

**NORMA
VENEZOLANA**

**COVENIN
1292-89**

**ALIMENTOS.
AISLAMIENTO Y RECUENTO DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS.**

(1^{ra}. REVISION)



COVENIN
1292-89

NORMA
VENEZOLANA

PRÓLOGO

La presente norma sustituye a la Norma Venezolana COVENIN 1292-79 Alimentos. Detección y recuento de Staphylococcus aureus.



TRAMITE

COMITE CT-10 PRODUCTOS ALIMENTICIOS

PRESIDENTE: DRA. FANNY CARRILLO DE PADILLA

SECRETARIA: LIC. GISELA PADRON

SUBCOMITE: CT10/SC3 MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS

COORDINADORA: LIC. GISELA PADRON

PARTICIPANTES

ENIDAD

REPRESENTANTES

MINISTERIO DE SANIDAD Y ASISTENCIA SOCIAL

VICKAR DE PERNIA
DOUGLAS YANEZ

INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE

MARIA LUISA NOVOA
MANUELA RIOS
BETSI BASTARDO

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE FARMACIA

CARMEN ELENA GARCIA

UNIVERSIDAD SIMON BOLIVAR

SILVIA MENDOZA
MARISA GUERRA

ASOCIACION DE INDUSTRIALES
DE LA CARNE

MARIA LUISA MORASSUTTI
MARINILDA PINEDO

ASOCIACION AMERICANA DE SOYA

JOSE FELIX CHAVEZ

FUNDACION CIEPE

ISMENIA DE MENDEZ
EUMELIA GOMEZ

BRDLAB s.r.l.

OLGAMAR FRANCESCHI

INDULAC

MIROSLAVA MORLES
ZULIA GRAFF

DISCUSION PUBLICA:

13/08/89

FECHA DE ENVIO: 28-08-89

RECEIVED DIRECTOR GENERAL

DURACION: 45 DIAS

FECHA DE APROBACION POR EL COMITE: 02-11-89

COMITE DE ASESORIA

FECHA DE APROBACION POR LA COVENIN: 06-12-89

COMITE DE ASESORIA

COMITE DE ASESORIA

13/08/89

SECRETARIA

SECRETARIA

MINISTRO DE RECURSOS HUMANOS

MINISTERIO DE RECURSOS HUMANOS

MINISTRO DE ECONOMIA Y FINANZAS

MINISTERIO DE ECONOMIA Y FINANZAS

MINISTRO DE LA PRESIDENCIA

MINISTERIO DE LA PRESIDENCIA

MINISTRO DE LA DEFENSA

MINISTERIO DE LA DEFENSA

MINISTRO DE LA INDUSTRIA Y COMERCIO

MINISTERIO DE LA INDUSTRIA Y COMERCIO

MINISTRO DE LA AGRICULTURA

MINISTERIO DE LA AGRICULTURA

MINISTRO DE LA SALUD

MINISTERIO DE LA SALUD

MINISTRO DE LA EDUCACION

MINISTERIO DE LA EDUCACION

MINISTRO DE LA CULTURA

MINISTERIO DE LA CULTURA

NORMA VENEZOLANA
ALIMENTOS
AISLAMIENTO Y RECUENTO
DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

COVENIN

1292-89

1^{ra} Revisión

1 NORMAS COVENIN A CONSULTAR

- COVENIN 1126-89 Alimentos. Identificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico.
- COVENIN 902-87 Alimentos. Método para recuento de colonias de bacterias aerobias en placas de Petri.

2 OBJETO Y CAMPO DE APLICACION

Esta Norma Venezolana contempla el método de ensayo para la determinación cuantitativa de Staphylococcus aureus mediante la utilización de un medio de cultivo sólido apropiado, en placas de Petri.

3 PRINCIPIO

- 3.1 El método consiste en sembrar un volumen dado de una muestra representativa y homogénea del alimento a analizar y/o diluciones de la misma, en la superficie de un medio de enriquecimiento sólido selectivo repartido en placas de Petri.
- 3.2 Después del periodo de incubación, se determina el número de colonias características, se efectúa una coloración de Gram y luego se confirma mediante la prueba de la coagulasa; si el resultado de esta prueba es dudoso, se procede a practicar la prueba de la nucleasa termoestable.

4 EQUIPO E INSTRUMENTOS

- 4.1 Equipo para la preparación de muestras (según Norma Venezolana COVENIN 1126).
- 4.2 Incubadora, regulada a una temperatura entre 35°C y 37°C.
- 4.3 Contador de colonias
- 4.4 Placas de Petri, de 15 mm x 100 mm, estériles.
- 4.5 Bradillas para tubos de ensayo.
- 4.6 Varillas de vidrio, estériles.
- 4.7 Láminas porta-objeto.
- 4.8 Tubos de 10 mm x 75 mm, estériles, para la prueba de la coagulasa.

4.9 Pipetas Pasteur, estériles.

4.10 Cámara húmeda, preparada en el laboratorio o estufa especial con sistema de humedad controlada.

4.11 Sistema de vacío.

4.12 Equipo de uso común en el laboratorio.

5 MEDIOS DE CULTIVO

5.1 DILUENTES

5.1.1 Solución tampón fosfato (solución de Butterfield) (ver Norma Venezolana COVENIN 1126).

5.1.2 Agua peptonada al 0,1% (ver Norma Venezolana COVENIN 1126)

5.2 MEDIOS DE CULTIVO (ver su preparación en el Anexo 1).

5.2.1 Agar Baird Parker

5.2.2 Agar leche-sal.

5.2.3 Agar nutritivo.

5.2.4 Caldo infusión cerebro-corazón.

5.2.5 Plasma de conejo o porcino toado con EDTA o heparina.

5.2.6 Agar ADN - azul de toluidina.

6 MATERIAL A ENSAYAR

El material a ensayar consiste en una muestra representativa del alimento tomada según la Norma Venezolana COVENIN correspondiente.

7 PROCEDIMIENTO

7.1 PREPARACION DE LA MUESTRA

La muestra se identifica y prepara según la Norma Venezolana COVENIN 1126.

7.2 AISLAMIENTO Y RECUENTO DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS.

7.2.1 En el caso de alimentos donde sea necesario detectar cantidades iguales o inferiores a 100 ufc/g o ml, se coloca mediante una pipeta estéril 1 ml de la muestra o de diluciones de la misma, en la superficie de 3 placas de Petri que contengan agar Baird Parker o agar leche-sal, previamente secadas, distribuyendo

en cantidades de 0,4 ml, 0,3 ml y 0,3 ml respectivamente.

7.2.2 En el caso de alimentos donde interese detectar cantidades superiores a 100 ufc/g o ml, se coloca mediante una pipeta estéril 0,1 ml de la muestra o de diluciones de la misma, en la superficie de cada una de dos placas de Petri que contengan agar Baird Parker o agar leche-sal previamente secadas.

7.2.3 Se extiende el inóculo sobre la superficie de los medios con una varilla de vidrio hasta absorción completa, en el caso de placas con 0,1 ml de inóculo. Para el caso de placas con inóculos mayores éstas deben colocarse en posición normal después de hacer el extendido hasta que se observe completa absorción del inóculo. Para cada dilución debe emplearse una varilla estéril.

7.2.4 Se incuban las placas invertidas, a una temperatura de 35-37°C durante 24 a 48 horas.

7.2.5 Al final del periodo de incubación se eligen las placas que tengan 20-200 colonias que presenten las características que se indican a continuación:

7.2.5.1 Agar Baird Parker
Colonias negras brillantes rodeadas de una zona reducida blanca y por una zona de aclaramiento que se extiende en el medio opaco.

7.2.5.2 Agar leche-sal

Colonias lisas y redondeadas con bordes enteros; pueden estar o no rodeadas por una zona opaca o por un área de aclaramiento.

7.2.6 Esto representa un recuento presuntivo de Staphylococcus aureus; para su confirmación se procede a realizar la prueba de la coagulasa.

7.3 PRUEBA DE LA COAGULASA

7.3.1 De cada una de las placas se seleccionan al menos 2 colonias de cada tipo para realizar la prueba.

7.3.2 Las colonias seleccionadas se transfieren a tubos con 0,2 - 0,3 ml de caldo infusión cerebro-corazón y se emulsionan cuidadosamente. Se siembra a continuación un agar nutritivo con una asa de la suspensión del caldo infusión cerebro-corazón.

7.3.3 Se incuban ambos medios a una temperatura de 35 - 37°C durante 18 a 24 horas.

7.3.4 Al final del periodo de incubación se realiza una coloración Gram con el cultivo del agar nutritivo. Si se observa la morfología típica de S. aureus, cocos Gram (+) de 0,8 - 1,0 μ m de diámetro, solos, en pares o más típicamente en agrupaciones irregulares semejantes a los racimos de uvas, se procede a realizar la prueba de la coagulasa.

7.3.5 Se añaden 0,5 ml de plasma para la prueba de la coagulasa al cultivo en caldo infusión cerebro-corazón y se mezcla cuidadosamente. Se incuba a 35 - 37°C y se examina inclinando suavemente los tubos, durante un lapso de 6 horas para observar la formación de un coágulo.

7.3.6 En caso dudoso, se continúa la incubación a la misma temperatura por no más de 24 horas.

7.3.7 Para determinar el grado de positividad de la prueba de la coagulasa debe hacerse referencia a la figura No. 1.

7.3.8 Cultivos que presenten grados de positividad 1+, 2+ para la prueba de la coagulasa, deben ser confirmados como *S. aureus* mediante la prueba de la nucleasa termoestable.

7.4 PRUEBA DE LA NUCLEASA TERMOESTABLE

7.4.1 Se prepara una lámina portaobjeto añadiendo en la superficie 3 ml de agar ADN-azul de toluidina. Cuando esté solidificado el agar se hacen orificios de 2 mm de diámetro sobre la superficie del mismo mediante la ayuda de una pipeta Pasteur (de 10 a 12 orificios por lámina). Se remueven los pequeños tacos de agar por aspiración mediante vacío.

7.4.2 A cada orificio se añade aproximadamente 0,01 ml del cultivo del germen en caldo infusión cerebro-corazón, previamente calentado en baño de agua hirviendo por 15 minutos.

7.4.3 Se incuban las láminas en una cámara húmeda durante 4 horas a una temperatura de 35 - 37°C.

7.4.4 Al final de las 4 h de incubación se observan las láminas. Una reacción positiva es la aparición de halos rosados que se extienden al menos 1 mm desde la periferia de los orificios.

NOTA:

Ambas pruebas deben realizarse incluyendo controles negativos y cultivos controles de *S. aureus* positivos.

B EXPRESION DE LOS RESULTADOS

8.1 Si la prueba de la coagulasa o de la nucleasa termoestable resultan positivas se considerará el recuento presuntivo como confirmativo de *Staphylococcus aureus*.

8.2 El número de colonias obtenido cuando se siembra 1 ml en 3 placas, se suma para obtener el número de colonias por mililitro de la dilución empleada; para obtener el número de colonias por mililitro o por gramo del alimento se multiplica este resultado por el inverso de la dilución empleada.

8.3 En el caso de sembrar 1 ml de la muestra sin diluir se suma el número de colonias obtenido en las 3 placas para obtener el resultado por mililitro de muestra.

8.4 El número de colonias obtenido cuando se siembra 0,1 ml en placas duplicadas se promedia y se multiplica por 10 para obtener el número de colonias por mililitro de la dilución empleada; para obtener el número de colonias por mililitro o por gramo del alimento se multiplica este resultado por el inverso de la dilución empleada.

8.5 Si no hay desarrollo de las colonias indicadas en 7.2.5 o ninguna colonia de las pruebas de la coagulasa y/o la nucleasa termoestable, los resultados se expresan como menos de "el número inverso de la primera dilución sembrada" (ufc/g o ml) o "menos de 1 ufc/g o ml cuando se siembra la muestra sin diluir".

8.6 En caso de no obtener placas que contengan entre 20 - 200 colonias deben seguirse las normas generales para recuento de colonias en placas de Petri, según la Norma Venezolana COVENIN 902.



BIBLIOGRAFIA

APHA.1984 Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 2nd. Edition. M. Speck Editor Washington D.C.

FDA.1984 Bacteriological Analytical Manual. Food and Drug Administration. Bureau of Foods Division of Microbiology. 6th. Edition A.O.A.C. Box 50. Benjamin Franklin Station. Washington D.C. 20044. USA.

Rayman M.K., J.J. Devoyod, U. Purvis, D. Kush, J. Lanier, R.J. Gilbert, D.G. Till and B.A. Jarvis. 1978 ICMSF methods studies. X. An international comparative study of four media for the enumeration of Staphylococcus aureus in foods. Can. J. Microbiol. 1978. 24 (3): 274-281.

... de la prueba de coagulasa se realiza en un tubo de ensayo con un volumen de 1 ml de cultivo bacteriano en un medio líquido. El resultado se observa a las 4 horas de incubación a 37°C. La prueba se considera positiva cuando se observa la formación de coágulos que se desplazan al invertir el tubo.



... de la prueba de coagulasa se realiza en un tubo de ensayo con un volumen de 1 ml de cultivo bacteriano en un medio líquido. El resultado se observa a las 4 horas de incubación a 37°C. La prueba se considera positiva cuando se observa la formación de coágulos que se desplazan al invertir el tubo.

Tomado de: APHA. 1984. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods 2nd. Edition. M. Speck Editor Washington D.C.

... de la prueba de coagulasa se realiza en un tubo de ensayo con un volumen de 1 ml de cultivo bacteriano en un medio líquido. El resultado se observa a las 4 horas de incubación a 37°C. La prueba se considera positiva cuando se observa la formación de coágulos que se desplazan al invertir el tubo.

NOTA:

- 1) Solo se considera como evidencia positiva de producción de coagulasa una reacción 3+ o 4+
- 2) Significado de la figura:
 - Negativo= no evidencia formación de fibrino
 - 1+ Positivo= pequeños coágulos dispersos
 - 2+ Positivo= pequeños coágulos constituidos
 - 3+ Positivo= coágulo grande bien constituido
 - 4+ Positivo= el contenido total del tubo se coagula y no se desplaza cuando se invierte el tubo.

FIG I. Tipos de reacciones a la prueba de la coagulasa.

MEDIOS DE CULTIVO

1 ABAR BAIRD PARKER

Este medio está formado por los siguientes ingredientes:

1.1 Medio base

1.1.1 Fórmula:

Triptona	10 g
Extracto de carne	5 g
Extracto de levadura	1 g
Cloruro de litio, hexahidratado	5 g
Agar	20 g
Sulfametacina de sodio	0,055 g
Agua destilada	1000 ml

1.1.2 Preparación

Se añaden todos los ingredientes a 1 litro de agua destilada y se calienta con agitación hasta obtener una disolución completa, se lleva a una temperatura de 50°C a 60°C y se ajusta el pH a 6,8. Se dispensa en frascos en cantidades de 90 ml y se esteriliza a 121°C durante 15 minutos. El pH después de la esterilización en autoclave debe ser de 6,8 a 7,0.

NOTA: El medio base preparado puede ser almacenado por varios meses a temperatura ambiente (bien tapado).

1.2 Solución de glicina al 20% p/v

1.2.1 Fórmula:

Glicina	20 g
Agua destilada c.s.p.	100 ml

1.2.2 Preparación:

Se disuelve la glicina en una parte de agua destilada y se completa hasta el volumen final. La solución se filtra y se esteriliza a 121°C durante 15 minutos.

NOTA: Esta solución puede almacenarse a temperatura ambiente por varios meses.

1.3 Solución de Telurito de potasio al 1% (p/v).

1.3.1 Fórmula:

Telurito de potasio 1 g
Agua destilada c.s.p. 100 ml

1.3.2 Preparación:

Se disuelve el telurito de potasio en una parte de agua y se completa hasta volumen final. La solución se esteriliza por filtración.

NOTA: Esta solución puede almacenarse a temperatura ambiente por varios meses.

1.4 Solución de piruvato de sodio al 20% (p/v).

1.4.1 Fórmula

Piruvato de sodio 20 g
Agua destilada c.s.p. 100 ml

1.4.2 Preparación:

Se disuelve el piruvato de sodio en una parte de agua destilada y se completa hasta el volumen final. La solución se filtra y se esteriliza a 121°C durante 15 minutos.

NOTA: Esta solución debe almacenarse a 5°C y debe ser reemplazada mensualmente.

1.5 Emulsión de yema de huevo.

1.5.1 Fórmula:

Yema de huevo 1 parte
Agua destilada estéril 4 partes

1.5.2 Preparación:

Se lavan los huevos con agua, se pasan por una solución de alcohol, se dejan secar permitiendo la evaporación del alcohol de la cáscara de huevo, se parte el huevo y se separa la clara de la yema. Se mezclan asepticamente 1 parte de yema de huevo con 4 partes de agua destilada. Se calienta en baño de agua a 45°C por 2 horas. Se centrifuga o se deja en reposo en nevera por 24 horas. Se homogeneiza bien y se toman 5 ml de esta emulsión para la preparación del medio.

1.6 El medio completo tiene la siguiente composición:

Medio base 90 ml
Solución de glicina 6,3 ml

Solución de telurito de potasio	1,0 ml
Solución de piruvato de sodio	5,0 ml
Emulsión de yema de huevo	5,0 ml

1.6.1

Preparación:

El medio base se funde a una temperatura de 45°C a 50°C y se le agregan asépticamente las cantidades de las soluciones de glicina, telurito y piruvato de sodio previamente filtradas y esterilizadas; posteriormente se agregan los 5 ml de emulsión de yema de huevo, manteniendo la temperatura de 45°C a 50°C. Se mezcla bien y se dispensa inmediatamente en placas de Petri en cantidades de 15 ml.

NOTAS:

- 1) El medio debe prepararse y usarse inmediatamente o dentro de las 24 horas siguientes a su preparación, nunca después de las 48 horas de preparación.
- 2) El agar Baird Parker deshidratado puede ser usado, pero los medios comerciales tienden a ser más inhibitorios que los preparados en el laboratorio y en algunos casos podrían obtenerse colonias muy pequeñas.

2 AGAR LECHE-SAL

2.1 Fórmulas:

Agar nutritivo	23 g
Cloruro de sodio	65 g
Agua destilada	900 ml

2.2 Preparación:

La suspensión se calienta para disolver el agar, se enfría a 50-55°C y se ajusta el pH a 7,4. La solución se esteriliza a 121°C por 15 minutos. El medio se lleva a una temperatura de 50-55°C y se le añade 100 ml de leche descremada al 10% esterilizada previamente a 110°C por 10 min. Se mezcla cuidadosamente y se preparan las placas.

3 AGAR NUTRITIVO

3.1 Fórmulas:

Extracto de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g

Agar 12,0 g
 Agua destilada 1000 ml

3.2 Preparación:

Se disuelven los componentes en agua destilada llevando a ebullición hasta obtener disolución completa. Se deja enfriar a 50-60°C y se ajusta el pH para que después de la esterilización sea de 7,0 ± 0,1. Se reparte en tubos y se esteriliza a 121°C por 15 minutos. Después de la esterilización se dejan enfriar en posición inclinada.

4 CALDO INFUSION CEREBRO-CORAZON

4.1 Fórmula:

Infusión de cerebro de ternero 200 g
 Infusión de corazón de ganado 250 g
 Peptona o proteosa peptona 10 g
 Fosfato disódico 2,5 g
 Glucosa 2,0 g
 Cloruro de sodio 5,0 g
 Agua destilada 1000 ml

4.2 Preparación:

Se disuelven los ingredientes en 1000 ml de agua destilada, se dispensa en tubos de ensayo en cantidades de 5 ml y se esteriliza a 121°C por 15 minutos. El pH final debe ser 7,4.

NOTA: Para mejores resultados el medio debe usarse el mismo día de su preparación. De otra manera debe hervirse por varios minutos y enfriarlo antes de su uso.

5 PLASMA DE CONEJO O PORCINO TOMADO CON EDTA O HEPARINA

Puede ser obtenido comercialmente o preparado a partir de la sangre fresca del animal y mezclado con EDTA o heparina.

6 AGAR ADN - AZUL DE TOLUIDINA

6.1 Fórmula:

Buffer tris, 0,05 M (pH 9,0) 1000 ml
 Acido desoxirribonucleico (ADN) 0,3 g
 Agar 10,0 g

Cloruro de calcio 0,01 M	1,0 ml
Cloruro de sodio	10,0 g
Azul de toluidina 0,1 M	3,0 ml

6.2 Preparación:

Se mezclan todos los ingredientes a excepción del azul de toluidina, se hierve la mezcla hasta que el agar y el ADN estén completamente fundidos. Se añade el azul de toluidina. La solución se reparte en tubos de ensayo.

NOTA: Este medio puede conservarse a temperatura ambiente y no se esteriliza.

COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES
 MINISTERIO DE FOMENTO
 Av. Andrés Bello Edif. Torre Fondo Común Pisos 11 y 12
 Las Rotondas, Caracas, Venezuela



publicación de

VENEZUELA
 MINISTERIO DE FOMENTO
 COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES

ISBN 980-00-00000-0
 000000-00-000000

COVENIN
1292-89

CATEGORIA
C

COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES
MINISTERIO DE FOMENTO
Av. Andrés Bello Edif. Torre Fondo Común Pisos 11 y 12
Telf. 575. 41. 11 Fax: 574. 13. 12
CARACAS

publicación de:



CDU: 641 : 576.851

ISBN 980 - 06 - 0489 - 8

RESERVADOS TODOS LOS DERECHOS .

Prohibida la reproducción total o parcial, por cualquier medio.
