

**NORMA
VENEZOLANA**

**COVENIN
2522-88**

**ALIMENTOS.
RECUENTO DE ENTEROCOCOS.**



TRAMITE

COMITE: CT10: PRODUCTOS ALIMENTICIOS
PRESIDENTE: DRA. FANNY CARRILLO DE PADILLA
SECRETARIA: LIC. GISELA PADRON
SUBCOMITE: CT10/SC3: MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS
COORDINADORAS: ING. MILAGROS DIAZ
LIC. GISELA PADRON

PARTICIPANTES

ENTIDAD

MINISTERIO DE SANIDAD Y ASISTENCIA SOCIAL

INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE

INSTITUTO NACIONAL DE NUTRICION

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD SIMON BOLIVAR

FUNDACION CIEPE

ASOCIACION AMERICANA DE SOYA

INDULAC

BROLAB s.r.l.

REPRESENTANTES

DOUGLAS YANEZ
VICMAR DE PERNIA

MILAGROS POLANCO
MARIA LUISA NOVQA
MANUELA DE SELGRAD

ROSARIO GARRIDO
MARIELA CALDERON

FANNY CARRILLO DE PADILLA
CARMEN ELENA GARCIA

SILVIA MENDOZA

EUMELIA GOMEZ
ISMENIA DE MENDEZ

JOSE FELIX CHAVEZ

MIROSLAVA MORLES
ZULIA GRAFF

OLGAMAR FRANCESCHI

DISCUSION PUBLICA

FECHA DE ENVIO: 09-03-88

DURACION: 45 DIAS

FECHA DE APROBACION POR EL COMITE: 01-09-88

FECHA DE APROBACION POR LA COVENIN: 05-10-88

1 NORMAS COVENIN A CONSULTAR

- COVENIN 1126-77 Alimentos. Codificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico.
- COVENIN 1104-84 Alimentos. Determinación del Número Más Probable de coliformes, de coliformes fecales y de *Escherichia coli*.

2 OBJETO Y CAMPO DE APLICACION

Esta Norma Venezolana establece el método de ensayo para recuento de enterococos : (*Streptococcus faecalis* (*S. faecalis* var *liquefaciens* y *S. faecalis* var *zymogenes*) y *Streptococcus faecium* (*S. faecium* var *durans*) en alimentos, mediante el recuento en placas o en aguas por el método del Número Más Probable.

3 RESUMEN DEL ENSAYO

3.1 El método del recuento en placas consiste en sembrar la muestra o diluciones de la misma en placas de Petri con un medio de cultivo selectivo, incubarlas a una temperatura entre 35 y 37°C durante 18 a 72 h, según el medio de cultivo utilizado, seleccionar las placas que presenten colonias características, hacer el recuento y confirmar si corresponden o no a enterococos.

3.2 El método del Número Más Probable consiste en colocar determinadas cantidades de muestra y/o sus diluciones, en cada uno de 3 ó 5 tubos de ensayo y un medio de cultivo apropiado. Después del periodo de incubación, se observan los tubos y en aquellos que presenten turbiedad (positivos presuntivos) se hacen pruebas confirmativas.

4. EQUIPO

- 4.1 EQUIPO PARA LA PREPARACION DE MUESTRAS (Según Norma Venezolana COVENIN 1126)
- 4.2 CONTADOR DE COLONIAS
- 4.3 INCUBADORA CON REGULADOR DE TEMPERATURA, graduada a 35°C-37°C.
- 4.4 TERMOMETRO, con escala graduada de 0°C a 100°C
- 4.5 PLACAS DE PETRI, estériles de 15 mm x 100 mm.

4.6 BAÑO DE AGUA, con regulador de temperatura, graduado a 44-46°C.

5 MATERIALES Y REACTIVOS

5.1 MEDIOS DE CULTIVO (Véase anexo 1)

5.1.1 Agar K.F. Streptococcus (1)

5.1.2 Agar sangre azida cristal violeta de Packer.

5.1.3 Agar bilis esculina.

5.1.4 Caldo infusión cerebro corazón.

5.1.5 Caldo infusión cerebro corazón con 6,5% de cloruro de sodio.

5.1.6 Caldo glucosa azida.

5.1.7 Agar selectivo para enterococos de Pfizer

5.2 DILUENTE

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

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

5.3 REACTIVOS

5.3.1 Solución de peróxido de hidrógeno al 3%.

6 PREPARACION DE LAS MUESTRAS

La muestra se codifica y se prepara según lo establecido en la Norma Venezolana COVENIN 1126.

7 PROCEDIMIENTO

7.1 RECUENTO EN PLACAS

7.1.1 Se transfiere 1 ml de la muestra del alimento previamente preparada y/o sus diluciones a placas de Petri estériles, por duplicado.

7.1.2 Se agrega alrededor de 15 ml de agar K.F. Streptococcus o Agar sangre azida cristal violeta de Packer, previamente fundido y temperado a 44-46°C en

cada placa de Petri, se mezcla suavemente el agar y la muestra por rotación y se deja solidificar. Se invierten las placas y se incuban en la estufa de acuerdo a lo indicado en la Tabla 1. Para productos lácteos se recomienda aumentar la temperatura de incubación a 45°C a fin de reducir el enmascaramiento por lactobacilos y otros enterococos.

7.1.3.1 TABLA 1. Condiciones de incubación de las placas

AGAR	TEMPERATURA DE INCUBACION (°C)	TIEMPO DE INCUBACION (h)	CARACTERISTICAS DE LAS COLONIAS
K.F. Streptococcus	35 ± 0,5	48 ± 3	Colonias color rojo oscuro (<i>S. faecalis</i>) y rosado claro (<i>S. faecium</i>)
Packer	35-37	72	Colonias pequeñas de color violeta

7.1.3 Se seleccionan las placas que presenten entre 30 y 300 colonias y se cuentan las que presenten las características señaladas en la Tabla 1.

7.1.4 Se calcula el número presuntivo de enterococos por gramo o por mililitro de muestra.

7.1.5 Pruebas confirmativas de enterococos

7.1.5.1 Se seleccionan 2 o más colonias típicas y se siembra cada una en tubos con caldo infusión cerebro corazón. Se incuban a 35 - 37°C por 18 a 24 h o hasta la aparición de turbiedad. Estos cultivos se utilizarán para realizar estudios bioquímicos y morfológicos.

7.1.5.2 Se hace una coloración de Gram para cada cultivo y se observa los cocos típicos, redondos, Gram positivos, en pares o en cadenas cortas o largas.

7.1.5.3 Prueba de la catalasa.

Se transfiere con pipeta, estérilmente, alrededor de 3 ml de cada cultivo a tubos que contengan aproximadamente 0,5 ml de solución de peróxido de hidrógeno al 3% y se mezclan. Los enterococos son catalasa negativos (no hay formación de burbujas).

7.1.5.4 Crecimiento a 45°C en caldo infusión cerebro corazón.

Se inocula un tubo de caldo infusión cerebro corazón (previamente calentado a 45°C) con el cultivo en estudio. Se incuba a 45°C por 48 h y al cabo de ese tiempo se observa si hay crecimiento (aparición de turbiedad en el medio).

7.1.5.5 Crecimiento en caldo infusión cerebro corazón con 6,5% de cloruro de sodio

Se inocula un tubo de caldo infusión cerebro corazón que contenga 6,5% de cloruro de sodio con el cultivo en estudio. Se incuba a 35 - 37°C por 72 h y se observa si hay crecimiento (aparición de turbiedad en el medio).

7.1.5.6 Crecimiento en agar bilis esculina.

Se inocula un tubo que contenga agar bilis esculina inclinado y se incuba a 35 °C por 24 h. Se observa si hay crecimiento (la prueba es positiva si hay ennegrecimiento).

7.1.5.7 Caracterización de un enterococo

Si es catalasa negativo, crece a 45°C, tolera una concentración de 6,5% de cloruro de sodio y crece en agar bilis esculina, se confirma que el cultivo es un enterococo.

7.2 NUMERO MAS PROBABLE

7.2.1 Se sigue el procedimiento descrito en la Norma Venezolana COVENIN 1104 para series de 3 y 5 tubos pero utilizando caldo glucosa azida, en lugar del caldo lauril sulfato triptosa. Se incuban los tubos a 35°C por 48 h.

Según el tipo de agua a ser analizada, deberá usarse 10 ml de caldo de concentración simple para inóculos de 1 ml o menores y 10 ml de caldo de concentración doble para inóculos de 10 ml. Las porciones empleadas variarán en tamaño y número según las características de la muestra.

7.2.2 Se observan los tubos a las 24 h y 48 h y aquellos que presenten turbiedad se consideran positivos presuntivos y deben confirmarse.

7.2.3 Pruebas confirmativas

A partir de los cultivos positivos en caldo glucosa azida, se siembra una asada en agar selectivo para enterococos de Pfizer o Agar K.F Streptococcus contenido en placas de Petri. Se incuban a 35 ± 0,5°C por 24 ± 2 h. Las colonias en agar selectivo para enterococos son de color marrón negruzcas con halos marrones. Las colonias en agar K.F Streptococcus son de color rojo oscuro (S. faecalis) y rosado claro (S. faecium).

7.2.4 Los resultados se leen según lo establecido en la Norma Venezolana COVENIN 1104 (se llevan a la Tabla del NMP que corresponda) y se calcula el Número Más Probable de enterococos por mililitro.

8 EXPRESION DE RESULTADOS

El recuento de enterococos en la muestra se expresa según el método utilizado de la siguiente forma:

8.1 Para recuento en placa, como unidades formadoras de colonias por gramo o por mililitro (ufc/g o ufc/ml).

8.2 Para la técnica del Número Más Probable, como Número Más Probable por mililitro según lo establecido en la Norma Venezolana COVENIN 1104.

9 INFORME

9.1 El informe del ensayo deberá indicar como mínimo la siguiente información:

9.1.1 Ensayo realizado según la presente Norma.

9.1.2 Fecha en la cual se realizó el ensayo y nombre de quién lo realizó.

9.1.3 Identificación de la muestra.

9.1.4 Resultados.

9.1.5 Observaciones.

BIBLIOGRAFIA

1. FDA 1978 Bacteriological Analytical Manual. Food and Drug Administration. Bureau of Foods Division of Microbiology. 3th Edition AOAC. Box 540. Benjamin Franklin Station. Washington D.C. 20044 U.S.A.
2. APHA - AWWA - WPCF. 1985. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association - American Water Works Association - Water Pollution Control Federation. 16 th Edition - Washington DC.
3. APHA. 1984. Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods. 2 nd Edition. Marvin Speck. Editor Washington DC.
4. ICMSF. 1978. Microorganismos de los Alimentos. Técnicas de análisis microbiológico. Volumen 1. 2a Edición (Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos). Traducción. Editorial Acribia. España.

ANEXO 1

Fórmula y preparación de los medios de cultivo requeridos para detectar la presencia de enterococos.

1 Agar K.E Streptococcus

1.1 Fórmula (g/l)

Proteosa-peptona No. 3 ó polipeptona	10,0 g
Extracto de levadura	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Glicerofosfato de sodio	10,0 g
Maltosa	20,0 g
Lactosa	1,0 g
Azida de sodio	0,4 g
Agar	20,0 g
Púrpura de bromocresol	0,0015 g
Agua destilada	1000,0 ml

1.2 Preparación

Se mezclan los componentes de la fórmula en 1000 ml de agua destilada.

Se calienta la mezcla hasta su punto de ebullición para obtener una homogeneización de ingredientes y fundir el agar. Se distribuye en matraces Erlenmeyer en los volúmenes adecuados y se esteriliza a 121 °C durante un máximo de 10 minutos. Se lleva a una temperatura entre 50 °C y 60 °C y se añade 1 ml de una solución acuosa estéril al 1% de cloruro de 2, 3, 5 trifeniltetrazolio (TTC) por cada 100 ml de medio. Se mezcla hasta obtener una distribución uniforme. El medio se puede mantener entre 45 °C - 50 °C hasta cuatro horas en baño de agua.

2 Agar sangre azida cristal violeta de Packer

2.1 Fórmula (g/l)

Triptosa	15 g
Extracto de carne	3 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	30 g
Sangre de oveja desfibrinada	50 ml

Cristal violeta (Sol. acuosa al 0,1% (p/v)	2 ml
Azida sódica	0,5 g
Agua destilada	1000 ml

2.2 Preparación

Se añade la triptosa, el extracto de carne, el cloruro sódico y el agar a un litro de agua destilada y se calienta hasta ebullición para disolver completamente. Se lleva a 50 °C - 60 °C y se ajusta la reacción de tal forma que el pH después de la esterilización sea de 7-7,2. Se distribuye en volúmenes de 100 ml, se esteriliza en autoclave (121°C durante 15 minutos). Se lleva a 50°C y se añade a cada 100 ml los siguientes componentes:

- a) 5 ml de sangre fresca de oveja defibrinada (se conserva la sangre no más de una semana antes de ser utilizada).
- b) 0,2 ml de una solución de cristal violeta (se esteriliza esta solución a 121°C durante 20 minutos y se conserva a 1-5°C).
- c) 1 ml de una solución acuosa estéril al 5% de azida sódica (se esteriliza esta solución por filtración).

Se mezcla bien, se lleva a 44-46 °C y se distribuye en placas al momento de ser utilizadas.

3 Agar bilis esculina

3.1 Fórmula (g/l)

Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Sales biliares (oxgall)	40 g
Citrato férrico	0,5 g
Esculina	1,0 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

3.2 Preparación

Se disuelve el extracto de carne, la peptona y el agar en 400 ml de agua destilada. Separadamente se disuelve el citrato férrico en 100 ml de agua. Se disuelven las sales biliares en 400 ml de agua. Se mezclan las soluciones y se calientan a 100°C por 10 min. Luego se esteriliza en autoclave a 121 °C por 15 min y se lleva a una temperatura de 50 °C. Asépticamente, se añaden 100 ml de una solución de esculina al 1% previamente esterilizada por filtración. Se distribuyen 4 ml en tubos de 13 mm x 100 mm con tapa de rosca formando bisel.

NOTA: La solución de esculina debe calentarse previamente antes de la filtración para facilitar la disolución completa.

4 Caldo infusión cerebro corazón

4.1 Fórmula (g/l)

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

4.2 Preparación

Se disuelven los ingredientes en el agua destilada, se dispensa esta solución en tubos de ensayo, en cantidades de 5 ml, se esterilizan en autoclave a 121 °C durante 15 min. El pH final debe estar en 7,4.

5 Caldo infusión cerebro corazón con 0,5% de cloruro de sodio

6 Caldo glucosa azida (APHA, 1975)

6.1 Fórmula (g/l)

Extracto de carne	4,5 g
Triptona o polipeptrona	15,0 g
Glucosa	7,5 g
Cloruro de sodio	7,5 g
Azida de sodio	0,2 g
Agua destilada	1000,0 ml

6.2 Preparación

Se disuelven los ingredientes en el agua destilada. Se distribuye en tubos y se esteriliza en autoclave por 15 min a 121 °C. El pH deberá ser de 7,2 después de la esterilización.

7 Agar selectivo para enterococos de Pfizer (PSE).

7.1 Fórmula (g/l)

Peptona C	17,0 g
Peptona B	3,0 g
Extracto de levaduras	5,0 g
Bilis bacteriológica	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Citrato de sodio	1,0 g
Esculina	1,0 g
Citrato amónico férrico	0,5 g
Azida de sodio	0,25g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1000 ml

7.2 Preparación

Se disuelven los ingredientes en el agua destilada. Se esteriliza a 121 °C por 15 minutos.

El pH deberá ser de 7,1 después de la esterilización. El medio deberá mantenerse a 45 - 50 °C por no más de 4 h antes de verterlo en las placas.

COVENIN
2522-88

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 664.576.8.08

ISBN 980-06-0302-6

RESERVADOS TODOS LOS DERECHOS

Prohibida la reproducción total o parcial, por cualquier medio.
