SENA-CENTRO AGROPECUARIO LA GRANJA
ANALISIS MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS
GUIA PARA PRACTICA DE LABORATORIO

Práctica No. 3: ANALISIS MICROBIOLOGICO DE LACTEOS, CARNICOS, HARINAS Y NECTAR

IMPLEMENTOS PARA EL LABORATORIO (por cada grupo):
Muestra: Mínimo 200 gr/ml en un mismo envase. 1 Cuchillo de mesa. 1 Tenedor de mesa. 1 frasco de mayonesa limpio que enrosque en base para licuar marca Oster,

Escoger una muestra por grupo entre:
- Queso fundido (hilado) Grupo 5
- Yogurt o kumis. Que no tenga trozos de fruta Grupo 3
- Néctar pasteurizado. Grupo 4
- Harina de trigo. Grupo 2
- Salchichón. Grupo 1

1. EXAMEN DE QUESO FUNDIDO
- Prepare dilución hasta 10^{-3} teniendo en cuenta las indicaciones dadas.
- Siembre 1 ml en el fondo a cajas de petri por duplicado debidamente marcadas; de las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} y adicionar Agar Chromocult para CT y CF. Invertir las cajas e incubar a 37ºC/24-48 horas. Contar colonias rojas para coliformes y azul rey para *E. coli* o CF. Para CT se suman rojas y azules.
- Siembre 1 ml en el fondo a cajas de petri por duplicado debidamente marcadas; de las diluciones 10^{-2}, 10^{-3}. Adicionar Agar Plate Count para Aerobios Mesófilos. Invertir las cajas e incubar a 37ºC durante 24-48 horas. Contar todas las colonias.
- Siembre 1 ml en el fondo a cajas de petri por duplicado debidamente marcadas; de las diluciones 10^{-1}, 10^{-2}. Adicionar Agar YGC para Mohos y Levaduras. Incubar las cajas e incubar a ambiente por 3 a 5 días.
- Siembre 0,1 ml en superficie a cajas de petri con medio solidificado por duplicado debidamente marcadas; de las diluciones 10^{-1}, 10^{-2}. Con asa de hockey o con la pipeta con que se sembró, dispersar el inóculo sobre el medio hasta que la superficie quede seca:
  a. Para recuento de Estafilococos coagulasa positivo en Agar Baird Parker. Invertir las cajas e incubarlas a 37ºC durante 48 horas. Contar colonias negras y brillantes, con borde reducidos blancos, rodeadas de zonas claras que contrastan con el medio opaco, zona de precipitado. Seguir pruebas confirmativas según procedimientos específicos (numeral 6.1)
  b. Para recuento de *Bacillus cereus* en Agar selectivo para *Bacillus cereus* según Mossel. Invertir las cajas e incubar a 37ºC durante 18-24 horas. Contar colonias rosadas que presentan un halo denso sobre un fondo rojo violeta o Si es agar de OXOID colonias dentadas, de 5 mm de diámetro de color azul turquesa (pavo real) con un precipitado del mismo color sobre un medio de color verde azuloso. Seguir pruebas confirmativas según procedimientos específicos (numeral 6.4)
- Recuento de esporas de Clostridum sulfito reductores: Tomar las diluciones 10^{-1}, 10^{-2} (después de sembrar para determinación de AM, CT, CF y MyL) y hacerles el tratamiento que se describe en los procedimientos específicos (numeral 6.2). Sembrar 1 ml en fondo a cajas de petri por duplicado debidamente marcadas. Invertir las cajas e incubar a 37ºC/24-72 horas en anaerobiosis. Contar las colonias negras.
- Determinación de *Salmonella*. (no se va ha hacer en esta práctica)

Hacer conteo del número de colonias e informe el número por gramo de muestra.

2. EXAMEN DE YOGURT O KUMIS
- Prepare dilución hasta 10^{-2} teniendo en cuenta las indicaciones dadas.
- Siembre 1 ml en el fondo a cajas de petri por duplicado debidamente marcadas; de las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} y adicionar Agar Chromocult para CT y CF. Invertir las cajas e incubar a 37ºC/24-48 horas. Contar colonias rojas para coliformes y azul rey para *E. coli* o CF. Para CT se suman rojas y azules.
- Siembre 1 ml en el fondo a cajas de petri por duplicado debidamente marcadas; de las diluciones 10^{-1}, 10^{-2}. Adicionar Agar YGC para Mohos y Levaduras. Incubar las cajas e incubar a ambiente por 3 a 5 días.

Hacer conteo del número de colonias e informe el número por gramo de muestra.

3. EXAMEN DE HARINA DE TRIGO
- Prepare dilución hasta 10^{-3} teniendo en cuenta las indicaciones dadas.
- Siembre 1 ml ml en el fondo a cajas de petri por duplicado debidamente marcadas; de las dilución 10^{-2} y 10^{-3} para Aerobios Mesófilos, adicionar Agar Plate Count. Invertir las cajas e incubar a 37ºC durante 24-48 horas. Contar todas las colonias.

- Siembre 1 ml en el fondo a cajas de petri por duplicado debidamente marcadas; de las diluciones 10^{-1} 10^{-2} para:
  a. Mohos y Levaduras, adicionar Agar OGY o YGC. Invertir las cajas e incubar a ambiente por 3 a 5 días. Contar todas las colonias.
  b. Coliformes Fecales o *E. coli*, adicionar Agar Chromocult. Invertir las cajas e incubar a 37ºC/24-48 horas. Contar colonias azul rey.
- Siembre 0,1 ml en superficie a cajas de petri con medio solidificado por duplicado debidamente marcadas; de las diluciones 10^{-1}, 10^{-2}. Con asa de hockey o con la pipeta con que se sembró, dispersar el inóculo sobre el medio hasta que la superficie quede seca:
  a. Para recuento de Estafilococos coagulasa positivo en Agar Baird Parker. Invertir las cajas e incubarlas a 37ºC durante 48 horas. Contar colonias negras y brillantes, con borde reducidos blancos, rodeadas de zonas claras que contrastan con el medio opaco, zona de precipitado. Seguir pruebas confirmativas según procedimientos específicos (numeral 6.1)
  b. Para recuento de *Bacillus cereus* en Agar selectivo para Bacillus cereus según Mossel. Invertir las cajas e incubar a 37ºC durante 18-24 horas. Contar colonias rosadas que presentan un halo denso sobre un fondo rojo violeta o Si es agar de OXOID colonias dentadas, de 5 mm de diámetro de color azul turquesa (pavo real) con un precipitado del mismo color sobre un medio de color verde azuloso. Seguir pruebas confirmativas según procedimientos específicos (numeral 6.4)
- Determinación de *Salmonella*. (no se va ha hacer en esta práctica)

Hacer conteo del número de colonias e informe el número por gramo de muestra.

4. EXAMEN DE NECTARES (pasteurizados)

- Prepare dilución hasta 10^{-2} teniendo en cuenta las indicaciones dadas.
- Siembre 1 ml en el fondo a cajas de petri por duplicado debidamente marcadas; de las diluciones 10^{-1}, 10^{-2}.
  a. Para Aerobios Mesófilos, adicionar Agar Plate Count. Invertir las cajas e incubar a 37ºC durante 24-48 horas. Contar todas las colonias.
  b. Para Coliformes Fecales o *E. coli*, adicionar Agar Chromocult. Invertir las cajas e incubar a 37ºC/24-48 horas. Contar colonias azul rey.
  c. Adicionar Agar OGY o YGC para Mohos y Levaduras. Invertir las cajas e incubar a 25ºC (T° ambiente) durante 3 a 5 días. Contar todas las colonias.

Hacer conteo del número de colonias e informe el número por mililitro de muestra.

5. EXAMEN DE SALCHICHÓN (productos cárnicos procesados cocidos embutidos)

- Prepare dilución hasta 10^{-3} teniendo en cuenta las indicaciones dadas.
- Siembre 1 ml en el fondo a cajas de petri por duplicado debidamente marcadas; de las diluciones 10^{-2}, 10^{-3} para Aerobios Mesófilos, adicionar Agar Plate Count. Invertir las cajas e incubar a 37ºC durante 24-48 horas. Contar todas las colonias.
- Siembre 1 ml en el fondo a cajas de petri por duplicado debidamente marcadas; de las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} para Coliformes Totales y Fecales, adicionar Agar Chromocult para CT y CF. Invertir las cajas e incubar a 37ºC/24-48 horas. Contar colonias rojas para coliformes y azul rey para *E. coli* o CF. Para CT se suman rojas y azules.
- Siembre 0,1 ml en superficie a cajas de petri con medio solidificado por duplicado debidamente marcadas; de las diluciones 10^{-1}, 10^{-2}. Para recuento de Estafilococos coagulasa positivo en Agar Baird Parker. Con asa de hockey o con la pipeta con que se sembró, dispersar el inóculo sobre el medio hasta que la superficie quede seca. Invertir las cajas e incubarlas a 37ºC durante 48 horas. Contar colonias negras y brillantes, con borde reducidos blancos, rodeadas de zonas claras que contrastan con el medio opaco, zona de precipitado. Seguir pruebas confirmativas según procedimientos específicos (numeral 6.1)
- Recuento de esporas de Clostridum sulfito reductores: Tomar las diluciones 10^{-1}, 10^{-2} (después de sembrar para determinación de AM, CT, CF y MyL) y hacerles el tratamiento que se describe en los procedimientos específicos (numeral 6.2). Sembrar 1 ml en fondo a cajas de petri por duplicado debidamente marcadas. Invertir las cajas e incubar a 37ºC/24-72 horas en anaerobiosis. Contar las colonias negras.
- Determinación de *Salmonella*. (no se va a hacer en esta práctica)
- Determinación de *Listeria monocytogenes*. (no se va a hacer en esta práctica)

Hacer conteo del número de colonias e informe el número por gramo de muestra.

6. PROCEDIMIENTOS ESPECIFICOS

6.1 <u>Recuento de Estafilococo Coagulasa Positiva</u>

La presencia de *Staphylococcus aureus* en un alimento se interpreta como indicativo de contaminación a partir de piel, boca y fosas nasales de los manipuladores de alimentos, material, equipos sucios y materias primas de origen animal contaminados. Las intoxicaciones estafilocócicas son causadas por la ingestión de alimentos que contienen una de las enterotoxinas producidas por el *Staphylococcus aureus* en el alimento.

Procedimiento

- Preparar las placas de Agar Baird Parker, dejar solidificar y secar la superficie de las placas.
- Preparar la muestra y las diluciones de los homogenizados tal como se ha recomendado
- Pipetear 0.1 mL de cada una de las diluciones sobre la superficie del Agar
- Extender el inóculo sobre la superficie del Agar, con la ayuda de la varilla de hockey, hasta que la superficie quede seca. Si no se tiene hacerlo con la pipeta utilizada para la siembra.
- Invertir las placas e incubarlas a 35ºC ± 2 ºC durante 48 horas.
- Seleccionar las placas que presenten entre 20 y 200 colonias aisladas y contar las colonias negras y brillantes, con bordes reducidos blancos, rodeadas de zonas claras que contrastan con el medio opaco, zona de precipitado.
- Tomar un mínimo de 3 colonias y realizar la prueba de la coagulasa

Prueba de la coagulasa

- Transferir el número de colonias a confirmar a un número igual de tubos que contienen 5 ml de caldo infusión cerebro corazón. (BHI)
- Hacer un control positivo sembrando una cepa de estafilococo coagulasa positiva en un Caldo BHI
- Incubar a 35ºC ± 2ºC durante 18 -24 horas
- Pasado este tiempo, transferir 0,3 ml de cada uno de los cultivos de Caldo infusión cerebro corazón (BHI) a tubos que contienen 0,3 ml de plasma deshidratado de conejo E.D.T.A.
- Transferir a un tubo 0,3 ml de plasma deshidratado de conejo como control negativo.
- lncubar a 35ºC ± 2ºC. Observar cada hora, durante 6 horas. En caso negativo descartar hasta las 24 horas
- Una vez finalizado el tiempo de incubación, hacer la lectura con base en los tubos que presentan coagulación del plasma comparándolos con los controles positivo y negativo
- Sobre el número total de colonias después de las 48 horas de incubación y la proporción de colonias confirmadas por la prueba de la coagulasa, hacer el cálculo de estafilococo coagulasa positiva, utilizando como factor de corrección la relación:.

$$\frac{\textbf{Colonias positivas}}{\textbf{colonias examinadas}}$$

Ejemplo:

Recuento en 10^{-2}: 35 colonias =3.500 colonias examinadas = 5
colonias positivas = 4

$$3500 \times \frac{4}{5} = \textbf{2800 ufc /g o ml}$$

Ausencia de colonias; expresar los resultados como:
Estafilococo coagulasa positiva <100 ufc/ g o ml

6.2 Recuento de formas esporuladas de clostridium sulfito reductores

Para obtener únicamente las formas esporuladas de Clostridium sulfito reductores se aprovecha su termorresistencia calentando a 80ºC el producto, la suspensión madre o las diluciones decimales. De ésta manera, se destruyen las formas vegetativas.

- Tomar 5 ml de cada una de las diluciones decimales y calentar en baño María a 80ºC/10 minutos. Enfriar inmediatamente bajo el grifo.
- Regeneración del medio de cultivo. El agar SPS se funde y regenera calentándolo en agua hirviendo durante 10 minutos para expulsar el oxígeno. Después se enfría a 45ºC bajo un chorro de agua fría.
- A partir de la serie de diluciones decimales, calentada a 80ºC durante 10 minutos, siembre 1 ml de cada dilución por duplicado sobre cajas de petri.
- Adicionar 15 mililitros del agar SPS. Incubar en jarra para anaerobios o en su defecto agregar una capa de medio adicional, parafina o vaselina, después de solidificado el medio. Temperatura de incubación: 37ºC durante 24-72 horas.
- Revisar cada 24 horas las cajas y realizar recuentos parciales.

Hacer conteo del número de colonias negras y exprese los resultados como UFC de Esporas Clostridium sulfito reductor /g o ml. Rango 20-200.

6.3 Detección de *Salmonella sp*

La única vía de entrada de la *Salmonella* en el cuerno humano es la oral, por lo que es de suma importancia el análisis de los alimentos para detectar su presencia. Todas las especies deben ser consideradas como potencialmente patógenas para el hombre. La presencia de *Salmonella* sp en productos procesados térmicamente, indica tratamiento inadecuado o contaminación pos proceso.

Aún no es posible recomendar un solo método para el aislamiento y la identificación de *Salmonella*. que sea completamente satisfactorio para todos los alimentos. Los métodos que se utilizan son similares en principio; comprenden varias etapas sucesivas: enriquecimiento no selectivo, enriquecimiento selectivo, siembra en placas con medios sólidos selectivos y diferenciales, caracterización bioquímica de las colonias sospechosas, confirmación serológica y tipificación por medio de bacteriófagos.

Procedimiento:

I. Enriquecimiento no selectivo

- Pesar en la bolsa para "stomacher" previamente tarada 25 g representativos de la muestra total (tomando tanto de la superficie corno de su interior).
- Añadir 225 mL de agua de peptona tamponada (medio de enriquecimiento no selectivo). En nuestro caso se hace en erlenmeyer de 500 ml con agua de peptona tamponada o caldo lactosado; y a esto se añade los 25 g de muestra.
- Cuando se analiza leche en polvo, utilizar agua destilada adicionada de 5 mL de solución verde brillante al 0.1 %.
- Colocar la bolsa en el "stomaeher" y hacer funcionar el aparato por 2 minutos, el tiempo máximo de homogenización dependerá del tipo de alimento. No debe sobrepasar los 3 minutos.
- Incubarar a 33ºC ± 2 por l8-24horas.
- Realizar controles positivo y negativo con cepas conocidas.

II. Enriquecimiento selectivo

- Transferir 1 mL de cultivo obtenido del enriquecimiento no selectivo en 10 mL de Caldo Selenito cistina.
- Incubar en baño de agua a 43º C +/ - 0.2 por 48 - 24 horas.
- Transferir 1 mL de cultivo obtenido del enriquecimiento no selectivo en 10 mL de Caldo tetrationato, adicionado de 0.2 mL de solución de yodo y 0.1 mL de solución acuosa de verde brillante al 0.1 %.
- Incubar en baño de agua 43ºC + / - 0.2 por 18 - 24 horas

III. Siembra en placa con medios selectivos y diferenciales

Se deben utilizar mínimo dos medios selectivos por cada caldo de enriquecimiento no selectivo y selectivo, para el aislamiento del microorganismo. EL laboratorio puede utilizar el medio diferencial de su elección, se recomienda el Agar bismuto sulfito, el Agar verde brillante lactosa sacarosa con novobiocina y el Agar XLD.

- A partir de cada uno de los cultivos obtenidos del enriquecimiento no selectivo y selectivo, sembrar en superficie con asa por agotamiento placas con Agar verde brillante lactosa-sacarosa, Agar bimuto sulfito o Agar XLD.
- Incubar las placas a 35ºC ± 2 durante 24-48 horas
- Escoger 3 colonias típicas sospechosas de *Salmonella* (lactosa negativa)
- Aislarlas en Agar selectivo para garantizar su pureza.
- Proceder a su identificación

IV. Identificación de Salmonella

La identificación de cultivos sospechosos de pertenecer al género *Salmonella sp* incluye dos etapas seguidas: Comprobación de las colonias sospechosas mediante pruebas bioquímicas determinativas. Identificación serológica de las cepas sospechosas mediante el uso de antisueros:

1. *Identificación de Salmonella mediante pruebas bioquímicas:*

- Coloración de Gram: Hacer frotis de cada una de las colonias seleccionadas y colorearlas por el método de Gram. *Salmonella*: bacilo Gram negativo, no.
- Prueba de la Oxidasa: En una caja de petrí, colocar papel de filtro e impregnarlo con el reactivo para oxidasa. Hacer un extendido, con asa de vidrio o palillo de madera, de una colonia sospechosa, sobre el papel de filtro impregnado con el reactivo, siguiendo una línea de 3 a 6 mm de longitud. Si se produce un cambio de color a azul o violeta indica una prueba positiva.
- Fermentación de carbohidratos: inocular con asa los tubos que contienen cada uno de los carbohidratos glucosa, lactosa y sacarosa. Incubar a 35ºC ± 2 por 24 - 48 horas. Si se produce un cambio de color, según el indicador de pH utilizado, la reacción es positiva.
- Prueba de la Lisina decarboxilasa: inocular con asa el tubo con el aminoácido L-lisina, colocar una capa de aceite mineral estéril. Incubar a 35ºC +/- 2ºC por 24 - 48 horas. El cambio de color a púrpura indica una prueba positiva.
- Movilidad: Inocular con asa recta por punción central, a una profundidad de ¼ a ½ pulgada, tubos con Agar movilidad, Incubar a 35ºC +/- 2ºC por 24 - 48 horas. El crecimiento es positivo si el microorganismo migra de la línea de siembra se difunde a través del medio. Cuando es inmóvil sólo crece en la línea de siembra.
- Reducción de nitrato: inocular con asa recta tubos de caldo nitrato. Incubar a 35º C +/- 2º C por 24 - 48 horas. Revelar la prueba de nitrato añadiendo unos miligramos del reactivo de Griess y observar el color que presenta. La aparición de un color rojo, indica presencia de nitritos (positividad); en el caso de que no ocurra cambio de color añadir unos miligramos de polvo de Zinc para determinar la presencia de nitrato residual. La aparición de un color rojo indica presencia de nitrato residual en el medio y por lo tanto una reacción negativa.

- Reacción en Agar hierro triple azúcar: Inocular cada uno de los tubos de Agar TSJ, sembrando por estría la parte inclinada y por picadura la columna del medio. Incubar a 35ºC ±/- 2ºC por 24- 48 horas. Los cultivos de *Salmonella* producirán una reacción K/A con producción de gas, y producción de H_2S.
- Reacción en Agar citrato de Simnions: inocular cada uno de los tubos de Agar citrato de Simons, sembrando por picadura la columna del medio. Incubar a 35º C +/- 2º C por 24 - 48 horas. Una reacción positiva estará dada por un un viraje del color verde a azul intenso.
- Reacción de LIA: Inocular cada uno de los tubos de Agar LIA, sembrando por doble picadura la columna del medio y por estría la superficie. Incubar a 35º C +/- 2º C por 24-48 horas. Los cultivos de *Salmonella* producirán una reacción K/K.
- Reacción en Agar urea: Inocular cada uno de los tubos de Agar urea, sembrando por estría la parte inclinada. Incubar a 35 ºC +/- 2º C por 24 - 48 horas. Se observa una reacción positiva cuando el color del medio vira a rosado violeta.
- Desaminación de la fenilalanina (APP): Inocular cada uno de los tubos de Agar fenilalanina, sembrando por estría la parte inclinada. Incubar a 35º C ± 2ºC por 24 - 48 horas. Revelar añadiendo 3 a 5 gotas de cloruro férrico al 10% sobre la estría decrecimiento. Un color verde indica positividad de la reacción.
- Producción de Indol: Inocular cada uno de los tubos de Caldo triptófano. Incubar a 35 ºC +/- 2 ºC por 24-48 horas. Revelar añadiendo 3 a 5 gotas de reactivo de Kovac's. Un anillo color cereza en la superficie del medio indica una reacción positiva.
- Rojo de metilo - Voges Proskauer (MR-VP): Inocular dos de los tubos con caldo MR-VP. Incubar a 35ºC +/- 2ºC c por 24-48 horas. Revelar el rojo de metilo (MR) agregando a uno de los tubos de 4 a 6 gotas de rojo de metilo. Un color rojo indica positividad de la reacción. Revelar el Voges Proskauer (VP), añadiendo en el otro tubo, 0.6 mL de alfa naftol al 5% y 12 mL de solución acuosa de hidróxido de potasio al 40%. Agitar el tubo suavemente y dejar en reposo por 10 minutos. Un color rojo indica positividad de la reacción.

6.4 Recuento de *Bacillus cereus*

Bacillus cereus es un microorganismo aerobio, Gram positivo, esporulado, común en el suelo, vegetales, alimentos crudos y procesados. Cuando se encuentra un número alto, mayor de 10^6 microbios/gr en un alimento puede ocasionar toxiinfección alimentaria.

Procedimiento

- Preparar las placas de Agar selectivo para cereus (15 ml de medio aproximadamente por placa), dejar solidificar y secarla superficie de las placas.
- Preparar la muestra y las diluciones de los homogenizados tal como se ha recomendado.
- Pipetear 0.1 mL de cada una de las diluciones sobre la superficie del Agar
- Extender el inóculo sobre toda la superficie del Agar, con la ayuda de la varilla de hockey, hasta que la superficie quede seca. Si no se tiene hacerlo con la pipeta utilizada para la siembra.
- Invertir las placas e incubarlas a 35ºC + /- 2ºC durante 18-24 horas
- Contar las colonias rosadas (manitol negativo) que presenten un halo denso (lecitina positiva) sobre un fondo rojo violeta. . Si es agar de OXOID entonces las colonias se ven dentadas, de aproximadamente 5 mm de diámetro de color azul turquesa (pavo real) con un precipitado del mismo color sobre un medio de color verde azuloso (no debe haber viraje a amarillo, ya que *B. cereus* es manitol negativo).
- Tomar como mínimo 3 colonias típicas y colorearlas por el método de Gram. Se observan bacilos Gram positivos, con extremos cuadrados, en cadenas cortas o largas, con esporas elipsoidales, centrales o subterminales de pared fina que no deforman el bacilo.

Confirmación bioquímica de las colonias de *Bacillus cereus*

Inocular con asa los tubos de los caldos glucosa, xilosa, arabinosa, el caldo nitrato y el caldo glucosa tamponado.
Sembrar por estría el Agar leche, Agar almidón y Agar gelatina. Incubar a 35ºC +/- 2ºC durante 48 horas. Pasado este tiempo revelar las pruebas bioquímicas:

Bioquímica del *Bacillus cereus*

Fermentación de Manitol	-	Fermentación de arabinosa	-
Presencia de lecitinasa	+	Hidrólisis de la gelatina	+
Fermentación de Glucosa	+ (sin gas)	Hidrólisis de la caseina	+
Reducción de Nitrato	+/-	Hidrólisis almidón	+
Fermentación de Xilosa	-	Acetil-metil-carbinol	+

Sobre el número total de colonias después de las 48 horas de incubación y la colonias confirmadas por las pruebas bioquímicas, hacer el cálculo utilizando corrección la siguiente relación:

$$\frac{\textbf{colonias positivas}}{\textbf{colonias examinadas}}$$

Ejemplo:

Dilución 10^{-2}: 6 colonias = 600 colonias examinadas = 3
colonias positivas = 2

$$\frac{600 \times 2}{3} = 400 \text{ ufc / gr o ml}$$

Ausencia de colonias: expresar el resultado como: ***Bacillus cereus*** **< 100 ufc / gr o ml.**

6.5 Prueba de Esterilidad

Esterilidad comercial de un alimento tratado térmicamente, es el estado que se consigue aplicando calor suficiente, solo o en combinación con otros tratamientos apropiados, con el objeto de liberar el alimento de microorganismos patógenos y de otros capaces de reproducirse en él en condiciones normales no refrigeradas en las que se mantendrá probablemente el alimento durante su distribución y almacenamiento. Este procedimiento analítico determina si los alimentos envasados en recipientes herméticamente cerrados cumplen con el requisito de esterilización comercial al que se sometieron y se aplica a todos aquellos alimentos catalogados como comercialmente estériles.

Procedimiento:

El análisis de esterilidad incluye las siguientes etapas:

I. Preparación de la muestra
II: Preincubación de las latas
III. Preparación de las latas para el análisis
IV. Análisis del contenido de la lata
V. Lectura al microscopio

I. Preparación de la muestra

Las dos latas que componen la muestra deben pertenecer al mismo lote de producción.

Retirar las etiquetas de las latas

- Lavar las latas con agua tibia jabonosa
- Enjuagar con agua tibia y secar con toallas limpias desechables
- Envolver cada lata en papel de filtro, con el objeto de descubrir cualquier escape dcl producto. -
- Marcar las latas con fecha, número de muestra y temperatura de incubación

II. Preincubación

- Incubar una lata a 35ºC +/- 2ºC durante 10 días y otra lata a 55º C +/- 2ºC durante 10 días.
- Observar las latas cada dos días, con el objeto de descubrir cualquier escape del producto (microfugas).
- Separar y examinar inmediatamente aquellas que muestren abombamiento o escape de material.
- Agitar las latas no alteradas e invertir su posición.

III. Preparación de las latas para su Análisis

- Desinfectar con alcohol al 70% todas las latas a examinar,
- Flamear rápidamente la parte que va a abrirse. No hacerlo nunca con latas abombadas.
- No abrir la tapa o fondo que lleva impreso el número de control, código o lote
- Abrir la lata trabajando en la cabina de flujo laminar y eliminar totalmente la tapa.
- Cubrir la lata abierta con la base de una caja de Petri estéril.

IV. Análisis del contenido de la lata

Transferir aproximadamente 2 gramos del producto (tomando todas las partes representativas) a cada uno de los 6 tubos que contienen 10 mL de Caldo de infusión cerebro-corazón, adicionados de 0.1% de almidón. Incubar 3 tubos en anaerobiosis y 3 tubos en aerobiosis a la misma temperatura de preincubación (35º C +/- 2 ºC y 55 ºC +/- 2º C) por 72 horas. Realizar un frotis directo del producto sobre la lámina limpia y desengrasada y colorearla con Gram, contar las células bacterianas por campo. Un número elevado indicará pésimas condiciones de higiene durante la preparación del producto y/o utilización de materias primas muy contaminadas.

V. Lectura

Hacer frotis de cada tubo sembrado y colorear con Gram para determinar el tipo de gérmenes presentes. Considerar que el producto es estéril cuando máximo, un tubo aerobio muestre desarrollo.

NORMAS DERIVADOS LACTEOS: Resolución 2310/86, Resolución 1804/89. Consultar otras normas actualizadas.
NORMAS DERIVADOS FRUTAS: Resolución 3929 de 2013. Consultar otras normas actualizadas.
NORMAS PRODUCTOS PANIFICACIÓN: Harina de Trigo: NTC 267 (Séptima actualización).
NORMAS DERIVADOS CARNICOS: NTC 1325 (Quinta actualización)