

INVESTIGACION Y RECUESTRO DE ENTEROBACTERIACEAE LACTOSA-POSITIVA (COLIFOTMES)

Las Enterobacteriaceae lactosa-positivas o grupo coli-aerogenes constituyen un grupo de bacterias que se definen más por las pruebas usadas para su aislamiento que por criterios, taxonómicos. Pertenecen a la familia enterobacteriaceae y se caracterizan por su capacidad para fermentar la lactosa con predicción de ácido y gas, más o menos rápidamente en un periodo de 48 horas y con una temperatura de incubación comprendida entre 30–37°C.

Son bacilos gram negativos, aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados. Del grupo «conformes» forman parte

varios géneros:

- Escherichia.
- Enterobacter.
- Klebsiella.
- Citrobacter.

Se encuentran en el intestino del hombre y de los animales, pero también otros ambientes: suelo, plantas, cáscara de huevo, etc. Aunque su especificidad como indicadores no son buenos, se suelen usar como índice de contaminación fecal por:

- Su frecuencia en heces.
- Su fácil detección en el laboratorio.
- Sus características semejantes, en algún aspecto, a las de algunos miembros patógenos de la familia Enterobacteriaceae.

Dentro de este grupo, son los coliformes fecales los que tienen significado sanitario y por consiguiente, los que más interesan en el análisis microbiológico de alimentos.

Se considera a los coliformes fecales como presuntos Escherichia coli. Sus principales características son:

- Aptitud para desarrollarse entre 43´5–45´5C.
- Capacidad para crecer en presencia de sales biliares.
- Facultad para producir índole en agua de peptona.

En general, niveles altos de Enterobacteriaceae lactosa-positivas (coliformes) indican manipulación y elaboración deficientes de los alimentos.

INVESTIGACION Y RECUESTRO DE ENTEROBACTERIACEAE LACTOSA-POSITIVAS (COLIFORMES)

Investigación y recuento en medio líquido.

Para la detección de Enterobacteriaceae lactosa-positivas (coliformes), se aprovechan ciertas características que las diferencian de otras Enterobacteriaceae como, por ejemplo, su capacidad para fermentar la lactosa con producción de ácido y gas en presencia de sales biliares.

Material:

- Tubos de ensayo de 16x160 mm.
- Gradillas.
- Pipetas estériles de 10 y 1 ml.
- Estufa de cultivo.

Medio de cultivo:

Caldo lactosado biliado verde brillante (Brilliant Green Bile Lactose: BGBL)

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 de ensayo con campana Durham a razón de 10 ml. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Técnica

Se preparan en una gradilla tres series de tres tubos cada una. Cada tubo contendrá 10 ml de BGBL (véase apartado anterior).

- En cada uno de los tubos de la primera serie, se vierte 1 ml de la dilución de la muestra al 1: 10. (-1).
- En cada uno de los tubos de la segunda serie, se vierte 1 ml de la dilución de la muestra al 1: 100 (-2).
- En cada uno de los tubos de la tercera serie, se vierte 1 ml de la dilución de la muestra al 1: 1.000 (-3).
- Incubar las tres series a $31 \pm 1^\circ\text{C}$, haciendo lecturas a las 24 y 48 horas. La reacción es positiva cuando se produce desprendimiento de gas en la campana Durham, por lo menos en 1/10 parte de su volumen, como consecuencia de la fermentación de la lactosa con formación de ácido y gas en presencia de sales biliares a una temperatura comprendida entre 30–37 °C.

Con el número de tubos positivos en cada serie, se recurre a la Tabla del Número Más Probable (NMP), donde se obtendrá el recuento por gramo o mililitro de muestra.

Tabla del Número Más Probable (NMP) por gramo

o mililitro utilizando tres series de tres tubos cada una,

conteniendo 10 ml de medio líquido y sembrando 1 ml

de la dilución 1:10, 1 ml de la dilución 1:100 y 1 ml

de la dilución 1:1.000

Tres tubos Tres tubos Tres tubos NMP de

1 ml 1 ml 1 ml gérmenes

1:10 1:100 1:1.000 g o ml

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

1 2 0 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

3 1 2 120

3 2 0 93

3 2 1 150

3 2 2 210

3 3 0 240

3 3 1 480

3 3 2 1.100

3 3 3 > 2.400

Investigación y recuento en medio sólida

En la técnica que se describe a continuación se utiliza el medio selectivo agar biliado rojo neutro cristal violeta (Violet Red Bile Agar: VRBA).

Material:

- Placas de Petri estériles de 90 mm de diámetro.
- Pipetas estériles de 1ml.
- Estufa de cultivo.
- Cuenta colonias.

Medio de cultivo (preparación del medio de cultivo).

Agar biliado-rojo neutro-cristal violeta (Violet Red Bile Agar: VRBA).

Composición:

- Extracto de levadura 3g.
- Peptona 7g.
- Cloruro sódico 5g.
- Sales biliares 10g.
- Lactosa 5g.
- Rojo neutro 0'03g.
- Cristal violeta 0'02g.
- Agar 15g.
- Agua destilada 1000g.

Disolver los ingredientes por calentamiento. Mantener en ebullición dos minutos. Ajustar el pH a 7,4. NO ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE. Para placas de Petri, se enfriará a 45 °C.

Técnica

A partir de 1a «serie de diluciones de decimales» (ver pág. 11) y por duplicado, se añade 1 ml de cada dilución en placas de Petri estériles; a continuación se vierten unos 15 ml de agar VRBA (véase apartado anterior) atemperado a 47°C. Mezclar cuidadosamente. Una vez solidificado el medio en una superficie horizontal se vierten 3-4 ml del mismo medio estéril sobre cada placa, formando una capa que evita el excesivo crecimiento y la extensión de las colonias, lo que facilita su recuento. Incubar las placas en posición invertida a 31 ± 1°C durante 24 horas.

Las sales biliares y el cristal violeta del medio inhiben la flora acompañante gram positiva. La fermentación de la lactosa hace que vire el indicador rojo neutro a un color rojo púrpura. También, se produce una precipitación de las sales biliares.

La lectura consiste en contar las colonias rojo púrpura rodeadas de una zona de precipitación de las sales biliares color violeta.

Para el recuento se eligen placas que contengan entre 30 y 150 colonias típicas. El número de colonias contadas, multiplicado por el factor de dilución de la placa elegida, da como resultado el número total de Enterobacteriaceae lactosa-positivas (coliformes) por gramo o mililitro de muestra.

INVESTIGACION Y RECuento DE ESCHERICHIA COLI

Escherichia coli es huésped constante del intestino del hombre y de los animales de sangre caliente. Por su especificidad, está considerado como un buen índice de contaminación fecal. Tiene el inconveniente de vivir poco tiempo en el ambiente extraentérico, por lo que su presencia en los alimentos indica contaminación reciente.

Se destruye a temperatura de pasteurización y también durante su almacenamiento en frío, sobre todo a temperatura de congelación.

Su escasa resistencia hace que no sea un buen indicador de flora patógena; así, por ejemplo, es mucho menos resistente que la *Salmonella* a las condiciones ambientales y a la acción del frío.

Pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Es un germen de forma bacilar, casi siempre móvil, gram negativo. Posee estructura antigénica, aunque no suele ser patógeno, existen cepas enteropatógenas para el hombre:

- Cepas enterotoxigénicas (ECET).
- Cepas enteroinvasivas (ECEI).
- Cepas enteropatógenas (ECEP).
- Cepas enterohemorrágicas (ECEH).

Escherichia coli se ajusta a las siguientes características:

Prueba Reacción

Movilidad + (casi siempre)

Indol +

Rojo de metilo +

Voges Proskauer –

Betagalactosidasa +

Citrato de Simmons –

SH2 –

Lisina +

Urea –

Fermentación de la glucosa +

Fermentación de la lactosa +

Material:

- Tubos de ensayo de 16x 160 mm.
- Gradillas.
- Asa de cultivo.
- Baño maría.
- Placas de Petri de 90 mm.
- Pipetas de 1ml.
- Estufa de cultivo.

MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

Caldo lactosado biliado verde brillante (Brilliant Green Bile Lactose: BGBL, ver pág. 18)

Agar Levine:

Composición:

- Peptona 10g.
- Lactosa 10g.
- Fosfato dipotásico 2g.
- Eosina 0´40g.
- Azul de metileno 0´065g.
- Agar 15g.
- Agua destilada 1000 ml.

Disolver por calentamiento. Ajustar el pH a 7´1, distribuir y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Atemperar para preparar placas de Petri.

Agua de triptona (Tryptone Water: TW, ver pág 11).

Reactivo de Kovacs

Composición:

- Paradimetil-amino-benzaldehído 5g.
- Alcohol amílico 75g.
- Ácido clorhídrico puro 25g.

Se disuelve el aldehído en el alcohol calentando a 60°C al baño maría. Dejar enfriar y añadir, gota a gota el ácido. Se obtiene un líquido de color amarillo dorado que debe conservarse en frasco tapado, al abrigo de la luz y en frigorífico.

Agar nutritivo (Plate Count Agar: PCA).

Medio de Clark y Lubs (MR–VP).

Composición:

- Peptona 7g.

- Glucosa 5g.
- Fosfato dipotásico 5g.
- Agua destilada 1000ml.

Disolver por calentamiento. Ajustar el pH a 6´9, distribuir en tubos de 16 x 160 mm a razón de 10 ml. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Reactivo para la prueba de rojo de metilo:

Composición:

- Alcohol de 90° 65 ml.
- Agua destilada 35 ml.
- Rojo de metilo 0´20g.

Se disuelve el colorante en el alcohol y se completa con el agua destilada.

Reactivos para la investigación de acetil–metil–carbinol (prueba de Voges Proskauer: VP):

Composición:

- Reactivo A:

- Alfa–naftol 40g.
- Alcohol absoluto 100ml.

La solución se conserva en oscuridad.

- Reactivo B:

- Hidróxido potásico 40g.
- Agua destilada 100ml.

Creatinina.

Agar citrato de Simmons:

Composición:

- Sulfato magnésico 0´20g.
- Dihidrógeno fosfato amónico 0´20g.
- Fosfato sódico amónico 0´80g.
- Citrato sódico 2g.
- Cloruro sódico 5g.
- Azul de bromotimol 0´08g.
- Agar 15g.
- Agua destilada 1000ml.

Disolver por calentamiento hasta ebullición. Ajustar el pH a 7. Distribuir en tubos de 16 x 160 mm a razón de 7 ml. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Dejar solidificar con una inclinación que permita

obtener un fondo de 2–3 cm y una superficie de 4–5 cm.

Caldo lauril sulfato (MUG):

Composición:

- Triptosa 20g.
- Lactosa 5g.
- Cloruro sódico 5g.
- Lauril-sulfato sódico 0'10g.
- Hidrógeno-fosfato dipotásico 2'75g.
- Hidrógeno-fosfato potásico 2'75g.
- Triptófano 1g.
- Metil-umbiferil-glucurómico 0'10g.
- Agua destilada 1000ml.

Disolver por calentamiento. Ajustar el pH a 7'1. Distribuir en tubos con campana Durham a razón de 10 ml. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

TECNICA

Para la investigación y recuento de E. Coli, se parte de los resultados obtenidos en la investigación de Enterobacteriaceae lactosa-positivas (coliformes), de acuerdo con los siguientes pasos:

Con asa de siembra se subcultivan todos los tubos positivos (con gas) que se han detectado en la investigación de Enterobacteriaceae lactosa-positivas (coliformes), a otros que contengan 10 ml de caldo lactosado verde brillante (BGBL) con campana Durham. Incubar los tubos sembrados en baño María regulado a $44,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ con lectura a las 24 y 48 horas.

La temperatura de incubación es selectiva para Escherichia coli. Se presupone que todo tubo que presente gas después de la incubación es Escherichia coli.

Para su confirmación, a partir de los tubos positivos, se hacen siembras sobre agar Levine, con el fin de obtener colonias aisladas fácilmente identificables. Incubar a $44,5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ con lecturas a las 24 y 48 horas.

Las colonias de E. Coli sobre agar Levine miden 2–3 mm de diámetro, son planas o ligeramente cóncavas, con centros oscuros, casi negros, que ocupan las $\frac{3}{4}$ partes de la colonia. Con luz reflejada, se observa un brillo metálico verdoso; a veces, este brillo metálico no se manifiesta.

Para investigar la producción de indol se siembran 1–2 colonias de cada placa en tubos con TW. Incubar en baño María a $44,5^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Pasado este tiempo se incorporan 0,5 ml del reactivo de Kovacs a cada tubo. La reacción positiva se manifiesta por la formación de un anillo rojo bermellón en la superficie del medio; la reacción negativa muestra anillo amarillento. Escherichia coli, al desaminar e hidrolizar el triptófano del medio, produce indol, que se pone de manifiesto al añadir el reactivo de Kovacs.

Cuando coincide crecimiento positivo (gas) en caldo BGBL a $44,5^{\circ}\text{C}$, producción de indol y crecimiento característico sobre agar Levine, se hace la lectura en la tabla del NMP para obtener el número de E. Coli por gramo o mililitro de muestra.

Otras pruebas de confirmación

Normalmente, basta con las pruebas anteriormente expuestas para la investigación y recuento de E. Coli. No

obstante, en ocasiones es necesario realizar más pruebas de confirmación como, por ejemplo, las IMVC, previa purificación de las colonias en agar nutritivo PCA.

I = indol

M = rojo de metilo

V = Voges Proskauer

C = citrato

Para llevar a cabo las pruebas de rojo de metilo y Voges Proskauer, se siembran dos tubos de medio de Clark y Lubs (MR–VP); por cada colonia que haya que identificar. Incubar a 37°C durante 4 días. En uno de los tubos se investiga el rojo de metilo y en otro el acetil–metil–carbinol (prueba de Voges Proskauer).

Reacción del rojo de metilo

A uno de los tubos que contienen el cultivo sobre el medio de Clark y Lubs (MR–VP), se añaden 1–2 gotas del reactivo rojo de metilo. En caso positivo, se produce una coloración roja; en la reacción negativa, el color es amarillo.

E. coli es un organismo rojo de metilo (RM) positivo.

Investigación de acetil–metil–carbinol (prueba de Voges Proskauer)

Al cultivo obtenido en el otro tubo del medio de Clark y Lubs (MR–VP) se añaden 0,6 ml de reactivo A y 0,2 ml del reactivo B. Agitar la mezcla e intensificar la reacción con unos cristales de creatinina. Hacer la lectura entre los 15 minutos y las 4 horas posteriores a la terminación de la prueba. La reacción positiva se manifiesta por un fuerte color rojo.

E. coli es un germen Voges Proskauer negativo.

Asimilación del citrato

A partir de un cultivo reciente en PCA de la colonia en estudio, se siembra en estría única sobre la superficie inclinada de agar citrato de Simmons. Incubar a 37°C durante 24 horas. La reacción es positiva cuando se produce crecimiento en el medio.

E. coli es una bacteria citrato–negativa, es decir, no crece sobre agar citrato de Simmons, por no utilizar el citrato como única fuente de carbono.

Escherichia coli responde a las pruebas IMVC de la forma siguiente:

Indol (I) = positivo; a veces, negativo

Rojo de metilo (M) = positivo

Voges Proskauer (V) = negativo

Citrato (C) = negativo

PRUEBA RAPIDA PARA INVESTIGACIÓN DE ESCHERICHIA COLI (MUG)

Dentro de la familia Enterobacteriaceae, E. Coli posee, junto con algunas especies de Salmonella y Shigella, la encima B-D-glucuronidasa, que tiene la facultad de romper el sustrato 4-metil-umbelifeeril-B-D-glucurónico (MUG). Esta sustancia, incorporada al medio de cultivo, libera como producto final 4-metil-umberiferona, por acción de la enzima. Este producto tiene la propiedad de emitir fluorescencia azul/verde cuando se ilumina con luz ultravioleta.

Aprovechando esta característica se utilizan medios de cultivo a los que se ha incorporado el sustrato MUG, con la ventaja de poder realizar una prueba rápida para la investigación de E. Coli.

Técnica en medio líquido

Se preparan tres series de tres tubos cada una, cada tubo con 10 ml de caldo lauril sulfato con MUG y campana Durham.

A cada uno de los tres tubos de la primera serie se le añade 1ml de la dilución del alimento al 1:10.

A cada uno de los tres tubos de la segunda serie se le añade 1 ml de la dilución del alimento al 1:100.

A cada uno de los tres tubos de la tercera serie se le añade 1 ml de la dilución del alimento al 1:1000.

Incubar las tres series de tubos a 37°C durante 24 horas.

En la lectura se tendrá en cuenta:

- Si se ha producido gas en la campana Durham por fermentación de la lactosa.
- Si se produce fluorescencia azul/verde por presencia de la enzima B-D-glucuronidasa.
- Si la reacción de indol es positiva al añadir el reactivo de Kovacs.

Deben coincidir: la aparición de gas en la campana Durham, la fluorescencia azul/verde al observar los tubos con luz ultravioleta y la presencia de indol.

Para obtener el número total de E. Coli por gramo o mililitro, se recurre a la Tabla del NMP.

En la investigación de cepas patógenas de Escherichia coli hay que tener en cuenta que las cepas enterohemorrágicas (ECEH) no dan fluorescencia cuando se investigan por una técnica MUG, debido a que no poseen la enzima B-D-glucuronidasa.

INVESTIGACION DE ENTEROBACTERIACEAE TOTALES

Los miembros de la familia Enterobacteriaceae son gérmenes de forma bacilar, gramnegativos, aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados, móviles o inmóviles, que fermentan la glucosa, reducen nitratos a nitritos, son citocromo-oxidasa negativos y crecen en medios que contienen sales biliares. De los integrantes de esta familia, unos fermentan la lactosa y otros no. Incluye los siguientes géneros:

No fermentadores de la lactosa Fermentadores de la lactosa

Salmonella Escherichia

Shigella Enterobacter

Edwardsiella Citrobacter

Hafnia Serratia (a veces)

Proteus Kelbsiella (excep. Kb. Rhinoscleromatis)

Providencia

Yersinia

Morganella

Erwinia (fermenta excepcionalmente)

Las Enterobacteriaceae son indicadoras de contaminación fecal, y su uso como índice ha adquirido gran aceptación en Europa. Se utilizan, preferentemente, para señalar la calidad sanitaria de alimentos procesados. Su presencia a niveles altos en estos productos indica elaboración poco higiénica, contaminación posterior a su fabricación o ambas cosas.

INVESTIGACION Y RECuento DE ENTEROBACTERIACEAE TOTALES EN MEDIO LIQUIDO

Material:

- Pipetas estériles de 1ml.
- Asa de cultivo.
- Estufa de cultivo.
- Cuenta colonias.
- Tubos de ensayo de 16 x 160 mm.
- Gradillas.
- Placas de Petri de 90 mm.

Medios de cultivo y reactivos.

a) Caldo triptona-soja (Tryptone Soy Broth: TSB).

Composición:

- Triptona 17g.
- Soja 3g.
- Dextrosa 2'50g.
- Cloruro sódico 5g.
- Fosfato dipotásico 2'50g.
- Agua destilada 1000ml.

Disolver por calentamiento. Ajustar el pH a 7'3. Distribuir en matraces de 100 ml a razón de 9 ml. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

b) Caldo EE de mossel simple.

Composición:

- Peptona 10g.
- Fosfato sódico 6'50g.
- Dextrosa 5g.
- Fosfato potásico 2g.
- Bilis de buey 20g.
- Verde brillante 0'125g.
- Agua destilada 1000ml.

Disolver por calentamiento. Ajustar el pH a 7'2. Distribuir en tubos de ensayo de 16 x 160 mm a razón de 10 ml. Calentar en baño María a 100°C durante 20 minutos, exactamente. Enfriar inmediatamente en agua del grifo. NO ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE.

c) Agar biliado rojo violeta glucosa (Violet Red Bile Glucose: VRBG).

Composición:

- Extracto de levadura en polvo 3g.
- Peptona 7g.
- Cloruro sódico 5g.
- Sales biliares 1'50g.
- Glucosa 10g.
- Rojo neutro 0'03g.
- Cristal violeta 0'002g.
- Agar 12g.
- Agua destilada 1000ml.

Disolver por calentamiento hasta ebullición. Ajustar el pH a 7'3. NO ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE. Atemperar el medio y preparar placas de Petri.

d) Reactivo para la prueba de citocromo-oxidasa: CO

Composición:

- Clorhidratado de N-dimetil-parafenilendiamina 100ml.
- Agua destilada 100ml.

Esta solución se usa recién preparada. En el comercio existen discos, tiras y varillas.

e) Medio Kliger Iron Agar: KIA

Composición:

- Extracto de carne 3g.
- Extracto de levadura 3g.
- Peptona 20g.
- Cloruro sódico 5g.
- Sulfato ferroso 0'30g.
- Tiosulfato sódico 0'30g.
- Lactosa 10g.
- Glucosa 1g.
- Rojo fenol 0'05g.
- Agar 15g.
- Agua destilada 1000ml.

Disolver por calentamiento. Ajustar el pH a 7'4. Repartir en tubos de 16 x 160 mm a razón de 7ml. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Dejar solidificar en posición inclinada con un fondo de 3–5 cm. El medio se puede utilizar en el transcurso de 5–6 días después de terminar su preparación.

f) Agar nutritivo (Plate Count Agar: PCA).

TECNICA

• Preenriquecimiento:

Se parte de la suspensión madre del alimento (1:10) en caldo triptona soja (TSB). El matraz que contiene la suspensión se deja a temperatura ambiente durante dos horas, agitando de vez en cuando.

• Enriquecimiento:

A partir de la suspensión madre (1:10) del alimento, se hacen diluciones al 1:100 y 1:1000, utilizando como diluyente caldo TSB.

Se preparan tres series de cinco tubos, conteniendo cada uno de ellos 10 ml de caldo de enriquecimiento EE de Mossel simple.

Usando distinta pipeta para cada dilución, se procede de la siguiente forma:

- En la primera serie de cinco tubos se añade a cada tubo 1 ml de la dilución del alimento al 1:10.

- En la segunda serie de cinco tubos se añade a cada tubo 1 ml de la dilución del alimento al 1:100.
- En la tercera serie de cinco tubos se añade a cada tubo 1 ml de la dilución del alimento al 1:1000.

Agitar para mezclar e incubar todas las series a 37° durante 24 horas.

- Identificación de colonias típicas en medio sólido:

Agitar para mezclar bien el contenido de los tubos que presenten crecimiento bacteriano. Con asa de cultivo, sembrar sobre la superficie bien seca de agar biliado rojo violeta (VRBG) contenido en placas de Petri. Incubar a 37°C durante 24 horas.

Las sales biliares y el cristal violeta que forman parte del medio inhiben el crecimiento de la flora competitiva. Todas las Enterobacteriaceae fermentan la glucosa con producción de ácido, lo que se pone de manifiesto por un viraje al rojo y la precipitación de las sales biliares alrededor de las colonias. Hay que tener en cuenta que esta misma reacción la dan en este medio las Aeromonas.

Las colonias de color rojo violeta rodeadas de una halo de precipitación, también violeta, se consideran Enterobacteriaceae.

- Pruebas confirmativas

De las colonias típicas crecidas sobre el medio VRBG, se siembran, como mínimo, dos colonias sobre PCA. Incubar a 37°C durante 24 horas.

Partiendo de este cultivo se realizan las siguientes pruebas confirmativas:

- Prueba de la citocromo-oxidasa

Para la detección de esta enzima, se coloca un trozo de papel Whatman de unos 5 cm² en una placa de Petri vacía. En el centro del papel se depositan tres gotas del reactivo. Con una pipeta Pasteur con la punta cerrada, se toma una porción del cultivo obtenido sobre agar nutritivo y se extiende sobre el papel impregnado de reactivo, en una zona de 4-5 mm. En la reacción positiva aparece un color violeta oscuro en la extensión del cultivo.

Las Enterobacteriaceae son citocromo-oxidasa negativas.

- Prueba sobre agar Kliger (KIA)

El medio lleva incorporados dos azúcares: glucosa y lactosa. También contiene sulfato ferroso, que sirve de indicador de SH₂ cuando, al reducirse, se transforma en sulfuro, de color negro.

En el fondo del tubo se refleja la fermentación de la glucosa, al virar el medio amarillo por acidificación. Esta fermentación puede ir acompañada de desprendimiento de gas, en cuyo caso se cuarteo el medio o se separa del tubo.

En la zona inclinada del medio se refleja la fermentación de la lactosa, al virar el medio a amarillo por acidificación.

Se siembra la cepa en estudio con asa de cultivo, en la superficie inclinada por diseminación y, en el fondo, por picadura. Incubar en estufa a 37°C. La lectura de los resultados se hará SIEMPRE a las 24 horas:

- Fermentación de la glucosa: fondo amarillo.

- No fermentación de la glucosa: fondo sin cambio (rojo grosella).
- Fermentación de la lactosa: superficie inclinada amarilla.
- No fermentación de la lactosa: superficie inclinada alcalina (rojo grosella).
- Gas: burbujas en la masa del medio, entre el medio y el tubo y, a veces, rotura del medio.
- Producción de SH₂: ennegrecimiento en la zona que separa el fondo de la pendiente o en toda la parte inferior del tubo.

Interpretación del medio Kliger Iron Agar

Microorganismo Fondo Superficie SH₂

Enterobacter aerogenes AG A –

Enterobacter cloacae AG A –

Escherichia coli AG A –

Proteus vulgaris AG SC +

Proteus morganii A o AG SC –

Shigella sonnei A SC –

Salmonella typhi A SC o ALC +

Salmonella typhimurium AG SC o ALC +

Salmonella enteritidis AG SC o ALC +

AG = formación de ácido y gas (amarillo y burbujas).

A = formación de ácido (amarillo).

SC = sin cambios.

ALC = alcalino (rojo).

+ = producción de SH₂ (ennegrecimiento).

– = sin ennegrecimiento.

Lectura de resultados:

Se calcula el número de Enterobacteriaceae totales por gramo o milímetro de alimento consultando la tabla del NMP de tres series de cinco tubos, en los tubos que muestren crecimiento en caldo EE de Mossel, los gérmenes sean citocromo-oxidasa negativos y el crecimiento sobre agar Kliger (KIA) corresponda al de las enterobacteriaceae.

Tabla del NMP por gramo o mililitro, utilizando tres series de cinco tubos cada una conteniendo 10 ml de medio líquido y sembrando 1 ml de la dilución 1:10, 1 ml de la dilución 1:1000 y 1 ml de la dilución 1:10000

5 tubos 5 tubos 5 tubos NMP de 5 tubos 5 tubos 5 tubos NMP de

1 ml 1 ml 1 ml gérmenes 1 ml 1 ml 1 ml gérmenes

1:10 1:100 1:1000 g o ml 1:10 1:100 1:1000 g o ml

0 0 0 0 4 0 0 13

0 0 1 2 4 0 1 17

0 0 2 4 4 0 2 21

0 1 0 2 4 0 3 25

0 1 1 4 4 1 0 17

0 1 2 6 4 1 1 21

0 2 0 4 4 1 2 26

0 2 1 6 4 2 0 22

0 3 0 6 4 2 1 26

1 0 0 2 4 2 2 32

1 0 1 4 4 3 0 27

1 0 2 5 4 3 1 33

1 0 3 8 4 3 2 39

1 1 0 4 4 4 0 34

1 1 1 6 4 4 1 40

1 1 2 6 4 5 0 41

1 2 0 6 4 5 1 48

1 2 1 8 5 0 0 23

1 2 2 10 5 0 1 31

1 3 0 8 5 0 2 43

1 3 1 10 5 0 3 58

1 4 0 11 5 0 4 76

2 0 0 5 5 1 0 33

2 0 1 7 5 1 1 46
2 0 2 9 5 1 2 63
2 0 3 12 5 1 3 84
2 1 0 7 5 2 0 49
2 1 1 9 5 2 1 70
2 1 2 12 5 2 2 94
2 2 0 9 5 2 3 120
2 2 1 12 5 2 4 148
2 2 2 24 5 2 5 177
2 3 0 12 5 3 0 79
2 3 1 14 5 3 1 109
2 4 0 15 5 3 2 141
3 0 0 8 5 3 3 175
3 0 1 11 5 3 4 212
3 0 2 13 5 3 5 253
3 1 0 11 5 4 0 130
3 1 1 14 5 4 1 172
3 1 2 17 5 4 2 221
3 1 3 20 5 4 3 278
3 2 0 14 5 4 4 345
3 2 1 17 5 4 5 426
3 2 2 20 5 5 0 240
3 3 0 17 5 5 1 348
3 3 1 21 5 5 2 542
3 4 0 21 5 5 3 920
3 4 1 24 5 5 4 1600

INVESTIGACION Y RECuento DE ENTEROBACTERIACEAE TOTALES EN MEDIO SOLIDO

Material:

- Pipetas estériles de 1 ml.
- Asa de cultivo.
- Placas de Petri de 90 mm estériles.
- Estufa de cultivo.
- Cuente colonias.
- Pipeta Pasteur de punta cerrada.

Medios de cultivo y reactivos:

- Agar biliado-rojo violeta-glucosa (Violet Red Bile Glucose: VRBG)
- Reactivo para la prueba de citocromo-oxidasa (CO).
- Medio Kliger Iron Agar (KIA).
- Agar nutritivo (PCA).

Técnica:

- Aislamiento en medio sólido: a partir de la serie de diluciones decimales y por duplicado, se deposita 1 ml de cada dilución en placas de Petri estériles. A continuación se vierten 15 ml de VRBG atemperado a 45–47°C. Mezclar cuidadosamente y dejar solidificar sobre una superficie horizontal. El agar solidificado se cubre con 10 ml del mismo estéril y se deja solidificar de la misma forma. Incubar en estufa a 37°C durante 18–24 horas.

Contar las colonias de color rojo violeta rodeadas de un precipitado también violeta.

- Confirmación de las colonias: sembrar como mínimo dos colonias típicas sobre PCA. Incubar a 37°C durante 18–24 horas. Con el crecimiento obtenido, se realizan las siguientes pruebas:
 - Prueba de la citocromo-oxidasa.
 - Pruebas de fermentación, gas y SH₂ sobre agar Kliger.
- Recuento de colonias: las colonias características confirmadas se multiplican por el factor de dilución de la placa y darán el número de Enterobacteriaceae totales por grano o milímetro de muestra.