

Republic of Ecuador

EDICT OF GOVERNMENT

In order to promote public education and public safety, equal justice for all, a better informed citizenry, the rule of law, world trade and world peace, this legal document is hereby made available on a noncommercial basis, as it is the right of all humans to know and speak the laws that govern them.



NTE INEN 1529-15 (1996) (Spanish): Control microbiológico de los alimentos. Salmonella. Método de detección

BLANK PAGE





INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

**FE DE ERRATAS
(2009-04-03)**

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA

NTE INEN 1529-15:2009

CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. SALMONELLA. MÉTODO DE DETECCIÓN.

Primera Edición

MICROBIOLOGICAL CONTROL OF FOODS. SALMONELLA. DETECTION METHOD

First Edition

En la página 14. Numeral 9.2

Dice:

9.2 Si a partir de uno, o de ambos medios de enriquecimiento selectivo, se aísla *Salmonella* en las placas de agar selectivo, reportar: "Se aisló *Salmonella* en 25 g (u otra cantidad) de muestra examinada; el medio(s) de enriquecimiento selectivo fue...; el medio(s) sólido selectivo secundario fue...; las pruebas bioquímicas realizadas fueron:...; los antisueros con que se aglutinó fueron:..., la marca..."

Debe decir:

9.2 Si a partir de uno, o de ambos medios de enriquecimiento selectivo, se aísla *Salmonella* en las placas de agar selectivo, reportar: "Se aisló *Salmonella* en 25 g de muestra examinada; el medio(s) de enriquecimiento selectivo fue...; el medio(s) sólido selectivo secundario fue...; las pruebas bioquímicas realizadas fueron:...; los antisueros con que se aglutinó fueron:..., la marca..."

DESCRIPTORES: Productos alimenticios, análisis microbiológico, determinación de Salmonella
AL 01.05-311
CDU: 614.32:539.67:579.84
CIIU: 9320
ICS: 07.100.30



INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA

NTE INEN 1 529-15:96

CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. SALMONELLA. MÉTODO DE DETECCIÓN

Primera Edición

MICROBIOLOGICAL CONTROL OF FOODS. SALMONELLA. DETECTION METHOD

First Edition

DESCRIPTORES: Productos alimenticios, análisis microbiológico, determinación de Salmonella
AL 01.05-311
CDU: 614.32:539.67:579.84
CIU: 9320
ICS: 07.100.30

Norma Técnica Ecuatoriana Obligatoria	CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. SALMONELLA. MÉTODO DE DETECCIÓN	NTE INEN 1 529-15:95 1996-01
--	---	---

Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN – Casilla 17-01-3999 – Baquerizo Moreno E8-29 y Almagro – Quito-Ecuador – Prohibida la reproducción

1. OBJETO

1.1 Esta norma describe el método de ensayo para detectar *Salmonella* en alimentos.

2. ALCANCE

2.1 Este método no es cuantitativo y solo es aplicable para determinar la presencia o ausencia de *Salmonella* en los alimentos, en general.

3. DEFINICIONES

3.1 Salmonella. Género perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Está integrado por microorganismos que forman colonias típicas sobre medios selectivos sólidos y poseen características bioquímicas y serológicas definidas. Generalmente son móviles, Gram negativas, fermentan la glucosa con formación de gas y no fermentan la lactosa.

3.2 Detección de Salmonella. Es la determinación de la presencia o ausencia de estos microorganismos en una determinada masa, cuando el ensayo es realizado según el método prescrito.

4. FUNDAMENTO

4.1 Las salmoneras, cuando presentes en los alimentos, generalmente lo están en pequeños números, algunas veces debilitadas y frecuentemente acompañadas de un gran número de otros miembros de *Enterobacteriaceae*, por tanto, en este método se considera las siguientes etapas:

4.1.1 *Pre-enriquecimiento.* Cultivo de la muestra a 37°C en medios mínimos sencillos, exentos de agentes químicos selectivos a fin de lograr la revitalización de las salmonelas lesionadas.

4.1.2 *Enriquecimiento selectivo.* Subcultivo a 37°C y entre 42 a 43°C, en medios líquidos selectivos del cultivo pre-enriquecido, para inhibir o restringir el crecimiento de la flora competitiva y favorecer la multiplicación de las salmonelas.

4.1.3 *Siembra en placa de medios selectivos sólidos.* Inoculación de los cultivos de enriquecimiento selectivo en la superficie de agar selectivos y diferenciales, para visualizar las colonias que por su aspecto característico se las considera como de *Salmonella* presuntiva.

4.1.4 *Identificación.* Subcultivo de las colonias de *Salmonella* presuntiva y determinación de sus características bioquímicas y serológicas para identificarlas como miembros del género *Salmonella*.

(Continúa)

DESCRIPTORES: Productos alimenticios, análisis microbiológico, determinación de *Salmonella*.

5. DISPOSICIONES GENERALES

5.1 El pre-enriquecimiento debe ser utilizado para alimentos que han sido sometidos a tratamientos de conservación: físicos (térmicos, desecación, irradiación); químicos (sal común, curado, ahumado, ácidos y sustancias conservadoras). Los alimentos que no han sido sometidos a tratamiento alguno, o que son altamente contaminados, homogeneizarlos directamente en los medios de enriquecimiento selectivo (8.3).

6. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, EQUIPO Y MATERIAL

6.1 Medios de cultivo y reactivos

6.1.1 *Requisitos básicos.* Para que haya uniformidad en los resultados, es necesario que los componentes de los medios sean de una calidad uniforme y de grado analítico o, a su vez, utilizar medios completos deshidratados, que se los reconstituye según las instrucciones del envase.

6.1.2 *Composición y preparación de los medios de cultivo y reactivos.* Ver NTE INEN 1529-1.

6.1.2.1 Agar bismuto-sulfito (BS)

6.1.2.2 Agar citrato de Simmon

6.1.2.3 Agar cristal-violeta rojo-neutro bilis lactosa

6.1.2.4 Agar fenilalanina

6.1.2.5 Agar hierro lisina (LIA)

6.1.2.6 Agar hierro triple-azúcar (TSI)

6.1.2.7 Agar nutritivo semisólido

6.1.2.8 Agar SS

6.1.2.9 Agar urea o caldo urea

6.1.2.10 Agar verde-brillante rojo-fenol (BG)

6.1.2.11 Agua peptona tamponada

6.1.2.12 Caldo base con púrpura de bromocresol

6.1.2.13 Caldo lisina-descarboxilase

6.1.2.14 Caldo MR-VP

6.1.2.15 Caldo selenito cistina

6.1.2.16 Caldo tetrionato (Muller Kauffmann)

(Continúa)

- 6.1.2.17 Caldo Triptona (Ljutov)
- 6.1.2.18 Caldo de soya tríptica (TSB)
- 6.1.2.19 Caldo nutritivo
- 6.1.2.20 Leche descremada en polvo
- 6.1.2.21 Solución de gelatinasa al 5%
- 6.1.2.22 Solución de hidróxido de sodio 1 N
- 6.1.2.23 Solución alcohólica de α naftol al 6%
- 6.1.2.24 Solución de ácido clorhídrico 1 N
- 6.1.2.25 Solución de KOH al 40%
- 6.1.2.26 Solución fisiológica
- 6.1.2.27 Solución de creatina al 0,5%
- 6.1.2.28 Solución fisiológica formalizada
- 6.1.2.29 Solución de ONPG (O-nitrofenil β -D-galactopiranosida)
- 6.1.2.30 Solución verde brillante al 1 %
- 6.1.2.31 Reactivo de Kovacs
- 6.1.2.32 Sulfito de potasio en polvo
- 6.1.2.33 Rojo de metilo
- 6.1.2.34 Tergitol aniónico 7
- 6.1.2.35 Tritón X-100
- 6.1.2.36 Antisueros "Vi" y polivalentes "O" y "H".

6.2 Instrumental y vidriería

6.2.1 *Requisitos básicos.* Toda la vidriería y utensilios que se utilicen en los ensayos deben ser de material inerte y resistente a esterilizaciones repetidas, además, deben estar perfectamente limpios y estériles.

6.2.1.1 Molino de carne para laboratorio, provisto de placas crivadas, cuyos agujeros no excedan de 4 mm de diámetro.

6.2.1.2 Licuadora de 8 000 a 45 000 rpm, con vasos de metal o vidrio autoclavables, de capacidad adecuada.

(Continúa)

6.2.1.3 Equipo para esterilizar medios de cultivo y material: autoclave, almohadillas de asbesto, membranas filtrantes, bujías de porosidad adecuada.

6.2.1.4 Estufa de secado, con regulador de temperatura

6.2.1.5 Incubadora, con regulador de temperatura, para cultivos a 37°C

6.2.1.6 Baño de agua, con regulador de temperatura

6.2.1.7 Incubadora o baño de agua para cultivos entre 42 y 43°C

6.2.1.8 Microscopio

6.2.1.9 Refrigeradora

6.2.1.10 Balanza de 0,1 g de sensibilidad

6.2.1.11 Mechero Bunsen

6.2.1.12 Gradillas o tuberías

6.2.1.13 Asas y agujas para cultivos

6.2.1.14 Materiales varios: cucharas, cuchillos, pinzas, tenedores, espátulas, tijeras, saca-bocados, etc.

6.2.1.15 Tubos de ensayo: de 150 mm x 20 mm; 160 mm x 16 mm; 120 mm x 12 mm; 100 mm x 12 mm

6.2.1.16 Probetas graduadas

6.2.1.17 Pipetas bacteriológicas de punta ancha graduadas en 1/10 de cm³

6.2.1.18 Placas Petri de vidrio o desechable de 100 mm x 15mm

6.2.1.19 Erlenmeyer

6.2.1.20 Frascos para muestreo con tapas de rosca, autoclavables

6.2.1.21 Pipetas Pasteur.

7. TOMA Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

7.1 La unidad analítica debe provenir de una unidad de muestra de por lo menos 100 g, y se la tomará según la NTE INEN 1529-2. Si el alimento está congelado, a la cantidad necesaria descongelarla durante la noche entre 2 a 5°C ó, a una temperatura menor de 45°C por aproximadamente 15 minutos, de preferencia, en un baño de agua con agitación.

7.2 Las unidades de muestras perecederas que llegan al laboratorio deben mantenerse en refrigeración (2 a 5°C), por no más de 24 h. En general, las muestras se deben mantener en las condiciones adecuadas al producto, hasta el momento del examen.

(Continúa)

8. PROCEDIMIENTO

8.1 Diluyentes. Los líquidos de dilución empleados para el objeto de esta norma son:

8.1.1 Agua peptona tamponada. Para colorantes alimentarios de $\text{pH} > 6$; productos del mar: crustáceos (camarones, cangrejos, etc), moluscos (bivalvos, caracoles), pescados; carnes y productos cárnicos; huevos pasteurizados, líquido o en polvo, productos con huevo; gelatinas y postres de gelatina; frutas y vegetales desecados; productos de panadería y pastelería; pastas alimenticias; quesos.

8.1.2 Caldo de soya triptica con 0,5% de K_2SO_3 . Para ajos y cebollas en polvo. El sulfito de potasio se añade al caldo antes de esterilizado.

8.1.3 Caldo de soya triptica. Para especias como, comino, pimienta, pprica, apio, perejil, tomillo, etc, vegetales en hojuelas, levadura seca.

8.1.4 Agua destilada estéril. Para productos desecados con alto contenido en sólidos solubles tales como, leche en polvo, productos desecados para bebes, etc.

8.1.5 Caldo nutritivo. Para productos de repostería.

8.1.6 Leche desnatada en polvo reconstituida. Para caramelos, chocolates y productos de confitería.

8.2 Pre-enriquecimiento. Preparar el homogeneizado con 25g de muestra y 225 cm^3 de diluyente (8.1), y si es necesario, ajustar el pH a $6,8 \pm 0,2$ con una solución estéril de hidróxido de sodio 1N,  de ácido clorhídrico 1 N,  de fosfato tripotásico al 8% ($\text{K}_3\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

8.2.1 Productos procesados en general

8.2.1.1 Asépticamente, pesar 25 g de la muestra en un frasco de boca ancha con tapa de rosca (500 cm^3), adicionar 225 cm^3 de diluyente, homogeneizar a alta velocidad durante 2 minutos. Si la muestra es pequeña, hacer la dilución proporcionalmente y proceder según el método (informar el resultado en base a la cantidad de muestra realmente analizada).

8.2.1.2 Tapar el frasco y dejar a temperatura ambiente por 60 minutos.

8.2.1.3 Mezclar bien y ajustar el pH. Si la muestra es rica en grasa, después de ajustar el pH, adicionar hasta 2,2 cm^3 de Tergitol Aniónico-7 , dos a tres gotas de Tritón X-100, esterilizados a vapor por 15 minutos. Utilizar estos surfactantes en la cantidad mínima necesaria para iniciar la formación de espuma.

8.2.1.4 Con la tapa aflojada 1/4 de vuelta, incubar a 37C durante no menos 16 horas y no más de 20 horas.

8.2.1.5 Continuar con 8.3.6.

8.2.2 Leche en polvo

8.2.2.1 Pesar asépticamente 25 g de muestra, adicionar 225 cm^3 de agua destilada estéril, tapar, mezclar bien y dejar 60 minutos a temperatura ambiente.

(Continúa)

8.2.2.2 Mezclar y ajustar el pH, adicionar 0,45 cm³ de verde brillante al 1 % y mezclar bien.

8.2.2.3 Con la tapa aflojada 1/4 de vuelta, incubar el frasco mínimo 16 horas y máximo 20 horas a 37°C.

8.2.2.4 Continuar con 8.3.6.

8.2.3 *Levadura deshidratada*. Utilizando como diluyente caldo de soya triptica, proceder según 8.2.1 y continuar con 8.3.6, excepto que para la levadura deshidratada activa, substituir el caldo de enriquecimiento selenito cistina por el caldo lauril sulfato triptosa.

8.2.4 *Gelatinas*. Pesar asépticamente 25g de muestra, adicionar 225 cm³ de agua peptona tamponada y 5 cm³ de una solución acuosa de gelatinasa al 5,0% esterilizada por filtración y proceder según 8.2.1.2 a 8.2.1.5

8.2.5 *Caramelos, chocolates y productos de confitería*. Pesar 25 g de muestra y añadir 225 cm³ de leche en polvo desnatada reconstituida estéril. Homogeneizar dos minutos a alta velocidad, tapar y dejar 60 minutos a temperatura ambiente. Proceder según 8.2.2.2 a 8.2.2.4 utilizando como agente inhibidor 0,9 cm³ de una solución acuosa de cristal violeta al 1 % ó 0,45 cm³ de verde brillante al 1 %.

8.2.6 *Bivalvos (conchas, almejas, ostiones, ostras)*. Las muestras de moluscos frescos con sus valvas deben mantenerse en ambiente seco, a temperaturas de refrigeración inferiores a 10°C evitando que entren en contacto con el hielo. A estas muestras, con valvas, y a las desbulladas no congeladas examinarlas dentro de las seis horas a partir de la colecta, en ningún caso se debe examinar muestras que después de la colecta hayan sido guardadas más de 24 h. Las muestras de conchas desbulladas congeladas deben mantenerse en su estado congelado, a temperaturas próximas a la que se encontraban durante la colecta y pueden analizarse tras períodos más prolongados, siempre que se mantengan ininterrumpidamente congeladas.

8.2.6.1 En un recipiente estéril, de boca ancha, de cualquier lote de conchas, desbullar asépticamente 30 conchas sanas.

8.2.6.2 Al azar, subdividir las 30 conchas en dos porciones de 15 conchas cada una, calcular el peso de cada porción y separar dos volúmenes de agua peptona tamponada en cantidad suficiente para obtener una suspensión de 10⁻¹.

8.2.6.3 De cada una de las dos porciones, y dependiendo del peso de cada concha individual, en vasos estériles adecuados para homogeneizar, pesar por separado, alícuotas de aproximadamente 100 g (carne y líquido).

8.2.6.4 Adicionar 300 cm³ de agua peptona tamponada a cada vaso y homogeneizar a alta velocidad durante 90 segundos, adicionar el restante del agua peptona hasta obtener la suspensión madre de 10⁻¹. Mezclar y dejar a temperatura ambiente durante 60 minutos.

8.2.6.5 Mezclar bien por agitación, ajustar el pH.

8.2.6.6 Incubar los dos frascos a 37°C por no menos 16 h y no más de 20 h.

8.2.6.7 Continuar con 8.3.6.

(Continúa)

8.2.7 Aves

8.2.7.1 Colocar la canal, o trozos de la misma, dentro de una bolsa plástica, adicionar 300 cm³ de agua peptona tamponada y lavarla frotando la superficie de la carcasa durante un minuto.

8.2.7.2 Asépticamente, retirar la canal y transferir el líquido de enjuague a un frasco con tapa. Proceder según 8.2.1.2 a 8.2.1.5.

8.2.7.3 Cuando no se requiere de pre-enriquecimiento, recoger el líquido de enjuague en dos frascos, en volúmenes iguales. Al un frasco añadir igual volumen de caldo tetrionato doble concentración, y al otro, caldo selenito cistina doble concentración. Mezclar bien y dejar 60 minutos a temperatura ambiente.

8.2.7.4 Continuar con 8.3.4 a 8.3.7 teniendo cuidado de mantener la concentración del verde brillante.

8.3 Enriquecimiento selectivo

8.3.1 Tarar dos vasos vacíos estériles del homogeneizador (o sustituto) de aproximadamente 500 cm³ de capacidad. Asépticamente, en cada uno, de las distintas zonas de la unidad de muestra pesar 25 ± 0,1 g (en pequeños pedazos).

8.3.2 Al uno, añadir 225 cm³ de caldo selenito cistina y al otro 225 cm³ de caldo tetrionato sin verde brillante. Sin pérdida de tiempo homogeneizar el alimento a alta velocidad por no más de 2,0 minutos, comenzar con pocas revoluciones hasta llegar entre 15 000 y 20 000 rpm. Omitir la trituración si la muestra es pulverulenta, molida o triturada.

8.3.3 Asépticamente, transferir el homogeneizado a frascos estériles de boca ancha con tapa de rosca (500 cm³) o a otros similares. Dejar 60 minutos a temperatura ambiente.

8.3.4 Mezclar bien y ajustar el pH.

8.3.5 Adicionar 2,25 cm³ de verde brillante al 0,1 % al frasco con caldo tetrionato, mezclar bien.

8.3.6 Cuando la muestra ha sido sometida a pre-enriquecimiento (8.2), entre las 16 y 20 horas de incubación, ajustar la tapa y delicadamente mezclar el cultivo de pre-enriquecimiento, pipetear 10 cm³ en 100 cm³ de caldo tetrionato verde brillante y otros 10 cm³ en 100 cm³ de selenito cistina.

8.3.7 Incubar el caldo selenito cistina a 37 ± 1 °C por 48 horas y el caldo tetrionato entre 42 y 43 °C durante 48 horas.

8.4 Siembra en placa de medios sólidos selectivos y diferenciales

8.4.1 Cuando el período de incubación de los medios tetrionato y selenito alcanza entre las 18 y 24 h, ajustar las tapas y de cada uno de ellos, con asa de cultivo sembrar en estría sobre la superficie seca de placas de agar verde-brillante rojo-fenol (BG), agar *Salmonella-Shigella* (SS), agar bismuto sulfito (BS) de manera a obtener colonias aisladas (primer subcultivo).

8.4.2 Invertir las placas e incubarlas a 37 ± 1 °C por 24 h.

8.4.3 Al término de las 48 horas de incubación de los caldos de enriquecimiento selectivo (8.3.7), de cada uno de ellos, realizar en idéntica forma un segundo subcultivo.

(Continúa)

8.4.4 Examinar las placas entre las 20 y 24 horas, si el crecimiento es pobre y no aparecen colonias típicas de salmonelas, examinarlas después de 24 horas más de incubación.

8.4.5 *Aspecto de las colonias de Salmonella en los medios de agar selectivos*

8.4.5.1 *Agar verde-brillante rojo-fenol.* La mayoría de las colonias típicas de salmonelas son opacas o translúcidas de color rosa o rojo oscuro, y el medio que las rodea varía de rosáceo a rojo. Las colonias típicas pueden presentarse incoloras, otras pueden aparecer de un color verde translúcido cuando están rodeadas por colonias de color verde o verde amarillento de microorganismos fermentadores de la lactosa o sacarosa. Las salmonelas fermentadoras de la lactosa (menos del 1%) presentarán colonias de color verde amarillento o verde.

8.4.5.2 *Agar Salmonella-Shigella.* La mayoría de las colonias típicas de salmonelas son opacas o translúcidas, incoloras o de color crema, con o sin centro negro. Las pocas salmonelas que fermentan la lactosa presentan colonias lisas de color rosa o naranja.

8.4.5.3 *Agar bismuto-sulfito.* Las colonias típicas tienen el centro negro, borde claro, precipitado negro con brillo metálico alrededor de las colonias ("ojo de conejo", "ojo de pez"). El medio que las rodea es, generalmente, oscuro al principio, tornándose negro a medida que aumenta el período de incubación, produciéndose el llamado efecto halo. Algunas cepas pueden producir colonias verdes con poco o ningún oscurecimiento del medio circundante.

ADVERTENCIA. Cualquier colonia típica o sospechosa debe ser confirmada, ya que reconocer las colonias de *Salmonella* supone mucha experiencia y el aspecto puede variar no solo de especie a especie sino también de lote a lote de medio de cultivo.

8.5 Selección y purificación de las colonias que serán confirmadas

8.5.1 *Selección.* De cada placa de medio selectivo (8.4) seleccionar 5 colonias típicas o sospechosas bien aisladas y sembrarlas directamente en agar TSI y en LIA (8.6.1). Si en una placa hay menos de cinco colonias típicas, sembrar todas.

8.5.2 *Purificación de las colonias elegidas*

8.5.2.1 Si en alguna placa, las colonias típicas o sospechosas están contaminadas con colonias de otras enterobacterias, con un asa inocular estas colonias en caldo tetrionato y en caldo selenito - cistina y proceder según 8.3.7 y 8.4.

8.5.2.2 Si en alguna placa no hay colonias bien aisladas, con un asa de cultivo, sin rozar en el agar, tocar solo el centro de la colonia seleccionada y sembrar en estría la superficie seca de placas individuales de agar cristal-violeta rojo-neutro bilis lactosa (ó BG ó, agar MacConkey), de tal manera que se obtengan colonias bien aisladas.

8.5.2.3 Invertir las placas e incubarlas a 37°C por 20 a 24 horas.

8.5.2.4 Elegir colonias incoloras (lactosa negativas), resembrarlas en tubos de agar nutritivo inclinado e incubarlas a 37°C por 20 a 24 horas.

8.5.2.5 Hacer extensiones a partir de los cultivos en agar nutritivo inclinado y teñirlas por el método de Gram. Si se comprueba la pureza de los cultivos, utilizarlos para la confirmación bioquímica y serológica.

(Continúa)

8.6 Confirmación bioquímica

8.6.1 Prueba exploratoria

8.6.1.1 De los cultivos purificados (8.5.2.5) o, directamente de cada una de las colonias típicas (8.5.1), evitando rozar en el agar selectivo, topar con la aguja solo en el centro y superficie de la colonia elegida.

8.6.1.2 Inocular en agar TSI y en agar LIA, inoculando primero un medio y, sin flamear la aguja, inocular el segundo medio de la misma manera. Sembrar por picadura la columna del agar y la superficie inclinada en estría, tapar-los con un tapón flojo. En la columna del agar LIA, hacer dos picaduras (la columna de éste, debe ser de por lo menos 3cm de altura y el sesgo corto).

8.6.1.3 Incubar los tubos de TSI y LIA entre 35 y 37°C por 24 ± 2 horas y 48 ± 2 horas, respectivamente.

8.6.1.4 Examinar conjuntamente los cambios habidos en el TSI y en el LIA e interpretar de la siguiente manera:

Reacciones típicas:

Agar TSI

Agar LIA.

Columna:

Columna:

- Amarilla: reacción ácida, por fermentación de la glucosa
- Burbujas o grietas en el agar: gas a partir de la glucosa (*la S.tiphy* y *S. gallinarum* fermentan sin producción de gas).
- Sin ennegrecimiento: sin producción de H₂S
- Ennegrecimiento: producción de H₂S

- Púrpura: reacción alcalina, por descarboxilación de la lisina
- Ennegrecimiento: producción de H₂S
- Sin ennegrecimiento: sin producción de H₂S.

Lengüeta:

- Roja o inalterada: reacción alcalina, sin fermentación de la lactosa y sacarosa
- Amarilla: reacción ácida por utilización de la lactosa o sacarosa (menos del 1 % de las salmonelas fermentan la lactosa y la lengüeta será amarilla).

8.6.1.5 Purificar los cultivos mixtos en TSI o LIA siguiendo lo indicado en los numerales 8.5.2.

(Continúa)

8.6.2 Pruebas complementarias. A partir de cada cultivo purificado que presenta reacciones de presuntas salmonelas en agar TSI y LIA, realizar las siguientes pruebas:

8.6.2.1 Prueba de la ureasa. Sembrar en estría sobre la superficie de agar urea inclinado (o caldo). Incubar entre 24 y 48 horas a 37°C. La reacción es positiva cuando el color del medio cambia a rosa más intenso o cereza intenso. El medio inalterado indica una reacción negativa. Las salmonelas dan reacción negativa.

8.6.2.2 Prueba de la lisina-decarboxilasa. Inocular en el fondo de la superficie líquida del caldo lisina-decarboxilasa, vedar con vaselina líquida estéril. Incubar 24 horas a 37°C. La reacción es positiva cuando el color del medio es púrpura, el cambio a amarillo indica una reacción negativa. Si el color del medio no es ni púrpura ni amarillo, añadir una o dos gotas de una solución al 0,2% de púrpura de bromocresol y volver a leer. Las salmonelas dan reacción positiva.

8.6.2.3 Prueba de la β galactosidasa

- a) En un tubo estéril hacer una suspensión bacteriana densa con 0,5 cm³ de solución salina estéril, agregar una gota de tolueno y agitar vigorosamente. Incubar el tubo en baño de agua a 37°C por 10 minutos. Añadir 0,25 cm³ de la solución tamponada 0,0133 M de ONPG, agitar e incubar en baño de agua a 37°C por 24 horas. La reacción es positiva cuando aparece un color amarillo, frecuentemente la reacción suele ser apreciable antes de tres horas. Las salmonelas dan reacción negativa.
- b) También se puede utilizar discos impregnados de ONPG que se los añade a la suspensión bacteriana, luego, se agita el tubo delicadamente e incuba de 4 a 6 horas a 35°C.

8.6.2.4 Prueba de Voges-Proskauer

- a) Sembrar en un tubo de caldo glucosa fosfato (caldo MR- VP) el cultivo en análisis, incubar a 37°C por 24 a 48 horas.
- b) Después de este período, añadir los siguientes reactivos cuidando de agitar el tubo después de cada adición:
 - b.1) Solución alcohólica de α naftol al 6%: 3 gotas
 - b.2) Solución de KOH al 40%: 2 gotas
 - b.3) Solución de creatina al 0,5%: 2 gotas (para acelerar la reacción, es opcional).
- c) Leer el resultado después de 4 horas, el color rosa - rojo rubí del medio indica una reacción positiva y es negativa cuando permanece inalterado. Frecuentemente la reacción es apreciable a los 15 minutos. Las salmonelas dan reacción negativa.

8.6.2.5 Prueba del indol. Sembrar en un tubo de agua triptona el cultivo en análisis. Incubar 24 horas a 37°C. Adicionar al tubo 0,2 ó 0,3 cm³ del reactivo de Kovacs. La aparición de un color rojo oscuro en la capa del reactivo indica una reacción positiva, amarillo una reacción negativa. Las salmonelas son indol negativas.

8.6.2.6 Prueba de la fenilalanina-desaminasa. Sembrar en estría sobre la superficie inclinada de agar fenilalanina. Incubar 24 horas a 37°C. Después de este período añadir unas gotas de solución de cloruro férrico 0,5 M. La reacción es positiva cuando aparece un color verde-azulado oscuro. Las salmonelas dan reacción negativa.

(Continúa)

8.6.2.7 Prueba de la utilización del citrato. Sembrar en estría sobre la superficie inclinada de agar citrato de Simmon. Incubar de 24 a 48 horas a 37°C. El cambio del color del medio a un azul fuerte indica una reacción positiva. La mayoría de las salmonelas dan reacción positiva.

8.6.2.8 En la Tabla 1 se resume las características bioquímicas y serológicas de la *Salmonella*. Cualquier cultivo que no haya sido claramente identificado como perteneciente, o no, al género *Salmonella* se debe someter a pruebas bioquímicas adicionales, tales como: pruebas relacionadas con aminoácidos, hidratos de carbono, resistencia al KCN, utilización de fuentes de carbono.

8.7 Confirmación serológica

8.7.1 Para la determinación en porta-objetos de los antígenos "O", "H" y "Vi" de las salmonelas, utilizar cultivos puros de 18 a 24 h en agar nutritivo inclinado, no autoaglutinables, procedentes del crecimiento en TSI y LIA. Por este procedimiento, que a continuación se indica, no es posible la confirmación serológica de las cepas autoaglutinables (se aglutinan espontáneamente en ausencia de antisuero).

8.7.2 Análisis del antígeno somático "O" y capsular "V"

8.7.2.1 Comprobar la eficacia de los antisueros, ensayando el antisuero con cultivos testigos conocidos.

8.7.2.2 Preparar una suspensión densa del microorganismo en análisis, suspendiendo el crecimiento del agar inclinado (8.7.1) en aproximadamente 1 cm³ de solución fisiológica. Tener cuidado para asegurar una suspensión uniforme.

8.7.2.3 En una lámina de vidrio o en la cara interna de una placa Petri de vidrio marcar con un lápiz graso secciones de alrededor 2,5 cm de lado.

8.7.2.4 Poner una gota (0,05 cm³) de la suspensión bacteriana (8.7.2.2) en cada una de dos secciones marcadas, adyacentes.

8.7.2.5 Colocar una gota de solución salina sobre una de las gotas de la suspensión bacteriana. Utilizando un asa de cultivo limpia y estéril, mezclar bien. Es el control negativo de la suspensión bacteriana y no debe aglutinarse. Desechar el cultivo si hay aglutinación.

8.7.2.6 Colocar una gota del antisuero *Salmonella* O poly A sobre la otra gota de la suspensión bacteriana, mezclar bien. Continuar con el poly B.

8.7.2.7 Balancear el porta o la placa Petri, por 1 ó 2 minutos, evitar una evaporación excesiva.

8.7.2.8 Observar la reacción contra un fondo negro, de preferencia con ayuda de una lupa. La aglutinación positiva será rápida y completa. Una aglutinación retrasada o parcial considerarla negativa.

8.7.2.9 Si se obtiene un resultado negativo con poly A o poly B, ensayar con el antisuero *Salmonella* Vi, de la manera indicada.

8.7.2.10 Si el cultivo se aglutina con el antisuero *Salmonella* Vi, calentar la suspensión bacteriana en baño de agua hirviendo durante 10 minutos y enfriar. Una vez fría, volver a ensayarla con el antisuero Vi y con los antisueros O de grupo: D₁, C₁.

(Continúa)

y con los antisueros O de grupo: D₁, C₁.

TABLA 1. Reacciones bioquímicas y serológicas de los miembros del género *Salmonella*.

Prueba o substracto	Positiva	Negativa	Reacción positiva, + o negativa, -	% medio de serotipos que tienen esta reacción (1)
TSI:glucosa-ácido	Columna amarilla	Columna roja	+	100
TSI:glucosa-gas	Burbujas-grietas	Sin burbujas ni grietas	+	91,9
TSI:lactosa-ácido	Lengüeta amarilla	Lengüeta roja	-(a)	99,2
TSI:sacarosa-ácido	Lengüeta amarilla	Lengüeta roja	-	99,5
TSI:H ₂ S	Ennegrecimiento	Sin ennegrecimiento	+	91,6
Ureasa	Color rojo púrpura	Color inalterado	-	100
Decarboxilación de la lisina	Color púrpura	Color amarillo	+	94,6
β-galactosidasa	Color amarillo	Sin cambio	-(a)	98,5
Voges Proskauer	Color rosa a rojo	Color inalterado	-	100
Indol	Anillo púrpura (superficie)	Anillo amarillo	-	98,9
Fenilalanina-desaminasa	Verde-azulado obscuro	Color inalterado	-	100
Utilización de citrato	Crecimiento y color azul	Sin crecimiento y color inalterado.	v	87,1
Suero polivalente "O"	Aglutina	No aglutina	+	100
Suero polivalente "H"	Aglutina	No aglutina	+	100

(1) +, -, indican que las reacciones son positivas o negativas en 1 o 2 días; v, variable. Estos porcentajes solo indican que no todas las cepas de **Salmonella** reaccionan conforme a lo calificado como + ó -. Estos porcentajes pueden variar de país a país y de producto alimenticio a producto alimenticio.

(a) El subgénero III de **Salmonella (Arizona)** puede dar reacciones lactosa y β-galactosidasa positivas; el subgénero II de **Salmonella** puede dar una reacción lactosa negativa, pero una reacción β-galactosidasa positiva.

(Continúa)

8.7.2.11 Si el cultivo después de tratado por el calor no reacciona frente al antisuero Vi, pero reacciona con el antisuero O de grupo D₁, probablemente es *Salmonella typhi*, y *Salmonella paratyphi C* si reacciona con el antisuero de grupo C₁. Confirmar estos resultados utilizando sueros monovalentes.

8.7.2.12 Si el cultivo calentado continúa reaccionando con el antisuero Vi, pero no con los antisueros O de grupo, probablemente es un miembro del género *Citrobacter* y no es *Salmonella*. Confirmar este resultado mediante las pruebas bioquímicas, especialmente lisina-descarboxilasa y KCN.

8.7.2.13 Si el cultivo sin tratamiento térmico (8.7.2.9, 8.7.2.10) no se aglutina con el antisuero Vi, ensayar la muestra con los demás antisueros *Salmonella* polivalentes O.

8.7.2.14 Si hay aglutinación con algún antisuero polivalente y se desea identificar el serogrupo al que pertenece, ensayar la muestra según lo indicado, pero utilizando los correspondientes antisueros O de grupo ó monovalentes.

8.7.3 *Análisis del antígeno flagelar "H"*. Utilizar cultivos puros (8.7.1) en agar nutritivo semisólido y ensayar la muestra según 8.7.2, pero utilizando antisueros H polivalentes o de grupo.

8.7.4 *Clasificación de la reacción*

8.7.4.1 *No específica*, cuando hay aglutinación en ambas mezclas. La mezcla suspensión bacteriana x solución fisiológica debe permanecer inalterada.

8.7.4.2 *Positiva*, cuando los microorganismos se aglutinan en presencia de un antisuero. La mezcla suspensión bacteriana x antisuero forma grumos.

8.7.4.3 *Negativa*, cuando en presencia de un antisuero los microorganismos no se aglutinan, permaneciendo inalterada la mezcla suspensión bacteriana x antisuero.

8.7.5 *Interpretación de los resultados*

8.7.5.1 Son consideradas *Salmonella* aquellas cepas que presentan reacciones bioquímicas típicas (tabla 1) y dan reacciones serológicas positivas según 8.7.2 y 8.7.3.

8.7.5.2 Pueden ser *Salmonella* aquellas cepas que presentan reacciones bioquímicas típicas según la tabla 1, pero que no dan reacciones serológicas positivas según 8.7.2 y 8.7.3, cepas que no presentan reacciones bioquímicas típicas, pero dan reacciones serológicas positivas según 8.7.2 y 8.7.3 y las cepas autoaglutinables que dan reacciones bioquímicas típicas.

8.7.5.3 No son consideradas como *Salmonella* las cepas que no presentan reacciones bioquímicas típicas (tabla 1) y reacciones serológicas positivas según 8.7.2 y 8.7.3.

8.7.6 *Confirmación definitiva*

8.7.6.1 Enviar las cepas consideradas como *Salmonella* (8.7.5.1) y las cepas sospechosas de ser *Salmonella* (8.7.5.2) a un Laboratorio de Referencia para *Salmonella* reconocido para que sean definitivamente tipificadas. Este envío debe ir acompañado de toda la información posible de la cepa(s).

(Continúa)

9. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

9.1 Si en ninguna de las placas de agar selectivo sembradas con el cultivo de enriquecimiento selectivo, se desarrolla colonia alguna de *Salmonella*, reportar: "No se aisló *Salmonella* en 25 g (u otra cantidad) de muestra examinada; el medio sólido selectivo secundario fue (SS, bismuto sulfito...)".

9.2 Si a partir de uno, o de ambos medios de enriquecimiento selectivo, se aísla *Salmonella* en las placas de agar selectivo, reportar: "Se aisló *Salmonella* en 25 g (u otra cantidad) de muestra examinada; el medio(s) de enriquecimiento selectivo fue...; el medio(s) sólido selectivo secundario fue...; las pruebas bioquímicas realizadas fueron:...; los antisueros con que se aglutinó fueron:..., la marca..."

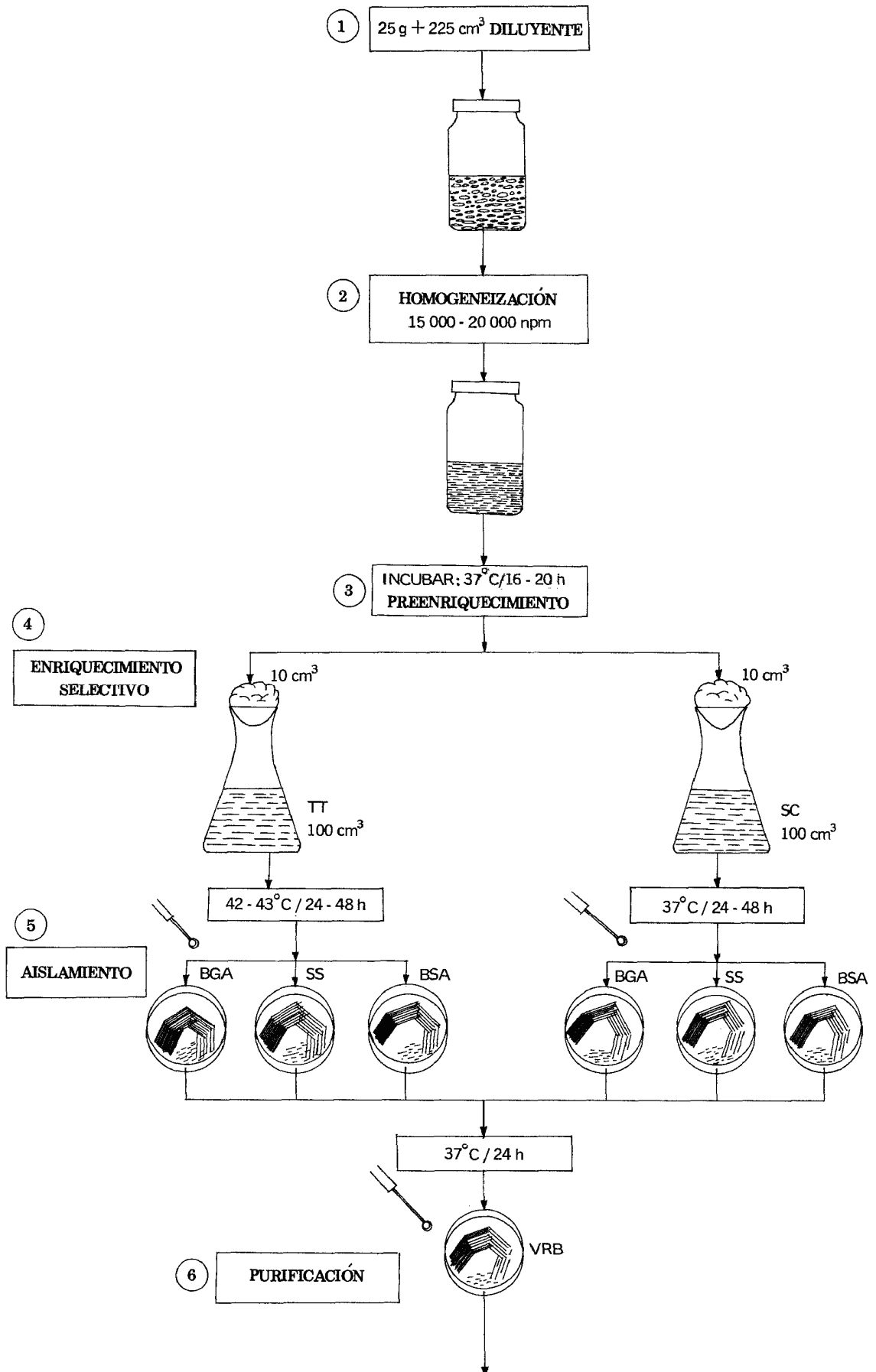
10. INFORME DEL ENSAYO

10.1 En el informe del ensayo reportar el resultado como se indica en el numeral 9. Además, indicar la norma de referencia y el nombre exacto del Centro donde se identificó la cepa.

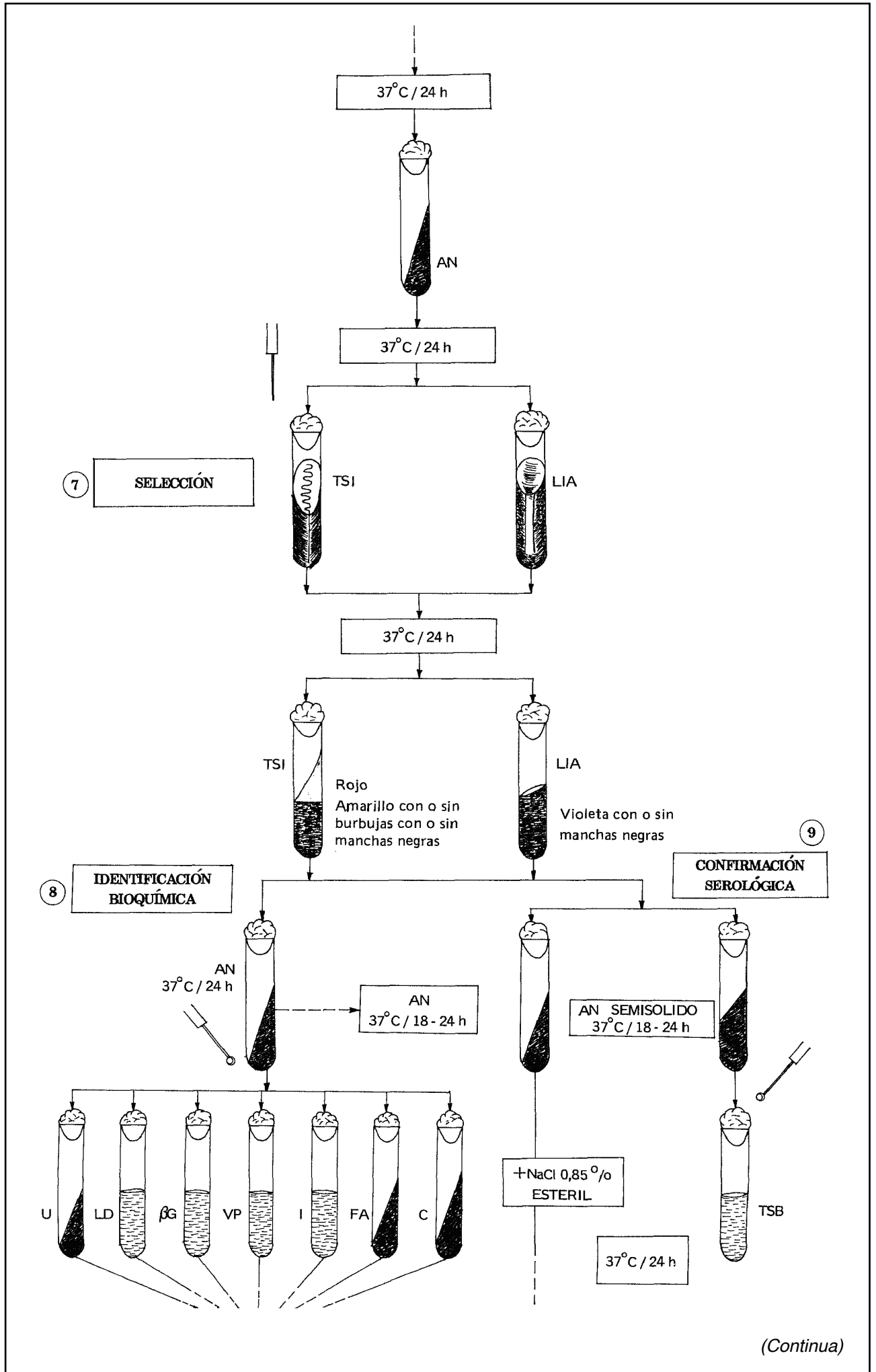
10.2 Indicar cualquier condición no especificada en esta norma o considerada como opcional. El reporte debe incluir todos los detalles necesarios para la completa identificación de la muestra.

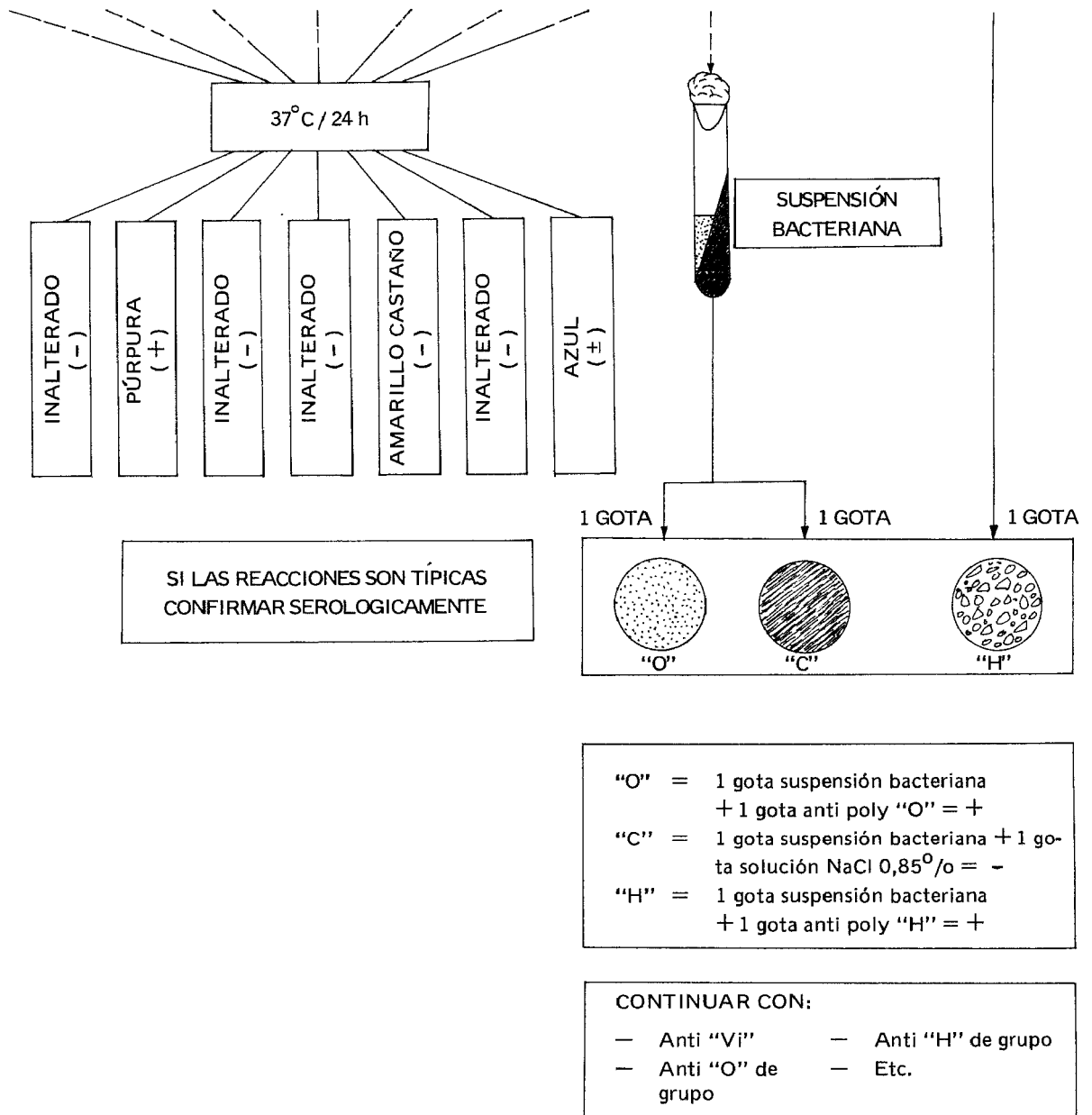
(Continúa)

ANEXO A
DETECCIÓN DE SALMONELLA



(Continua)





(Continúa)

APENDICE Z

Z.1 DOCUMENTOS NORMATIVOS A CONSULTAR

Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-1:1995 *Control microbiológico de los alimentos. Preparación de medios de cultivo.*

Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-2:1995 *Control microbiológico de los alimentos, Toma y preparación de muestras.*

Z.2 BASES DE ESTUDIO

Norma Internacional ISO 3565-1975 *"Meat and meat products". Detection of Salmonellae (Reference method). First Edition.* International Organization for Standardization. Switzerland, 1975.

Manual Food and Drug Administration Bureau of Food Division of Microbiology. *"Bacteriological Analytical Manual"*. Fifth Ed. AOAC. Washington, DC 1978.

Manual Centro Nacional de Alimentación y Nutrición. *"Métodos de Examen Microbiológico para Alimentos y Bebidas"*, Normas Recomendadas. Manual Práctico. Madrid, 1976.

Harrigan, W.F., McCance, M. E. *"Métodos de Laboratorio en Microbiología de Alimentos y Productos Lácteos"*. Academia. León-España, 1979.

Mossel, D.A.A., Moreno García, B. *"Microbiología de los Alimentos"*, 1a. edición española. Acribia. Zaragoza-España.

ICMSF *"Microorganismos de los Alimentos 1"*. Técnicas del Análisis Microbiológico. Acribia. Zaragoza-España

**Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN - Baquerizo Moreno E8-29 y Av. 6 de Diciembre
Casilla 17-01-3999 - Telfs: (593 2)2 501885 al 2 501891 - Fax: (593 2) 2 567815
Dirección General: E-Mail: direccion@inen.gob.ec
Área Técnica de Normalización: E-Mail: normalizacion@inen.gob.ec
Área Técnica de Certificación: E-Mail: certificacion@inen.gob.ec
Área Técnica de Verificación: E-Mail: verificacion@inen.gob.ec
Área Técnica de Servicios Tecnológicos: E-Mail: inenlaboratorios@inen.gob.ec
Regional Guayas: E-Mail: inenguayas@inen.gob.ec
Regional Azuay: E-Mail: inencuenca@inen.gob.ec
Regional Chimborazo: E-Mail: inenriobamba@inen.gob.ec
URL: www.inen.gob.ec**