadas y translúcidas, con o sin bordes ásperos.
- b. Inocular colonias sospechosas en los siguientes medios: caldo de glucosa, agar tendido TSI, caldo de lisina descarboxilasa, agar de motilidad y triptona.
- c. Incubar a 35 °C durante 48 h, examinar cada 20 h.
- d. Seleccionar los aislados que presenten las siguientes características:
 - i. bacilos Gramnegativos
 - ii. Negativo para H₂S, ureasa, glucosa (gas), motilidad, lisina descarboxilasa, sacarosa, adonitol, inositol, lactosa (2 días), KCN, malonato, citrato y salicina;
 - iii. Positivo para rojo de metilo.
 - iv. Desechar todos los cultivos que muestren motilidad, formación de gases (H₂S), descarboxilación de lisina y fermentación de sacarosa o lactosa.
 - v. Todos los aislamientos sospechosos del enriquecimiento a 42 °C pueden ser positivos o negativos y, en consecuencia, deben conservarse.

- vi. Comparar el comportamiento fisiológico de los potenciales aislados de *Shigella* con el de los 32 serotipos presentados en las Tablas 22-25. Si estas pruebas no pueden identificar el serotipo, son posibles dos explicaciones: que el serotipo no ha sido aceptado por una comisión internacional de taxonomía como una especie de *Shigella* o que los cultivos pueden ser *E. coli*.
- vii. Evaluar las reacciones de mucate y acetato para contribuir a esclarecer. Las especies de *Shigella* tienden a ser negativas en todas estas reacciones, mientras que la *E. coli* anaerógena (no productora de gas) tiende a ser positiva en al menos una de las reacciones (Tabla 26).

5.3.5.3 Caracterización serológica

- a. Inocular las cepas sospechosas de ser *Shigella* spp. en agar tendido de infusión de ternera.
- b. Incubar a 35°C durante 24 h.
- c. Inocular una solución salina al 0,85% a una turbidez N° 5 McFarland
- d. Marcar nueve rectángulos de 3 × 1 cm en una placa de Petri de vidrio transparente con un lápiz de cera.
- e. Agregar gotas de suspensión, antisuero y solución salina de acuerdo con el siguiente protocolo.
- f. Mezclar el contenido de cada rectángulo con una aguja, teniendo cuidado de que no se mezcle entre rectángulos.
- g. Oscilar suavemente la placa Petri por 3 a 4 min para acelerar la aglutinación. Leer la prueba de la aglutinación de la siguiente manera:
 - 0 = sin aglutinación
 - 1+ = aglutinación apenas detectable
 - 2+ = aglutinación con 50% de limpieza
 - 3+ = aglutinación con 75% de limpieza
 - 4+ = flóculo visible con fluido de suspensión totalmente despejado.
- h. Volver a examinar la suspensión en sueros monovalentes que pertenecen a cada polivalente en el que se ha producido una reacción positiva distinta (2+, 3+, 4+). En el caso de una reacción negativa, calentar la suspensión en un vaporizador durante 30 minutos para hidrolizar el antígeno capsular interferente.

Tabla 22. Reacciones bioquímicas de *S. dysenteriae* subgrupo A^a

	Manitol	%+	Ducitol	%+	Xilosa	%+	Ramnosa	%+	Rafinosa	%+	Glicerol	%+	Indol	%+	Ornitina ^b	%+
1	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	+ o (+)	100	-	0	-	0
2	-	0	-	0	-	0	+	98	-	0	(+) o +	98	+	100	-	0
3	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	(+) o +	100	-	0	-	0
4	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	(+) o +	100	-	0	-	0
5	-	0	+ o (+)	100	-	0	-	0	-	0	+ o (+)	100	-	0	-	0
6	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	- o (+)	38	-	0	-	0
7	-	0	-	0	-	0	(+) o +	90	-	0	-	0	+	100	-	0
8	-	0	-	0	+ o (+)	96	-	8	-	0	+ o (+)	100	+	100	-	0
9	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	+ o (+)	100	-	0	-	0
10	-	0	-	0	+	100	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0

^a +, 90% o más de cepas dan positivo en 1 o 2 días; -, 90% o más de las cepas dan negativo; + o -, mayoría positivo; - o +, mayoría negativo; (+) retraso positivo. ^b Ornitina descarboxilasa.

Tabla 23. Reacciones bioquímicas de serotipos de *S. sonnei* subgrupo D^a

Manitol	%+	Ducitol	%+	Xilosa	%+	Ramnosa	%+	Rafinosa	%+	Glicerol	%+	Indol	%+	Ornitina ^b	%+
+	99	-	1	-	1	+ o (+)	98	D	84	D	46	-	0	+	>99

Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

^a +, 90% o más de cepas dan positivo en 1 o 2 días; -, 90% o más de las cepas dan negativo; + o -, mayoría positivo; - o +, mayoría negativo; (+) retraso positivo; D, diferentes resultados de las reacciones [+ , (+), -].

Tabla 24. Reacciones bioquímicas de serotipo de *S. boydii* subgrupo C^a

	Manitol	%+	Ducitol	%+	Xilosa	%+	Ramnosa	%+	Rafinosa	%+	Glicerol	%+	Indol	%+	Ornitina ^b	%+
1	+	100	-	1	+ o (+)	97	-	0	-	0	(+) o +	96	-	0	-	0
2	+	100	-	1	-	0	-	0	-	0	+ o (+)	100	-	0	-	0
3	+	100	D	75	D	86	-	0	-	0	+ o (+)	91	-	0	-	0
4	+	99	- o (+)	28	-	0	-	0	-	0	+ o (+)	100	-	0	-	0
5	+	100	-	0	(+)	94	-	0	-	0	D	61	+	100	-	0
6	+ o (+)	100	(+) o +	100	+	100	-	0	-	0	(+) o +	100	-	0	-	0
7	+	100	-	0	+	98	-	0	-	0	(+) o +	98	+	100	-	0
8	+	100	-	0	+	94	-	0	-	0	(+) o +	100	-	0	-	0
9	+	95	-	0	-	0	D	80	-	0	(+) o -	82	+	100	-	0
10	+	94	+	100	D	84	-	0	-	0	(+) o +	100	-	0	-	0
11	+	100	- o (+)	34	+ o (+)	100	-	0	-	0	(+) o +	100	+	100	-	0
12	+	100	- o (+)	14	-	0	-	0	-	0	- o +	14	-	0	-	0
13	+	100	-	0	-	0	-	0	-	0	(+) o -	63	+	100	+	100
14	- o +	29	-	0	(+) o +	100	-	0	-	0	+ o (+)	100	-	0	-	0
15	+	90	-	0	-	0	-	0	-	0	(+) o -	64	+	100	-	0

^a +, 90% o más de cepas dan positivo en 1 o 2 días; -, 90% o más de las cepas dan negativo; + o -, mayoría positivo; - o +, mayoría negativo; (+) retraso positivo; D, diferentes resultados de las reacciones [+ , (+), -].

^b Ornitina descarboxilasa.

Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

Tabla 25. Reacciones bioquímicas de serotipo de *S. flexneri* subgrupo B^a

	Manitol	%+	Ducitol	%+	Xilosa	%+	Ramnosa	%+	Rafinosa	%+	Glicerol	%+	Indol	%+	Ornitina(b)	%+
1	+	95	-	0	-	0	-	0	D	89	-	0	- o +	35	-	0
2	+	99	-	0	-	0	-	0	D	77	-	0	- o +	44	-	0
3	+	98	-	0	-	0	D	12	D	88	-	0	+ o -	88	-	0
4	+	99	-	0	-	0	D	23	D	82	-	0	+ o -	55	-	0
4	-	0	-	0	D	71	- o +	48	-	3	-	0	+	98	-	0
5	+	99	-	0	-	0	-	S	D	72	-	0	+	95	-	0
6	+	>99	D	80	-	4	-	6	-	0	D	88	-	0	-	0
6(c)	+	100	D	86	D	75	-	0	-	0	+ o (+)	100	-	0	-	0
6(c)	-	0	+ o (+)	100	-	0	-	0	-	0	(+)	100	-	0	-	0

^a +, 90% o más de cepas dan positivo en 1 o 2 días; -, 90% o más de las cepas dan negativo; + o -, mayoría positivo; - o +, mayoría negativo; (+) retraso positivo; D, diferentes resultados de las reacciones [+ , (+), -].

^b Ornitina descarboxilasa

^c Algunos cultivos de *S. flexneri* 6 (los biotipos de Newcastle y Manchester) producen gas a partir de sustratos fermentables; otras *Shigella* son anaerógenas

Tabla 26. Resultados de reacciones de *Shigella* y *Escherichia coli* en medio acetato, citrato

Especie	Acetato de sodio	%+	(%+)	Muscato de Christensen	%+	(%+)	Muscato de sodio	%+	(%+)
<i>S. dysenteriae</i>	-	0	0	-	0	0	-	0	0
<i>S. flexneri</i>	-	0	0	-	0	0	-	0	0
<i>S. boydii</i>	-	0	0	-	0	0	-	0	0
<i>S. sonnei</i>	-	0	0	-	0	0	D	6,4	(30,3)
<i>E. coli</i>	+ o (+)	83,8	(9,7)	D	15,8	(18,4)	+	91,6	(1,4)
Biotipos de Alkalescens-Dispar	+ o (+)	89,6	(4,7)	D	75	(12,5)	D	29,5	(27,9)

^a +, 90% o más de cepas dan positivo en 1 o 2 días; -, 90% o más de las cepas dan negativo; + o -, mayoría positivo; - o +, mayoría negativo; (+) retraso positivo; D, diferentes resultados de las reacciones [+ , (+), -].

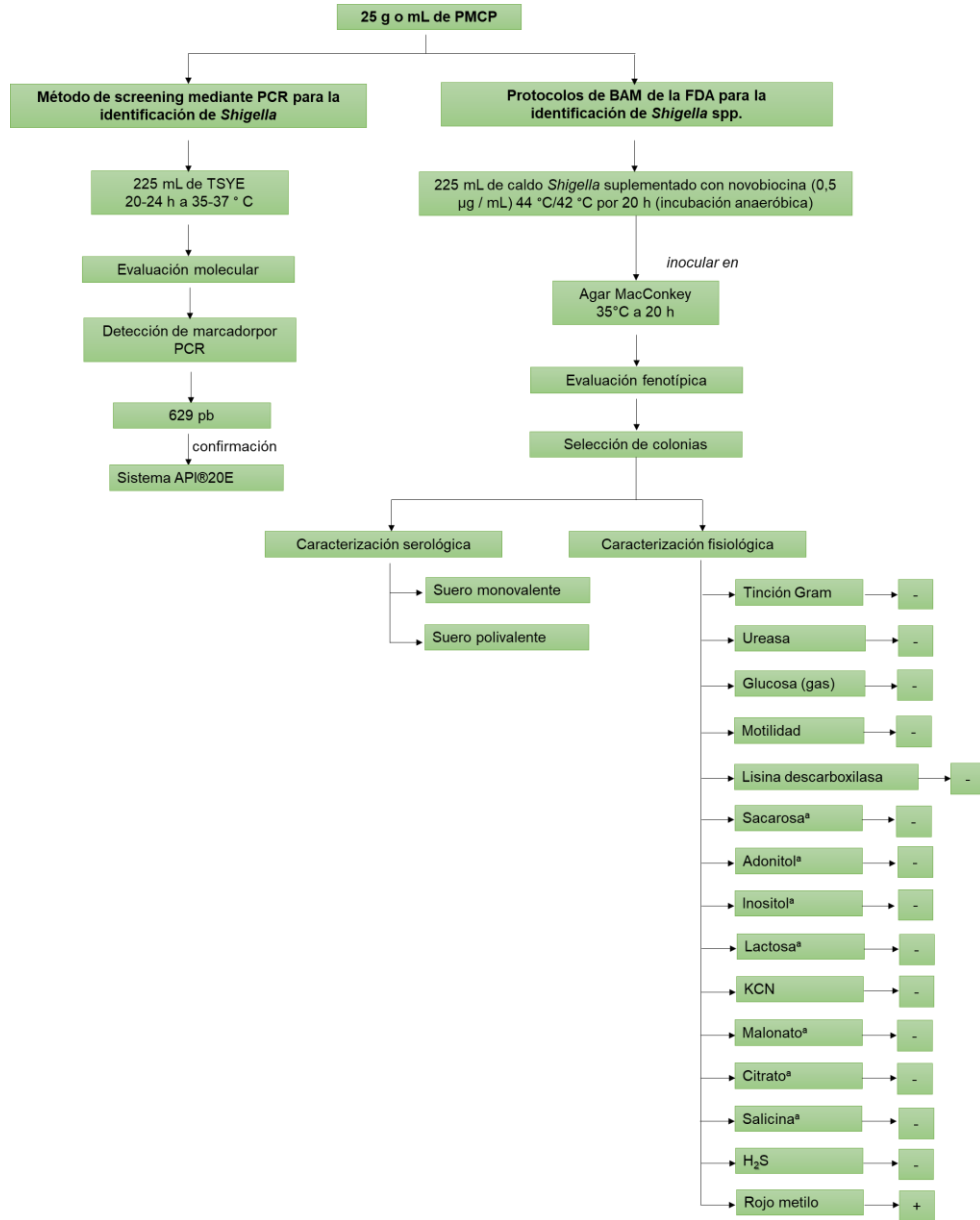
^b Ornitina descarboxilasa

^c Algunos cultivos de *S. flexneri* 6 (los biotipos de Newcastle y Manchester) producen gas a partir de sustratos fermentables; otras *Shigella* son anaerógenas

Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

Figura 13. Matriz experimental para la detección de *Shigella* spp.

^a Se refiere a la evaluación de la capacidad de fermentación de dichas fuentes de carbono.



6. Método de detección de *Pseudomonas aeruginosa*

El procedimiento de detección a utilizar por el laboratorio es el Protocolo rápido de detección de *P. aeruginosa* en PMCP (descrito en el Compendio de Métodos Analíticos de Health Canada MFLP-61).

6.1 Fundamento

Para su detección, se filtra una suspensión de muestra a través de un filtro hidrofóbico de membrana de rejilla (HGMF). Este método se utiliza para la detección y enumeración de microorganismos. En este caso, *P. aeruginosa* se enumera mediante el uso de un filtro de membrana que contiene una cuadrícula de 1.600 cuadrados. Una muestra se filtra a través de un filtro de membrana de rejilla hidrofóbica, y la membrana se coloca en agar mPAC y otros medios de *P. aeruginosa* disponibles comercialmente. Los organismos estresados pueden crecer durante 4 horas en un medio no selectivo antes de exponerse a condiciones de crecimiento selectivo.

El HGMF permitirá realizar recuentos a partir de suspensiones que contienen hasta 5.000 organismos / mL, por lo tanto, una sola dilución proporciona un recuento preciso en un amplio rango de niveles de contaminación.

La precisión del recuento puede ser mejor que en las placas convencionales u otros sistemas de filtro de membrana, ya que las líneas hidrofóbicas del HGMF actúan como barreras físicas para la propagación de colonias, lo que en última instancia conduce a una mejor claridad en el recuento. Después de contar el crecimiento típico en el filtro, el número más probable de *P. aeruginosa* se estima a partir de la Tabla 15 ó 16 descrita en el documento "Metodología de recuento de agentes microbianos de control de plagas y de contaminantes biológicos en productos microbianos de control de plagas", código D-RIS-RAI-PA-003.

6.2 Reactivos y medios de cultivos

La descripción de la composición de los medios de cultivos o reactivos está en la sección 9.

- a. Peptona estéril en agua al 0,1% (PA), peptona / diluyente Tween 80 (PT) o citrato de sodio al 2%
- b. Agar mPAC/mPA
- c. Agar cetrimida
- d. Agar Pseudomonas-CN
- e. Agar Pseudomonas-CFC
- f. Medio King B (S91)
- g. Agar de soja tróptico (S92)
- h. Filtros de membrana de grilla hidrofóbica HGMF: grilla 1600 con un tamaño de poro de 0,45 µm (por ejemplo, filtros de membrana ISO-GRID de Oxoid Ltd. o equivalente)
- i. Un sistema de filtración a través de membrana de grilla hidrofóbica HGMF especializado.
- j. Stomacher, frasco, matraz o equivalente
- k. Punta de pipetas con prefiltros
- l. Pinzas de filtro de membrana
- m. Incubadoras capaces de mantener de 30 a 35 ° C y 42 ° C.
- n. Luz UV (opcional)
- o. Dispositivos manuales o automatizados de conteo de colonias (opcional)
- p. Agarosa
- q. Azul de bromofenol (por ejemplo, un colorante de seguimiento en el tampón de carga)
- r. dNTP
- s. DNA Ladder 100 bp (o equivalente)

- t. Bromuro de etidio u otro agente intercalante de ácidos nucleicos
- u. Sal disódica de EDTA
- v. KCl
- w. MgCl₂
- x. Sacarosa
- y. Tampón de PCR 10X (concentrado)
- z. Taq ADN polimerasa
- aa. Cianol de xileno
- bb. Tris [hidroximetil] aminometano (por ejemplo, base Trizma® de Sigma)
- cc. Agua libre de nucleasas

6.3 Instrumental

- a. Cabina de bioseguridad de tipo II
- b. Termociclador convencional
- c. Cámara de electroforesis
- d. Transiluminador

6.4 Cepas de referencia para la evaluación de *P. aeruginosa*

- a. Cultivos de control (p. Ej., Cultivos ATCC)
- b. Control positivo: *P. aeruginosa*
- c. Control negativo: *E. coli*

6.5 Procedimientos

6.5.1 Preparación de material y recomendaciones

- a. Precalentar agua de peptona estéril al 0,1%, placas de citrato sódico al 2% precalentado, agar tríptico de soja (TSA) y agares selectivos.
- b. Limpiar la superficie del área de trabajo con un desinfectante adecuado.
- c. Preparar el sistema o aparato de filtración.
- d. Para garantizar una unidad analítica verdaderamente representativa, agitar líquidos o materiales que fluyan libremente hasta que el contenido sea homogéneo. Si la unidad de muestra es sólida, obtenga la unidad analítica tomando una porción de varios lugares dentro de la unidad de muestra.

6.5.2 Preparación de la muestra

- a. Preparar una dilución 1 en 10 del PMCP agregando asépticamente 25 g o mL (la unidad analítica) en 225 ml del diluyente agua peptonada. Se pueden usar otros tamaños de muestra si se mantiene la misma relación de muestra a diluyente.
- b. Mezclar o aplicar vórtex según sea necesario para una mezcla completa o agitar la botella de dilución 25 veces a través de un arco de 30 cm en aproximadamente 7 segundos.
- c. Preparar diluciones seriadas decimales según sea necesario, usando una pipeta estéril separada para cada transferencia. Registrar la dilución utilizada para el análisis.
- d. Si se espera un recuento bajo, filtre más de 1 mL de la suspensión. Filtrar el volumen total que se filtrará en una operación; No intente filtrar partes alícuotas sucesivas de 1 ml. Registre el volumen (V) filtrado.
- e. Colocar asépticamente la membrana HGMF en el aparato de filtración limpio y estéril empleando pinzas estériles. Se puede usar el mismo sistema de filtración si se analizan diluciones sucesivas, de más diluidas a menos diluidas, de la misma

Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

muestra; de lo contrario, cambie / limpie el sistema de filtración para cada nueva muestra.

- f. Agitar todas las diluciones inmediatamente antes de realizar transferencias al sistema de filtración. Para humedecer la membrana y asegurar una distribución uniforme de los microorganismos presentes en la muestra, agregar una pequeña porción de líquido a la membrana. Consulte las instrucciones del fabricante para obtener más detalles sobre el uso del sistema de filtración.
- g. Si solo se usa el filtro de extensión, se puede filtrar un volumen máximo de 10 mL sin el uso de un embudo o el accesorio del depósito. Se puede filtrar un mínimo de 1 mL directamente en un filtro colocado en el filtro de dispersión; en este caso, distribuya manualmente el volumen sobre el filtro.
- h. Abrir la válvula del filtro hasta que haya pasado todo el líquido, cerrar la válvula y retirar asépticamente el HGMF. Solo para el colector del embudo, agregue otros 10 mL de diluyente estéril a la cámara y extráigalo a través del filtro.
- i. Siga las instrucciones del fabricante para limpiar el aparato de filtración.
- j. Repetir los pasos 5.6.5.2c - 5.6.5.2i con diluciones posteriores según sea necesario, comenzando con la dilución más alta (es decir, la más diluida).
- k. Hacer diluciones adecuadas del control positivo y filtrar como se indicó anteriormente.
- l. Transferir el HGMF a la superficie de una placa TSA, evitar que queden atrapadas burbujas de aire. Incubar las placas en pilas de no más de tres, a 35 ± 1 °C durante 4 h.
- m. Después de la primera incubación, transfiera un HGMF a la superficie de una placa de mPAC. Incubar mPAC durante 24-48 ha $42 \pm 0,5$ °C.
- n. Transferir un duplicado de la membrana a un segundo agar selectivo de la lista que se menciona a continuación e incuba de acuerdo con las instrucciones. En mPAC, las colonias de *P. aeruginosa* son de color tostado a marrón oscuro con centros de color marrón oscuro.

6.5.3 Medios de cultivos selectivos y descripciones del crecimiento típico

- a. Agar cetrimida: Incubar durante 18-48 h a 35 °C. Examinar después de 24 h, si es necesario, vuelva a incubar. *P. aeruginosa* se observa como colonias pigmentadas de color azul, azul-verde o amarillo-verde y puede fluorescer bajo iluminación UV.
- b. Agar *Pseudomonas*-CN: Incubar durante 24-48 h a 36 ± 2.0 °C. *Pseudomonas* spp. son colonias pigmentadas de color verde azulado o marrón y pueden fluorescer bajo iluminación UV.
- c. Agar *Pseudomonas*-CFC: Incubar durante 48-72 h a 22 °C. *Pseudomonas* spp. son colonias pigmentadas de color verde azulado o marrón y pueden fluorescer bajo iluminación UV.
- d. Medio King B - durante 18-24 h a 35 °C. Si es necesario, vuelva a incubar durante uno o dos días a 25-35 °C. *Pseudomonas* spp. son colonias pigmentadas de color verde amarillo y pueden fluorescer bajo iluminación UV.

6.5.4 Confirmación

- a. Seleccionar cinco de las presuntas colonias típicas de *P. aeruginosa* de los medios selectivos.
- b. Realizar análisis de multilocus (MLSA) para la identificación molecular de las presuntas colonias (5.6.6) o emplear para la identificación el sistema de pruebas bioquímica automatizado Vitek2-GN o los sistemas de baterías bioquímicas API® 20 E / API® S / API® 20N.

5.6.6 Análisis de MLSA

- a. Las condiciones de reacción para todos los partidores son las siguientes: desnaturalización inicial a 96 ° C durante 1 min; 30 ciclos de desnaturalización a 96°C durante 1 min, hibridación de los partidores a 55 ° C durante 1 min, extensión a 72°C durante 1 min; seguido de un paso de extensión final de 72°C durante 10 min.
- b. Cada mezcla de reacción de amplificación de 50 µl comprendía 2,0 µl de ADN cromosómico (5-20 ng / µl), 2,0 µl de cada partidore (10 pmol / µl) (Tabla 27), 5,0 µl de tampón de PCR 10x (Qiagen, contiene MgCl₂ 15 mM), 1,0 µl de solución de dNTP (10 mM cada dNTP), 0,25 µl de polimerasa Taq (5 unidades / µl) y 37,75 µl de agua de calidad para PCR.
- c. Cortar la banda del tamaño esperado y purificar el producto de PCR desde el gel. Para ello se puede emplear kits comerciales de purificación o protocolos establecidos en publicaciones de corriente principal. Enviar a secuenciar el producto purificado a un servicio de secuenciación. Secuenciar ambos sentidos de la cadena de ADN empleando los partidores de la Tabla 27. Editar y ensamblar las secuencias sentido y antisentido empleando el programa Vector NTI u otro programa afín. Los extremos 5´ y 3´ "poco claros" deben recortarse. Solo se deben usar secuencias de nucleótidos de alta calidad. En general, las secuencias dirigidas por los partidores durante la amplificación por PCR deben excluirse del análisis porque los partidores pueden causar sesgo en el análisis de la secuencia.
- d. Llevar a cabo un análisis filogenético que permitirá determinar si los aislados corresponden a *P. aeruginosa*. Para ello, alinear cada marcador genético del microorganismo que se requiere identificar con las secuencias de los marcadores de las cepas Tipo de *Pseudomonas aeruginosa*. Las cepas Tipo de las distintas especies bacteriana se indican en la Revista Internacional de Microbiología Sistemática y Evolutiva (IJSEM). Adicionalmente, emplear para el análisis secuencias de otras cepas del mismo género y/o especies que hayan sido sus secuencias publicadas en revistas indexadas. Alinear las secuencias por cada marcador empleado un programa de alineamiento múltiple tal como Muscle, ClustalW, MAFFT u otro programa afín. Remover las regiones ambiguas de forma manual o empleando el programa Gblocks. Concatenar las secuencias alineadas por cada marcador y determinar el mejor modelo de sustitución nucleotídica empleando el software MEGA, JModeltest u otro programa afín. Se recomienda determinar la historia evolutiva mediante el método Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood, ML) o por inferencia Bayesiana. En el caso de emplear el método ML sustentar la hipótesis de las relaciones filogenéticas mediante 1000 réplicas de Bootstrap. En el caso de llevar a cabo la inferencia Bayesiana utilizar el análisis de cadenas de Markov Monte Carlo. Para la construcción de cada árbol filogenético emplear un grupo externo. Considerar un valor de Bootstrap $\geq 70\%$ o un soporte Bayesiano $\geq 0,95$ como soporte significativo de rama dependiendo del método de inferencia filogenética escogido. Adicionalmente, determinar el porcentaje de identidad, cobertura y gaps entre la secuencia del presunto aislado de *P. aeruginosa* con respecto a las secuencias de la cepa tipo de *P. aeruginosa*.

Tabla 27. Marcadores genéticos y partidores para su amplificación

Marcador	Partidor	Secuencia del partidor
Acetil coenzima A sintetasa(<i>acsA</i>)	acsA-F	ACCTGGTGTACGCCTCGCTGAC
	acsA-R	GACATAGATGCCCTGCCCTTGAT
Shikimato dehidrogenasa (<i>aroE</i>)	aroE-F	TGGGGCTATGACTGGAAACC
	aroE-R	TAACCCGGTTTTGTGATTCCTACA
GMP sintasa (<i>guaA</i>)	guaA-F	CGGCCTCGACGTGTGGATGA
	guaA-R	GAACGCCTGGCTGGTCTTGTGGTA
Proteína de reparación a daños del ADN(<i>mutL</i>)	mutL_F	CCAGATCGCCGCCGGTGAGGTG
	mutL_R	CAGGGTGCCATAGAGGAAGTC
Subunidad D de la NADH dehidrogenasa (<i>nuoD</i>)	nuoD_F	ACCGCCACCCGTA CTG
	nuoD_R	TCTCGCCCATCTTGACCA
fosfoenolpiruvato sintasa (<i>ppsA</i>)	ppsA-F	GGTCGCTCGGTCAAGGTAGTGG
	ppsA-R	GGTTCTCTTCTTCCGGCTCGTAG
Componente I de antralita sintetasa (<i>trpE</i>)	trpE_F	GCGGCCCAGGGTCGTGAG
	trpE_R	CCCGGCGCTTGTTGATGGTT

6.7 Cuantificación de *P. aeruginosa*

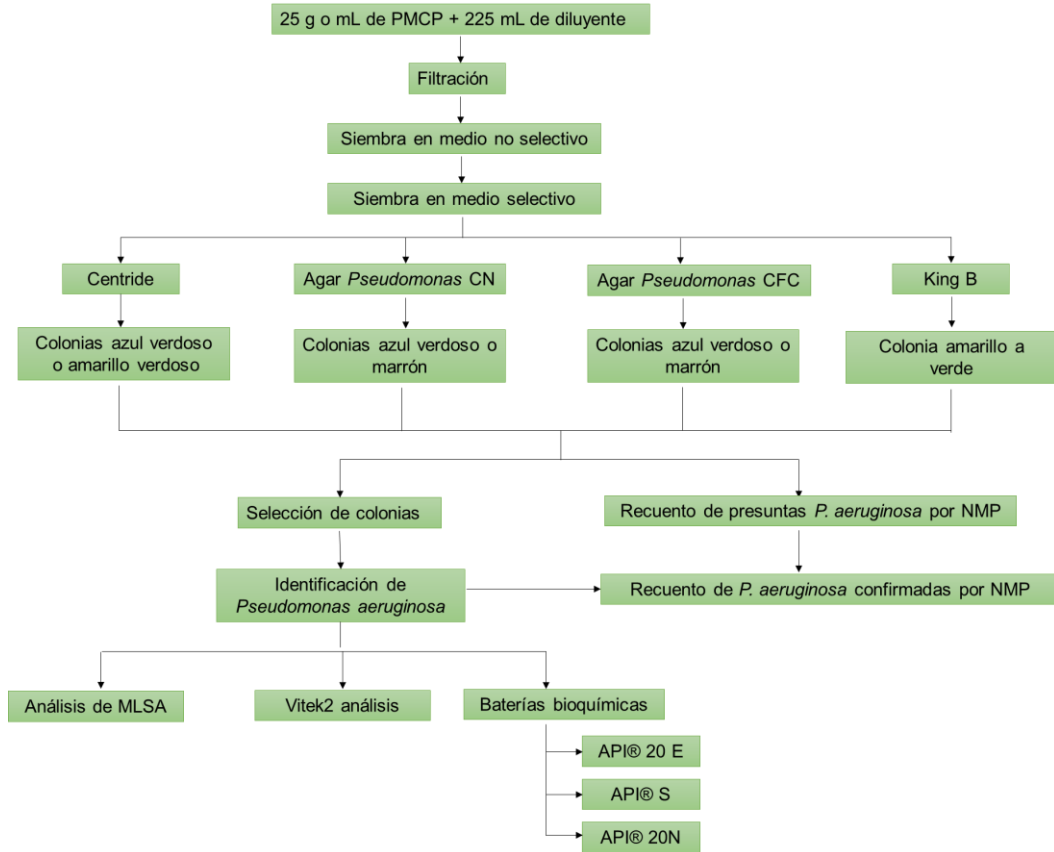
- Seguir las instrucciones del fabricante para el uso de contadores automáticos o manuales.
- Dependiendo de los medios utilizados, el crecimiento en la cuadrícula HGMF que exhibe características típicas de *P. aeruginosa* (descrito en 5.6.5.3 - 5.6.5.4) debe tratarse como presunta *P. aeruginosa*.
- Sobre la base de las pruebas confirmatorias, para obtener la puntuación de *P. aeruginosa* confirmada, proceda con el siguiente cálculo:

$$\text{Confirmar el conteo de HGMF} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de presuntas colonias de } P. \text{ aeruginosa confirmadas}}{\text{N}^\circ \text{ de colonias testeadas}} \times \text{Presunto conteo de HGMF}$$

- Calcular del número más probable de *P. aeruginosa*. Determine el número más probable de unidades de crecimiento.
- Informar el promedio de NMP para las presuntas *P. aeruginosa* o la confirmada *P. aeruginosa*.

Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

Figura 14. Matriz experimental para la detección de *Pseudomonas aeruginosa*.



7. Métodos para la detección de *Vibrio* spp.

El procedimiento de detección a utilizar por el laboratorio puede ser uno, o más de uno, de los siguientes métodos:

- a. Método de detección rápida de muestras de PMCP mediante enriquecimiento y siembra en CHROMagar™ *Vibrio* e identificación de presuntos aislados de *Vibrio* mediante el sistema API® 20E o PCR.
- b. Método de detección descrito en el capítulo 9 del Manual de Análisis Bacteriológico (BAM) de la FDA.

7.1 Cepas de referencia:

Las cepas de referencia *V. Cholerae*, *V. vulnificus* (ATCC 27562), *V. parahaemolyticus* (ATCC 33845), *V. alginolyticus* (ATCC 33839) deben incluirse como control positivo. Las cuales serán mantenidas y utilizadas de acuerdo a lo señalado en la Norma Chilena 2726.

7.2 Método de detección rápida de muestras de PMCP

7.2.1 Fundamento:

Vibrio spp. son típicamente fáciles de cultivar. El medio selectivo estándar comúnmente usado para su aislamiento es el agar citrato de tiosulfato con sales biliares y sacarosa (TCBS). Las cepas de *V. cholerae* y *V. alginolyticus* pueden metabolizar la sacarosa y forman colonias amarillas en este medio de cultivo, mientras que otras especies patógenas de *Vibrio* como *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus* y *V. vulnificus* producen colonias verdes. Adicionalmente, se pueden emplear agar sangre y agar CHROM para aislar *V. parahaemolíticos* y el medio agar celobiosis-polimixina B-colistina (CPC) para el aislamiento de *V. vulnificus*. En la Tabla 28 se indican algunas características metabólicas distintivas entre las diferentes especies de *Vibrios*.

La detección molecular de las principales especies patógenas de *Vibrio* spp. mediante análisis de PCR convencional y de PCR en tiempo real están bien estandarizada y cada vez son mayormente empleadas. Con estas técnicas se evalúa la presencia de genes de virulencia asociados a *V. colera* (los genes *ctxA* y *ctxB*), *V. parahaemolyticus*. (*tdh* y *trh*).

Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas


Tabla 28. Características del perfil metabólico de *Vibrios* spp. patógena.

	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. furnissii</i>	<i>V. hollisae</i>	<i>V. metshnikovii</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>
Agar TCBS	A	A	A	A	SC	A	V	V	V
Agar mCPC	SC	P	SC	SC	SC	SC	SC	SC	A
Agar CC	SC	P	SC	SC	SC	SC	SC	SC	A
AGS	Al-Ac	Al-ac	Al-Al	Al-Al	Al-ac	Al-Al	Al-Ac	Al-Ac	Al-Ac
Oxidasa	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Arginina hidrolasa	-	-	+	+	-	+	-	-	-
Ornitina descarboxilasa	+	+	-	-	-	-	+	+	+
Lisina descarboxilasa	+	+	-	-	-	-	+	+	+
0% NaCl	-	+	-	-	-	-	+	-	-
3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6% NaCl	+	-	+	+	+	+	-	+	+
8% NaCl	+	-	v	+	-	v	-	+	-
10% NaCl	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento a 42 °C	+	+	v	-	ND	V	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	-	+	-	-	-
D-celobiosa	-	-	+	-	-	-	-	v	+
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Arabinosa	-	-	+	+	+	-	-	+	-
D-manosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	-	+	+	-	v
ONPG	-	+	+	+	-	+	+	-	+
Voges-Proskauer	+	v	-	-	-	+	-	-	-
10 µg O/129	R	S	R	R	ND	S	S	R	S
150 µg O/129	S	S	S	S	ND	S	S	S	S
Gelatinasa	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Ureasa	-	-	-	-	-	-	-	v	-

Abreviaturas: TCBS, tiosulfato-citrato-sales biliares-sacarosa; mCPC, celobiose-polimixina B-colistina modificada; AGS, inclinación de arginina-glucosa. A = amarillo, SC = sin crecimiento o deficiente, S = susceptible. ND = no determinado. V = verde V = variable entre cepas R = resistente P = púrpura, v = variable. Al = alcalina inclinada / alcalina a tope, KA = alcalina inclinada / ácida a tope, Ka = alcalina inclinada / a tope ligeramente ácida. O/129 es un agente vibrioestático.

7.2.2 Procedimiento

- Pesar 25 g de muestra en un matraz (capacidad de aproximadamente 500 mL).
- Agregar 225 mL de medio APA a un matraz. Mezclar bien la muestra o mezclar por 2 minutos a alta velocidad.
- Incubar APA a 35 ± 2 °C durante 6 a 8 h.
- Sembrar una alícuota mediante siembra por agotamiento empleando asa bacteriológica de Nicrom en agar CHROMagar™ *Vibrio* e incubar durante 18 a 24 h a 35 ± 2 °C. Adicionalmente sembrar una alícuota de 100 µL en empleando asa de Drigalsky.
- Las colonias de *V. cholerae* y *V. vulnificus* presentan un color azul verdoso a azul turquesa, mientras que las colonias *V. parahaemolyticus* presentan un color malva y *V. alginolyticus* muestran un color crema.
- Seleccionar cinco de las presuntas colonias típicas de *V. cholerae*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* de los medios selectivos.
- Corroborar la identificación mediante batería bioquímica comercial API 20E para *V. cholerae* y *V. vulnificus*. En el caso de los presuntos aislados de *V. parahaemolyticus*, resuspenden NaCl al 2% para hacer la evaluación mediante el sistema API 20 NE siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Para el caso de *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* se puede realizar PCR de los marcadores que se describen más adelante como alternativa a la identificación bioquímica.

	DOCUMENTO GENERAL
	Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

7.3 Protocolos descrito por BAM de la FDA para la identificación de *Vibrio* spp.


7.3.1 Equipos

- a. Cabina de bioseguridad de tipo II
- b. Termociclador convencional
- c. Cámara de electroforesis
- d. Transiluminador luz UV de onda larga o reticulador UV (longitud de onda de 254 nm)
- e. Baño (s) de agua con agitación capaces de alcanzar hasta 65 °C. (temperaturas necesarias, 42, 54, 55 y 65 ° C)
- f. Plataforma agitadora a temperatura ambiente
- g. Microonda

7.3.2 Medios y reactivos

La descripción de la composición de los medios de cultivos o reactivos está en la sección 9.

- a. Agua de peptona alcalina (APA)
- b. Medio AKI
- c. Agar tendido de arginina y glucosa (AGS)
- d. Agar sangre (5% glóbulos rojos de oveja)
- e. Caldo de extracto de levadura y casaminoácidos (CAYE)
- f. Agar colistina poliximina B celobiosa modificado (CPCm)
- g. Agar de celobiosa colistina (CC)
- h. Prueba de motilidad media-1% NaCl
- i. Reactivo de oxidasa (1% N, N, N, N'-tetrametil-p-fenilendiamina.2HCl en dH₂O)
- j. Diluyente peptona-Tween-sal (PTS)
- k. Solución salina tamponada con fosfato (PBS)
- l. Discos de polimixina B, 50 U (Difco o equivalente)
- m. Solución salina: 0,85% en dH₂O
- n. Solución de NaCl al 2%
- o. Desoxicolato de sodio - 0.5% en dH₂O estéril
- p. Agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS)
- q. Agares T₁N₁ y T₁N₃ (1% de triptona y 1% o 3% de NaCl)
- r. Caldos T₁N₀, T₁N₃, T₁N₆, T₁N₈, T₁N₁₀
- s. Agar Trípico de soja-sulfato de magnesio- 3% de NaCl (TSAMS) Tripticasa (o trípico) caldo de soya (TSB), agar (TSA) (con NaCl agregado, 2%)
- t. TSB-1% NaCl-24% glicerol
- u. Caldo de urea o agar de urea de Christensen suplementado con NaCl al 2%
- v. *V. cholerae* antisuero polivalente O1 y O139
- w. Kit de detección de enterotoxinas VET-RPLA TD920A (Oxoid, Inc.)
- x. Agar sacarosa *V. parahaemolyticus* (VPSA)
- y. Agar *V. vulnificus* (VVA)
- z. Sistema de diagnóstico API 20E y reactivos (BioMerieux)
- aa. Bolsas tolerantes al calor (y sellador)
- bb. Placas de microtitulación de 96 pocillos con tapas
- cc. Micropipeteador de 8 o 12 canales
- dd. Replicador de 48 puntas
- ee. Agarosa
- ff. Azul de bromofenol (por ejemplo, un colorante de seguimiento en el tampón de carga)
- gg. dNTP

	DOCUMENTO GENERAL
	Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

- hh. DNA Ladder 100 bp (o equivalente)
- ii. Bromuro de etidio u otro agente intercalante de ácidos nucleicos
- jj. Sal disódica de EDTA
- kk. KCl
- ll. MgCl₂
- mm. Sacarosa
- nn. Tampón de PCR 10X
- oo. Taq ADN polimerasa
- pp. Cianol de xileno
- qq. Tris [hidroximetil] aminometano (por ejemplo, base Trizma® de Sigma)
- rr. Agua libre de nucleasas

7.4 Procedimiento para la detección de *V. cholerae*

7.4.1 Preparación de la muestra

- a. Pesar 25 g de muestra en un recipiente tarado (capacidad de aproximadamente 500 mL).
- b. Agregar 225 mL de medio APA a un matraz. Mezclar bien la muestra o mezclar por 2 minutos a alta velocidad.
- c. Incubar APA a 35 ± 2 °C durante 6 a 8 h.
- d. Preparar placas de agar TCBS y de los medios CPC modificado (CPCm) o CC.
- e. Sembrar un inóculo de caldo de cultivo APA en los medios de cultivo agar TCBS y CPCm o CC mediante el traspaso de inóculo con un asa bacteriológica de 3 mm de diámetro. Se deben obtener colonias aisladas a partir de la siembra.
- f. Incubar TCBS durante la noche (18 a 24 h) a 35 ± 2 °C. Incubar CPCm y CC durante la noche a 39 a 40 °C. Si no se dispone de una incubadora de 39 a 40 °C, se puede incubar a 35 a 37 °C debido a que la selectividad se determina principalmente por los antibióticos en la formulación que por la alta temperatura.

7.4.2 Visualización de las colonias de *V. cholerae*

- a. Las colonias típicas de *V. cholerae* en agar TCBS son grandes (2 a 3 mm), lisas, amarillas y ligeramente aplanadas con centros opacos y periferias translúcidas.
- b. Las colonias típicas de *V. cholerae* en agar mCPC o CC son pequeñas, lisas, opacas y de color verde a púrpura, con un fondo púrpura luego de una incubación prolongada.

7.4.3 Identificación bioquímica de las colonias

- a. Para la identificación bioquímica de las presuntas colonias de *V. cholerae* se deben sembrar en un agar no selectivo (agar T₁N₁, T₁N₃ o TSA-2% NaCl).
- b. Incubar durante la noche a 35 ± 2 °C y proceder con la identificación utilizando una sola colonia aislada.
- c. Subcultivar tres o más colonias de cada medio agar tendido en agar T₁N₁ o sembrar pinchando en el medio de prueba de motilidad.
- d. Incubar los medios de cultivo durante la noche a 35 ± 2 °C.

7.4.4 Examinación y confirmación

- a. Agar inclinado de glucosa con arginina (AGS).
 - i. Inocular en medios de agar tendido AGS los cultivos sospechosos crecidos en agar T₁N₁. Se debe sembrar la superficie del agar y luego pinchar el extremo del agar.
 - ii. Incubar el medio AGS inoculado con tapa suelta durante la noche a 35 ± 2°C.

Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

- iii. Los cultivos de *V. cholerae* y *V. mimicus* mostraran una coloración purpura (alcalina) en la superficie del agar tendido y en el extremo del agar presentaran una coloración amarilla (ácida), ya que la arginina no se hidroliza. Tampoco se produce gas ni H₂S.
- b. Tolerancia a la sal.
 - i. Del cultivo T₁N₁ inocular (con poco inóculo) un tubo de cada uno de los caldos T₁N₀ y T₁N₃.
 - ii. Incubar los tubos durante la noche a 35 ± 2 °C.
 - iii. Los cultivos de *V. cholerae* y *V. mimicus* crecerán sin NaCl.
- c. String test.

Esta es una prueba útil para evaluar potenciales cepas de *V. cholerae*, ya que todas las cepas de este género son positivas.

 - i. Inocular una gran colonia de un cultivo de agar T₁N₁ en una pequeña gota de desoxicolato de sodio al 0,5% en dH₂O estéril.
 - ii. En 60 segundos, las células se lisan (pérdida de turbidez) y las cadenas de ADN cuando se levanta forma un bucle (hasta 2 a 3 cm) desde el portaobjetos.
- d. Reacción oxidasa.
 - i. Crecer las cepas sospechosas en medio T₁N₁ durante toda la noche.
 - ii. Transferir un inóculo de cultivo con un alambre de platino (no se debe usar alambre de nicrom) o con un mondadientes de madera estéril a un papel filtro saturado con reactivo de oxidasa (1% N, N, N, N'-tetrametil-p-fenilendiamina·2HCl).
 - iii. Un color púrpura oscuro se desarrolla en 10 segundos y es indicativo de una reacción positiva.
 - iv. Alternativamente, agregar una gota de reactivo en una placa de agar T₁N₁.
 - v. *V. cholerae* y *V. mimicus* son oxidasa positiva.
- e. Prueba de aglutinación serológica.

El determinar la presencia del antígeno O o la obtención de una prueba positiva en el ensayo string test proporciona una evidencia epidemiológica importante. Los serotipos del serogrupo O1, Ogawa e Inaba, y el serogrupo O139 se reconocen como patógenos humanos. Los dos serotipos de O1 se observan tanto en el clásico *V. cholerae* como en los biotipos de El Tor. El serogrupo O139 se encuentra solo en el cero biotipo El Tor.

 - i. Para cada cultivo, marcar tres secciones (con lápiz de cera) de aproximadamente 1 × 2 cm en el interior de una placa de Petri de vidrio o en un portaobjetos de vidrio de 2 × 3 pulgadas.
 - ii. Agregar una gota de solución salina al 0,85% en la parte inferior de cada sección marcada.
 - iii. Con un asa o aguja de transferencia estéril, transferir un inóculo del cultivo T₁N₁ en la solución salina para una sección y repetir para la otra sección. Verificar la aglutinación.
 - iv. Agregar una gota de antisuero polivalente *V. cholerae* O1 a una sección que contiene inóculo del cultivo y mezclar con un asa o aguja estéril.
 - v. Agregar una gota de anti-O139 a una sección separada.
 - vi. Inclinar la mezcla hacia adelante y hacia atrás durante un minuto y observar contra un fondo oscuro.
 - vii. Una reacción positiva se observa mediante una aglutinación rápida y fuerte en un fondo claro.

Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

- viii. Si la reacción es positiva, probar por separado con los antisueros Ogawa e Inaba. El serotipo Hikojima reacciona con ambos antisueros.
- ix. Los anticuerpos contra Inaba y Ogawa, y el antígeno del grupo O1 están disponibles comercialmente. De manera similar, el antisuero O139 está disponible comercialmente.
- x. Los resultados de los cultivos no aglutinables deben informarse como no *V. cholerae* O1 / O139.

7.4.5 Pruebas bioquímicas

La Tabla 29 presenta el número mínimo de caracteres necesarios para identificar las cepas de *V. cholerae*. La capacidad de *V. cholerae* para crecer en triptona al 1% sin NaCl lo diferencia de otros *vibrios* positivos para el catabolismo de sacarosa.

7.4.6 Determinación de enterotoxigenidad (opcional)

La mayoría de las cepas de *V. cholerae* aisladas de los alimentos o del medio ambiente no producen toxina del cólera (CT) y no se consideran virulentas. Los aislados identificados como *V. cholerae* o *V. mimicus* deben analizarse para la producción de CT o el gen *ctx*.

- a. Ensayo de células adrenales de ratón Y-1.
 - i. Se ha demostrado que la CT estimula la enzima adenilato ciclasa con la producción de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) que finalmente influye en varios procesos celulares. En el ensayo con la línea celular Y-1, la CT promueve la conversión de células alargadas parecidas a fibroblastos en células redondas refractiles.
 - ii. Inocular los cultivos en agar T₁N₁ a caldo de cultivo CAYE e incubar durante la noche a 30 ° ± 2 °C.
 - iii. Inocular una porción de 10 mL de caldo CAYE en un matraz Erlenmeyer de 50 ml de cada cultivo estacionario.
 - iv. Incubar durante 18 horas con agitación. Centrifugar cada cultivo de prueba; filtrar el sobrenadante a través de un filtro de 0,22 µm. Los filtrados refrigerados se pueden almacenar hasta por 1 semana.
 - v. Añadir 25 µL de cada filtrado, sin calentar y sometido a calefacción (incubación a 80 ° C durante 30 minutos), a los pocillos de la placa de ensayo de microtitulación.
 - vi. Además de los filtrados de cultivos toxigénicos y no toxigénicos conocidos, agregue alícuotas de 0,025 mL de preparaciones que contengan 1,0 y 0,1 ng CT / mL. La supresión del redondeo celular mediante el tratamiento de filtrados de prueba con suero anti-CT es un control aconsejable para reacciones inespecíficas.
- b. Inmunoensayo para CT. Se ha desarrollado un inmunoensayo disponible comercialmente para detectar la presencia de CT en cultivos filtrados de *V. cholerae* y *V. mimicus* (VET-RPLA, Oxoid, Inc., Ogdensburg, NY).
 - i. Inocular los cultivos de prueba en medio AKI e incubar a 35 ± 2 ° C 18 h con agitación a 100 rpm.
 - ii. Centrifugar de 5 a 7 ml de cultivo a 8,000 × g durante 10 min.
 - iii. Filtrar el sobrenadante a través de un filtro de 0,2 µm ester o se usa como está.
 - iv. Probar el sobrenadante o el filtrado siguiendo el protocolo del fabricante utilizando placas de microtitulación cónicas de 96 pocillos. Incubar la placa durante la noche, sin perturbar a temperatura ambiente.

7.5 Detección por PCR de *V. cholerae*

El gen CT puede estar presente en cepas de *V. cholerae* y *V. mimicus*, pero no expresarse en condiciones experimentales. Por lo tanto, se recomienda un ensayo genotípico como la amplificación por PCR del gen *ctx*. Este procedimiento ofrece un resultado más rápido y es menos complicado que los ensayos fenotípicos.

7.5.1 Preparación de la muestra

- Crece los aislados que hayan presentado un perfil metabólico (Tabla 29) en medio APA a 35°C por 18h.
- Hervir 1 mL de cultivo en un tubo de microcentrifuga de 1,5 mL durante 10 minutos para lisar la célula.
- Emplear el lisado inmediatamente para la PCR o almacenarlo a -20 ° C hasta su uso. El producto de PCR es un fragmento de 777 pb.

7.5.2 Reacción de PCR

- Preparar una solución madre de los partidores de 10 µM para la amplificación de la toxina del cólera. Los partidores son: Partidor F: 5'-tga aat aaa gca gtc agg tg-3' y Partidor R: 5'-ggg att ctg cac aca aat cag-3'.
- Realizar la reacción de amplificación del marcador *ctx* con los siguientes componentes: Tampon *Taq* polimerasa (Tris-HCl 10 mM, pH 8,3); 1,5 mM MgCl₂; 200 µM de cada nucleótido (dATP, dTTP, dCTP, dGTP); 2 a 5% (v / v) de lisado APA (plantilla); 0,5 µM de cada partidor; 2,5 U *Taq* polimerasa por 100 µl de reacción y agua libre de nucleasa para completar el volumen de la reacción. Se pueden realizar las reacciones a un volumen de 25 a 100 µL. Para minimizar la contaminación cruzada de los reactivos de PCR, se recomienda preparar una mezcla maestra de PCR (Sin *Taq* y muestra de ADN) y almacenar alícuotas congeladas (-20 ° C) hasta su uso.
- Agregar la *Taq* polimerasa a la mezcla maestra y agregar la muestra de ADN después de la distribución a la mezcla de PCR a los tubos de microcentrifuga de 0,6 mL.
- Realizar el siguiente perfil de amplificación del gen *ctxAB* que consiste en una desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94°C por 1 min, temperatura de hibridación de 55°C durante 1 min y una extensión a 72 °C por 1 min) y una extensión final a 72 °C por 3 min.

7.5.3 Electroforesis del producto de PCR

- Mezclar 10 µL de producto de PCR con 2 µL de tampón de carga 6X y cargar los pocillos de muestra de gel de agarosa de 1,5 a 1,8% que contenga 1 µg / mL de bromuro de etidio (u otro agente intercalante de ADN) sumergido en 1 × TBE.
- Realizar la electroforesis a un voltaje constante de 5 a 10 V/cm. Iluminar el gel con un transiluminador UV y visualizar las bandas en relación con la migración del marcador de peso molecular. Los partidores amplifican un fragmento de 777 pb de *ctxAB*. Se pueden tomar fotografías del gel para documentación. Los controles de cultivos positivos y negativos y el control de reactivos deben incluirse con cada ejecución de PCR.
- Se han desarrollado sondas para detectar también la presencia de *ctxAB*. También se puede preparar una sonda marcada para la detección del gen *ctxAB* usando hibridación de colonias. La preparación de la sonda, las condiciones de hibridación para el marcaje de las colonias de aislamientos sospechosos y el protocolo de lavado se debe realizar según lo describe el fabricante.

7.5.4 Reporte final

El informe final para *V. cholerae* debe incluir la identificación bioquímica y recomendablemente la prueba serológica de los presuntos aislados. La cantidad mínima de caracteres para identificar la especie se presenta en la Tabla 29.

Tabla 29. Número mínimo de caracteres necesarios para identificar cepas de *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*

	Reacción positiva	Porcentaje (%)
Gram negativo, bacilo asporógeno	+	100
Oxidasa	+	100
String test	+	100
L-lisina descarboxilasa	+	100
L-arginina dihidrolasa	-	0
L-ornitina descarboxilasa	+	98,9
Crecimiento en caldo tripton a 1% ^a	+	91,1 ^{b/0} ^c

^a sin NaCl; ^b *V. cholerae*; ^c *V. parahaemolyticus*.

7.6 Protocolos descrito por BAM de la FDA para la identificación de *V. parahaemolyticus*

7.6.1 Enriquecimiento y aislamiento de *V. parahaemolyticus*

- Pesar 50 g de muestra PMCP y agregar 450 mL de tampón PBS, mezclar durante 1 minuto a 8.000 RPM. Esto constituye la dilución 1:10.
- Preparar diluciones de 1:100, 1:1000, 1:10.000 diluciones.
- Inocular porciones de 1 mL de las diluciones 1:10, 1: 100, 1: 1.000 y 1: 10.000 en 10 ml de APA de concentración única. Realizar este paso en triplicado.
- Incubar APA durante la noche a 35 ± 2°C.
- Sembrar una muestra de los cultivos de APA en TCBS y en CCP o CC para aislamiento.
- Incubar las placas TCBS a 35 ± 2°C y las placas mCPC o CC preferiblemente a 39-40°C o (35-37°C si 39-40°C) no está disponible durante la noche.

7.6.2 Visualización de colonias de *V. parahaemolyticus*

- V. parahaemolyticus* presentan colonias redondas, opacas, verdes o azuladas, de 2 a 3 mm de diámetro en agar TCBS. La mayoría de las cepas de *V. parahaemolyticus* no crecen en agar mCPC o CC y si lo hiciesen se observarían colonias de color verde-púrpura debido a su incapacidad de fermentar celobiosa.
- Las cepas de *V. alginolyticus* presentan colonias grandes, opacas y amarillas.
- Purificar los aislamientos como se describió anteriormente.
- Inocular una placa de microtitulación para el almacenamiento en el congelador.

7.6.3 Análisis y Confirmación mediante identificación bioquímica de aislamientos.

- Detectar cultivos sospechosos de *V. parahaemolyticus* (y *V. vulnificus*), usando AGS y caldos T₁N₀ y T₁N₃ como se describió anteriormente. Incubar los tubos a 35 ± 2 °C durante 18-24 h.

Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

- b. Transferir 2 o más colonias sospechosas con una aguja desde agar TCBS a agar inclinado de glucosa y arginina (AGS). Sembrar el agar tendido y pinchar el extremo del agar durante la noche a 35 ± 2 °C.
- c. Tanto *V. parahaemolyticus* como *V. vulnificus* producen una inclinación alcalina (púrpura) y un extremo ácido (amarillo) (arginina dihidrolasa negativa), pero no hay producción de gas o H₂S en AGS.
- d. Para los cultivos de agar inclinado de TSB y TSA (suplementados con NaCl al 2%), inocular ambos medios e incubar durante la noche a 35 ± 2 °C. Estos cultivos proporcionan inóculos para otras pruebas, así como material para la tinción de Gram y para el examen microscópico. Tanto *V. parahaemolyticus* como *V. vulnificus* son organismos pleomórficos positivos a la oxidasa, Gramnegativos, bacilos curvos o rectos con flágelos polares.
- e. Inocular un tubo de medio de prueba de motilidad pinchando a una profundidad de aproximadamente 5 cm. Incubar durante la noche a 35 ± 2 °C. Una extensión circular de la línea de puñalada constituye una prueba positiva. *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* son móviles.
- f. *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* solo crecerán en T₁N₃ pero no en T₁N₀. Solo los cultivos que requieren sal necesitan ser probados más a fondo.
- g. Solo los bacilos móviles Gramnegativos que en el medio AGS muestran un crecimiento ácido y en la superficie del agar inclinado presentan un crecimiento alcalino, no forman H₂S o gas, y requieren sal, requieren un examen más detallado.
- h. Las características de identificación de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* se presentan en la Tabla 30. El análisis bioquímico de las capacidades metabólicas de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* son similares, pero pueden diferenciarse por las reacciones ONPG, tolerancia a la sal, celobiosa y lactosa (Tabla 30). Mediante el uso de análisis bioquímicos seleccionados, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* pueden distinguirse de la mayoría de los *vibrios* marinos y de otros microorganismos marinos.
- i. Todos los aislamientos de *V. parahaemolyticus* deben analizarse para detectar la presencia de ureasa, ya sea usando caldo de urea suplementado con NaCl al 2% o en agar de urea de Christensen suplementado con NaCl o utilizando el API 20E. La producción de ureasa se correlaciona con la presencia de los genes *tdh* y/o *trh*. La reacción de la ureasa es una valiosa prueba de detección de cepas potencialmente patógenas.
- j. Inocular caldo de urea-NaCl al 3% o el medio de agar tendido Christensen-urea-NaCl. Incubar 35 ± 2 °C 18-24 h. La producción de ureasa está determinada por un color rosa (alcalino) al medio. Los cultivos negativos deben incubarse 24 h adicionales para las cepas raras productoras de ureasa lenta.
- k. Alternativamente, los aislamientos se pueden identificar como *V. parahaemolyticus* o *V. vulnificus* mediante hibridación con sondas de ADN o PCR como se describe en las siguientes secciones.

7.6.4 Tipificación serológica

V. parahaemolyticus posee tres componentes antigénicos: H, O y K. El antígeno H es común a todas las cepas de *V. parahaemolyticus* y tiene poco valor en el serotipo. La K, o antígeno capsular, puede eliminarse del cuerpo bacteriano calentando el aislado durante 1 o 2 horas a 100 °C. Este proceso expone el antígeno O, o somático, que es termoestable. Como el antígeno K enmascara al antígeno O, es necesario eliminar el primero calentando antes de realizar las pruebas de aglutinación de O.

Hasta la fecha se han descrito 76 serotipos (Tabla 30). Las pruebas serológicas por sí mismas no se utilizan para identificar *V. parahaemolyticus* debido a las reacciones

cruzadas con muchos otros organismos marinos. Sin embargo, durante las investigaciones de brotes transmitidos por alimentos, las pruebas serológicas se convierten en una valiosa herramienta epidemiológica.

Para la tipificación serológica de *V. parahaemolyticus* se pueden emplear kits comerciales.

Tabla 30. Esquema antigénico de *V. parahaemolyticus*

Grupo	Tipo K
1	1, 25, 26, 32, 41, 56, 58, 65, 69
2	3, 28
3	4, 5, 6, 27, 30, 31, 33, 37, 43, 45, 48, 54, 57, 58, 58, 65
4	4, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 34, 42, 49, 53, 55, 63, 67
5	5, 15, 17, 30, 47, 60, 61, 68
6	6, 18, 46
7	7, 19
8	8, 20, 21, 22, 39, 70
9	9, 23, 44
10	19, 24, 52, 66, 71
11	36, 40, 50, 51, 61
12	52
Total	65

7.6.5 Determinación de la patogenicidad

Los aislados de *V. parahaemolyticus* de las heces de pacientes con infecciones entéricas son hemolíticos en un agar especial de sangre humana con alto contenido de sal, mientras que los aislados de *V. parahaemolyticus* de mariscos y agua marina generalmente no lo son. Wagatsuma luego modificó este agar especial para evitar confusión con la actividad hemolítica normal regular de *V. parahaemolyticus* en agar convencional de sangre de oveja al 5%. El agar especial se llamó agar Wagatsuma y la respuesta hemolítica se denominó Kanagawa. Se usa sangre humana, de perro o de oveja recién extraída para preparar el agar.

La correlación ha sido bien establecida de que las cepas de *V. parahaemolyticus* que causan enfermedades en humanos son casi siempre positivas para Kanagawa y los aislamientos recuperados de los mariscos son casi siempre negativos para Kanagawa. Además, una extensa investigación en modelos animales sugiere que la hemolisina de Kanagawa es el principal factor de virulencia en *V. parahaemolyticus*. La prueba de Kanagawa, o la hibridación con la sonda del gen *tdh*, proporciona información confiable sobre la presencia de cepas patógenas aisladas de los alimentos. Debido a la dificultad de obtener sangre fresca y la fuerte correlación entre el fenómeno de Kanagawa y la

presencia del gen *tdh*, se recomienda utilizar los métodos de sonda de ADN descritos en este capítulo para determinar la virulencia potencial de los aislados de *V. parahaemolyticus* en lugar del fenómeno de Kanagawa.

7.7 Identificación por PCR multiplex de *V. parahaemolyticus*

Análisis de PCR de *V. parahaemolyticus* multiplex, un paso de confirmación alternativo para aislamientos sospechosos.

7.7.1 Preparación de la muestra

- a. Crecer los cultivos de las colonias sospechosas durante la noche a 35 ± 2 ° C en TSB-2% NaCl.
- b. Centrifugar 1 mL de cultivo en un tubo de microcentrífuga durante 3 minutos a $15.000 \times g$.
- c. Lavar el sedimento dos veces con solución salina fisiológica.
- d. Resuspender el sedimento en 1,0 ml de dH₂O y hervir 10 min.
- e. Almacenar el templado de DNA a -20 ° C hasta su uso.

7.7.2 Reacción de PCR

- a. Preparar una solución madre de los partidores de 10 µM para la amplificación de la toxina del cólera (Tabla 31). Los partidores son:

Tabla 31. Set de partidores

Marcador	Partidor	Secuencia
Gen trL (450 bp)	L-TL	AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG
hemolisina temoestable	R-TL	GCTACTTTCTAGCATTTTCTCTGC
Gen tdh (500 bp)	VPTRH-L	CCATCTGTCCCTTTTCCTGCC
Hemolisina directa temoestable	VPTRH-R	CCACTACCACTCTCATATGC
Gen trh (270 bp)	VPTRH-L	TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT
Hemolisina relacionada temoestable	VPTRH-R	CATAACAAACATATGCCCATTTCCG

- b. Realizar la reacción de amplificación de los marcadores de la Tabla 31 con los siguientes componentes: Tris-HCl 10 mM, pH 8.3; 1,5 mM MgCl₂; 200 µM cada uno de dATP, dTTP, dCTP, dGTP; 2 a 5% (v / v) de lisado APA (plantilla); 0,5 µM de cada cebador y 2,5 U Taq polimerasa por 100 µl de reacción. Se pueden usar volúmenes de 25 a 100 µl. Agregue la polimerasa Taq a la mezcla maestra y agregue la plantilla después de la distribución a los recipientes de reacción de tubo de microcentrífuga de 0,6 ml.
 - c. Realizar el siguiente perfil de amplificación de los marcadores: desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min, seguido de 5 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94°C por 1 min, temperatura de hibridación de 60°C durante 1 min y una extensión a 72 °C por 2 min) y una extensión final a 72 °C por 3 min.
- 7.7.3 Análisis del producto de PCR en gel de agarosa
- a. Preparar gel de agarosa de 1,5 a 1,8% de agarosa suplementado con 1 µg / ml de bromuro de etidio u otro agente intercalante que permita la visualización de DNA.
 - b. Sumergir el gel de agarosa en TBE 1X.
 - c. Mezclar 10 µl de producto de PCR con 2 µl de gel de carga 6 × y cargar en los pocillos de gel de agarosa.
 - d. Emplear un voltaje constante de 5 a 10 V / cm.
 - e. Iluminar el gel con un transluminador UV para visualizar las bandas en relación con la migración del marcador de peso molecular.
 - f. Tomar fotografías del gel para documentación.
 - g. Los controles de cultivos positivos y negativos y el control de reactivos deben incluirse con cada ejecución de PCR.

7.8 Protocolos descrito por BAM de la FDA para la identificación de *V. vulnificus*

7.8.1 Método de identificación y enumeración

Se describen dos esquemas analíticos para aislar y enumerar *V. vulnificus*. El primero es un análisis de número más probable (NMP) junto con la identificación de aislados sospechosos utilizando perfiles bioquímicos e hibridación de colonias de sonda de ADN o PCR. La segunda metodología incluye dos metodologías de hibridación con sondas de ADN para la identificación de colonias. Estas metodologías se han utilizado en varios estudios y se ha demostrado que son equivalentes al método NMP. La técnica de

cromatografía de gases que compara los perfiles de ácidos grasos también ha sido exitosa para identificar *V. vulnificus*.

7.8.2 Enriquecimiento, aislamiento y enumeración

- a. Pesar 2 g de muestras de 5 lotes distintos de PMCP en 10 mL de APA.
- b. Incubar los tubos de 18 a 24 h a 35 ± 2 °C.
- c. Con un asa bacteriológica tomar una muestra superficial de medio del caldo de cultivo APA y sembrarla en medio mCPC o CC.
- d. Incubar durante la noche a 39-40 °C (35-37 °C si 39-40 °C no está disponible).
- e. En ambos medios de cultivos, las colonias se visualizan redondas, planas, opacas, amarillas y de 1 a 2 mm de diámetro.
- f. Tras la identificación de *V. vulnificus*, utilice las diluciones positivas originales de APA y aplique las tablas de 3 tubos-NMP (Tabla 15 ó 16 descrita en el documento "Metodología de recuento de agentes microbianos de control de plagas y de contaminantes biológicos en productos microbianos de control de plagas", código D-RIS-RAI-PA-003) para la enumeración final del organismo.

7.8.3 Identificación bioquímica de aislamientos bacterianos

A menos que se especifique lo contrario, todos los medios en esta sección deben contener como mínimo 0,5% de NaCl.

- a. Transferir y sembrar dos o más colonias sospechosas con una aguja desde placas de agar CC o CPCm a TSA suplementado con NaCl al 2%.
- b. Preparar una suspensión bacteriana proveniente de una sola colonia en una solución de NaCl al 2%. Las reacciones de detección, AGS, reacción oxidasa, motilidad y tolerancia a la sal, se usan como para *V. parahaemolyticus*. Las tiras de diagnóstico API 20E también se pueden usar. Las reacciones bioquímicas para diferenciar *V. vulnificus* de *V. parahaemolyticus* se pueden encontrar en la Tabla 28.
- c. Para realizar la identificación mediante sonda de ADN del gen de citolisina específico de esta especie consultar De Paola, *et al.* 2017 y Wright, *et al.* 1993.

7.8.4 Confirmación de *V. vulnificus* por reacción en cadena de la polimerasa

Los aislamientos obtenidos por el procedimiento MPN pueden confirmarse por PCR. Los partidores para la amplificación del *vvhA* que codifica para la citolisina (amplicón de base 519) son los siguientes:

Vvh-785F	5' CCG CGG TAC AGG TTG GCG CA 3'
Vvh-1303R	5' CGC CAC CCA CTT TCG GGC C 3'

- a. Las mezclas maestras contienen todos los reactivos necesarios, excepto la polimerasa Taq y el lisado (plantilla) a amplificar. La reacción final contiene: Tris-HCl 10 mM, pH 8.3; 1,5 mM MgCl₂; 200 μM de cada uno de dATP, dTTP, dCTP, dGTP; 2 a 5% (v/v) de lisado APA (plantilla); 0,5 μM de cada cebador y 2.5 U Taq polimerasa por 100 μl de reacción. Se pueden usar volúmenes de 25 a 100 μl. Agregue la polimerasa Taq a la mezcla maestra y agregue la plantilla después de la distribución a los recipientes de reacción de tubo de microcentrífuga de 0,6 ml.
- b. Realizar el siguiente perfil de amplificación del gen *ctxAB* que consiste en una desnaturalización inicial a 94 °C por 10 min, seguido de 25 ciclos de amplificación

Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

(desnaturalización a 94°C por 1 min, temperatura de hibridación de 62°C durante 1 min y una extensión a 72°C por 1 min) y una extensión final a 72 °C por 10 min.

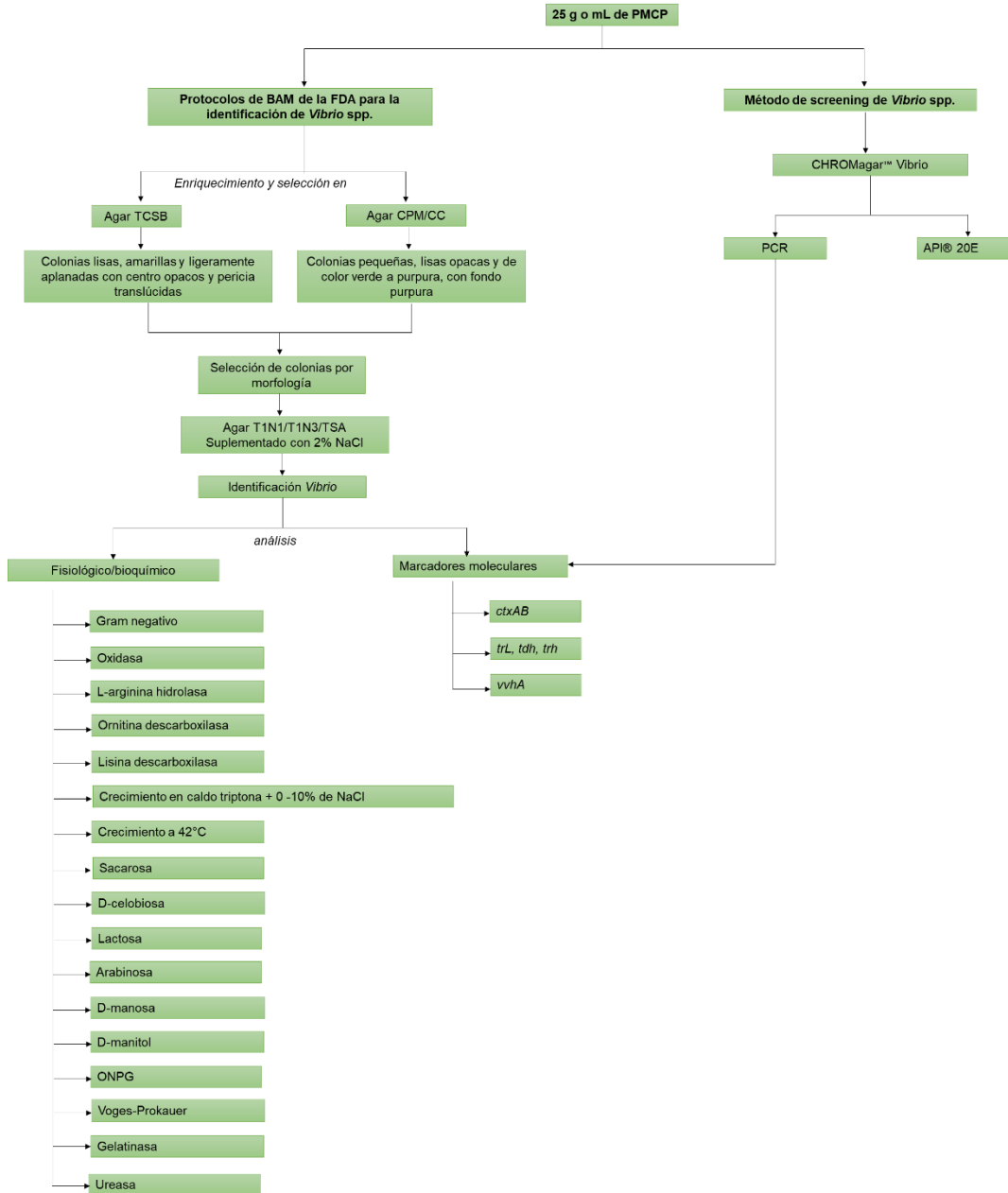
- c. Analizar en gel de agarosa la presencia del producto de PCR. Mezclar 10 µL de producto de PCR con 2 µL de tampón de carga 6X y cargar los pocillos de muestra de gel de agarosa de 1,5 a 1,8% que contenga 1 µg / mL de bromuro de etidio sumergido en 1 × TBE. Usar un voltaje constante de 5 a 10 V / cm. Iluminar el gel con un transluminador UV y visualizar las bandas en relación con la migración del marcador de peso molecular. Los partidores amplifican un fragmento de 519 pb del gen *vvhA*. Se pueden tomar fotografías polaroid del gel para documentación. Los controles de cultivos positivos y negativos y el control de reactivos deben incluirse con cada ejecución de PCR.

7.8.5 Interpretación de resultados microbiológicos

- a. La contaminación de PMCP con *V. cholerae* enterotoxigénico o *V. mimicus* o *V. parahaemolyticus* constituye un hallazgo importante desde el punto de vista de la salud pública.
- b. Las cepas de *V. parahaemolyticus* virulentas se separan de las cepas avirulentas mediante la prueba de Kanagawa o la detección del gen *tdh*. En la mayoría de los casos, las cepas de negativas para la prueba de Kanagawa no causan gastroenteritis humana. La presencia de cepas positivas para Kanagawa, o cepas que contienen *tdh* y/o *trh*, constituye un problema de salud pública.

Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

Figura 15. Matriz experimental para la detección de *Vibrio* spp. (*) En la Tabla 28 se indican los resultados de los análisis bioquímicos.



8. Métodos para la detección *Staphylococcus aureus* en PMCP

El procedimiento de diagnóstico a utilizar por el laboratorio puede ser uno, o más de uno, de los siguientes métodos:

- a. Método de detección rápida de muestras de PMCP mediante enriquecimiento y siembra en medio agar selectivo e identificación de presuntos aislados de *S. aureus* mediante el sistema API® Staph.
- b. Método de detección descrito en el capítulo 12 del Manual de Análisis Bacteriológico (BAM) de la FDA.

8.1 Justificación

La reacción de coagulasa con una valoración 4+ permite la identificación incuestionable de *S. aureus*. Las cepas sospechosas que presentan reacciones de coagulasa inferiores a 4+ deben confirmarse mediante otras pruebas, como la fermentación anaeróbica de glucosa, la sensibilidad a la lisostafina y la producción de termonucleasas.

Se utilizará como estándar una cepa de *S. aureus* ATCC o de colecciones de referencia, la cual será mantenida y utilizada de acuerdo a lo señalado en la Norma Chilena 2726. Las cepas de trabajo obtenidas a partir de dichas cepas ATCC, serán utilizadas para el control del método de ensayo. Para el control de calidad de los medios de cultivo, podrán utilizarse las cepas ATCC recomendadas por el fabricante, tanto para controles positivos como controles negativos.

8.2 Método detección rápida de *S. aureus* en muestras de PMCP

8.2.1 Medios y reactivos

- a. Medio Baird-Parker
- b. Tampón fosfato o fosfato de solución de fosfato Butterfield
- c. Sistema API® Staph.

8.2.2 Equipos y materiales

- a. El mismo equipo básico que para el conteo de placas convencional.
- b. Gabinete de bioseguridad de tipo II
- c. incubadora para secar la superficie de las placas de agar.
- d. Asa de Drigalski

8.3 Procedimiento

8.3.1 Preparación de la muestra

Agregar 450 mL de tampón fosfato Butterfield a 50 g o 50 mL de PMCP homogenizar en agitador orbital o Stomacher por 15-20 min. Esto resulta en una dilución de 10^{-1} . Realice diluciones del homogeneizado original con prontitud, utilizando pipetas que entreguen el volumen requerido con precisión. No entregue menos del 10% del volumen total de pipeta. Por ejemplo, no utilice una pipeta con una capacidad superior a 10 mL para administrar volúmenes de 1 mL; para suministrar volúmenes de 0,1 mL, no utilice pipetas con una capacidad superior a 1,0 mL. Preparar todas las diluciones decimales con 90 mL de diluyente estéril más 10 mL de la dilución anterior, a menos que se especifique lo contrario. Agite todas las diluciones vigorosamente 25 veces en un arco de 30 cm en 7 s. No deben transcurrir más de 15 minutos desde el momento en que se mezcla la muestra hasta que todas las diluciones estén en el medio apropiado.

8.3.2 Aislamiento y enumeración de *S. aureus*

- a. Para cada dilución que se va a sembrar, transferir asépticamente 1 mL de suspensión de muestra a 3 placas de agar Baird-Parker, distribuyendo 1 mL de inóculo equitativamente en 3 placas (por ejemplo, 0,4 mL, 0,3 mL y 0,3 mL).
- b. Extender el inóculo sobre la superficie de la placa de agar, usando un asa de Drigalsky estéril. Mantener las placas en posición vertical hasta que el inóculo sea absorbido por el agar (aproximadamente 10 minutos). Si el inóculo no se adsorbe fácilmente, coloque las placas en la incubadora durante aproximadamente 1 h. Invierta las placas e incube 45-48 h a 35-37 ° C. Seleccione las placas que contienen 20-200 colonias, a menos que solo las placas con diluciones más bajas (> 200 colonias) tengan colonias con apariencia típica de *S. aureus*.
- c. Las colonias de *S. aureus* son circulares, lisas, convexas, húmedas, de 2-3 mm de diámetro, de color gris a negro azabache, frecuentemente con margen de color claro (blanquecino), rodeadas por una zona opaca y rodeada exteriormente por una zona clara. Las colonias tienen consistencia mantecosa a gomosa cuando se tocan con una aguja de inoculación. Las cepas aisladas que provienen de muestras almacenadas por períodos prolongados con frecuencia desarrollan menos coloración negra que las colonias típicas y pueden tener una apariencia rugosa y textura seca.
- d. Contar y registrar colonias. Si se observan varios tipos de colonias que parecen ser *S. aureus* en placas seleccionadas, cuente el número de colonias de cada tipo y registre los recuentos por separado. Es ideal que se hagan los recuento en placas que presentan un número de colonias que van entre las 20 – 200 colonias. Pero, cuando las placas de la dilución más baja contienen <20 colonias, se pueden usar. Si las placas que contienen >200 colonias tienen colonias con la apariencia típica de *S. aureus* y las colonias típicas no aparecen en diluciones más altas, use estas placas para la enumeración de *S. aureus*, pero no cuente las colonias no típicas.

8.3.3 Confirmación

- a. Seleccionar cinco de las presuntas colonias típicas de *S. aureus* del medio selectivo.
- b. Realizar el análisis de la batería bioquímica comercial API® Staph de acuerdo a las instrucciones descritas por el fabricante.
- c. Multiplicar el número de colonias que presenten el mismo fenotipo de las colonias que fueron confirmadas como *S. aureus* por el factor de dilución de la muestra. Informar este número como número de *S. aureus*/g o *S. aureus*/mL de PMCP.

8.4 Protocolos descrito por BAM de la FDA para la identificación de *S. aureus*

8.4.1 Equipos y materiales

- a. El mismo equipo básico que para el conteo de placas convencional.
- b. Gabinete de bioseguridad de tipo II
- c. incubadora para secar la superficie de las placas de agar.
- d. Asa de Drigalski.

8.4.2 Medios y reactivos

- a. Medio Baird-Parker
- b. Tripticasa (tríptico) agar de soja (TSA)
- c. Tampón fosfato o fosfato de solución de fosfato Butterfield
- d. Caldo de infusión de cerebro y corazón (BHI)
- e. Plasma de coagulasa (conejo) con EDTA
- f. Agar toluidina con ADN azul
- g. Lisostafina (Schwartz-Mann, Mountain View Ave., Orangeburg, NY 10962)

- h. Agar extracto de levadura triptona
- i. Aceite de parafina estéril
- j. Tampón de fosfato: solución salina 0,02 M, que contiene 1% de NaCl
- k. Prueba de catalasa

8.4.3 Preparación de la muestra

Preparar la muestra como se indicó en la sección 8.3.1.

8.4.4 Aislamiento y enumeración de *S. aureus*

- a. Realizar el mismo procedimiento que la sección 8.3.2.

8.4.5 Prueba de coagulasa

- a. Transferir las colonias sospechosas de *S. aureus* a tubos pequeños que contengan 0,2-0,3 mL de caldo BHI y resuspender el inóculo completamente.
- b. Sembrar una suspensión bacteriana de BHI en un medio de agar inclinado de TSA.
- c. Incubar la suspensión de cultivo BHI y de agar inclinado TSA por 18-24 h a 35-37 °C. Conservar los cultivos de agar inclinado a temperatura ambiente para pruebas auxiliares o repetir en caso de que los resultados de la prueba de coagulasa sean cuestionables.
- d. Agregar 0,5 mL de plasma de coagulasa reconstituido con EDTA al cultivo BHI y mezclar bien. Incubar a 35-37 °C y examinar periódicamente durante 6 h para la formación de coágulos. Solo el coágulo firme y completo que permanece en su lugar cuando el tubo está inclinado o invertido se considera positivo para *S. aureus*. Los aislados que presenten una coagulación parcial debe ser adicionalmente testeados. Pruebe cultivos positivos y negativos conocidos simultáneamente con cultivos sospechosos de actividad de coagulasa desconocida.
- e. Teñir todos los cultivos sospechosos con reactivo de Gram y observe microscópicamente. Una prueba de aglutinación de látex (AUREUS TESTTM, Trisum Corp., Taipei, Taiwán) puede ser sustituida por la prueba de coagulasa si se desea un procedimiento más rápido.

8.4.6 Pruebas auxiliares

a. Prueba de catalasa

Utilizar inóculo de agar inclinado sobre un portaobjetos de vidrio e iluminar adecuadamente para observar la producción de burbujas de gas generado por una prueba catalasa positiva.

b. Catabolismo anaeróbico de glucosa

- Inocular con la colonia sospecha (el inóculo debe llegar al fondo del tubo) en un tubo de inoculación de medio de fermentación de carbohidratos que contenga glucosa (0,5%).
- Cubrir la superficie del agar con una capa de aceite de parafina estéril de al menos 25 mm de espesor. Incubar 5 días a 35-37 °C.
- El ácido se producirá anaeróticamente si el indicador cambia a amarillo en todo el tubo, lo que indica la presencia de *S. aureus*. Ejecutar controles simultáneamente (cultivos positivos y negativos y controles de medios de cultivos).

c. Catabolismo anaeróbico de manitol

- Repetir el procedimiento de la sección 8.4.6b, usando manitol como carbohidrato.
- *S. aureus* suele crecer en esas condiciones, pero algunas cepas son negativas. Ejecutar los controles simultáneamente.

d. Sensibilidad a la lisostafina.

- Transferir la colonia aislada de la placa de agar con asa de inoculación a 0,2 mL de tampón fosfato-solución salina.
- Transferir la mitad de las células suspendidas a otro tubo (13 × 100 mm) y mezclar con 0,1 mL de tampón fosfato salino como control.
- Agregar 0,1 mL de lisostafina (disuelta en 0,02 M de solución salina de fosfato que contiene NaCl al 1%) al tubo original para una concentración de 25 µg de lisostafina /mL.
- Incubar ambos tubos a 35-37 °C durante no más de 2 h. Si la turbidez desaparece en la mezcla de prueba, la prueba se considera positiva.
- Si la turbidez no se ha producido en 2 h, la prueba es negativa.
- *S. aureus* es generalmente positivo.

e. Producción de nucleasa termoestable

Esta prueba es tan específica como la prueba de coagulasa, pero menos subjetiva, porque implica un cambio de color de azul a rosa brillante. No es un sustituto de la prueba de coagulasa sino más bien un ensayo complementario, particularmente para resultados de reacción parcial de coagulación.

- Preparar los portaobjetos esparciendo 3 mL de agar toluidina azul-desoxirribonucleico en la superficie de cada portaobjetos. Cuando el agar se haya solidificado, corte pocillos de 2 mm de diámetro (10-12 por portaobjetos) en agar y retire el tapón de agar.
- Agregar aproximadamente 0,01 mL de muestra calentada (15 min en baño de agua hirviendo) de cultivos de caldo utilizados para la prueba de coagulasa en el pocillo de agar presente en los portaobjetos.
- Incubar los portaobjetos en cámara húmeda 4 h a 35-37 °C. El desarrollo de un halo rosa brillante que se extiende al menos 1 mm desde la periferia del pozo indica una reacción positiva.

Tabla 32. Características bioquímicas de 2 especies de *Stafilococos* y *Micrococcos*

Característica	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>Micrococci</i>
Actividad catalasa	+	+	+
Producción de coagulasa	+	-	-
Producción termonucleasa	+	-	-
Sensibilidad a lisostafina	+	+	-
Catabolismo anaeróbico de glucosa	+	+	-
Catabolismo anaeróbico de manitol	+	-	-

^a +, Más del 90% de las cepas son positivas; -, más del 90% de las cepas son negativas.

f. Determinación del número más probable

El método de número más probable (NMP) se recomienda para la vigilancia rutinaria de productos en los que se espera un pequeño número de *S. aureus* y que presenten una gran población de especies competidoras.

Equipo y materiales: igual que para el método de recuento directo de placas, arriba.

Medios y reactivos: igual que para el método de recuento directo de placas, arriba. Se recomienda emplear caldo de soja Trypticase (tríptico) (TSB) que contiene 10% de NaCl y 1% de piruvato de sodio.

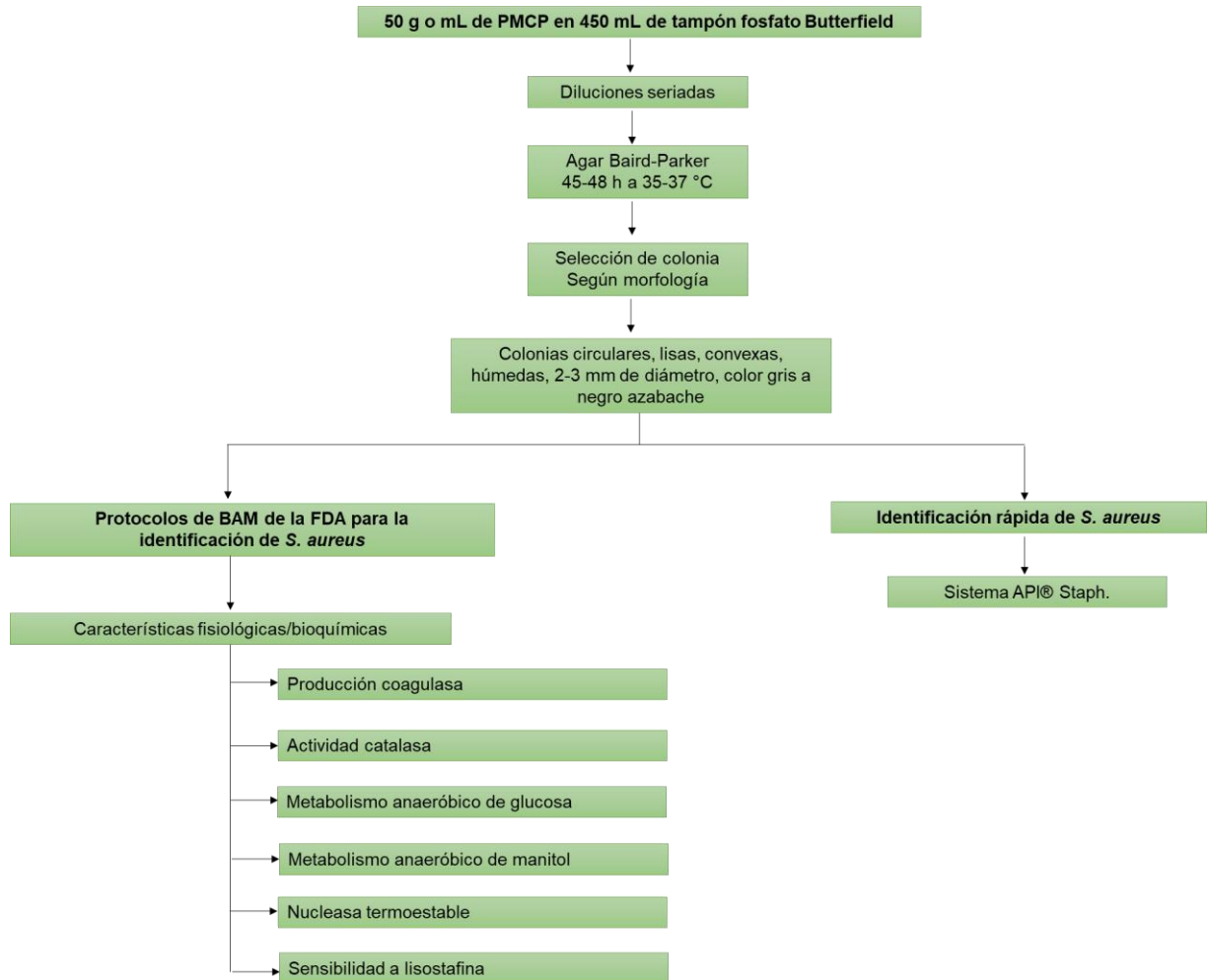
Preparación de la muestra: igual que para el método de recuento directo de placas, arriba.

g. Procedimiento para la determinación del MPN

- Inocular 3 tubos de TSB que contengan NaCl al 10% y piruvato de sodio al 1% con porciones de 1 mL de diluciones decimales de cada muestra. La dilución más alta debe dar un punto final negativo.
- Incubar los tubos 48 ± 2 h a $35-37$ ° C. Usando un asa bacteriológica de diámetro de loop de 3 mm, transferir un inóculo de cada tubo que muestre crecimiento (turbidez) a la placa del medio Baird-Parker. Mezclar los tubos en vórtex antes de rayar si el crecimiento es visible solo en el fondo o en los lados de los tubos. Sembrar el inóculo para obtener colonias aisladas.
- Incubar las placas 48 h a $35-37$ °C. De cada placa que muestre crecimiento, transferir al menos 1 colonia sospechosa de ser *S. aureus* al caldo BHI.
- Continuar el procedimiento para la identificación y confirmación de *S. aureus* (Figura 16). Informe *S. aureus* / g como MPN / g, de acuerdo con las tablas del Tabla 15 ó 16 de determinación de NMP que se detalla en el documento "Metodología de recuento de agentes microbianos de control de plagas y de contaminantes biológicos en productos microbianos de control de plagas", código D-RIS-RAI-PA-003

Figura 16. Matriz experimental para la detección de *S. aureus* spp. (*) En la Tabla 32 se indican los resultados del análisis bioquímico.

Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas




9. Medios de cultivos y reactivos

1) Caldo de verde brillante-bilis-lactosa (BGLB)

- Peptona 10 g
- Lactosa 10 g
- Oxgall 20 g
- Verde brillante 0.0133 g
- Agua destilada 1 litro

Disolver la peptona y la lactosa en 500 mL de agua destilada. Agregar 20 g de oxgall deshidratado disuelto en 200 mL de agua destilada. El pH de esta solución debe ser de 7,0 a 7,5. Mezclar y agregar agua para hacer 975 ml. Ajuste el pH a 7,4. Añadir 13,3 ml de verde brillante acuoso al 0,1% en agua destilada. Agregue agua destilada para hacer 1 litro. Dispensar en tubos de fermentación. Autoclave 15 min a 121 °C. pH final, 7,2 ± 0,1.

	DOCUMENTO GENERAL
	Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

2) Caldo de lauril triptosa (LST)

- Triptosa o tripticasa 20 g
- Lactosa 5 g
- K₂HPO₄ 2,75 g
- KH₂PO₄ 2,75 g
- NaCl 5 g
- Lauril sulfato de sodio 0,1 g
- Agua destilada 1 litro

Dispensar porciones de 10 ml en tubos de 20 x 150 mm que contienen tubos de fermentación invertidos de 10 x 75 mm. Autoclave 15 min a 121 ° C. pH final, 6,8 ± 0,2.

3) Caldo lactosa

- Extracto de ternera 3 g
- Peptona 5 g
- Lactosa 5 g
- Agua destilada 1 litro

Dispensar porciones de 225 ml en matraces Erlenmeyer de 500 ml. Después de esterilizar en autoclave durante 15 min a 121 ° C y justo antes de su uso, ajuste asépticamente el volumen a 225 ml. pH final, 6,9 ± 0,2.

4) Caldo EC

- Tripticasa o triptosa 20 g
- Ventas biliares No. 3 1,5 g
- Lactosa 5 g
- K₂HPO₄ 4 g
- KH₂PO₄ 1,5 g
- NaCl 5 g
- Agua destilada 1 litro


Distribuya porciones de 8 ml en tubos de ensayo de 16 x 150 mm que contienen tubos de fermentación invertidos de 10 x 75 mm. Autoclave 15 min a 121 ° C. pH final, 6,9 ± 0,2.

5) Agar de eosina-azul de metileno (L-EMB) de Levine

- Peptona 10 g
- Lactosa 10 g
- K₂HPO₄ 2 g
- Agar 15 g
- Eosina Y 0,4 g
- Azul de metileno 0.065 g
- Agua destilada 1 litro

Hervir para disolver la peptona, el fosfato y el agar en 1 litro de agua. Agregue agua para hacer el volumen original. Dispensar en porciones de 100 o 200 ml y esterilizar en autoclave durante 15 min a no más de 121 ° C. pH final, 7,1 ± 0,2. Antes de usar, derrita y a cada porción de 100 ml agregue:

- ml de solución estéril de lactosa al 20%;
- 2 ml de solución acuosa de eosina Y al 2%; y
- 4,3 ml de solución acuosa de azul de metileno al 0,15%.

	DOCUMENTO GENERAL
	Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

6) Caldo de triptona, 1%

- Triptona o tripticasa 10 g
- Agua destilada 1 litro

Disolver y dispensar porciones de 5 ml en tubos de ensayo de 16 × 125 o 16 × 150 mm. Autoclave 15 min a 121 ° C. pH final, 6,9 ± 0,2.

7) Medio M104: Caldo MR-VP

Existen 3 alternativas para el mismo medio de cultivo

a. Medio 1

- Polvo de agua y peptona tamponada (Difco o BBL) 7 g
- Glucosa 5 g
- K₂HPO₄ 5 g
- Agua destilada 1 litro

b. Medio 2

- Digerido pancreático de caseína 3,5 g
- Digerido péptico de tejido animal 3,5 g
- Dextrosa 5,0 g
- Fosfato de potasio 5,0 g
- Agua destilada 1 litro

Disolver los ingredientes en agua con calor suave si es necesario. Dispensar 10 ml en tubos de ensayo de 16 × 150 mm y esterilizar en autoclave durante 15 min a 118-121 ° C. pH final, 6,9 ± 0,2.

c. Medio 3

- Peptona 5,0 g
- Glucosa 5,0 g
- Tampón de fosfato 5,0 g
- Agua destilada 1 litro

Disolver los ingredientes en agua. Dispensar 10 mL en tubos de ensayo de 16 × 150 mm y esterilizar en autoclave durante 15 min a 121 ° C. pH final, 7,5 ± 0,2.


Para *Salmonella*: dispense 10 ml en tubos de ensayo de 16 × 150 mm y esterilice en autoclave durante 12-15 min a 121 ° C.

Para el crecimiento de cepas de *Vibrio* spp. halófilas, agregue NaCl hasta una concentración final de 2-3%.

8) Caldo de citrato de Koser

- NaNH₄HPO₄ · 4H₂O 1,5 g
- KH₂PO₄ (monobásico) 1 g
- MgSO₄ · 7H₂O 0,2 g
- Citrato de sodio · 2H₂O 3 g
- Agua destilada 1 litro

Dispensar en tubos con tapón de rosca según se desee. Autoclavar 15 min a 121 ° C. pH final, 6,7 ± 0,2. Esta formulación se enumera en Métodos oficiales de análisis de AOAC Internacional y Métodos estándar para el examen de aguas residuales de la APHA. Se diferencia de la composición del medio deshidratado disponible comercialmente. Este último se puede emplear también.

	DOCUMENTO GENERAL
	Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

9) Agar para recuento en placa (AC) (métodos estándar)

- Triptona 5 g
- Extracto de levadura 2,5 g
- Dextrosa 1 g
- Agar 15 g
- Agua destilada 1 litro

Calentar para disolver los ingredientes. Dispensar en tubos o matraces adecuados. Autoclave 15 min a 121 ° C. pH final, 7,0 ± 0,2.

10) Tampón fostato con fosfato de Butterfield

- KH_2PO_4 34 g
- Agua destilada 500 mL

Ajuste el pH a 7,2 con NaOH 1 N. Llevar el volumen a 1 litro con agua destilada.

Esterilizar 15 min a 121 ° C. Conservar en frigorífico.

11) Reactivo Kovacs'

- p-dimetilaminobenzaldehído 5 g
- Alcohol amílico (solo normal) 75 ml
- HCl (concentrado) 25 ml

Disolver p-dimetilaminobenzaldehído en alcohol amílico normal. Agregue lentamente HCl. Conservar a 4 ° C. Para probar el indol, agregue 0,2-0,3 ml de reactivo a 5 ml de cultivo de bacterias de 24 h en caldo de triptona. El color rojo oscuro en la capa superficial es una prueba positiva para indol.

12) Reactivo Voges-Proskauer (VP)

a. Solucion 1

- α -naftol 5 g
- Alcohol (absoluto) 100 ml

b. Solucion 2

- Hidróxido de potasio 40 g
- Agua destilada 100 ml


c. Prueba de Voges-Proskauer (VP)

Transferir 1 mL de cultivo de 48 h a un tubo de ensayo y agregar 0,6 mL de solución 1 y 0,2 mL de solución 2. Agitar después de agregar cada solución. Para intensificar y acelerar la reacción, agregar algunos cristales de creatina a la mezcla. Dejar reposar a temperatura ambiente. Leer los resultados 4 h después de agregar los reactivos.

13) Indicador de rojo de metilo

- Rojo de metilo 0,10 g
- Etanol, 95% 300 mL
- Agua destilada para hacer 500 mL

Disuelva rojo de metilo en 300 ml de etanol. Llevar el volumen a 500 mL con agua destilada.

	DOCUMENTO GENERAL
	Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

14) Agar bilis rojo violeta (VRBA)

- Extracto de levadura 3,0 g
- Peptona o gelificado 7,0 g
- NaCl 5,0 g
- Sales biliares o sales biliares No. 3 1,5 g
- Lactosa 10.0 g
- Rojo neutro 0,03 g
- Violeta cristal 0,002 g
- Agar 15,0 g
- Agua destilada 1,0 litro

Suspender los ingredientes en agua destilada y dejar reposar unos minutos. Mezclar bien y ajustar a pH $7,4 \pm 0,2$. Calentar con agitación y hervir durante 2 min. No esterilizar. Antes de usar, enfriar a 45°C y usar como medio de recubrimiento. Después de la solidificación, agregue una capa de cobertura sobre el agar de aproximadamente 3,0 a 4,0 mL para evitar el crecimiento de la superficie y la propagación de colonias.

15) Agar bilis rojo violeta (VRBA)

Agregar 0,1 g de 4-metilumbeliferil- β -D-glucurónido (MUG) a los ingredientes para 1 litro de VRBA (M174) y continúe como para la preparación de VRBA.

16) Medio EC MUG

Preparar como para el caldo EC (M49), pero agregue 50 mg de 4-metilumbeliferil- β -D-glucurónido (MUG) por litro antes de esterilizar en autoclave (15 min, 121°C). El medio EC-MUG está disponible comercialmente.

17) Caldo de lauril triptosa MUG (LST-MUG)

- Triptosa o tripticasa 20 g
- Lactosa 5 g
- K_2HPO_4 2,75 g
- KH_2PO_4 2,75 g
- NaCl 5 g
- Lauril sulfato de sodio 0,1 g
- 4-Metilumbeliferilo
- β -D-glucurónido (MUG) * 50 mg
- Agua destilada 1 litro

Preparar caldo de lauril triptosa y agregue TAZA. Disuelva a fuego suave si es necesario. Dispensar porciones de 10 ml en tubos de ensayo de 20 x 150 mm que contienen tubos de fermentación invertidos de 10 x 75 mm. Autoclave 15 min a 121°C . pH final, $6,8 \pm 0,2$.

* MUG se puede obtener de varias fuentes, por ejemplo, HACH Co., Loveland, CO.

18) Diluyente de peptona

- Peptona 5 g
- Agua destilada 1 litro

Autoclave 15 min a 121°C . pH final, $7,0 \pm 0,2$.

19) Caldo de enriquecimiento de *Listeria* tamponado (BLEB)

a. Medio base:

Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

- Caldo de soja tripticasa 30 g
- Extracto de levadura 6 g
- Fosfato monopotásico (anhidro) 1,35 g/L
- Fosfato disódico (anhidro) 9,6 g/L
- Piruvato de sodio (sal de sodio) 1,11 g/L
- Agua destilada 1 litro

Pese los ingredientes y disuelva en agua. Autoclave 15 min a 121°C. pH final 7,3 ± 0,1.

Opcionalmente, se puede agregar una solución de piruvato de sodio al 10% (p / v) esterilizada por filtración después de la autoclave (11,1 mL/L)]

b. Suplementos selectivos:

- Acriflavina HCl 10 mg / L
- Ácido nalidíxico (sal sódica) 40 mg / L
- Cicloheximida 50 mg / L

Prepare suplementos de acriflavina y ácido nalidíxico como soluciones madre al 0,5% (p/v) en agua destilada. Prepare el suplemento de cicloheximida como una solución madre al 1,0% (p/v) en una solución al 40% (v/v) de etanol en agua. Filtrar-esterilizar las soluciones madre y almacenar a 4 ° C, proteger la acriflavina de la luz.

Añada asépticamente los 3 suplementos selectivos al enriquecimiento después de 4 h de incubación a 30 ° C como se describe en el Capítulo 10. Volumen final por solución madre de suplemento determinado por el volumen total de BLEB utilizado en la muestra enriquecida.

20) Caldo Dey-Engley (D-E)

- Triptona 5,0 g
- Extracto de levadura 2,5 g
- Glucosa 10.0 g
- Tioglicolato de sodio 1,0 g
- Tiosulfato de sodio 6.0 g
- Bisulfito de sodio 2,5 g
- Polisorbato 80 5,0 g
- Lecitina (soja) 7.0 g
- Brom cresol violeta 0,02 g
- Agua destilada 1 L

Autoclavar 15 min. a 121 ° C. pH final 7,6 ± 0,2.

21) Medio Oxford

- Agar sangre Columbia 39,0 g
- Esculina 1,0 g
- Citrato de amonio férrico 0,5 g
- Cloruro de litio 15,0 g
- Cicloheximida 0,4 g
- Sulfato de colistina 0,02 g
- Acriflavina 0,005 g
- Cefotetán 0,002 g
- Fosfomicina 0,010 g
- Agua destilada 1 litro

Añadir los 55,5 g de los primeros 4 componentes (medio basal) a 1 L de agua destilada. Deje hervir suavemente para que se disuelva por completo. Esterilizar en autoclave a 121 °

C durante 15 min. Enfriar a 50 ° C y agregar de forma aséptica el suplemento, mezclar y verter en placas de Petri estériles. Para preparar el suplemento, disuelva cicloheximida, sulfato de colistina, acriflavina, cefotetan y fosfomicina en 10 ml de una mezcla 1: 1 de etanol y agua destilada. Filtrar y esterilizar el suplemento antes de usarlo. El medio basal Oxford y la mezcla de suplementos están disponibles comercialmente.

22) Agar selectivo PALCAM

a. Medio basal

- Peptona 23 g
- Almidón 1 g
- NaCl 5 g
- Agar Columbia 13 g
- Manitol 10 g
- Citrato de amonio férrico 0,5 g
 - Esculina (esculina) 0,8 g
 - Dextrosa (glucosa) 0,5 g
 - Cloruro de litio 15,0 g
 - Rojo de fenol 0,08 g
 - Agua destilada 1000 mL

b. Agentes selectivos

- Sulfato de polimixina B 10 mg
- Acriflavina 5 mg
- Cefotazidina 20 mg
- Agua destilada 2 mL

Para preparar 500 mL de medio, pesar 34,4 g de medio basal en polvo (todos los ingredientes excepto los antibióticos) y suspender en 500 mL de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121 ° C durante 15 min. Disolver la mezcla de antibióticos en agua destilada estéril a una concentración de 17,5 mg/mL y esterilizar por filtración. Añadir 1 mL de solución de suplemento de antibióticos a 500 mL de medio basal estéril que se haya enfriado a 50 ° C. Mezclar suavemente y verter en las placas. pH final 7,2 ± 0,1.


23) Agar MOX

- Base de agar sangre Columbia (depende de la marca) 39,0-44,0 g
- Agar 2,0 g
- Esculina 1,0 g
- Citrato de amonio férrico 0,5 g
- Cloruro de litio (calidad Sigma L0505 o equivalente) 15,0 g
- Solución tamponada de metanosulfonato de colistina (1% p / v) 1,0 ml
- Agua destilada 1,0 L

Hidratar el polvo medio basal revolviendo gradualmente en agua destilada. Ajustar el pH a 7,2 ± 0,1 si es necesario. Esterilizar en autoclave a 121 ° C durante 10 min. Mezclar de nuevo. Enfriar rápidamente a 46 ° C en un baño de agua. Añadir 2 mL de solución de moxalactama tamponada esterilizada con filtro al 1% p/v y mezcle bien. Vierta 12 ml por placa de Petri.

a. Solución tamponada de colistina al 1% p / v:

- Metanosulfonato de colistina (calidad Sigma C1511 o equivalente) 1,0 g
- Tampón de fosfato de potasio 0,1 M, pH 6,0 ± 0,1 100 mL

	DOCUMENTO GENERAL
	Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

Dispensar la solución tamponada en alícuotas de 5 ml. Almacene las alícuotas a -20 °C.

b. Solución tamponada de moxalactama al 1% p / v:

- Moxalactama de sodio (o amonio) (calidad Sigma M1900 o equivalente) 1.0 g
- Tampón de fosfato de potasio 0,1 M, pH 6,0 ± 0,1 100 mL

Disolver, esterilizar por filtración y dispense en alícuotas de 2 mL. Conservar a -20 ° C.

24) Agar de cloruro de litio-feniletanol-moxalactama (LPM) con esculina y hierro añadidos

- Agar feniletanol (Difco) 35,5 g
- Anhídrido de glicina
- (NOTA: no glicina) 10 g
- Cloruro de litio 5 g
- Solución madre de moxalactama,
- 1% en tampón fosfato, pH 6,0 2 mL
- Agua destilada 1 litro

Esterilizar el medio (sin moxalactama) a 121 ° C durante 15 min. Enfriar a 48-50 ° C y agregar una solución de moxalactama esterilizada por filtración.

a. Solución madre de moxalactama

- Consiste en 1 g de sal de moxalactama (amonio o sodio) en 100 ml de tampón de fosfato de potasio 0,1 M, pH 6,0. Almacene la solución madre esterilizada por filtración congelada en alícuotas de 2 mL.

La moxalactama (Eli Lilly Co.) se vende al por menor por Sigma Chemical Co. Para evitar que el agar delgado se seque, refrigere y use placas rápidamente. El medio basal LPM está disponible comercialmente en forma de polvo.

25) LPM más esculina y hierro férrico

- Esculina 1,0 g
- Citrato de amonio férrico 0,5 g

Agregar estos componentes a los de LPM (S24).

Esterilizar el medio, enfriar a 48-50 ° C y agregar una solución de moxalactama esterilizada por filtración como se describe para el medio LPM.

26) Medio cromogénico Biosynth (BCM) para *Listeria monocytogenes*

El medio de placa BCM *Listeria monocytogenes* patentado contiene un sustrato para las enzimas fosfolipasa C (PlcA) específicas de fosfatidilinositol que diferencia a *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* de otras especies de *Listeria*. Se puede obtener comercialmente como medio basal deshidratado más suplementos. La actividad diferencial para todas las especies de *Listeria* se debe a la adición de un sustrato cromogénico. Una fuente es Biosynth International, Inc., Naperville, IL.

27) Agar Aloa

- Peptona de carne 18 g
- Triptona 6 g
- Extracto de levadura 10 g
- Piruvato de sodio 2 g
- Glucosa 2 g

Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

- Glicerofosfato de magnesio 1 g
- Sulfato de magnesio 0,5 g
- Cloruro de sodio 5 g
- Cloruro de litio 10 g
- Fosfato de hidrógeno disódico anhidro 2,5 g
- 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucopiranosido 0,05 g
- Agar, según la fuerza de gelificación 12 g a 18 g
- Agua, según volumen de suplemento fungistat 925-930 ml

Disolver los componentes deshidratados o la base completa deshidratada en el agua hirviendo. Ajuste el pH, si es necesario, para que después de la esterilización sea de $7,2 \pm 0,2$. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C .

Suplementos: disolver 2 g de L- α -Fosfatidilinositol (Sigma P 6636) en 50 ml de agua destilada fría.

Agitar durante unos 30 minutos hasta obtener una suspensión homogénea. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a $48-50^\circ \text{C}$.

Disolver los siguientes compuestos individualmente en los disolventes especificados y esterilice por filtración las soluciones: 0,02 g de ácido nalidíxico (sal sódica) en 5 mL de agua; 0,02 g de ceftazidima en 5 mL de agua; 76700 U de polimixina B en 5 mL de agua; 0,05 g de cicloheximida en 2,5 mL de etanol y añadir 2,5 mL de agua; 0,01 g de anfotericina B en una mezcla de 2,5 ml de HCl (1 M) y 7,5 mL de dimetilformamida.

Medio completo: Agar base 925 mL (o 930 mL); solución de ácido nalidíxico; 5 mL; solución de ceftazidima, 5 ml; solución de cicloheximida, 5 mL (o solución de anfotericina B, 10 mL); Solución de polimixina B, 5 mL; solución de L- α -Fosfatidilinositol, 50 mL.

Este medio está disponible comercialmente como medio de agar listo para usar.

28) Agar cromogénico para *Listeria*

Este medio selectivo patentado, que contiene el sustrato, lecitina, diferencia a *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* de otras especies de *Listeria*. Oxoid Ltd, Basingstoke, Inglaterra, lo proporciona como un medio basal deshidratado y un suplemento de lecitina con un suplemento antibiótico selectivo. La actividad diferencial para todas las especies de *Listeria* se debe a la adición de un sustrato cromogénico. Siga las instrucciones del fabricante.

29) Rapid 'L. mono

- a. Peptonas 30 g
- b. Extracto de carne 5 g
- c. Extracto de levadura 1 g
- d. Cloruro de litio 9 g
- e. Suplemento selectivo 20 ml
- f. D-xilosa 10 g
- g. Rojo de fenol 0,12 g
- h. Agar Ba 13 g
- i. Sustrato cromogénico 1 mL
- j. Agua destilada 1000 mL

El pH final es 7.3 ± 0.1 . Almacenar a $2-8^\circ \text{C}$ en oscuridad en su embalaje original. La vida útil es de 4 meses en estas condiciones. El medio está disponible como placas de Petri listas para servir de, p. Ej. Bio-Rad. Debido a la presencia de D-xilosa y rojo fenol, este agar puede distinguir *L. ivanovii* y *L. monocytogenes*.

30) CHROMagar *Listeria*

Este medio selectivo patentado diferencia *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* de otras especies de *Listeria* basándose en las fosfolipasas de estas especies. La actividad diferencial para todas las especies de *Listeria* se debe a la adición de un sustrato cromogénico. CHROMagar, París, Francia, produce el medio. Siga las instrucciones del fabricante.

31) Agar tripticasa de soja con extracto de levadura al 0.6%

- Agar tripticasa soja 40 g
- Extracto de levadura 6 g
- Agua destilada 1 L

Pesar los ingredientes, agregar agua, mezclar y esterilice en autoclave durante 15 min a 121 ° C. pH final, 7,3 ± 0,2. Después de esterilizar en autoclave, agite para dispersar el agar fundido.

32) Agar sangre de oveja

- Base de agar sangre (Oxoid No. 2) 95 mL
- Sangre de oveja esterilizada, desfibrinada 5 mL

Rehidratar y esterilizar la base según lo recomendado por el fabricante. El agar y la sangre deben estar a 45-46 ° C antes de agregar la sangre y verter las placas.

Pueden usarse placas comerciales de agar sangre de oveja vertidas previamente.

33) Prueba de catalasa

Verter 1 mL de peróxido de hidrógeno al 3% sobre el crecimiento en cultivo inclinado. Las burbujas de gas indican una prueba positiva. Alternativamente, emulsione la colonia en una gota de peróxido de hidrógeno al 3% en un portaobjetos de vidrio. El burbujeo inmediato es una prueba de catalasa positiva. Si la colonia se extrae de una placa de agar sangre, cualquier arrastre de glóbulos rojos puede dar una reacción falsa positiva.

34) Medio de prueba de motilidad (MTM)


- Extracto de ternera 3 g
- Peptona o gelysate 10 g
- NaCl 5 g*
- Agar 4 g
- Agua destilada 1 L

Instrucciones generales: Calentar con agitación y hervir 1-2 min para disolver el agar. Para su uso con *Salmonella*, consulte las instrucciones que se enumeran a continuación. Dispense porciones de 8 ml en tubos con tapón de rosca de 16 x 150 mm. Autoclavar 15 min a 121 ° C. pH final, 7,4 ± 0,2.

* Para usar con *Vibrio* spp. Halófilas, agregue NaCl hasta una concentración final de 2-3%.

Para *Listeria*: Mantenga los tubos individuales bien tapados y sellados con parafilm. Almacenar en el refrigerador hasta por dos semanas.

Para *Salmonella*: Dispensar en porciones de 20 mL en tubos con tapón de rosca de 20 x 150 mm, colocando los tapones sin apretar. Autoclave 15 min a 121 ° C. Enfriar a 45 ° C después de esterilizar en autoclave. Apriete las tapas y refrigere a 5-8 ° C. Para usar,

	<p>DOCUMENTO GENERAL</p> <p>Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas</p>
---	--

vuelva a fundir en agua hirviendo o vapor y enfríe a 45 ° C. Dispense asépticamente porciones de 20 ml en placas petri estériles de 15 × 100 mm. Cubra los platos y deje solidificar. Úselo el mismo día en que lo preparó. PH final, 7,4 ± 0,2. Emplear el agar el mismo día que se preparó.

35) Caldo de soja tripticasa con extracto de levadura al 0,6% (TSBYE)

- Caldo de soja tripticasa 30 g
- Extracto de levadura 6 g
- Agua destilada 1 L

Pese los ingredientes y disuelva en agua. Autoclave 15 min a 121 ° C. pH final, 7,3 ± 0,2.

36) Base de caldo de fermentación de carbohidratos púrpura, q contiene soluciones al 0,5% de dextrosa, esculina, maltosa, ramnosa, manitol y xilosa

- Peptona proteasa 10 g
- Extracto de ternera 1 g
- NaCl 5 g
- Bromocresol púrpura 0,02 g
- Agua destilada 1L

Preparar como para el caldo de carbohidratos con rojo fenol. pH final, 6,8 ± 0,2. Para usar con *Vibrio* spp. Halófilas, agregue NaCl hasta una concentración final de 2-3%.

37) Solución salina fisiológica al 0,85% (estéril)

- NaCl 8,5 g
- Agua destilada 1 litro

Disolver 8,5 g de NaCl en agua. Autoclave 15 min a 121 ° C. Dejar enfriar a temperatura ambiente.

38) Medio de reducción de nitrato (M108)

- Extracto de ternera 3 g
- Peptona 5 g
- KNO₃ (sin nitritos) 1 g
- Agua destilada 1 L

Disolver los ingredientes. Ajustar pH final, 7,0 ± 0,2. Dispensar porciones de 5 mL en tubos de 16 × 125 mm. Autoclave 15 min a 121 ° C.

39) Caldo lactosa

- Extracto de carne 3 g
- Peptona 5 g
- Lactosa 5 g
- Agua destilada 1 L

Dispensar porciones de 225 mL en matraces Erlenmeyer de 500 mL, pH 6,9 ± 0,2. Después de esterilizar en autoclave durante 15 min a 121 ° C y justo antes de su uso, ajuste asépticamente el volumen a 225 mL.

40) Leche descremada en polvo

- Leche desnatada en polvo 100 g

Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

- Agua destilada 1 L

Suspenda 100 g de leche en polvo deshidratada sin grasa en 1L de agua destilada. Remueve hasta que se disuelva. Autoclave 15 min a 121 ° C.

41) Caldo Selenita cisteina

a. Medio 1 (modificación de la formulación de Leifson para caldo de selenita)

- Triptona o polipéptona 5 g
- Lactosa 4 g
- Selenito ácido de sodio (NaHSeO_3) 4 g
- Na_2HPO_4 10 g
- L-cistina 0,01 g
- Agua destilada 1 litro

Calentar a ebullición para disolver. Dispensar porciones de 10 mL en tubos de ensayo estériles de 16 × 150 mm. Calentar 10 min en vapor. NO AUTOCLAVAR. pH final, 7,0 ± 0,2. El medio no es estéril. Úselo el mismo día en que lo preparó.

b. Medio 2 (modificación North-Bartram)

- Polipeptona 5 g
- Lactosa 4 g
- Selenito ácido de sodio (NaHSeO_3) 4 g
- Na_2HPO_4 5,5 g
- KH_2PO_4 4,5 g
- L-cistina 0,01 g
- Agua destilada 1 litro

Calentar con agitación para disolver. Dispense porciones de 10 mL en tubos de ensayo estériles de 16 × 150 mm. Calentar 10 min en vapor. NO AUTOCLAVAR. Úselo el mismo día en que lo preparó.

42) Caldo de tetrionato (TT)

a. Base de caldo de tetrionato

- Polipeptona 5 g
- Sales biliares 1 g
- Carbonato de calcio 10 g
- Tiosulfato de sodio · 5H₂O 30 g
- Agua destilada 1L

Suspender los ingredientes en 1L de agua destilada, mezcle y caliente hasta que hierva. NO AUTOCLAVE. (El precipitado no se disolverá por completo). Enfriar a menos de 45 ° C. Almacenar a 5-8 ° C. pH final, 8,4 ± 0,2.

b. Solución de yoduro de yodo y potasio ($\text{I}_2\text{-KI}$)

- Yoduro de potasio 5 g
- Yodo resublimado 6 g
- Agua destilada estéril 20 mL

Disolver el yoduro de potasio en 5 ml de agua destilada estéril. Agregar yodo y revolver para disolver. Diluir a 20 ml.

c. Solución verde brillante

- Colorante verde brillante, estéril 0,1 g
- Agua destilada estéril 100 mL

Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

El día de uso, agregar 20 mL de solución I₂-KI y 10 mL de solución verde brillante a 1 litro de base. Resúspender el precipitado agitando suavemente y dispense asépticamente porciones de 10 mL en tubos de ensayo estériles de 20 × 150 o 16 × 150 mm. No calentar el medio después de agregar I₂-KI y soluciones de tinte.

43) Medio Rappaport-Vassiliadis (RV)

a. Caldo base

- Triptona 5 g
- NaCl 8 g
- KH₂PO₄ 1,6 g
- Agua destilada 1 litro
- Solución de cloruro de magnesio
- MgCl₂ · 6H₂O 400 g
- Agua destilada 1 litro
- Solución de oxalato de verde de malaquita
- Oxalato de verde de malaquita 0,4 g
- Agua destilada 100 ml


Para preparar el medio completo, combine 1000 mL de caldo base, 100 mL de solución de cloruro de magnesio y 10 mL de solución de oxalato de verde de malaquita (el volumen total del medio completo es 1110 mL). La base de caldo debe prepararse el mismo día en que se combinan los componentes para hacer un medio completo. La solución de cloruro de magnesio puede almacenarse en una botella oscura a temperatura ambiente hasta por 1 año. Para preparar la solución, disuelva todo el contenido de MgCl₂ · 6H₂O del recipiente recién abierto de acuerdo con la fórmula, porque esta sal es muy higroscópica. La solución de oxalato de verde de malaquita se puede almacenar en un frasco oscuro a temperatura ambiente hasta por 6 meses. Se recomienda el oxalato de verde de malaquita analíticamente puro de Merck porque es posible que otras marcas no sean igualmente efectivas. Dispense volúmenes de 10 mL de medio completo en tubos de ensayo de 16 × 150 mm. Autoclavar 15 min a 115 ° C. pH final, 5,5 ± 0,2. Conservar a 4-8 °C y utilizar en el plazo de 1 mes.

No se recomienda el uso de medios deshidratados disponibles comercialmente. Los usuarios de este medio deben saber que existen formulaciones y temperaturas de incubación para este medio distintas de las recomendadas en este manual.

44) Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)

- Extracto de levadura 3 g
- Citrato férrico amónico 0,8 g
- L-lisina 5 g
- Tiosulfato de sodio 6,8 g
- Xilosa 3,75 g
- NaCl 5 g
- Lactosa 7,5 g
- Agar 15 g
- Sacarosa 7,5 g
- Rojo de fenol 0,08 g
- Desoxicolato de sodio 2,5 g
- Agua destilada 1 litro

Calentar con agitación hasta que hierva a fuego medio. No sobrecalentar. Vierta en platos cuando el medio se haya enfriado a 50 ° C. Deje secar unas 2 h con las tapas

	DOCUMENTO GENERAL
	Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

parcialmente retiradas. Luego cierre los platos. pH final, $7,4 \pm 0,2$. Puede almacenarse hasta 30 días en refrigeración (4 ± 2 ° C).

45) Agar entérico de Hektoen (HE)

- Peptona 12 g
- NaCl 5 g
- Extracto de levadura 3 g
- Tiosulfato de sodio 5 g
- Sales biliares No. 3 9 g
- Citrato férrico amónico 1,5 g
- Lactosa 12 g
- Azul de bromotimol 0,065 g
- Sacarosa 12 g
- Fucsina ácida 0,1 g
- Salicina 2 g
- Agar 14,0 g
- Agua destilada 1L

Calentar a ebullición con agitación frecuente para disolver. Hervir no más de 1 min. No sobrecalentar. Enfriar al baño maría. Vierta porciones de 20 mL en placas de Petri estériles de 15 × 100 mm. Dejar secar 2 h con las tapas parcialmente retiradas. pH final, $7,5 \pm 0,2$.

46) Agar de sulfito de bismuto

- Polipeptona (o peptona) 10 g
- Extracto de ternera 5 g
- Dextrosa 5 g
- Na_2HPO_4 (anhidro) 4 g
- FeSO_4 (anhidro) 0,3 g
- Sulfito de bismuto (indicador) 8 g
- Verde brillante 0.025 g
- Agar 20 g
- Agua destilada 1 L


Mezclar bien y calentar con agitación. Ajustar pH a $7,7 \pm 0,2$. Hervir alrededor de 1 min para obtener una suspensión uniforme. (El precipitado no se disolverá). Enfriar a 45-50 ° C. Suspende el precipitado agitando suavemente y verter porciones de 20 mL en placas de Petri estériles de 15 × 100 mm. Dejar secar las placas unas 2 h con las tapas parcialmente retiradas; luego cerrar las placas.

NO AUTOCLAVAR. Prepare las placas el día antes de rayar y guárdelas en la oscuridad. La selectividad disminuye en 48 h.

47) Agar Hierro Triple Azúcar

a. Medio 1

- Polipeptona 20g
- NaCl 5g
- Lactosa 10g
- Sacarosa 10g
- Glucosa 1g
- $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g
- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,2g

	DOCUMENTO GENERAL
	Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

- Fenol rojo 0,025 g
- Agar 13g
- Agua destilada 1L

b. Medio 2

- Extracto de carne 3g
- Peptona 3g
- Peptona proteasa 15g
- Glucosa 5g
- Lactosa
- Sacarosa
- FeSO₄
- NaCl
- Na₂S₂O₃
- Rojofenol
- Agar
- Agua destilada 1L

Estos dos medios son intercambiables para uso general.

Suspender los ingredientes del Medio 1 en agua destilada, mezcle bien y caliente con agitación ocasional. Hierva aproximadamente 1 minuto para disolver los ingredientes. Llene los tubos de 16 × 150 mm hasta 1/3 de su capacidad y tape o tape para mantener las condiciones aeróbicas. Ajustar pH a 7,3 ± 0,2 Esterilice el Medio 1 en autoclave durante 15 min a 118 ° C.

Preparar el Medio 2 de la misma manera que el Medio 1. Ajustar pH a 7,4 ± 0,2 excepto que esterilice en autoclave durante 15 min a 121 ° C. Antes de que el medio se solidifique, incline los tubos para obtener una inclinación de 4-5 cm y un extremo de 2-3 cm.

Para usar con *Vibrio* spp. Halófilas, agregue NaCl hasta una concentración final de 2-3%.

48) Caldo triptona 1%

- Triptona o tripticasa 10 g
- Agua destilada 1 L


Disolver, ajustar pH a 6,9 ± 0,2 y dispensar porciones de 5 ml en tubos de ensayo de 16 × 125 o 16 × 150 mm. Autoclavar 15 min a 121 ° C.

49) Caldo de soja tripticasa (tríptico)

- Peptona tripticasa 17 g
- Peptona fitona 3 g
- NaCl 5 g
- K₂HPO₄ 2,5 g
- Glucosa 2,5 g
- Agua destilada 1L

Calentar con agitación suave para disolver. Ajustar pH 7,3 ± 0,2 Dispensar 225 mL en matraces Erlenmeyer de 500 mL. Autoclave 15 min a 121 °C. Para el caldo de tripticasa de soja sin glucosa, prepare como se indicó anteriormente, pero omita 2,5 g de glucosa.

Para usar con *Vibrio* spp. Halófilas, agregue NaCl hasta una concentración final de 2-3%.

	DOCUMENTO GENERAL
	Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

50) Caldo tripticasa de soja y triptosa

- Caldo de soja tripticasa (comercial, deshidratado) 15 g
- Caldo triptosa
- (comercial, deshidratado) 13,5 g
- Extracto de levadura 3 g
- Agua destilada 1 litro

Disolver los ingredientes en 1 L de agua. Ajustar a pH $7,2 \pm 0,2$. Calentar suavemente para disolver. Dispensar porciones de 5 mL en tubos de ensayo de 16 × 150 mm. Autoclavar 15 min a 121 ° C.

51) Caldo MR-VP

a. Medio 1

- Polvo de agua y peptona tamponada
- (Difco o BBL) 7 g
- Glucosa 5 g
- K₂HPO₄ 5 g
- Agua destilada 1 L

b. Medio 2

- Digerido pancreático de caseína 3,5 g
- Digerido péptico de tejido animal 3,5 g
- Dextrosa 5,0 g
- Fosfato de potasio 5,0 g
- Agua destilada 1 L

Disolver los ingredientes en agua con calor suave si es necesario. Ajustar pH $6,9 \pm 0,2$. Dispensar 10 mL en tubos de ensayo de 16 × 150 mm y esterilizar en autoclave durante 15 min a 118-121 ° C.

c. Medio 3

- Peptona 5,0 g
- Glucosa 5,0 g
- Tampón de fosfato 5,0 g
- Agua destilada 1 L

Disolver los ingredientes en agua. Dispensar 10 ml en tubos de ensayo de 16 × 150 mm y esterilizar en autoclave durante 15 min a 121 ° C. Ajustar pH a $7,5 \pm 0,2$.

Para *Salmonella*: dispensar 10 mL en tubos de ensayo de 16 × 150 mm y esterilizar en autoclave durante 12-15 min a 121 ° C.

Para usar con *Vibrio* spp. halófilas, agregue NaCl hasta una concentración final de 2-3%.

52) Agar citrato Simmon

- Citrato de sodio * 2 g
- NaCl 5 g
- K₂HPO₄ 1 g
- NH₄H₂PO₄ 1 g
- MgSO₄ 0,2 g
- Azul de bromotimol 0,08 g
- Agar 15 g
- Agua destilada 1 L



DOCUMENTO GENERAL

Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

Calentar suavemente con agitación ocasional. Hervir 1-2 minutos hasta que el agar se disuelva. Ajustar pH final, $6,8 \pm 0,2$. Llenar tubos con tapón de rosca de 13×100 o 16×150 mm hasta $1/3$ de su capacidad. Autoclavar 15 min a 121°C . Antes de que el medio solidifique, inclinar los tubos para obtener inclinaciones de 4-5 cm y culatas de 2-3 cm.

53) Caldo urea

- Urea 20 g
- Extracto de levadura 0,1 g
- Na_2HPO_4 9,5 g
- KH_2PO_4 9,1 g
- Rojo de fenol 0,01 g
- Agua destilada 1 L

Disolver los ingredientes en agua destilada, ajustar pH $6,8 \pm 0,2$. Esterilizar por filtración a través de una membrana de $0,45 \mu\text{m}$. Dispense asépticamente porciones de 1,5-3,0 ml en 13 tubos de ensayo estériles de 100 mm.

54) Caldo urea (rápido)

- Urea 20 g
- Extracto de levadura 0,1 g
- KH_2PO_4 0,091 g
- Na_2HPO_4 0,095 g
- Rojo de fenol 0,01 g
- Agua destilada 1 L

Preparar como caldo urea (S52)


55) Caldo malonato

- Extracto de levadura 1 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g
- K_2HPO_4 0,6 g
- KH_2PO_4 0,4 g
- NaCl 2 g
- Malonato de sodio 3 g
- Glucosa 0,25 g
- Azul de bromotimol 0,025 g
- Agua destilada 1 L

Disolver calentando, si es necesario. Ajustar pH $6,7 \pm 0,2$. Dispensar porciones de 3 mL en tubos de ensayo de 13×100 mm. Autoclavar 15 min a 121°C .

56) Agar lisina hierro (Edwards y Fife)

- Gelisado o peptona 5 g
- Extracto de levadura 3 g
- Glucosa 1 g
- Clorhidrato de L-lisina 10 g
- Citrato de amonio férrico 0,5 g
- Tiosulfato de sodio (anhidro) 0,04 g
- Bromocresol púrpura 0,02 g
- Agar 15 g
- Agua destilada 1 L

	DOCUMENTO GENERAL
	Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

Calentar para disolver los ingredientes. Dispense porciones de 4 ml en 13 tubos con tapón de rosca de 100 mm. Ajustar pH final, $6,7 \pm 0,2$. Autoclavar 12 min a 121°C . Dejar solidificar en posición inclinada para formar colillas de 4 cm e inclinaciones de 2,5 cm.

57) Caldo de lisina descarboxilasa (Falkow) (para *Salmonella*)

- Gelisado o peptona 5 g
- Extracto de levadura 3 g
- Glucosa 1 g
- L-lisina 5 g
- Bromocresol púrpura 0,02 g
- Agua destilada 1 L

Calentar hasta que se disuelva. Ajustar pH final, $6,8 \pm 0,2$. Dispensar porciones de 5 ml en 16 tubos con tapón de rosca de 125 mm. Esterilizar en autoclave los tubos sin apretar durante 15 min a 121°C . Enroscar bien las tapas para el almacenamiento y después de la inoculación.

Para *Vibrio* spp. Halófilas, agregue NaCl hasta una concentración final de 2-3%.

58) Caldo de cianuro de potasio (KCN)

- Cianuro de potasio (KCN) 0,5 g
- Proteosa peptona n.º 3 o polipéptona 3 g
- NaCl 5 g
- KH_2PO_4 0,225 g
- Na_2HPO_4 5,64 g
- Agua destilada 1 L

Disolver los ingredientes anteriores excepto el cianuro de potasio. Ajustar pH final, $7,6 \pm 0,2$. Esterilizar en autoclave durante 15 min a 121°C . Enfriar y refrigerar a $5-8^\circ \text{C}$.

Preparar la solución madre de KCN disolviendo 0,5 g de KCN en 100 mL de agua destilada estéril enfriada a $5-8^\circ \text{C}$.

Con una propipeta de perilla, agregar 15 mL de solución madre de KCN fría a 1 L de medio base estéril fría. NO PIPEAR POR LA BOCA. Manejar con guantes.

Mezclar y dispensar asepticamente porciones de 1,0-1,5 ml en 13 tubos estériles de 100 mm. Utilizando una técnica aseptica, taponar los tubos con tapones de corcho n° 2 impregnados con parafina. Preparar los corchos hirviendo en parafina unos 5 min. Coloque los corchos en los tubos para que la parafina no fluya hacia el caldo, sino que forme un sello entre el borde de los tubos y el corcho. Almacene los tubos a $5-8^\circ \text{C}$ no más de 2 semanas antes de su uso.

59) Caldo de carbohidrato rojo de fenol

- Tripticasa o proteona peptona n.º 3 10 g
- NaCl 5 g
- Extracto de ternera (opcional) 1 g
- Fenol rojo
- (7,2 ml de solución de rojo de fenol al 0,25%) 0,018 g
- Agua destilada 1 L
- Carbohidrato*

Disolver 5 g de dulcitol, 10 g de lactosa o 10 g de sacarosa (como se especifica en la prueba de *Salmonella*) en este caldo basal.

Dispensar porciones de 2,5 mL en tubos de ensayo de 13 x 100 mm que contengan tubos de fermentación invertidos de 6 x 50 mm. Ajustar pH final, $7,4 \pm 0,2$. Autoclavar 10 min a 118°C .

Alternativamente, disuelva los ingredientes, omitiendo los carbohidratos, en 800 mL de agua destilada con calor y agitación ocasional. Dispensar porciones de 2,0 mL en tubos de ensayo de 13 x 100 mm que contienen tubos de fermentación invertidos. Ajustar pH $7,4 \pm 0,2$. Autoclavar 15 min a 118°C y deje enfriar. Disolver los carbohidratos en 200 ml de agua destilada y esterilizar pasando la solución a través de un filtro de retención de bacterias. Añada asépticamente 0,5 ml de filtrado estéril a cada tubo de caldo esterilizado después de enfriar a menos de 45°C . Agite suavemente para mezclar.

Para usar con *Vibrio* spp. Halófilas, agregar NaCl hasta una concentración final de 2-3%.

60) Agar MacConkey

- Peptona proteosa o polipéptona 3 g
- Peptona o gelificado 17 g
- Lactosa 10 g
- Sales biliares No. 3 mezcla de sales biliares 1,5 g
- NaCl 5 g
- Rojo neutro 0,03 g
- Violeta cristal 0,001 g
- Agar 13,5 g
- Agua destilada 1 L

Suspenda los ingredientes y caliente con agitación para disolver. Ajustar pH $7,1 \pm 0,2$. Hervir 1-2 min. Esterilice en autoclave durante 15 min a 121°C , enfríe a $45-50^\circ\text{C}$ y vierta porciones de 20 ml en placas de Petri estériles de 15×100 mm. Secar a temperatura ambiente con las tapas cerradas. No usar placas húmedas.

61) Caldo nutritivo


- Extracto de ternera 3 g
- Peptona 5 g
- Agua destilada 1 L

Calentar para disolver. Dispensar porciones de 10 mL en tubos o porciones de 225 ml en matraces Erlenmeyer de 500 ml. Autoclave 15 min a 121°C . PH final, $6,8 \pm 0,2$.

62) Caldo y agar de infusión de cerebro y corazón (los medios equivalentes están disponibles en Difco y BBL)

a. Medio 1

- Cerebro de ternera, infusión de 200 g
- Corazón de ternera, infusión de 250 g.
- Peptona proteosa (Difco) o polipéptona (Bioquest) 10 g
- NaCl 5 g
- Na_2HPO_4 2,5 g
- Dextrosa 2,0 g
- Agua destilada 1 L

	DOCUMENTO GENERAL
	Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

Disolver los ingredientes del Medio 1 en agua destilada con calor suave.

* Difco no especifica aguas de hidratación.

b. Medio 2

- Infusión cerebro-corazón 6,0 g
- Digerido péptico de tejido animal 6,0 g
- NaCl 5,0 g
- Dextrosa 3,0 g
- Digerido pancreático de gelatina 14,5 g
- Na₂HPO₄ 2,5 g
- Agua destilada 1 L

Suspender los ingredientes del Medio 2 en agua destilada y hierva durante 1 minuto para disolverlos por completo.

Tanto para el Medio 1 como para el Medio 2, dispense el caldo en botellas o tubos para almacenarlos. Autoclave 15 min a 121 ° C. pH final, 7,4 ± 0,2. El medio comercial disponible es aceptable.

Para preparar agar de infusión de cerebro-corazón, agregar 15 g de agar a 1 L de caldo de cultivo. Autoclavar 15 min a 121 °C. Calentar para disolver el agar antes de dispensarlo en botellas o matraces.

Para usar con cepas *Vibrio* spp. halófilas, agregue NaCl hasta una concentración final de 2-3%.

63) Solución de papaína, 5%

- Papaína 5 g
- Agua destilada 95 mL

Agregar papaína a agua destilada estéril y agite hasta que se disuelva por completo. Dispensar una porción de 100 mL en botellas.

64) Solución celulasa

Disolver 1 g de celulasa en 99 ml de agua destilada estéril. Filtrar esterilizar a través de un filtro de 0,45 µm. La solución de celulasa puede almacenarse a 2-5 ° C durante 2 semanas.


65) Base de agar sangre de triptosa

- Triptosa 10 g
- Extracto de ternera 3 g
- NaCl 5 g
- Agar 15 g
- Agua destilada 1L

Suspenda los ingredientes en agua destilada, mezcle bien y caliente con agitación ocasional. Hervir alrededor de 1 min. Llene los tubos de 16 × 150 mm hasta 1/3 de su capacidad y tape o tape para mantener las condiciones aeróbicas. Autoclave 15 min a 121 ° C. Antes de que los medios solidifiquen, incline los tubos para obtener una inclinación de 4-5 cm y un extremo de 2-3 cm.

66) Caldo de preenriquecimiento universal

- Triptona 5 g

	DOCUMENTO GENERAL
	Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

- Proteosa peptona 5 g
- KH_2PO_4 15 g
- Na_2HPO_4 7 g
- NaCl 5 g
- Dextrosa 0,5 g
- MgSO_4 0,25 g
- Citrato de amonio férrico 0,1 g
- Piruvato de sodio 0,2 g
- Agua destilada 1,0 L

Calentar con agitación suave para disolver. Ajustar pH final, $6,3 \pm 0,2$. Autoclavar 15 min a 121°C .

67) Caldo de preenriquecimiento universal (sin citrato de amonio férrico)

- Triptona 5 g
- Proteosa peptona 5 g
- KH_2PO_4 15 g
- Na_2HPO_4 7 g
- NaCl 5 g
- Dextrosa 0,5 g
- MgSO_4 0,25 g
- Piruvato de sodio 0,2 g
- Agua destilada 1,0 L

Calentar con agitación suave para disolver. Ajustar pH $6,3 \pm 0,2$. Autoclavar 15 min a 121°C .

68) Agua de peptona tamponada

- Peptona 10 g
- Cloruro de sodio 5 g
- Fosfato de disodio 3,5 g
- Fosfato monopotásico 1,5 g
- Agua destilada 1 L

Ajustar pH final $7,2 \pm 0,2$. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.


69) Caldo Dey-Engley

- Triptona 5,0 g
- Extracto de levadura 2,5 g
- Glucosa 10.0 g
- Tioglicolato de sodio 1,0 g
- Tiosulfato de sodio 6.0 g
- Bisulfito de sodio 2,5 g
- Polisorbato 80 5,0 g
- Lecitina (soja) 7,0 g
- Bromo cresol violeta 0,02 g
- Agua destilada 1 L

Ajustar pH $7,6 \pm 0,2$. Autoclavar 15 min a 121°C .

70) Solución de cloro, 200 ppm, que contiene dodecil sulfato de sodio al 0,1%

- Lejía comercial (Hipoclorito de sodio al 5,25%) 8 mL

	DOCUMENTO GENERAL
	Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

- Agua destilada que contiene 1 g dodecil sulfato de sodio 992 mL

Disolver 1 g de dodecilsulfato de sodio en 992 mL de agua destilada. Agregar 8 mL de lejía comercial y mezclar bien cada vez que se emplee.

71) Solución de etanol 70%

- Etanol 95% 700 ml
- Agua destilada añadir hasta un volumen final de 950 ml

72) Reactivo de Kovacs

- p-dimetilaminobenzaldehído 5 g
- Alcohol amílico (solo normal) 75 ml
- HCl (concentrado) 25 ml

Disolver p-dimetilaminobenzaldehído en alcohol amílico normal. Agregar lentamente HCl. Conservar a 4 ° C. Para probar el indol, agregar 0,2-0,3 mL de reactivo a 5 mL de cultivo de bacterias de 24 h en caldo de triptona. El color rojo oscuro en la capa superficial es una prueba positiva para indol.

73) Solución de hidróxido de potasio. 40%

- KOH 40 g
- Agua destilada para hacer 100 ml

74) Solución de hidróxido de sodio 1N

- NaOH 40 g
- Agua destilada para hacer 1 L

75) Ácido clorhídrico 1N

- HCl (concentrado) 89 ml
- Agua destilada para hacer 1 L

76) Solución de tinte verde brillante, 1

- Tinta verde brillante 1 g
- Agua destilada (esterilizada) 10 mL

Disolver 1 g de tinte en agua esterilizada. Diluir a 100 mL. Antes de usar, pruebe todos los lotes de tinte para detectar toxicidad con microorganismos de prueba positivos y negativos conocidos.


77) Solución de colorante púrpura de bromocresol, 0.2%

- Colorante violeta de bromocresol 0,2 g
- Agua destilada (esterilizada) 100 ml

Disolver 0,2 g de tinte en agua estéril y diluya a 100 ml.

78) Indicador rojo de metilo

- Rojo de metilo 0,10 g
- Etanol, 95% 300 mL
- Agua destilada para hacer 500 mL

	<p>DOCUMENTO GENERAL</p> <p>Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas</p>
---	--

Disolver rojo de metilo en 300 mL de etanol. Llevar el volumen a 500 mL con agua destilada.

79) Solución salina fisiológica formalizada

- Solución de formaldehído (36-38%) 6 mL
- NaCl 8,5 mL
- Agua destilada 1 L

Disolver 8.5 g de NaCl en 1 L de agua destilada. Autoclavar 15 min a 121 ° C. Dejar enfriar a temperatura ambiente. Agregar 6 mL de solución de formaldehído. No esterilizar en autoclave después de la adición de formaldehído.

80) Agua de peptona tamponada modificada (mBPW)

- Pancreático digerido de gelatina 5,0 g
- Extractos de carne de vacuno 5,0 g
- Cloruro de sodio 5,0 g
- Fosfato de disodio (Na₂HPO₄) 7.0 g
- Fosfato monopotásico (KH₂PO₄) 3,0 g
- Agua destilada 1000 mL

Ajustar pH final a 7,2 ± 0,2. Esterilizar en autoclave a 121 ° C durante 15 min.

81) Caldo *Shigella*

- Medio base
- Triptona 20 g
- K₂HPO₄ 2 g
- KH₂PO₄ 2 g
- NaCl 5 g
- Glucosa 1 g
- Tween 80 1,5 ml
- Agua destilada 1 L

Ajustar pH 7,0 ± 0,2. Autoclavar 15 min a 121 ° C.

82) Solución de novobiocina

- Pesar 50 mg de novobiocina en 1 L de agua destilada.
- Esterilizar por filtración a través de una membrana de 0,45 µm. Añada 2,5 mL de concentrado a 225 mL de medio base.


83) Tripticase caldo de extracto de levadura de soja (TSYE)

- Caldo de soja tripticasa 30 g
- Extracto de levadura 6 g
- Agua destilada 1 L

Pesar los ingredientes y disuelva en agua. Ajustar pH final, 7,3 ± 0,2. Autoclavar 15 min a 121 ° C.

84) Agar citrato de Christensen

- citrato de sodio 3 g
- Glucosa 0,2 g
- Extracto de levadura 0,5 g

	DOCUMENTO GENERAL
	Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

- Monohidrocloreuro de cisteína 0,1 g
- Citrato de amonio férrico 0,4 g
- KH₂PO₄ 1 g
- NaCl 5 g
- Tiosulfato de sodio 0,08 g
- Rojo de fenol 0,012 g
- Agar 15 g
- Agua destilada 1 L

Suspender los ingredientes, mezclar bien, ajustar pH a $6,9 \pm 0,2$. y calentar con agitación ocasional. Hervir aproximadamente 1 minuto para disolver los ingredientes. Llenar los tubos de 16 x 150 mm hasta 1/3 de su capacidad y tape para mantener las condiciones aeróbicas. Autoclavar durante 15 min a 121 ° C. Antes de que los medios solidifiquen, incline los tubos para obtener una inclinación de 4-5 cm y un extremo de 2-3 cm. La formulación de Difco no incluye citrato de amonio férrico ni tiosulfato de sodio.

85) Agar y caldo para infusión de ternera

- Ternera, infusión de 500 g
- Proteosa peptona n. ° 3 10 g
- NaCl 5 g
- Agar 15 g
- Agua destilada 1L

Calentar con agitación para disolver el agar. Dispense porciones de 7 mL en tubos de 16 x 150 mm. Autoclave 15 min a 121 ° C. Incline los tubos para obtener una inclinación de 6 cm. pH final, $7,3 \pm 0,2$.

a. Caldo de infusión de ternera

Prepare como arriba, pero omita el agar de 15 g. Autoclave 15 min a 121 ° C. PH final, $7,4 \pm 0,2$.

86) Caldo púrpura de Bromocresol

a. Medio base

- Peptona 10 g
- Extracto de ternera 3 g
- NaCl 5 g
- Bromocresol violeta 0,04 g
- Agua destilada 1 L

Dispensar porciones de 2,5 mL de solución base en 13 tubos de ensayo de 100 mm que contienen tubos de fermentación de 6 x 50 mm. Ajustar pH final, $7,0 \pm 0,2$. Autoclavar 10 min a 121 ° C.

Esterilizar las soluciones madre de carbohidratos (50% p/v) por separado mediante autoclave o, preferiblemente, mediante filtración (tamaño de poro de 0,2 µm). Añadir $0,278 \pm 0,002$ ml de solución madre de carbohidratos a 2,5 mL de medio basal para obtener una concentración final de carbohidratos del 5% p/v.

Para usar con *Vibrio* spp. halófilas, agregar NaCl hasta una concentración final de 2-3%.

87) Agar acetato

- acetato de sodio 2 g
- NaCl 5 g

Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

- $MgSO_4$ (anhidro) 0,2 g
- Fosfato de amonio 1 g
- K_2HPO_4 1 g
- Azul de bromotimol 0,08 g
- Agar 20 g
- Agua destilada 1 L

Agregar todos los ingredientes excepto $MgSO_4$ a 1L de agua destilada. Calentar hasta que hierva sin dejar de remover. Agregar $MgSO_4$ y ajustar el pH (6,7). Dispensar porciones de 8 mL en tubos de 16 x 150 mm. Autoclavar 15 min a 121 ° C. Inclinar los tubos para obtener una inclinación de 5 cm.

Este medio contiene una concentración de acetato ligeramente menor que la fórmula recomendada en Ewing (1986).

88) Caldo de mucate

- Peptona 10 g
- Ácido múxico 10 g
- Azul de bromotimol 0,024 g
- Agua destilada 1 L

Disolver la peptona. Disolver el ácido múxico agregando lentamente NaOH 5 N y agitando. Ajustar pH a $7,4 \pm 0,1$. Dispensar en porciones de 5 mL en 13 tubos con tapón de rosca de 100 mm. Autoclave 10 min a 121 ° C.

89) Caldo de mucate control

- Peptona 10 g
- Azul de bromotimol 0,024 g
- Agua destilada 1 L

Disolver los ingredientes. Dispensar porciones de 5 mL en 13 tubos con tapón de rosca de 100 mm. Ajustar pH a $7,4 \pm 0,1$. Autoclavar 10 min a 121 ° C.

90) Medio basal descarboxilasa (lisina, Falkow)

a. Medio base


- Peptona o gelysate 5 g
- Extracto de levadura 3 g
- Glucosa 1 g
- Bromcresol púrpura 0,02 g
- Agua destilada 1 L

Ajustar el pH para que el valor después de la esterilización sea de $6,5 \pm 0,2$. Dispensar en porciones de 5 mL en 16 tubos con tapón de rosca de 125 mm. Esterilizar en autoclave los tubos sin apretar durante 10 min a 121 ° C. Enrosque bien las tapas para el almacenamiento y después de la inoculación. Para el control, use una base sin suplementos.

Para una base de 1 L, agregue:

- Caldo de arginina 5 g L-arginina
- Caldo de lisina (Falkow) 5 g L-lisina
- Caldo de ornitina 5 g L-ornitina

Para usar con *Vibrio* spp. Halófilas, agregue NaCl hasta una concentración final de 2-3%.

	DOCUMENTO GENERAL
	Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

91) Tinción Gram

Violeta de cristal de Hucker

a. Solución A

- Violeta cristal (90% de contenido de colorante) 2 g
- Etanol, 95% 20 ml

b. Solución B

- Oxalato de amonio 0,8 g
- Agua destilada 80 ml
- Mezclar las soluciones A y B. Almacenar 24 hy filtrar con papel de filtro grueso.

c. Yodo de Gram

- Yodo 1 g
- Yoduro de potasio (KI) 2 g
- Agua destilada 300 ml

Colocar el KI en el mortero, agregar yodo y triturar durante 5-10 s. Agregar 1 mL de agua y moler; luego añadir 5 mL de agua y moler, luego 10 mL y moler. Verter esta solución en una botella de reactivo. Enjuagar el mortero y la mano con la cantidad de agua necesaria para llevar el volumen total a 300 mL.

d. Contratinción de Hucker (solución madre)

- Safranina O (certificada) 2.5 g
- Etanol, 95% 100 ml

Solución de trabajo: agregar 10 mL de solución madre a 90 mL de agua destilada.

Procedimiento de tinción (tinción de Gram):

Fije las películas secadas al aire de la muestra de alimentos a fuego moderado. Tiña las películas durante 1 min con una solución de oxalato de amonio y violeta cristalina. Lavar brevemente con agua y escurrir. Aplicar yodo de Gram durante 1 min. Lavar con agua y escurrir. Decolorar con etanol al 95% hasta que ya no se libere el color azul (aproximadamente 30 s). Alternativamente, inundar los portaobjetos con etanol, vierta inmediatamente y vuelva a inundar con etanol durante 10s. Lavar brevemente con agua, escurrir y aplicar contratinción de Hucker (solución de safranina) durante 10-30 g. Lavar brevemente con agua, escurrir, secar o secar al aire y examinar.


92) Agar KingB

- Peptona 20 g
- glicerol 15 mL
- K_2HPO_4 , 1,5 g
- $MgSO_4 \times 7H_2O$ 1,5 g
- Agua destilada para 1 L

Ajustar el pH a 7,2. Esterilizar en autoclave durante 15 min a 121 °C.

93) Caldo de soya (TSB), agar (TSA) (S92) (con NaCl agregado, 2%)

- Tripticasa peptona 15 g
- Peptona Phytone 5 g
- NaCl 5 g

	DOCUMENTO GENERAL
	Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

- Agar 15 g
- Agua destilada 1 L

Calentar con agitación para disolver el agar. Ajustar pH a $7,3 \pm 0,2$. Hervir 1 min. Dispensar en tubos o matraces adecuados. Autoclave 15 min a 121°C .

Para usar con *Vibrio* spp. Halófilas, agregue NaCl hasta una concentración final de 2-3%.

94) Agua de peptona alcalina

- Peptona 10 g
- NaCl 10 g
- Agua destilada 1 L

Ajuste el pH para que el valor después de la esterilización sea de $8,5 \pm 0,2$.

Dispensar en tubos con tapón de rosca. Autoclave 10 min a 121°C .

95) Medio AKI

- Peptona 15 g
- Extracto de levadura 4 g
- NaCl 5 g
- Agua destilada 970 mL
- NaHCO_3
- 10% acuoso, esterilizado por filtración 30 mL

El día de uso, disuelva la peptona, el extracto de levadura y el NaCl en agua destilada. Ajustar pH final $7,4 \pm 0,2$. Autoclavar 15 min a 121°C . Enfriar. Añadir 30 ml de NaHCO_3 recién preparado y esterilizado por filtración y mezclar. Dispensar asépticamente en tubos con tapón de rosca (use 15 mL para tubos de 16×125 mm).

96) 96. Agar tendido de arginina y glucosa

- Peptona 5 g
- Extracto de levadura 3 g
- Triptona 10 g
- NaCl 20 g
- Glucosa 1 g
- L-arginina (clorhidrato) 5 g
- Citrato de amonio férrico 0,5 g
- Tiosulfato de sodio 0,3 g
- Bromocresol púrpura 0.02 g
- Agar 13,5 g
- Agua destilada 1L

Suspender los ingredientes en agua destilada y hervir para disolver. Ajustar $6,8-7,0$. Dispensar en tubos (para tubos de 13×100 mm utilice 5 mL). Autoclavar 10-12 min a 121°C . Después de la esterilización, solidificar en forma inclinada.

97) Caldo de extracto de levadura y casaminoácidos

- Casaminoácidos 20 g
- Extracto de levadura 6 g
- NaCl 2,5 g
- K_2HPO_4 8,71 g
- Solución de trazas de sales

Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

- (abajo), opcional 1 ml
- Agua destilada 1 L

Ajustar pH de modo que el valor después de la esterilización en autoclave sea $8,5 \pm 0,2$. Autoclavar 15 min a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

a. Solución de trazas de sales (opcional)

- MgSO_4 50 g
- MnCl_2 5 g
- FeCl_2 5 g
- Agua destilada 1L

Suspender los ingredientes. Agregar suficiente H_2SO_4 0,1 N para disolver. Esterilizar por filtración a través de una membrana de $0,45\text{ }\mu\text{m}$. Agregue 1 mL a 1L de base. Dispensar porciones de 10 mL en matraces de 50 mL.

98) Agar colistina poliximina B celobiosa modificado

a. Solución 1

- Peptona 10 g
- Extracto de ternera 5 g
- NaCl 20 g
- 1000 × Solución madre de tinte * 1 ml
- Agar 15 g
- Agua destilada 900 ml

Ajustar a pH 7,6. Hervir para disolver el agar. Enfriar a $48\text{-}55\text{ }^{\circ}\text{C}$.

b. Solución madre de tinte 1000X

- Azul de bromotimol 4.0 g
- Rojo cresol 4.0 g
- Etanol, 95% 100 ml

Para obtener un color medio uniforme, use una solución de tinte en lugar de pesar repetidamente los tintes secos. Disuelva los tintes en etanol para obtener una solución madre al 4% (p / v). Usando 1 mL de esta solución por litro de agar mCPC se obtienen 40 mg de azul de bromotimol y 40 mg de rojo de cresol por litro.

c. Solución 2

- Celobiosa 10 g
- Colistina 400.000 unidades
- Polimixina B 100.000 unidades
- Agua destilada 100 mL

Disolver la celobiosa en agua destilada calentando suavemente. Frio. Agrega antibióticos.


Agregar la Solución 2 a la Solución 1 enfriada, mezclar y distribuir en placas de Petri. Color final, verde oscuro a marrón verdoso.

Este medio, como TCBS, no requiere esterilización en autoclave. El medio se puede almacenar 2 semanas a temperaturas de refrigeración.

99) Agar de celobiosa colistina

a. Solucion 1

- Peptona 10 g

	DOCUMENTO GENERAL
	Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

- Extracto de ternera 5 g
- NaCl 20 g
- 1000 × Solución madre de tinte * 1 mL
- Agar 15 g

Agua destilada 900 ml

Ajustar a pH 7,6. Hervir para disolver el agar. Enfriar a 48-55 ° C.

b. Solución madre de tinte 1000 ×

- Azul de bromotimol 4.0 g
- Rojo cresol 4.0 g
- Etanol, 95% 100 mL

Para obtener un color medio uniforme, use una solución de tinte en lugar de pesar repetidamente los tintes secos. Disuelva los tintes en etanol para obtener una solución madre al 4% (p / v). Usando 1 ml de esta solución por litro de agar mCPC se obtienen 40 mg de azul de bromotimol y 40 mg de rojo de cresol por litro.

c. Solución 2

- Celobiosa 10 g
- Colistina 400.000 unidades
- Agua destilada 100 mL

Disolver la celobiosa en agua destilada calentando suavemente. Enfriar y agregar antibióticos y esterilizar por filtración.

Agregar la Solución 2 a la Solución 1 enfriada, mezclar y distribuir en placas de Petri. Color final, verde oscuro a marrón verdoso.

Este medio no requiere esterilización en autoclave. El medio se puede almacenar 2 semanas a temperaturas de refrigeración.

100) Reactivo de oxidasa

- N, N, N', N'-Tetrametil-p-fenilendiamina · 2HCl 1 g
- Agua destilada 100 mL

Úselo recién preparado. Sin embargo, el reactivo se puede usar hasta 7 días si se almacena en una botella de vidrio oscuro bajo refrigeración.

Aplicar la solución recién preparada directamente al cultivo joven (24 h) en placa de agar o inclinada. Las colonias oxidasa-positivas desarrollan un color rosa y progresivamente se vuelven de color púrpura oscuro. Si se van a conservar los cultivos, complete la transferencia de las placas a las que se ha agregado el reactivo en 3 minutos, ya que el reactivo es tóxico para los organismos.

Método opcional: transfiera una pequeña cantidad de cultivo a un papel de filtro impregnado de reactivo. El color violeta oscuro dentro de 10 s indica prueba positiva. Utilice alambre de platino o un palito de madera estéril (mondadientes), ya que el alambre que contiene hierro (por ejemplo, alambre de nicromo en las agujas y bucles de inoculación ordinarios) produce reacciones de falso positivo.

Alternativamente, la prueba puede realizarse con una solución al 1% de clorhidrato de N, N-dimetil-p-fenilendiamina. Aplique la solución directamente a la placa de cultivo o inclinada.

101) Diluyente peptona-Tween-sal (PTS)

- Peptona 1,0 g
- Tween 80 10,0 g
- Cloruro de sodio 30,0g
- Agua destilada 1 L

Disolver los ingredientes en agua destilada, ajustar el pH a 7,2 y verter en botellas del volumen deseado. Autoclave 15 min a 121 ° C.

102) Solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,4

- NaCl 7,650 g
- Na₂HPO₄, anhidro 0,724 g
- KH₂PO₄ 0,210 g
- Agua destilada 1 L

Disuelva los ingredientes en agua destilada. Ajuste el pH a 7,4 (con NaOH 1 N). Autoclave 15 min a 121 ° C. Este tampón se puede utilizar para cualquier paso en *Vibrio* spp. métodos cuando se necesita PBS.

103) Discos de polimixina B, 50 unidades

- Sulfato de polimixina B
- Agua destilada, esterilizada
- Discos de papel de filtro, 5-6 mm o 1/4 de pulgada, esterilizados
- Micropipeta, para suministrar 10 µL

Esterilizar discos de papel de filtro en placas petri de vidrio. Disolver la polimixina B en agua estéril para obtener una concentración final de 5000 unidades / mL. Colocar 10 µL de la solución de 5000 unidades / mL en cada disco. Seca los discos. Almacenar desecado y protegido de la luz en el frigorífico.

La polimixina B se vende por actividad en unidades USP por mg. Revise la botella de reactivo para ver la actividad del lote en uso. Para la polimixina B con actividad antibiótica de 8090 unidades USP por mg, disuelva 0,618 mg en 1 ml de agua estéril.

Cálculo:

$$\frac{5000 \text{ Unidades / ml}}{8090 \text{ Unidades / mg}} = 0,618 \text{ mg / ml}$$

104) Solución salina al 2%


- Solución al 2%: NaCl 20 g, Agua destilada 1 L.
- Solución al 3%: NaCl 30 g, Agua destilada 1 L.

Disolver NaCl en agua. Ajustar pH 7,0. Autoclavar 15 min a 121 ° C.

105) Desoxicolato de sodio: 0,5% en H2O destilada estéril (R91)

- Desoxicolato de sodio 0,5 g
- Agua destilada 100mL

No es necesario ajustar el pH de la solución y se puede almacenar en un frasco con tapón de rosca a temperatura ambiente.

	DOCUMENTO GENERAL
	Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

106) Agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS)

- Extracto de levadura 5 g Oxgall 5 g
- Peptona 10 g NaCl 10 g
- Sacarosa 20 g Citrato férrico 1 g
- Tiosulfato de sodio 5H₂O 10 g Azul de bromotimol 0,04 g
- Citrato de sodio 2H₂O 10 g Azul de timol 0,04 g
- Colato de sodio 3 g Agar 15 g
- Agua destilada 1 L

Preparar en un matraz al menos 3 veces más grande que el volumen requerido de medio. Agregue los ingredientes a agua destilada tibia y caliente para disolver. Deje que hierva y retire inmediatamente del fuego. ¡NO AUTOCLAVE! Enfriar a 50 ° C y verter en placas de Petri. Seque las placas durante la noche o a 37-45 ° C antes de su uso.

107) Agares T₁N₁ y T₁N₃ (1% de triptona y 1% o 3% de NaCl)

- Tripticasa o triptona 10 g
- NaCl 10 g
- Agar 20 g
- Agua destilada 1 L

Suspender los ingredientes y hervir para disolver el agar. Para inclinaciones, distribuya en tubos. Autoclavar 15 min a 121 ° C. Solidificar los tubos inclinados. Enfriar el medio para placas a 45-50 ° C y verter en placas de Petri estériles.

Para el agar T₁N₂, utilice 20 g de NaCl en lugar de los 10 g especificados para el agar T₁N₁.

108) Caldos T₁N₀, T₁N₃, T₁N₆, T₁N₈, T₁N₁₀

- Tripticasa o triptona 10 g
- NaCl 0, 10, 30, 60, 80 o 100 g
- Agua destilada 1 L

Disolver los ingredientes en agua destilada.

Para T₁N₀, no agregue NaCl.

Para T₁N₁, use 10 g de NaCl [1% (p / v) NaCl].


Para T₁N₃, use 30 g de NaCl / L [3% (p / v) NaCl], etc.

Ajustar pH final, 7,2 ± 0,2. Dispensar en tubos con tapón de rosca de 16 × 125 mm. Apretar las tapas para mantener la concentración de sal correcta en el tubo. Autoclavar 15 min a 121 ° C.

109) Agar Trípico de soja-sulfato de magnesio- 3% de NaCl

- Tripticasa peptona 15 g
- Peptona Phytone 5 g
- NaCl 20 g
- MgSO₄ · 7H₂O 1,5 g
- Agar 15 g
- Agua destilada 1 L

Ajustar pH a 7,3 ± 0,2 antes colocar el agar. Calentar con agitación para disolver el agar. Hervir 1 min. Dispensar en tubos o matraces adecuados. Autoclave 15 min a 121 ° C.

	DOCUMENTO GENERAL
	Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

110) Agar de urea de Christensen

a. Medio base

- Peptona 1 g
- NaCl 5 g
- Dextrosa 1 g
- KH₂PO₄ 2 g
- Fenol rojo
- (6 ml de solución 1: 500) 0,012 g
- Agar 15 g
- Agua destilada 900 ml

Disolver todos los ingredientes excepto la urea en 900 ml de agua (medio basal). Para *Vibrio* spp. Halófila, agregue 15 g adicionales de NaCl (concentración final de NaCl, 2%).

Autoclavar 15 min a 121 ° C. Enfriar a 50-55 ° C.

- Concentrado de urea
- Urea 20 g
- Agua destilada 100 ml

Disolver la urea en 100 ml de agua. Esterilizar con filtro; agregar asépticamente al medio basal enfriado. Mezcla. Ajustar pH final, 6,8 ± 0,1. Dispensar en tubos estériles o placas de Petri. Tubos inclinados para tope de 2 cm y oblicuo de 3 cm.

111) Agar de sacarosa *Vibrio vulnificus* (VPSA)

- Triptosa 5,0 g
- Triptona 5,0 g
- Extracto de levadura 7,0 g
- Sacarosa 10,0 g
- NaCl 30,0 g
- Sal biliar n. ° 3 1,5 g
- Azul de bromotimol 0,025 g
- Agar 15,0 g
- Agua destilada 1.0 L

Hervir para disolver los ingredientes y enfriar a 50-55 ° C. Ajuste el pH a 6,8 con NaOH 1,0 N y distribuir en placas de Petri estériles.

112) Agar *V. vulnificus*

a. Solución 1

- Peptona 20 g
- NaCl 30 g
- Solución madre de tinte 100X* 10 ml
- Agar 25 g
- Agua destilada 900 ml

Ajustar a pH 8.2. Hervir para disolver el agar. Autoclavar durante 15 min a 121 ° C. Templar hasta 50 ° C.

* Solución madre de tinte:

- Azul de bromotimol 0,6 g
- Etanol al 70% 100 ml

Para obtener un color medio uniforme, use una solución de tinte en lugar de pesar repetidamente los tintes secos.

b. Solución 2

- Celobiosa 10 g
- Agua destilada 100 ml

Disuelva la celobiosa en agua destilada calentando suavemente. Enfriar y esterilizar por filtración.

Agregue la Solución 2 a la Solución 1 enfriada, mezcle y distribuya en placas de Petri. Color final, celeste. El medio se puede almacenar 2 semanas a temperaturas de refrigeración.

113) Medio Baird-Parker

- Medio Baird-Parker, pH 7,0
- Medio basal
- Triptona 10 g
- Extracto de ternera 5 g
- Extracto de levadura 1 g
- Piruvato de sodio 10 g
- Glicina 12 g
- Cloruro de litio · 6H₂O 5 g
- Agar 20 g

Ajustar pH a 7,0 ± 0,2. Autoclavar 15 min a 121 ° C. Si lo desea para uso inmediato, mantenga el medio derretido a 48-50 ° C antes de agregar el enriquecimiento. De lo contrario, almacene el medio solidificado a 4 ± 1 ° C hasta 1 mes. Derretir medio antes de usar.

a. Medio completo

Añadir asepticamente 5 ml de enriquecimiento de telurito Bacto EY precalentado (45-50 ° C) a 95 ml de base fundida. Mezclar bien (evitando burbujas) y verter porciones de 15-18 ml en placas de Petri estériles de 15 × 100 mm. El medio debe ser densamente opaco. Secar las placas antes de usarlas. Almacenar las placas preparadas a 20-25 ° C hasta por 5 días. Véase Métodos oficiales de análisis de AOAC International, 15ª edición (1990), pág. 429, para obtener más información.

114) Agar azul de toluidine

- Ácido desoxirribonucleico (ADN) 0,3 g
- Agar 10 g
- CaCl₂ (anhidro) 1,1 mg
- NaCl 10 g
- Azul de toluidina O 0.083 g
- Tris (hidroximetil) aminometano 6,1 g
- Agua destilada 1 L

Disolver Tris (hidroximetil) aminometano en 1L de agua destilada. Ajustar el pH a 9,0. Agregar los ingredientes restantes, excepto el azul de toluidina O, y calentar a ebullición para disolver. Disolver el azul de toluidina O en un medio. Distribuir en matraces con tapón de goma. La esterilización no es necesaria si se usa inmediatamente. El medio estéril es estable a temperatura ambiente durante 4 meses y es satisfactorio después de varios ciclos de fusión.

a. Agar de extracto de levadura triptona

Metodología de detección e identificación de microorganismos de patógenos humanos en lotes de producción de productos microbianos de control de plagas

- Triptona 10 g
- Extracto de levadura 1 g
- Carbohidrato* 10 g
- Bromocresol violeta 0,04 g
- Agar 2 g
- Agua destilada 1 L

Disolver el agar con calor y agitación suave. Ajustar el pH a $7,0 \pm 0,2$. Llenar los tubos de 16×125 mm a $2/3$ de su capacidad. Autoclavar 20 min a 115°C .

* La glucosa y el manitol son los carbohidratos que se utilizan para la identificación de *Staphylococcus aureus*.