

Art. 5.º A efectos de lo previsto en la presente Orden, la Unión de Iglesias Cristianas Adventistas del Séptimo Día de España, asumirá los derechos y obligaciones establecidos para los empresarios en el Régimen General de la Seguridad Social.

DISPOSICION FINAL

Se faculta a las Direcciones Generales de Régimen Jurídico y de Régimen Económico de la Seguridad Social para resolver, en las esferas de sus respectivas competencias, las cuestiones que se planteen con motivo de la aplicación de lo dispuesto en la presente Orden, que entrará en vigor el día 1 del segundo mes siguiente al de su publicación en el «Boletín Oficial del Estado».

Lo que comunico a VV. II. para su conocimiento y efectos.
Madrid, 2 de marzo de 1987.

CHAVES GONZALEZ

Ilmos. Sres. Subsecretario y Secretario general para la Seguridad Social.

MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACION

6272 REAL DECRETO 339/1987, de 6 de marzo, relativo al control fitosanitario de vegetales y productos vegetales en régimen de comercio exterior.

La adecuación de la reglamentación fitosanitaria española a la normativa de la Comunidad Económica Europea requiere la previa modificación de determinados preceptos actualmente en vigor, no acordes con lo establecido en las directivas comunitarias en relación con las exigencias de control fitosanitario de vegetales y productos vegetales en régimen de comercio exterior.

En este sentido, la Directiva del Consejo 77/93/CEE, de 21 de diciembre de 1976, referente a las medidas de protección contra la introducción en los Estados miembros de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales establece una gradación del control a realizar sobre los diferentes productos vegetales, exigiendo, únicamente en determinados casos, un certificado oficial, certificado fitosanitario que la normativa española actual impone como obligatoria en todos los casos.

En consecuencia, procede modificar la normativa fitosanitaria española abriendo el cauce para la transposición de la Directiva 77/93/CEE, que efectuará el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, determinando, en uso de las facultades que le confiere el Decreto de 13 de agosto de 1940, las medidas de protección contra la introducción de organismos nocivos para los vegetales y productos vegetales.

En su virtud de lo expuesto, a propuesta del Ministro de Agricultura, Pesca y Alimentación y previa deliberación del Consejo de Ministros en su reunión del día 6 de marzo de 1987,

DISPONGO:

Artículo 1.º El presente Real Decreto tiene por objeto la determinación de las actuaciones necesarias para proteger el territorio nacional contra la introducción de organismos nocivos para los vegetales y productos vegetales, garantizar el buen estado fitosanitario de los que sean objeto de exportación y el cumplimiento de los acuerdos o exigencias internacionales sobre Sanidad Vegetal.

Art. 2.º El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación establecerá para los vegetales, productos vegetales y otros objetos relacionados con ellos:

- Relación de organismos nocivos para los vegetales y productos vegetales cuya introducción estará prohibida en el territorio nacional.
- La relación para los que sea preceptiva la inspección fitosanitaria o control previos a la importación, exportación o tránsito, así como los que deban estar provistos de certificado fitosanitario.
- Las prohibiciones de importación o tránsito.
- Las condiciones particulares de carácter fitosanitario que deben cumplir para que pueda ser autorizada su importación o tránsito.
- Las medidas y tratamientos a que deben someterse los vegetales y productos vegetales que sean objeto de importación, exportación o tránsito, entre las que se incluirá, en caso necesario, la reexpedición o destrucción de la mercancía sin derecho a indemnización alguna.

f) Las cuarentenas fitosanitarias dentro del territorio nacional respecto de vegetales y productos vegetales destinados a la exportación, oídas las Comunidades Autónomas afectadas.

Art. 3.º Los vegetales, productos vegetales y otros objetos para los que sea preceptivo el control o inspección fitosanitaria, estarán provistos de la correspondiente autorización fitosanitaria previa a la importación, exportación y tránsito, que se presentará ante los Servicios de Aduanas.

DISPOSICION DEROGATORIA

Quedan derogados, para todo el territorio nacional, a excepción de Ceuta y Melilla, los apartados 1 a 16 inclusive, 27 a 33 inclusive, del artículo 9 del Real Decreto de 20 de junio de 1924; los artículos 1 y 5 del Real Decreto de 29 de abril de 1927, así como cuantas disposiciones se opongan a lo previsto en el presente Real Decreto.

DISPOSICION FINAL

El presente Real Decreto entrará en vigor el mismo día de su publicación en el «Boletín Oficial del Estado».

Dado en Madrid a 6 de marzo de 1987.

JUAN CARLOS R.

El Ministro de Agricultura, Pesca y Alimentación,
CARLOS ROMERO HERRERA

MINISTERIO DE RELACIONES CON LAS CORTES Y DE LA SECRETARIA DEL GOBIERNO

6273 REAL DECRETO 340/1987, de 30 de enero, por el que se modifica el artículo 9 del Real Decreto 670/1983, de 2 de marzo, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de helados.

La experiencia adquirida en la aplicación de la Reglamentación para la elaboración, circulación y comercio de helados, aprobada por Decreto 2130/1974, de 20 de julio, y modificada posteriormente por el Real Decreto 670/1983, de 2 de marzo, con excepción de las Normas Microbiológicas que se regían por el Real Decreto 2580/1980, de 14 de noviembre, ha puesto de relieve la necesidad de modificar dichas normas microbiológicas.

Por otra parte, cada día se estima más necesario el que la determinación microbiológica, se efectúe partiendo de muestras significativas que tengan conexión en el sistema analítico utilizado. En este sentido, y para las determinaciones que se contemplan en la presente disposición, se hace preciso diferenciar dos tipos de circunstancias que exijan metodologías diferenciadas: En fábricas y almacenes en donde existen considerables cantidades de helados y en minoristas, puestos de temporada, etc., donde únicamente se encuentran pequeñas cantidades de estos productos.

En su virtud, previo informe preceptivo de la Comisión Interministerial para la Ordenación Alimentaria, a propuesta de los Ministros de Economía y Hacienda, de Industria y Energía, de Agricultura, Pesca y Alimentación y de Sanidad y Consumo y previa deliberación del Consejo de Ministros en su reunión del día 30 de enero de 1987,

DISPONGO:

Artículo único.—Se modifica el artículo 9 del Real Decreto 670/1983, de 2 de marzo, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de helados, que quedará redactado de la forma siguiente:

«Art. 9.º Los métodos de toma de muestras, su transporte y conservación, tolerancias microbiológicas y los métodos de análisis de los helados, son los que aparecen especificados en el anexo único del presente Real Decreto.»

DISPOSICION TRANSITORIA

Se autoriza al Ministerio de Sanidad y Consumo para que mediante Orden y previo informe de la Comisión Interministerial para la Ordenación Alimentaria, puedan ser modificadas las tolerancias microbiológicas contenidas en el presente Real Decreto.

Los Ministerios proponentes podrán mediante Orden y previo informe de la Comisión Interministerial para la Ordenación Alimentaria, modificar las especificaciones que sobre toma de muestras y métodos de análisis figuran en el citado anexo.

DISPOSICION DEROGATORIA

Queda derogado el Real Decreto 2580/1980, de 14 de noviembre, por el que se modifica el artículo 10 de la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de helados, aprobada por el Decreto 2130/1974, de 20 de julio, y cuantas disposiciones de igual o inferior rango se opongan a lo dispuesto en el presente Real Decreto.

DISPOSICION FINAL

La presente disposición entrará en vigor a los treinta días de su publicación en el «Boletín Oficial del Estado».

Dado en Madrid a 30 de enero de 1987.

JUAN CARLOS R.

El Ministro de Relaciones con las Cortes y de la Secretaría del Gobierno, VIRGLIO ZAPATERO GOMEZ

ANEXO UNICO

NORMAS MICROBIOLÓGICAS PARA HELADOS

Primera.-Toma de muestras.

La toma de muestras de los helados, destinados a ser analizados con el fin de determinar su estándar microbiológico se hará por triplicado, según el Real Decreto 1945/1983, de 22 de junio, y de acuerdo con los siguientes métodos:

- a) Se tomarán cinco muestras del mismo lote. Los envases o cajas serán originales, no abiertos e íntegros.
- b) En aquellos casos en donde no se puedan tomar el número de muestras indicado en el apartado a), por falta de cantidad suficiente de un mismo lote, se tomará una muestra.

En el caso de muestras en envases abiertos, cada muestra será, de hasta 250 mililitros de volumen y se recogerán en recipientes esterilizados, precintados y con espátulas asimismo estériles.

Segunda.-Transporte y conservación de las muestras.

Para transportar las muestras y su conservación hasta el momento de su análisis, se dispondrá de los elementos frigoríficos necesarios para que la muestra obtenida en todo momento mantenga las características adecuadas para no desvirtuar la finalidad del análisis.

Tercera.-Tolerancias microbiológicas.

Para las muestras tomadas según el procedimiento primera, a), las tolerancias serán las indicadas en el cuadro siguiente:

	Pasterizados				Pasterizados con adiciones no pasterizadas			
	n	c	m	M	n	c	m	M
Aerobios mesófilos/g ...	5	2	1 x 10 ⁵	3 x 10 ⁵	5	2	2 x 10 ⁵	5 x 10 ⁵
Enterobacteriaceas lactosa positiva/g	5	2	1 x 10 ²	2 x 10 ²	5	2	2 x 10 ²	4 x 10 ²
E. coli/g	5	2	0	1 x 5	5	2	0	1 x 5
Staphylococcus aureus/g	5	1	1 x 10	1 x 10 ²	5	1	1 x 10	1 x 10 ²
Salmonella/25 g	5	0	0	0	5	0	0	0
Shigella/25 g	5	0	0	0	5	0	0	0

a: Número de muestras a tomar de un mismo lote.
 c: Número de muestras que pueden rebasar el valor m sin sobrepasar M.
 m: Tolerancia microbiológica que no puede sobrepasar ninguna de las n-c muestras.
 M: Tolerancia microbiológica que no puede sobrepasar ninguna de las c muestras.

Para las muestras tomadas según el procedimiento primera, b), las tolerancias serán las indicadas a continuación:

	Pasterizados	Pasterizados con adiciones no pasterizadas
Aerobios mesófilos/g	2 x 10 ⁵	3 x 10 ⁵
Enterobacteriaceas lactosa positiva/g	2 x 10 ²	3 x 10 ²
E. coli/g	0	0

	Pasterizados	Pasterizados con adiciones no pasterizadas
Staphylococcus aureus/g	5 x 10	5 x 10
Salmonella/25 g	0	0
Shigella/25 g	0	0

Cuarta.-Métodos de análisis.

1. Recuento total de microorganismos aerobios revivificables. Es la determinación del número total de microorganismos aerobios revivificables por gramo o mililitro de alimento.

- Material:
- Pipetas estériles de 1 ml.
 - Placas de Petri estériles de 90 mm de diámetro.
 - Estufa de cultivo.
 - Cuentaciones.

Medio de cultivo: Medio Plate Count Agar (PCA).

Composición:

Triptona	5 g
Extracto de levadura	2,5 g
Dextrosa	1 g
Agar	12 g
Agua destilada	1.000 ml

Disolver los ingredientes por calentamiento. Ajustar el pH a 7. Distribuir en tubos o matraces y esterilizar durante veinte minutos a 121° C.

Técnica: Cada muestra se hace por duplicado, empleando dos series de placas.

A partir de la «serie de diluciones decimales», con pipeta estéril de 1 ml, se pone esta cantidad de cada una de las diluciones decimales en otras tantas placas de Petri estériles. A continuación se vierten 15 ml del medio de cultivo, previamente enfriado a 47° C, sobre cada una de las placas. Se mezcla suavemente, moviendo la placa varias veces en un sentido y otras tantas en el sentido contrario. Se dejan solidificar y se incuban en posición a 31° C, durante setenta y dos horas.

Pasado el tiempo de incubación, se cuenta el número de colonias que han crecido en el medio, solamente en aquellas placas que contengan entre 50 ± 150 colonias. El número de colonias por gramo o mililitro de alimento se calcula multiplicando el número de colonias contado por el factor de dilución de la placa.

2. Investigación y recuento de enterobacteriaceae lactosa positiva (Coliforme).

Numeración de coliformes:

Es la determinación del número total de «coliformes» por gramo o mililitro de alimento.

1. Numeración en placa. Técnica de numeración sobre medio VRBG (Violet-Red-Bile-Agar).

- Material:
- Pipetas de 1 ml estériles.
 - Placas de Petri estériles de 90 mm de diámetro.
 - Estufa de cultivo.
 - Cuentaciones.

Medio de cultivo: VRBG (Violet-Red-Bile-Agar).

Composición:

Extracto de levadura	3 g
Peptona	7 g
Cloruro sódico	5 g
Sales biliares	5 g
Lactosa	10 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal violeta	0,02 g
Agar	15 g
Agua destilada	1.000 ml

Disolver por calentamiento. Ajustar el pH a 7.4. Mantener en ebullición durante dos minutos. No necesita esterilización en autoclave. Para su uso se debe enfriar a 45° C.

Técnica: A partir de la «serie de diluciones decimales», y por duplicado, se añade 1 ml de cada dilución sobre placas de Petri estériles. En cada placa se vierten 15 ml del medio de cultivo

VRBG a 45° C. Mezclar cuidadosamente. después de la solidificación del medio, se vierten sobre cada placa 3-4 ml del mismo medio de cultivo licuado, estéril, para evitar el crecimiento en superficie y la extensión de las colonias, haciendo así más fácil la numeración de las mismas.

Las placas, en posición invertida, se incuban a 31° C durante veinticuatro horas.

Las colonias de «coliformes» aparecen en este medio con tonalidad rojo púrpura y rodeadas de una zona de precipitación de las sales biliares.

Para numerar los coliformes por esta técnica, se eligen las placas que contengan entre 30 y 150 colonias características. El número de colonias contadas y confirmadas se multiplica por el factor de dilución de la placa, obteniendo así el número total de «coliformes» por gramo o mililitro de alimento.

Estas colonias deben ser confirmadas como «coliformes», para lo cual se toman diez colonias representativas de cada tipo característico y se siembra cada una de ellas sobre caldo BGBL con campana Durham. Incubar a 31° C y examinar a las veinticuatro-cuarenta y ocho horas para comprobar si se ha formado gas. Solamente las colonias que han dado lugar a la producción de gas se consideran «coliformes».

2. Numeración en tubos. Técnica del número más probable (NMP) sobre medio de cultivo caldo lactosado-biliado al verde brillante (BGBL).

Material:

- Gradillas.
- Pipetas de 1 ml estériles.
- Estufa de cultivo.

Medio de cultivo: BGBL (caldo lactosado-biliado al verde brillante).

Composición:

Peptona	10	g
Lactosa	10	g
Bilis de buey	20	g
Verde brillante	0,0133	g
Agua destilada	1.000	ml

Disolver. Ajustar el pH a 7.4. Distribuir en tubos con campana Durham a razón de 10 ml. Esterilizar durante veinte minutos a 121° C.

Técnica: Se preparan tres series de tres tubos conteniendo medio BGBL con campana.

A cada tubo de la primera serie se le añade 1 ml de la dilución del alimento al 1:10. En cada uno de los tres tubos de la segunda serie se pone a 1 ml de la dilución al 1:100, haciendo lo mismo con los tubos de la tercera serie, a los que se añade 1 ml de la dilución 1:1.000.

Los tubos de las tres serie se incuban a 31° C, leyéndose los resultados a las veinticuatro-cuarenta y ocho horas. Los que presenten gas se consideran positivos, y el número de «coliformes» por gramo o mililitro de alimento se lee en las tablas de NMP.

NUMERO MAS PROBABLE (NMP) DE MICROORGANISMOS POR GRAMO O MILILITRO. UTILIZANDO TRES TUBOS SEMBRADOS CADA UNO CON UN MILILITRO DE DILUCIONES 10⁻¹, 10⁻² Y 10⁻³

Tubos positivos			NMP por gramo o mililitro
10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
0	0	0	3
0	0	1	3
0	1	0	3
1	0	0	4
1	0	1	7
1	1	0	7
1	1	1	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
2	2	1	28
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	1	75

Tubos positivos			NMP por gramo o mililitro
10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
3	1	2	120
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1.100
3	3	3	2.400

3. Identificación Escherichia coli:

Consiste en poner de manifiesto la presencia de E. coli mediante identificación por técnicas adecuadas.

Material:

- Baño de agua regulado a 45° C con tapa.
- Estufa de cultivo.
- Pipetas estériles.
- Asa de cultivo.

Medio de cultivo y reactivos:

a) Caldo EC con campana:

Composición:

Triptona	20	g
Sales biliares	1,5	g
Lactosa	5	g
Fosfato dipotásico	4	g
Fosfato potásico	1,5	g
Cloruro sódico	5	g
Agua destilada	1.000	ml

Disolver por calentamiento. Ajustar el pH a 6.9. Distribuir en tubos con campana Durham a razón a 10 ml por tubo. Someter a esterilización en autoclave durante 15 minutos a 121° C.

b) Agar Levine:

Composición:

Peptona	10	g
Lactosa	10	g
Fosfato dipotásico	2	g
Eosina	0,4	g
Azul de metileno	0,065	g
Agar	15	g
Agua destilada	1.000	ml

Disolver. Ajustar el pH a 7.1. Distribuir en tubos o matraces y esterilizar en autoclave durante quince minutos a 121° C.

c) Agua de triptona (TW):

Se usa el agua de triptona (TW), según la siguiente fórmula:

Triptona	10	g
Cloruro sódico	5	g
Agua destilada	1.000	ml

Disolver. Ajustar el pH a 7.5. Mezclar y distribuir en tubos de ensayo de 160 x 16 mm, a razón de 9 ml por tubo. Esterilizar en autoclave durante quince minutos a 121° C.

d) Plate Count Agar (P. C. A.).

Composición:

Triptona	5	g
Extracto de levadura	2,5	g
Dextrosa	1	g
Agar	12	g
Agua destilada	1.000	ml

Disolver los ingredientes por calentamiento. Ajustar el pH a 7. Distribuir en tubos o matraces y esterilizar durante veinte minutos a 121° C.

e) Caldo MR-VP:

Composición:

Peptona	7	g
Glucosa	5	g
Fosfato dipotásico	5	g
Agua destilada	1.000	ml

Disolver. Filtrar. Ajustar pH a 6.9. Distribuir a razón de 10 ml y someter a esterilización en autoclave durante quince minutos a 121° C.

f) Caldo citrato de Koser:

Composición:

Fosfato sódico amónico	1,5 g
Fosfato monopotásico	1 g
Sulfato magnésico	0,2 g
Citrato sódico	3 g
Agua destilada	1.000 ml

Disolver. Ajustar el pH a 6.7. Distribuir a razón de 10 ml en tubos de ensayo y esterilizar en autoclave durante quince minutos a 121° C.

g) Equipo de coloración de Gram.

h) Reactivo de Kovacs:

Composición:

Paradimetilaminobenzaldehído	5 g
Alcohol amílico	75 ml
Ácido clorhídrico	25 ml

Disolver el paradimetilaminobenzaldehído en el alcohol y añadir lentamente el ácido clorhídrico. Mantener a 4° C al abrigo de la luz.

i) Reactivo para la prueba de Voges-Proskauer:

Solución A:

Alfa naftol	5 g
Alcohol absoluto	100 ml

Solución B:

Hidróxido potásico	40 g
Agua destilada	100 ml
Creatinina	-

j) Indicador rojo metilo:

Composición:

Rojo metilo	0,10 g
Alcohol de 96°	300 ml
Agua destilada hasta completar	500 ml

Disolver el colorante en el alcohol y completar hasta 500 ml con el agua destilada.

Técnica: Los tubos de BGBL con campana Durham que muestren gas después del período de incubación cuando se emplea la técnica del NMP se agitan suavemente, y con asa de cultivo de tres mm de diámetro se siembran sobre tubos que contengan medio EC con campana. Estos tubos se incuban durante cuarenta y ocho horas en baño maría regulado a 45° C. Después de veinticuatro horas de incubación se examina para saber si hay producción de gas y, en caso negativo, se mantienen hasta las cuarenta y ocho horas para hacer la lectura definitiva.

De los tubos con gas el caldo EC se siembra con asa de cultivo sobre Agar Levine para obtener colonias aisladas. Las placas se incuban veinticuatro horas a 37° C. Las colonias características de E. coli presentan un centro oscuro, con o sin brillo metálico.

Las colonias sospechosas crecidas en Agar Levine se siembran sobre tubos de PCA inclinado y se someten a incubación durante dieciocho-veinticuatro horas a 37° C. Este cultivo se utiliza para el estudio de las características morfológicas y tintoriales del germen y para las pruebas bioquímicas.

Comprobadas por observación microscópica las características morfológicas y tintoriales de la cepa estudiada (bacilos cortos Gram negativos) se realizan las pruebas bioquímicas: Indol, acetil-metil-carbinol (Voges-Proskauer), rojo de metilo y utilización del citrato:

a) Formación de indol (I): A partir del crecimiento sobre PCA se siembra un tubo de agua de triptona (TW), incubando veinticuatro horas a 37° C. A continuación se le añade un ml de reactivo de Kovacs. En caso positivo aparece un anillo rojo en la superficie del medio.

b) Prueba de Voges-Proskauer (V): Se siembran dos tubos del medio MR-VP por cada colonia a identificar, incubable a 37° C durante cuarenta y ocho horas. En uno de los tubos se investiga la presencia de acetil-metil-carbinol, con el otro tubo se realiza posteriormente la prueba del rojo de metilo.

Para detectar el acetil-metil-carbinol se añade al tubo 0,6 ml de la solución A y 0,2 ml de la solución B. Agitar, y para intensificar la reacción se añaden unos cristales de creatinina. Se hace la lectura a las cuatro horas. La reacción positiva revela un color rojo.

c) Prueba del rojo de metilo (M): En el tubo restante conteniendo un cultivo en MR-VP se añaden 0,3 ml de la solución rojo de metilo. Una prueba positiva se manifiesta por una coloración roja.

d) Utilización de citrato (C): A partir del crecimiento en PCA se siembra una pequeña cantidad sobre caldo citrato de Koser. Incubación a 37° C durante cuarenta y ocho horas. La reacción es positiva cuando aparece turbidez del medio.

Los cultivos que den lugar a formación de gas, sean bacilos cortos Gram negativos y que la prueba IMViC se ajuste a: + + - - o - + - -, se consideran E. coli.

PRUEBAS IMViC

	Indol	Rojo metilo	Voges-Proskauer	Utilización del citrato
Shigella	±	+	-	-
Escherichia	±	+	-	-
Salmonella	-	+	-	+
Arizona	-	+	-	+
Citrobacter	-	+	-	+
Klebsiella	±	-	+	+
Enterobacter	-	-	+	+
Serratia	-	-	+	+
Hafnia	-	-	+	+
Proteus	+	+	-	+
Providencia	+	+	-	+

d) Identificación de St. aureus:

Es la determinación de la presencia o ausencia de St. aureus por gramo o mililitro de alimento.

4. Recuento de Staphylococcus aureus (St. aureus):

Es el número de St. Aureus por gramo o mililitro de producto cuando se emplea un método adecuado.

Material:

- Pipetas de un ml estériles.
- Placas de Petri estériles de 90 mm.
- Asa de cultivo.
- Asa de vidrio.
- Gradillas.
- Estufa de cultivo.

Medio de cultivo y reactivos:

a) Medio Giolitti Cantoni:

Composición:

Triptona	10 g
Extracto de carne	5 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de litio	5 g
Manitol	20 g
Cloruro sódico	5 g
Glicina	1,2 g
Paruvato sódico	3 g
Agua destilada	1.000 ml

Disolver por calentamiento hasta ebullición. Ajustar al pH a 6.9. Distribuir a razón de 19 ml por tubo. Esterilizar durante veinte minutos a 121° C. Enfriar rápidamente y añadir a cada tubo 0,3 ml de una solución de telurito al 3,5 por 100, esterilizada por filtración.

b) Caldo extracto cerebro-corazón (BHI).

Composición:

Peptona	10 g
Extracto cerebro ternera	12,5 g
Extracto corazón de buey	5 g
Glucosa	2 g
Cloruro sódico	5 g
Monohidrógeno fosfato sódico	2,5 g
Agua destilada	1.000 ml

Disolver por calentamiento hasta ebullición. Ajustar el pH a 7.4. Repartir en tubos de ensayo a razón de 10 ml. Esterilizar a 121° C durante 20 minutos. Se conserva varios meses en refrigeración.

c) Medio Baird-Parker.

Composición:

Triptona	10 g
Extracto de carne	5 g
Extracto de levadura	1 g
Piruvato sódico	10 g
Glicina	12 g
Cloruro de litio	5 g
Agar	20 g
Sol. sulfametazina 0,2 por 100	25 ml
Agua destilada	1.000 ml

Disolver por calentamiento. Ajustar el pH a 6,9. Esterilizar durante 20 minutos a 121° C. Enfriar a 50° C y añadir 50 ml de emulsión estéril de yema de huevo y 3 ml de solución de telurito potásico al 3,5 por 100, esterilizada por filtración. Mezclar bien. Repartir en placas de Petri.

Para preparar la solución de sulfametazina se disuelven 0,5 g de sulfametazina pura en 25 ml de hidróxido sódico n/10 y se completa hasta 250 ml con agua destilada. Esta solución se añade al medio, antes o después de ser sometido al autoclave.

d) Parafina punto de fusión 42° C-44° C.

e) Agar DNsa.

Composición:

Triptona	20 g
Acido desoxirribonucleico	2 g
Cloruro sódico	5 g
Agar	12 g
Agua destilada	1.000 ml

Disolver por calentamiento. Ajustar el pH a 7,3. Distribuir a razón de 15 ml y esterilizar en autoclave 15 minutos a 121° C. Preparar placas de Petri.

f) Plasma de conejo con ácido etilodiaminotetracético (EDTA).

El plasma EDTA no da reacciones de coagulasa falsas por los gérmenes que utilizan citratos.

g) Solución de ácido clorhídrico 1N.

h) Solución de azul de toluidina.

Composición:

Azul de toluidina	1 g
Agua destilada	100 ml

A) Técnica para investigación de presencia o ausencia de *St. aureus*.

Esta técnica se usa cuando se sospecha la existencia de más de 100 *St. aureus* por gramo o mililitro de alimento.

De la solución madre se siembra 1 ml, por duplicado, sobre el medio Giolitti Cantoni. Cubrir el medio sembrado con una capa de 2-3 cm de parafina estéril, licuada previamente. Incubar a 37° C 24-48 horas. Al cabo de este tiempo los cultivos que presentan coloración o precipitado negro se consideran presuntamente positivos. El caldo Giolitti Cantoni contiene telurito, glicina y cloruro de litio, que son inhibidores de microorganismos no *Staphylococcus* coagulasa positivos. Por otra parte el telurito es reducido a telurito solamente por los mismos microorganismos, dando como reacción el ennegrecimiento del medio. Este medio es de enriquecimiento. Si se produce ennegrecimiento del medio Giolitti Cantoni, se siembra 0,1 ml de los tubos ennegrecidos sobre el medio Baird-Parker, diseminando con asa de vidrio estéril. Las placas sembradas incuban en posición invertida, a 37° C durante 48 horas como máximo. De las placas que presenten colonias características negras, brillantes, convexas, rodeadas de una zona clara que puede ser también parcialmente opaca, se seleccionan 5 colonias para llevar a cabo su confirmación bioquímica.

B) Investigación del número más probable (NMP) de *St. aureus*.

Este método se aconseja cuando se sospecha la existencia de menos de 100 *St. aureus* por gramo o mililitro de alimento.

A partir de la «serie de diluciones decimales», se siembra 1 ml de la dilución 10⁻¹ en una serie de tres tubos conteniendo el medio Giolitti Cantoni. De la dilución 10⁻² se siembra 1 ml en cada uno de otra serie de tres tubos conteniendo el mismo medio, y finalmente, de la dilución 10⁻³ se siembra 1 ml en cada tubo de otra serie de tres tubos. Una vez sembrados, todos los tubos se cubren con una capa de parafina previamente fundida y, una vez solidificada ésta, se someten a una incubación a 37° C durante 48 horas. Los tubos en los que aparezca ennegrecimiento del medio al cabo de este tiempo se resiembran en placas de Baird-Parker, incubándose a 37° C durante 48 horas. El número de gérmenes viene dado

por las tablas del NMP, según las placas que se han confirmado positivas. Las colonias que han mostrado un crecimiento característico en el medio Baird-Parker se pasan aisladas a caldo BHI para confirmación bioquímica de las mismas. Para esta confirmación se suelen seleccionar 5 colonias características.

C) Recuento de colonias de *St. aureus* en placas.

A partir de la «serie de diluciones decimales», se siembra 0,1 ml de cada dilución sobre otras tantas placas de Petri conteniendo medio Baird-Parker y extendiendo perfectamente con asa de vidrio estéril. Una vez seca la superficie sembrada, se incuban las placas en posición invertida a 37° C durante 48 horas. Observar el crecimiento característico de las colonias sobre este medio. Se seleccionan 5 colonias típicas para su confirmación bioquímica.

Por esta técnica, el número de colonias referidas a gramo o mililitro de alimento viene dado por el recuento de colonias típicas confirmadas bioquímicamente multiplicado por el factor de dilución.

D) Pruebas de confirmación bioquímica.

Coagulasa: Cada colonia característica seleccionada en el medio de Baird-Parker se siembra sobre tubos conteniendo medio BHI Incubar a 37° C durante 20-24 horas.

A 0,3 ml de plasma de conejo contenido en tubos estériles de 10x75 mm se le añade 0,1 ml de cultivo obtenido sobre BHI Incubar a 37° C y examinar si se produce coagulación del plasma en el transcurso de 6 horas.

Desoxirribonucleasa (DNsa): A partir de colonias características sobre Baird-Parker se siembra en estrías radiales sobre la superficie del agar DNsa. Incubar a 37° C durante 18-24 horas. Al cabo de este tiempo, cubrir el medio con solución de ácido clorhídrico y esperar unos minutos. La reacción es positiva si los cultivos presentan una zona transparente alrededor. Se puede usar como reactivo azul de toluidina en vez de ácido clorhídrico; en este caso, la reacción se considera positiva si aparece una coloración rosada alrededor de la estria.

Si las pruebas confirmativas son positivas, según técnica descrita B, se emplea para conocer el número de gérmenes por gramo o mililitro de alimento, la tabla del NMP.

En el caso de recuento en placas el número de colonias características se multiplica por el factor de dilución de la placa y la cifra obtenida es el número de colonias por gramo o mililitro de alimento.

Las pruebas de confirmación se deben hacer, simultáneamente, con cepas coaguladas y DNsa positivas y negativas, como control.

5. Investigación de *Salmonella*.

Es la determinación de la presencia o ausencia de estos microorganismos por métodos adecuados.

Material:

- Gradillas.
- Pipetas de 1 ml estériles.
- Estufa de cultivo.
- Asa de cultivo.
- Placas de Petri de 140 mm de diámetro.
- Placas de Petri de 90 mm de diámetro.

Medios de cultivo, reactivos y antisuecos:

- Agua peptona tamponada.
- Medio Müller-Kauffmann al tetrionato.
- Medio selenito verde brillante (Stokes y Osborne).
- Agar verde brillante-rojo fenol (BGA modificado).
- Agar desoxicolato citrato.
- Agar Hektoen.
- Agar lactosa bilis cristal violeta-rojo neutro (VRB).
- Agar hierro triple azúcar (TSI).
- Agar urea (Christensen).
- Agar nutriente semisólido.
- Solución salina.
- Medio para decarboxilación de la lisina.
- Reactivo beta galactosidasa.
- Reacción Voges-Proskauer.
- Antisuecos específicos.

A) Preparación de agua de peptona tamponada.

Composición:

Peptona	10 g
Cloruro sódico	5 g
Fosfato disódico hidratado (Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O)	9 g
Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	1,5 g
Agua destilada	1.000 ml

Disolver por calentamiento. Ajustar el pH a 7. Repartir en matraces de 500 ml a razón de 225 ml. Esterilizar 20 minutos a 121° C.

B) *Medio Müller-Kauffmann al tetrionato.*

1. Medio base.

Composición:

Extracto de carne	5	g
Peptona	10	g
Cloruro	3	g
Carbonato cálcico	0,045	g
Agua	1.000	ml

Mezclar y hervir hasta la disolución de los componentes. Esterilizar 20 minutos a 121° C.

2. Solución de tiosulfato sódico.

Composición:

Tiosulfato sódico	50	g
Agua hasta volumen final	100	ml

Disolver el tiosulfato en una parte de agua; diluir hasta el volumen final. Esterilizar 20 minutos a 121° C.

3. Solución de yodo:

Composición:

Yodo	20	g
Yoduro potásico	25	g
Agua hasta volumen final	100	ml

Disolver el yoduro potásico en un volumen mínimo de agua y añadir el yodo. Agitar hasta disolución completa y poner en envase opaco bien cerrado.

4. Solución de verde brillante:

Composición:

Verde brillante	0,5	g
Agua	100	ml

Añadir el verde brillante al agua. Mantener la solución un día en oscuridad para que se produzca la autoesterilización.

5. Solución de bilis de buey:

Composición:

Bilis de buey desecada	10	g
Agua	100	ml

Disolver la bilis en agua por ebullición. Esterilizar 20 minutos a 121° C.

6. Medio completo:

Composición:

Base (b.1)	900	ml
Solución tiosulfato sódico	100	ml
Solución de yodo	20	ml
Solución verde brillante	2	ml
Solución bilis de buey	50	ml

Añadir a la base, asépticamente, los demás ingredientes en el orden expuesto. El medio completo se distribuye a razón de 100 ml, asépticamente, en matraces estériles de 500 ml de capacidad.

Almacenar a 4° C en oscuridad en el transcurso de una semana.

C) *Preparación del medio selenito verde brillante (Stokes y Osborne).*

1. Medio base:

Composición:

Peptona	5	g
Extracto de levadura	5	g
Manitol	5	g
Taurocolato sódico	1	g
Selenito sódico hidrogenado	4	g
Agua destilada	900	ml

Disolver los cuatro primeros ingredientes en agua por ebullición durante cinco minutos. Después añadir el selenito. Ajustar el pH a 7.

Almacenar a 4° C en la oscuridad hasta su uso en el transcurso de una semana.

2. Solución Buffer:

Composición:

Solución I:

Ortofosfato dipotásico	34	g
Agua destilada	1.000	ml

Disolver.

Solución II:

Ortofosfato dipotásico	43,6	g
Agua destilada	1.000	ml

Disolver.

Mezclar dos partes de la solución I y tres partes de la solución II para obtener una solución con un pH 7.

Solución de verde brillante. Composición y preparación como solución de verde brillante.

3. Solución de verde brillante:

Composición:

Verde brillante	0,5	g
Agua	100	ml

Añadir el verde brillante al agua. Mantener la solución un día en oscuridad para que se produzca la autoesterilización.

4. Medio completo:

Composición:

Base (c.1)	900	ml
Solución Buffer	100	ml
Solución verde brillante	1	ml

Añadir la solución Buffer a la base. Calentar a 80° C. Enfriar y añadir la solución de verde brillante.

El medio así preparado se reparte en matraces de 500 ml estériles a razón de 100 ml.

Se usa el mismo día de su preparación.

D) *Preparación de agar verde brillante-rojo fenol (BGA):*

Composición:

Extracto de carne	5	g
Peptona	10	g
Extracto de levadura	3	g
Lactosa	10	g
Sacarosa	10	g
Cloruro sódico	3	g
Fosfato disódico hidrogenado	1	g
Fosfato sódico dihidrogenado	0,6	g
Rojo fenol	0,08	g
Verde brillante	0,0047	g
Agar	12	g
Agua destilada	1.000	ml

Disolver por calentamiento. Ajustar el pH a 7, NO NECESITA AUTOCLAVE. Dejar enfriar hasta 50° C y verter en placas de 140 mm de diámetro, dejando solidificar.

Inmediatamente antes del uso, se sacarán las placas cuidadosamente en estufa a 50° C durante treinta minutos.

E) *Preparación de Agar desoxicolato citrato.*

Composición:

Extracto de carne	7	g
Peptona	5	g
Lactosa	10	g
Citrato sódico	8,5	g
Tiosulfato sódico	5,4	g
Citrato férrico	1	g
Dexoxicolato sódico	5	g
Rojo neutro	0,02	g
Agar	12	g
Agua destilada	1.000	ml

Disolver por calentamiento. Ajustar el pH a 7,3. Este medio es sensible al calor, no necesita autoclave, se debe usar recién preparado. Se vierte a temperatura de 50° C en capa espesa sobre placas de Petri de 90 mm de diámetro. Las placas han de estar secas antes de su empleo.

F) *Agar Hektoen.*

Composición:

Peptona	12	g
Extracto de levadura	3	g
Lactosa	12	g
Sacarosa	12	g
Salicina	2	g
Salas biliares	9	g

Cloruro sódico	5	g
Tiosulfato sódico	5	g
Citrato férrico amónico	1,5	g
Fuchina ácida	0,1	g
Azul de bromotimol	0,065	g
Agar	14	g
Agua destilada	1.000	ml

Disolver por calentamiento hasta ebullición. Ajustar el pH a 7,5. Enfriar a 60° C y distribuir en placas de Petri estériles. No necesita autoclave.

G) *Preparación de Agar-lactosa bilis cristal violeta rojo neutro (V.R.B).*

Composición:

Peptona	7	g
Extracto de levadura	3	g
Lactosa	10	g
Cloruro sódico	5	g
Sales biliares	1,5	g
Rojo neutro	0,03	g
Cristal violeta	0,002	g
Agar	15	g
Agua destilada	1.000	ml

Disolver por calentamiento. Ajustar el pH a 7. Distribuir el medio en tubos o matraces a razón de 15 ml. Este medio no necesita esterilización. Si se prepara de antemano, no deberá permanecer más de una semana en refrigerador.

Las placas de 90 mm de diámetro se preparan a partir del medio licuado y dejándolas secas en estufa a 50° C durante treinta minutos.

H) *Preparación del Agar hierro triple azúcar (TSI).*

Composición:

Extracto de carne	3	g
Extracto de levadura	3	g
Peptona	20	g
Cloruro sódico	5	g
Lactosa	10	g
Sacarosa	10	g
Glucosa	1	g
Citrato férrico	0,3	g
Tiosulfato sódico	0,3	g
Rojo fenol	0,024	g
Agar	12	g
Agua destilada	1.000	ml

Disolver por calentamiento. Ajustar el pH a 7,4. Repartir en tubos de 160 x 16 mm, a razón de 10 ml por tubo. Esterilizar quince minutos a 121° C. Los tubos, para su solidificación, se colocan de forma que se obtenga un fondo de unos tres cm de largo y el plano inclinado la misma dirección.

I) *Preparación del agar urea (Christensen).*

1. Medio base.

Composición:

Peptona	1	g
Glucosa	1	g
Cloruro sódico	5	g
Fosfato monopotásico	2	g
Rojo fenol	0,012	g
Agar	12	g
Agua destilada	1.000	ml

Disolver por calentamiento. Ajustar el pH a 6,8. Esterilizar quince minutos a 121° C.

2. Preparación de la solución de urea.

Composición:

Urea	400	g
Agua destilada hasta volumen final	1.000	ml

Disolver la urea en el agua. Esterilizar por filtración y comprobar la esterilidad.

3. Preparación del medio completo:

Medio base (i.1)	950	ml
Solución de urea	50	ml

Añadir la solución de urea en condiciones asépticas sobre el medio base. Ajustar el pH a 6,8. Distribuir en tubos estériles a razón de 10 ml por tubo. Solidificar en posición inclinada.

J) *Preparación de agar nutriente semisólido.*

Composición:

Extracto de carne	3	g
Peptona	5	g
Agar	8	g
Agua	1.000	ml

Disolver por calentamiento. Ajustar el pH a 7. Repartir un matraces cuya capacidad no sea superior a 500 ml. Esterilizar veinte minutos a 121° C. El medio recién preparado se distribuye en placas de 90 mm, a razón de quince ml cada placa. Estas placas no se secan.

K) *Preparación de solución salina.*

Composición:

Cloruro sódico	8,5	g
Agua destilada	1.000	ml

Disolver el cloruro sódico en agua por calentamiento. Ajustar el pH a 7. Distribuir en matraces a razón de 100 ml. Esterilizar veinte minutos a 121° C.

L) *Preparación del medio para la descarboxilación de la lisina.*

Composición:

Extracto de levadura	3	g
Dextrosa	1	g
L-Lisina	5	g
Púrpura de bromocresol	0,015	g
Agua	1.000	ml

Disolver por calentamiento. Ajustar el pH a 6,8. Distribuir a razón de 5 ml en tubos estrechos de 160 x 8 mm. Esterilizar diez minutos a 121° C.

M) *Preparación del reactivo para beta-galactosidasa.*

1. Solución «buffer».

Composición:

Ortofosfato de hidrogenado	6,9	g
Solución de hidróxido sódico, aproximadamente, 0,1 N (4g/litro)	3	g
Agua destilada hasta un volumen final	50	ml

Disolver el ortofosfato en 45 ml, aproximadamente, de agua. Ajustar el pH a 7 con tres ml, aproximadamente, de solución de hidróxido sódico. Añadir agua hasta un volumen final de 50 ml. Almacenar en refrigeración.

2. Solución O. N. P. G.

Composición:

O-nitrofenil beta-D-galactopiranosida (O. N. P. G.) ..	80	ml
Agua destilada	15	ml

Disolver el O. N. P. G. en agua a 50° C. Enfriar la solución.

3. Reactivo completo.

Composición:

Solución «buffer»	5	ml
Solución O. N. P. G.	15	ml

Añadir la solución «buffer» a la O. N. P. G. Almacenar el reactivo completo en frigorífico, pero no más de un mes.

N) *Reacción de Voges-Proskauer.*

Ya descrita en prueba de Voges Proskauer. [Ver 3. Identificación Escherichia coli, apartado «Técnica», punto b).]

Ñ) *Reacción de Indol.*

Ya descrita en formación de Indol. [Ver 3. Identificación Escherichia coli, apartado «Técnica», punto a).]

O) *Antisueros específicos.*

Los sueros se obtienen comercialmente o en el Instituto «Pasteur».

- Sueros anti O:

Monovalentes.
Polivalentes.

- Sueros anti Vi.
- Sueros anti H:

Monovalentes.
Polivalentes.

Técnica: La muestra representativa debe ser, al menos, de 100 g. De esta manera se hará una pesada, de distintas zonas, de 25 g.

Trituración y homogeneización: El líquido de dilución empleado en esta norma es el agua de peptona tamponada. [Ver apartado «Métodos de cultivo, reactivos y antisueros», punto a.) mezclan 225 ml de agua de peptona tamponada con los 25 g de alimento. Se lleva al triturador-homogeneizador triturando entre 8.000 y 10.000 revoluciones por minuto durante dos minutos.

Si la muestra es más pequeña se hace proporcionalmente la dilución, teniendo en cuenta al dar los resultados.

El alimento triturado necesita un ajuste de pH entre 6-7, particularmente en alimentos ácidos, donde la salmonella no puede desarrollarse.

Pre-enriquecimiento: El contenido del homogeneizador se pasa aseptícamente a matraces estériles de 500 ml, por duplicado. Incubar a 37° C entre 16 y 20 horas como máximo.

Enriquecimiento: Una vez incubado, pasar 10 ml al matraz conteniendo el medio al tetrionato (Müller-Kauffmann) y otros 10 ml al medio selenito verde brillante.

El medio al tetrionato sembrado se incuba cuarenta y ocho horas a 42-43° C y el medio al selenito durante cuarenta y ocho horas a 37° C.

Siembra en placas: Cuando la incubación de ambos medios alcanza veinticuatro horas se siembra a partir de cada uno, con asa de cultivo, la superficie de placas contenido: Agar-verde brillante-rojo fenol (B. G. A.), agar-desoxicolatocitrato y agar Hektoen, con el fin de obtener colonias aisladas (primer subcultivo). Incubar las placas a 37° C durante cuarenta y ocho horas.

Después de las cuarenta y ocho horas se repite la siembra a partir de los medios de enriquecimiento sobre los mismos medios selectivos (segundo subcultivo). A las veinticuatro horas de incubación de las placas se leen los resultados observando el aspecto de las colonias crecidas en cada medio:

Microorganismos	Agar verde brillante. Rojo fenol (B.G.A.)	Agar desoxicolato citrato	Agar Hektoen
Salmonellaceae.	Colonias rojo rosado con halo rojo.	A las dieciocho horas, rosa pálido a incolora, que con el tiempo, se van haciendo opacas más grandes y con un punto central gris a negro.	Colonias azul verdoso, con o sin centro negro.
Shigella.	-	En principio, incoloras y luego rosa pálido.	Colonias convexas, verdosas, de aspecto húmedo.

Se toman colonias típicas de cada medio y se confirman, lo que requiere cierta experiencia, ya que el aspecto de las mismas puede variar, no sólo de especie a especie, sino de lote a lote de medio de cultivo. Para este fin se puede usar una prueba de aglutinación rápida sobre porta poniendo en contacto la colonia con un antisuero Salmonella polivalente.

Confirmación de las colonias sospechosas

Selección de las colonias sospechosas: De cada placa de medio selectivo se escogen 5-6 colonias típicas o sospechosas para ser confirmadas.

Sembrar las colonias seleccionadas sobre la superficie de placas de agar lactosa-bilis-cristal violeta-rojo neutro (V.R.B.) para obtener las aisladas. Incubar a 37° C veinticuatro horas.

Se eligen las colonias no coloreadas (lactosa negativas) para confirmarlas bioquímica y serológicamente.

Confirmación bioquímica

Siembra e incubación del medio: Sembrar mediante asa de cultivo, con colonias puras lactosa negativas, los siguientes medios de cultivo:

Agar T.S.I.: Sembrar en estría la superficie del agar y por picadura en el fondo. Incubar veinticuatro-cuarenta y ocho horas a 37° C.

Lectura:

Fondo	Superficie inclinada
Amarillo = Fermentación de glucosa.	Amarillo = Lactosa y/o sacarosa fermentada.
Rojo o sin cambio = No fermentación de la glucosa.	Rojo o sin cambio = Ni lactosa ni sacarosa fermentada.
Burbujas o grietas = Gas a partir de la glucosa.	-

Agar urea: Sembrar en la superficie del agar inclinado. Incubar cuarenta y ocho horas a 37° C.

Se hace la lectura. En caso positivo el color rojo fenol cambia a rosa, y más tarde a cereza intenso.

Medio para decarboxilación de lisina: Sembrar exactamente debajo del medio líquido. Incubar veinticuatro horas a 37° C.

La reacción positiva se manifiesta por un color púrpura. Amarillo indica reacción negativa.

Reacción de Voges-Proskauer: Se siembra en el medio MR-VP la colonia sospechosa [ya se ha descrito la técnica para esta reacción con anterioridad. Ver 3. Identificación Escherichia coli, apartado «Técnica», punto b.)]

Reacción del Indol: Sembrar sobre agua de triptona (TW) la colonia sospechosa [ya se ha descrito la técnica para esta reacción con anterioridad. Ver 3. Identificación Escherichia coli, apartado «Técnica», punto a.)]

6. Investigación de Shigella:

Es la determinación de la presencia o ausencia de los microorganismos pertenecientes a este género por métodos adecuados.

Material:

- Gradillas.
- Pipeta estériles de 1 ml.
- Asar de cultivo.
- Placas de Petri estériles de 90 y 150 mm de diámetro.
- Estufa de cultivo.

Medios de cultivo y reactivos:

a) Preparación del caldo triptona soja (T.S.B.):

Composición:

Triptona	17 g
Soja	3 g
Dextrosa	2,5 g
Cloruro sódico	5 g
Fosfato dipotásico	2,5 g
Agua destilada	1.000 ml

Se disuelven los ingredientes por calentamiento hasta ebullición. Se ajusta el pH 7,3 y se distribuye el medio en matraces de 500 ml, a razón de 225 ml. Esterilizar en autoclave durante veinte minutos a 121° C.

b) Preparación del caldo de enriquecimiento EE de Mossel concentrado:

Composición:

Peptona	20 g
Fosfato sódico	13 g
Fosfato potásico	4 g
Dextrosa	10 g
Bilis de buey	40 g
Verde brillante	0,027 g
Agua destilada	1.000 ml

Disolver. Ajustar el pH a 7,2. Distribuir en matraces de 100 ml a razón de 10 ml y calentar a «baño María» a 100° C durante treinta minutos. Enfría a chorro de agua fría. Este medio no necesita autoclave.

c) Preparación de agar xilosa-lisina-decarboxilasa (XLD):

Composición:

Xilosa	3,5 g
Lisina	5 g
Lactosa	7,5 g
Sacarosa	7,5 g
Cloruro sódico	5 g
Extracto de levadura	3 g
Desoxicolato sódico	2,5 g
Tiosulfato sódico	6,8 g
Citrato férrico amoniacal	0,8 g
Rojo fenol	0,08 g

Agar	14	g
Agua destilada	1.000	ml

Disolver por calentamiento, evitando que éste sea prolongado. Enfriar inmediatamente en agua hasta alcanzar los 50° C. Puede aparecer un precipitado que no interfiere ni en el crecimiento ni en las características del germen. Se vierte sobre placas de Petri de 150 mm. Este medio, una vez preparado, presenta coloración rojiza. No precisa autoclave.

d) Preparación de agar común:

Composición:

Triptona	15	g
Peptona de soja	5	g
Cloruro de sodio	5	g
Agar	15	g
Agua destilada	1.000	ml

Humedecer el agar durante quince minutos. Disolver por calentamiento todos los ingredientes y llevar a ebullición hasta su completa disolución. Ajustar el pH a 7,3, distribuir en tubos de ensayo y esterilizar en autoclave durante quince minutos a 121° C. Colocar los tubos para obtener agar inclinado.

e) Preparación de agar Hektoen.

Composición:

Peptona	12	g
Extracto de levadura	3	g
Lactosa	12	g
Sacarosa	12	g
Salicina	2	g
Sales biliares	9	g
Cloruro sódico	5	g
Tiosulfato sódico	5	g
Citrato férrico amónico	1,5	g
Fuchina ácida	0,1	g
Azul de bromotimol	0,065	g
Agar	14	g
Agua destilada	1.000	ml

Disolver por calentamiento hasta ebullición. Ajustar el pH a 7,5. Enfriar a 60° C y distribuir en placas de Petri estériles. No necesita autoclave.

f) Preparación de agar semisólido en tubo en U.

Composición:

Peptona	10	g
Cloruro sódico	5	g
Agar	5	g
Agua destilada	1.000	ml

Disolver por calentamiento. Ajustar el pH a 7,2 y distribuir a razón de unos 10 ml en tubos con forma de U de 200 mm de longitud y 10 mm de diámetro. Esterilizar en autoclave durante veinte minutos a 121° C.

g) Preparación de agar de Simmons para comprobar la asimilación del citrato.

Composición:

Sulfato magnésico	0,2	g
Fosfato monoamónico	1	g
Fosfato bipotásico	1	g
Citrato sódico	5	g
Azul de bromotimol	0,08	g
Agar	15	g
Agua destilada	1.000	ml

Disolver por calentamiento. Ajustar el pH a 6,8. Repartir en tubos de ensayo y esterilizar durante veinte minutos a 121° C. Dejar solidificar en posición inclinada.

h) Preparación del agar-hierro-triple azúcar (T. S. I.).

Composición:

Extracto de carne	3	g
Extracto de levadura	3	g
Peptona	20	g
Cloruro sódico	5	g
Lactosa	10	g
Sacarosa	10	g
Glucosa	1	g
Citrato férrico	0,3	g
Tiosulfato sódico	0,3	g
Rojo fenol	0,024	g
Agar	12	g
Agua destilada	1.000	ml

Disolver perfectamente por calentamiento hasta ebullición. Ajustar el pH a 7,3. Distribuir en tubos, llenándolos a 1/3 de su capacidad. Esterilizar en autoclave a 120° C durante quince minutos. Dejar solidificar en posición inclinada, de tal forma que quede también un fondo profundo.

i) Preparación del reactivo para la prueba de la citocromooxidasa.

Composición:

Clorhidrato de N-dimetil-parafenilendiamina	1	g
Agua destilada	100	ml

Esta solución hay que prepararla en el momento del uso, pues no se conserva. En el momento de realizar la reacción de humedece papel Whatman con unas gotas de reactivo y se coloca sobre una porta dentro de una placa de Petri, quedando así preparado para uso inmediato.

j) Preparación del medio para la utilización de azúcares.

Composición:

Peptona tripsica	20	g
Agar	3,5	g
Rojo fenol	0,02	g
Agua destilada	1.000	ml

Disolver. Ajustar el pH de forma que al final sea 7,4. Repartir a razón de 12 ml en tubos de ensayo. Esterilizar quince minutos a 121° C. Este medio de cultivo, que está exento totalmente de azúcares fermentescibles, se emplea cuando se utilizan discos de papel impregnados en azúcares para comprobar la fermentación de los mismos.

k) Preparación del medio para la investigación de la degradación del malonato.

Composición:

Extracto de levadura	1	g
Sulfato amónico	2	g
Fosfato dipotásico	0,6	g
Fosfato monopotásico	0,4	g
Cloruro sódico	2	g
Malonato de sodio	3	g
Glucosa	0,25	g
Azul de bromotimol	0,025	g
Agua destilada	1.000	ml

Disolver por calentamiento. Ajustar el pH a 6,4. Repartir en tubos de 120 x 12 mm a razón de 3 ml. Esterilizar en autoclave durante diez minutos a 115° C. El medio tiene color amarillo verdoso a pH 6,4.

l) Preparación del medio de Christensen para determinación de la hidrólisis de la urea.

Composición:

Peptona	1	g
Dextrosa	1	g
Cloruro sódico	5	g
Fosfato disódico	1,2	g
Fosfato potásico	0,8	g
Rojo fenol	0,012	g
Agar	15	g
Agua destilada	1.000	ml

Disolver por calentamiento. Ajustar el pH a 6,8. Esterilizar en autoclave durante veinte minutos a 115° C. Enfriar a 50° C e introducir asepticamente 5 ml de solución de urea al 40 por 100 estéril. Mezclar bien y distribuir a razón de 10 ml en tubos de ensayo estériles y dejar solidificar en posición inclinada.

m) Preparación de caldo para determinación de lisina decarboxilasa.

Composición:

Extracto de levadura	3	g
Dextrosa	1	g
L-lisina	5	g
Púrpura de bromocresol	0,016	g
Agua destilada	1.000	ml

Disolver. Repartir a razón de 5 ml por tubo con tapón de rosca y esterilizar en autoclave durante diez minutos a 120° C.

n) Preparación del medio al acetato de Trabulsi y Edwards.

Composición:

Cloruro de sodio	5	g
Sulfato magnésico	0,2	g

Fosfato monoamónico	1	g
Fosfato dipotásico	1	g
Acetato sódico	2	g
Agar	12	g
Agua destilada	1.000	ml

Disolver. Ajustar el pH a 7. Repartir en tubos a razón de 3 ml. Esterilizar en autoclave durante quince minutos a 121° C. Dejar solidificar en posición inclinada, de forma que se obtenga un fondo de 1 cm. El medio terminado tiene tonalidad verde.

Técnica: Para esta investigación, la muestra representativa debe ser, como mínimo, de 100 g. De esta cantidad se tomarán 25 g de distintas zonas para hacer el análisis. La toma de la muestra se hará con todas las precauciones asepticas. En el caso de alimentos congelados, el producto debe ser sometido a descongelación por permanencia en frigorífico, entre 2 y 5° C, durante dieciocho horas y, a continuación, se hará la toma de la muestra para el análisis.

Una vez tomada la muestra, y si la requiere el alimento a analizar, se procederá a su trituración-homogeneización, empleando un triturador adecuado. La trituración debe hacerse mezclando el producto con una cantidad suficiente del diluyente (T.S.B.) y una vez triturado, se le incorporará más diluyente, hasta completar 225 ml. La mezcla así obtenida se mantiene durante dos horas a temperatura de laboratorio. En esta fase se intenta revivificar las posibles Shigella y Salmonella. Pasadas las dos horas, se toman 10 ml y se siembran en un matraz conteniendo 10 ml del medio EE de Mossel concentrado. El medio sembrado se lleva a estufa a 41° C durante veinticuatro horas. Esta es la fase de enriquecimiento.

Transcurrido el período de incubación, y a partir del medio de enriquecimiento EE de Mossel, se siembra con asa de cultivo sobre:

- Placas de agar-xilosa-lisina-decarboxilasa (XLD).
- Placas de agar Hektoen.

Estos medios son selectivos para aislamiento de Shigella y Salmonella ya que eliminan gran parte de la flora que pueda estorbar el crecimiento de estos microorganismos.

En el agar XLD se puede investigar la fermentación de tres azúcares: Xilosa, lactosa y sacarosa, que, en caso positivo, hacen virar el medio a color amarillo gracias al indicador rojo fenol. El citrato férrico amónico sirve para indicar la formación de sulfuro de hierro que se manifiesta por un ennegrecimiento de las colonias. Los gérmenes que decarboxilan la lisina se identifican por la aparición de un color rojo púrpura alrededor de las colonias, como consecuencia del aumento del pH.

En este medio las colonias de los distintos gérmenes crecen como sigue:

Microorganismos	Colonias
Shigella. Providencia. Pseudomonas. Salmonella.	Colonias transparentes, tienen color rojo del medio.
Proteus.	Colonias transparentes, tienen color rojo del medio y, a veces, centro negro.
Serratia. Hafnia.	Colonias opacas, amarillas, rodeadas de amarillo.
Citrobacter. Klebsiella.	Colonias opacas, amarillas, rodeadas de amarillo.
E. Coli. Enterobacter. Aeromonas.	Colonias opacas, amarillas, rodeadas de amarillo y con halo de precipitación.

En la composición del agar Hektoen intervienen tres azúcares: Lactosa, sacarosa y salicina; el indicador es el azul de bromotimol. El citrato férrico amónico sigue teniendo en este medio el papel de indicar la formación de sulfuro de hierro. El sistema indicador es menos tóxico que en otros medios, lo que favorece el desarrollo del género Shigella.

El aspecto de las colonias en este medio es el siguiente:

Microorganismos	Colonias
Pseudomonas.	Colonias irregulares, planas de tono verde a marrón.
Salmonella.	Colonias verde azulado con o sin centros negros.
Shigella.	Colonias convexas, verdosas, de aspecto húmedo.

Las colonias sospechosas por sus características de crecimiento sobre estos medios, se aíslan y se siembran en tubos de agar común inclinado o en placas de agar común. Incubación a 37° C hasta el día siguiente. Con el crecimiento obtenido en estos medios a partir de las colonias aisladas, se procede a la identificación de las mismas, con la siguiente pauta:

- Estudio microscópico de los gérmenes, previa coloración por el método de Gram.
- Comprobación de la motilidad.
- Prueba de la citocromo-oxidasa.
- Modo de actuar sobre los azúcares: glucosa, lactosa, sacarosa, salicina.
- Prueba de la hidrólisis de la urea.
- Prueba para determinar la decarboxilación de la lisina.
- Prueba para determinar la utilización de citrato.
- Prueba para investigar la degradación del malonato.
- Medio complementario para el estudio de Shigella.

A) Estudio de la morfología de los gérmenes que integran las colonias aisladas, previa coloración por el método de Gram.

Se prepara un frotis sobre porta limpio y desengrasado, a partir de una suspensión bacteriana del cultivo crecido sobre agar común. El frotis debe ser fino y regular. Dejar secar a temperatura de laboratorio. Fijar por el calor de la llama del mechero y dejar enfriar antes de iniciar la coloración:

- Se procede a la coloración con el colorante violeta de genciana filtrado para evitar la formación de precipitados y se le deja actuar durante un minuto.
- A continuación debe actuar el mordiente (lugol), que se verterá sobre el porta una vez desechado el violeta de genciana, sin necesidad de lavado de agua. El tiempo de actuación del mordiente debe ser igual o algo mayor que el del colorante.
- La fase siguiente es la decoloración con alcohol acetona, una vez desechado el lugol, actuando hasta que el decolorante salga sin color.

Al final de esta fase se hace un lavado con agua.

- La coloración de fondo se hace con fuchina diluida al 1/10 dejándola actuar unos veinte segundos y lavando finalmente con agua. La preparación ya coloreada se seca perfectamente entre papel de filtro.
- El frotis coloreado se examina al microscopio empleando objetivo de inmersión.

Según la coloración de Gram, las bacterias se dividen en dos grandes grupos:

- Gram positivas.
- Gram negativas.

Las bacterias Gram positivas conservan su coloración por el violeta de genciana después de ser decoloradas con el alcohol acetona.

Las bacterias Gram negativas se decoloran con el alcohol acetona y se tiñen por la fuchina en rosa.

B) Comprobación de la motilidad.

Por esta comprobación se puede emplear el agar de cultivo semisólido en un tubo en U. Se siembra por una de las ramas del tubo, incubando luego a 37° C durante veinticuatro-cuarenta y ocho horas y comprobando si los gérmenes que se han sembrado tienden a alcanzar, en su crecimiento, la rama opuesta a la de la siembra, lo que indica que el germen en cuestión es móvil. Si el crecimiento se limita a la línea de siembra, el germen es inmóvil.

C) Prueba de la citocromo-oxidasa.

Como regla general, todas las Enterobacteriaceae son citocromo-oxidasa negativas, así que es fundamental su investigación para clasificar un bacilo Gram negativo dentro de esta familia.

Para esta prueba se usa papel impregnado de reactivo o las tiras que se venden en el comercio. Estas tiras se ponen sobre porta y en el interior una placa de Petri. Con pipeta de Pasteur cerrada en su punta, se toma una porción de cultivo en agar común y se extiende sobre el papel impregnado del reactivo. Cuando las bacterias son oxidasa positivas, aparece sobre el papel una tonalidad marrón rojiza, que se va oscureciendo. Esto no ocurre con los gérmenes oxidasa negativos.

D) Modo de actuar sobre los azúcares: Glucosa, lactosa, sacarosa.

A partir del cultivo sobre agar común se hace una siembra en el medio agar hierro triple azúcar, T.S.I., primero, abundantemente

en la inclinación del medio, y luego, en el fondo por picadura. Incubar a 37° C de dieciocho a cuarenta y ocho horas.

En este medio se manifiesta la fermentación de los azúcares por un viraje al amarillo debido al indicador rojo fenol. El gas se detecta por la aparición de burbujas o grietas en el medio de cultivo. Los gérmenes que producen SH₂ dan lugar a un ennegrecimiento, al formarse sulfuro de hierro.

La interpretación de la manera de comportarse los gérmenes sobre el medio T.S.I. es como sigue:

Fondo	Superficie inclinada
Amarillo: Fermentación de la glucosa. Rojo o sin cambio: No fermentación de la glucosa. Burbujas o grietas: Gas a partir de la glucosa.	Amarillo: Fermentación de la lactosa y sacarosa. Rojo o sin cambio: No fermentación de la lactosa ni sacarosa.

Comportamiento de algunas Enterobacteriaceae en agar hierro triple azúcar (T.S.I.):

Especie	Fondo	Superficie inclinada	SH ₂
Sh. dysenteriae.	Amarillo.	Sin cambio.	Neg.
Sh. boydii.	Amarillo.	Sin cambio.	Neg.
Sh. flexneri.	Amarillo.	Sin cambio.	Neg.
Sh. sonnei.	Amarillo.	Amarillo, viraje lento (biotipo 1) y sin cambio (biotipo 2).	Neg.
Sh. typhimurium.	Amarillo y gas.	Sin cambio.	Pos.
Citrobacter.	Amarillo y gas.	Amarillo.	Pos.
E. Coli.	Amarillo y gas.	Amarillo.	Neg.

E) *Modo de actuar sobre la salicina.*

Esta determinación, así como otras en las que se intente investigar el comportamiento de los gérmenes sobre distintos azúcares, se puede llevar a cabo sobre el medio para fermentación de azúcares. Se procede del modo siguiente: Con una pinza estéril se introduce un disco impregnado en salicina en el interior de un tubo conteniendo agar blando exento de azúcares. En este tubo se hace una siembra por picadura, a partir del cultivo obtenido sobre agar común, teniendo la precaución de hacer la picadura hasta la mitad del medio, para que el fondo del mismo sirva de testigo. Empujar ligeramente el disco para que quede cubierto unos 4 milímetros dentro del agar. Se incuba a 37° C y se hacen lecturas a partir de dieciocho horas y a intervalos regulares.

Cuando se produce la fermentación del azúcar aparece una tonalidad amarillo limón, primero a nivel del disco y después en una zona más amplia, cuando se forma gas aparecen burbujas alrededor del disco, en la superficie o a lo largo de la picadura. Cuando no hay fermentación el indicador no hace virar el medio. En el caso de una bacteria alcalinizante la coloración que aparece es rojo grosella.

El procedimiento descrito para la salicina se puede utilizar para cualquier azúcar, cambiando los discos impregnados con el azúcar que interese en cada caso.

F) *Prueba para la determinación de la hidrólisis de la urea.*

Por esta prueba se investiga la presencia de una ureasa en algunos gérmenes, que interviene para transformar la urea en carbonato amónico, alcalinizando los medios preparados a este fin.

Del cultivo obtenido sobre agar común se siembra abundantemente sobre la superficie inclinada del agar de Christensen. Incubación a 37° C entre dieciocho y cuarenta y ocho horas. La hidrólisis de la urea se manifiesta por una alcalinización del medio, que toma tonalidad rosa y luego roja. Es aconsejable poner un tubo testigo sin urea para comprobar que la alcalinización no se debe a una degradación de la peptona que contiene el medio.

G) *Pruebas para la determinación de la descarboxilación de la lisina.*

Muchas bacterias elaboran enzimas capaces de atar algunos aminoácidos. Estos enzimas, descarboxilasas, actuando sobre la lisina, en medio ácido, la transforman en cadaverina, que se detecta por el viraje que se produce del amarillo al violeta.

Para realizar esta prueba se hace una suspensión en solución salina o en solución Ringer al 1/4, a partir de un cultivo de veinticuatro horas sobre agar común. Cinco gotas de la suspensión se siembran sobre el medio y se cubre este último con una capa de parafina estéril, incubándose a 37° C. Los tubos han de observarse a diario durante cuatro días. La aparición de una tonalidad violeta o roja violeta indica que ha habido utilización de la lisina y, por tanto, la reacción es positiva. La permanencia de la tonalidad amarilla del medio indica reacción negativa.

H) *Prueba para determinar la utilización del citrato.*

Algunas bacterias poseen un citrato permeasa que les permite utilizar el citrato como fuente de carbono; por tanto, únicamente los gérmenes que poseen esta característica pueden crecer en un medio sintético cuya única fuente de carbono es el citrato sódico. Para determinar esta particularidad se usa el medio al citrato de Simmons.

Para realizar la siembra sobre este medio se emplea un cultivo obtenido sobre agar común, pero nunca un cultivo líquido, pues lo mismo el caldo que el agua de peptona pueden llevar elementos nutritivos que den lugar a resultados erróneos. El inóculo de siembra debe ser escaso y se debe hacer una estría de siembra única. El medio sembrado se incubará a 37° C durante veinticuatro horas. Si al cabo de este tiempo hay crecimiento abundante con o sin alcalinización (se produce un viraje por liberación de amoniaco con la alcalinización) se trata de gérmenes citrato positivos. Cuando no hay crecimiento a lo largo de la línea de siembra, los gérmenes son citratos negativos.

I) *Prueba para investigar la degradación del malonato.*

Es un medio complementario para la identificación de Shigella. Para determinar la degradación del malonato se utiliza el medio sembrando en el mismo a partir de un cultivo sobre agar. Incubar a 37° C durante setenta y dos horas. Los microorganismos malonato positivos viran el medio a azul. Los malonatos negativos no modifican el medio.

J) *Medio complementario para el estudio de Shigella.*

El medio al acetato de Trabulsi y Edwards se utiliza para la diferenciación entre Alcalescens-Dispar y Shigella, ya que el estudio bioquímico puede dar lugar a confusión, el 95 por 100 de las cepas de Alcalescens-Dispar crecen en este medio mientras que las Shigella no lo hacen nunca.

ALGUNAS PROPIEDADES CLAVE DE LA SHIGELLA

Género	Morfología y coloración	Movilidad	Citocromo oxidasa	Glucosa	Lactosa	Sacarosa	Salicina	Urea	Lisina	Citrato	Malonato	Medio acetato
Shigella	Bacilo Gram negativo	-	-	+, sin gas	- ó +	- ó +	-	-	-	-	-	-
Alcalescens	Bacilo Gram negativo	-	-	+, sin gas	-	-	-	-	+	+	-	+
Dispar	Bacilo Gram negativo	-	-	+, sin gas	+	-	-	-	+	+	-	+
E. colianaerógenos	-	+ ó -	-	+, sin gas	+	+ ó -	+ ó -	-	+	-	-	-

* Sh. Sonnei biotipo 1 fermenta lactosa, aunque tardamente.

** Algunas cepas de Sh. Sonnei fermentan la sacarosa, aunque tardamente.

A partir de una suspensión en solución salina o solución Ringer a 1/4, obtenida de un cultivo puro sobre agar común, se hace una siembra sobre la superficie inclinada del agar al acetato de Trabulsi y Edwards. Incubar a 37° C durante cuarenta y ocho-setenta y dos horas. Las cepas que degradan el acetato producen una elevación del pH del medio de cultivo, que vira su color verde original a azul. La lectura se debe hacer diariamente durante siete días.

La identificación de las Shigella se puede complementar con pruebas serológicas, empleando sueros aglutinantes, sobre todo

para diferenciarlas de los Alcalescens-Dispar y E. Coli, que se asemejan a las Shigella en algunos aspectos bioquímicos. De todas formas, son de más valor las pruebas bioquímicas que las serológicas cuando se trata del género Shigella.

Nota: Dentro de la práctica de realización de todos los métodos analíticos anteriormente expuestos, al fundir la muestra de helado para su análisis se mantendrá ésta como máximo diez minutos a 45° C ± 1° C.