

GUÍA DE TRABAJOS
PRÁCTICOS

Facultad de Química
Bioquímica y Farmacia



Microbiología de los Alimentos

CURSO OPTATIVO DE GRADO

Licenciatura en Bioquímica
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE QUÍMICA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS

2024



MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

CURSO OPTATIVO DE GRADO

Guía de Trabajos Prácticos

Profesor Responsable:

Dra. Alba Edith Vega

Profesor Co -responsable:

Dra. Gabriela Favier

Profesor colaborador:

Dra. Cecilia Lucero Estrada



Licenciatura en Bioquímica

ÁREA DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE QUÍMICA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS

2024

Vega, Alba Edith

Microbiología de los alimentos. Curso optativo de grado: Guía de trabajos prácticos /
Alba Edith Vega; Gabriela Favier; Cecilia Lucero Estrada - 2a ed. - San Luis: Nueva
Editorial Universitaria - UNSL, 2023. Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online
ISBN 978-987-733-388-6

1. Microbiología. I. Favier, Gabriela. II. Lucero Estrada, Cecilia. III. Título.
CDD 664.07

Universidad Nacional de San Luis

Rector: CPN Víctor Aníbal Moriño

Vicerrector: Mg. Héctor Flores

Nueva Editorial Universitaria

Avda. Ejército de los Andes 950

Tel. (+54) 0266-4424027 Int. 5197 / 5110

www.neu.unsl.edu.ar

E mail: unslneu@gmail.com

Directora:

Lic. Jaquelina Nanclares

Director Administrativo

Sr. Omar Quinteros

Administración

Esp. Daniel Becerra

Dpto de Imprenta:

Sr. Sandro Gil

Dpto. de Diseño:

Tec. Enrique Silvage

DG Nora Aguirre

ISBN 978-987-733-388-6

Queda hecho el depósito que marca la ley 11.723

© 2023 Nueva Editorial Universitaria

Avda. Ejército de los Andes 950 - 5700 San Luis



RED DE EDITORIALES
DE UNIVERSIDADES
NACIONALES



Universidad
Nacional
de San Luis

Presentación de Curso

Nombre del curso optativo: Microbiología de los alimentos

Este curso optativo está destinado a los alumnos de la Carrera Licenciatura en Bioquímica y comprende el estudio de los microorganismos que afectan la calidad sanitaria de los alimentos y el agua. Su contenido incluye las características generales de estos microorganismos, aislamiento, caracterización, resistencia al medioambiente, su capacidad para sobrevivir y desarrollarse en los alimentos, las consecuencias de este desarrollo y los factores que influyen en este proceso. Además del conocimiento y aplicación del sistema de análisis de peligro y puntos críticos de control en la elaboración de alimentos, esencial para garantizar la inocuidad de los mismos; como así también el estudio de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) y de los factores epidemiológicos básicos que determinan dichas ETA.

Tipo de Asignatura

Este curso es de carácter optativo para los alumnos de Carrera Licenciatura en Bioquímica. Forma parte del Área Temática Optativa dentro de la malla curricular. Posee un crédito horario total de 60 h y semanal de 10 h, distribuidos en 4 horas de Prácticos de Laboratorio o Aula, y 6 horas de clases teóricas.

Fundamentación del sentido del Curso dentro del Plan de Estudio

Este curso permitirá al estudiante iniciar su conocimiento en Microbiología de los Alimentos abordando conceptos de conservación, alteración y contaminación de los alimentos por diversos microorganismos. Se estudiarán las técnicas de cultivo y moleculares para el aislamiento de bacterias a partir de matrices alimentarias que junto con el conocimiento de los puntos críticos de control en la cadena de producción alimentaria, aportarán a la inocuidad y conservación de los mismos. Asimismo, la determinación de los reservorios, fuentes de infección y otros factores epidemiológicos contribuirán al entendimiento de la cadena de transmisión al ser humano, tomando las medidas necesarias para evitar la diseminación de las ETA.

Equipo docente:

Profesor Responsable: Dra. Alba Edith Vega.

Profesor Co -responsable: Dra. Gabriela Favier.

Profesor colaborador: Dra. Cecilia Lucero Estrada.

Jefes de Trabajo Prácticos:

Lic. Claudia Cáceres

Dra. Andrea Arismendi

Dra. Anna Chiara Mastrodonato

Personal no docente:

Daniel Molina

Victoria Oyola

ÍNDICE	Página
Normas de bioseguridad	7
Trabajo Práctico de Laboratorio N° 1-A: reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	14
Trabajo Práctico de Laboratorio N° 1-B: análisis bacteriológico de agua de red.	28
Trabajo Práctico de Laboratorio N° 2: análisis microbiológico de pastas	42
Trabajo Práctico de Aula	59

Programa analítico y/o de examen actualizado:

Siu guaraní. UNSL, http://cargaprogramas.unsl.edu.ar/public_view.

NORMAS DE BIOSEGURIDAD

OBJETIVOS

- Adquirir conciencia de los riesgos potenciales durante el trabajo en el Laboratorio de Microbiología
- Reconocer las vías de infección más comunes en el laboratorio
- Identificar los distintos niveles de bioseguridad en Microbiología y los requerimientos de protección personal, del medio ambiente y de las muestras, en cada uno de ellos.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Las personas que trabajan en un laboratorio QUÍMICO están expuestas a una serie de riesgos potencialmente graves. Comúnmente están en contacto con sustancias y vapores tóxicos y explosivos, carcinógenos, sustancias cáusticas, altos voltajes, radiaciones, etc. En un laboratorio de Microbiología hay que agregar otro riesgo: la INFECCION por microorganismos.

La INFECCION es la colonización y multiplicación de microorganismos en el hospedador y difiere de la mayoría de los otros riesgos en que los efectos no están limitados a quien trabaja individualmente ni a sus compañeros de trabajo, sino que la infección también puede ser transmitida fuera del laboratorio, a su familia, contactos humanos casuales, y animales domésticos o de experimentación. No debe olvidarse que también pueden diseminarse agentes no patógenos para los seres humanos pero capaces de contaminar medios de cultivo y reactivos.

- Vías de infección más comunes en el laboratorio:

- **tracto digestivo:** ingestión o transferencia de microorganismos desde dedos contaminados.
- **mucosas:** nasal, conjuntiva, por aerosoles y manos contaminadas.
- **piel – vía percutánea:** inyección, cortes o escoriaciones.
- **respiratoria:** es la más importante. El 80% de las infecciones contraídas en el laboratorio de Microbiología es de origen aéreo por inhalación de aerosoles que transportan microorganismos o virus.

- Importancia de la vía respiratoria

Se deben tener en cuenta 3 factores principales.

- La facilidad con que se producen pequeñas gotas y partículas.
- Las pequeñas partículas (entre 1-4 μm) no son retenidas en el tracto respiratorio y llegan a pulmón.
- La capacidad de la mayoría de los microorganismos patógenos para invadir tejido pulmonar.

- La infectividad de un microorganismo depende de:

- el tamaño de la dosis
- la susceptibilidad individual
- la virulencia del agente (varía con el microorganismo y la cepa)
- el sitio de invasión

- Situaciones de riesgo más comunes en el Laboratorio:

• Producción de aerosoles

La producción de aerosoles es generada por dos mecanismos:

- atomización de suspensiones líquidas
- molido muy fino de material sólido infectado

Muchas técnicas de laboratorio producen distintos aerosoles mediante burbujeo, salpicadura, espuma, quemado del ansa, y dos mecanismos adicionales: vibración de alta frecuencia y fuerza centrífuga. Los aerosoles también se producen cuando se manipulan cultivos secos, liofilizados o secados con acetona (ej. cuando se destapan tubos o ampollas).

• Prácticas incorrectas

Además de la producción de aerosoles hay que tener en cuenta el riesgo que se genera como consecuencia de la deposición de material infectado sobre distintas superficies, como la mesada de trabajo, elementos personales como cuadernos, lapiceras, y las propias manos, a partir de las cuales

los microorganismos pueden ser transferidos a la piel, boca y ojos. Es recomendable el uso de guantes descartables, barbijo y gafas y lavarse las manos al retirarse del laboratorio.

- **Uso de pipetas y pipeteo**

Las pipetas se esterilizan antes de ser utilizadas. Una práctica casi universal en Microbiología es colocar un tapón de algodón en la boquilla de la pipeta para prevenir la entrada de polvo y detener el ascenso de líquido. Sin embargo, el tapón NO protege a quien usa la pipeta ya que es fácilmente contaminado por microorganismos presentes en las suspensiones líquidas. El pipeteo oral debe ser evitado; en su lugar se recomienda el uso de propipeta. Las pipetas contaminadas se descartan siempre en un frasco con lavandina al alcance del operador.

- **El ansa**

Mediante el flameado (quemado al rojo en la llama) del ansa o agujas contaminadas se puede producir diseminación de organismos, especialmente cuando se trabaja con inóculos semi-sólidos (ej. suspensiones de esporas, colonias de *Mycobacterium* o esputo). Esto también puede ocurrir con pequeños volúmenes de líquido. El mismo riesgo se corre cuando se introduce el ansa caliente en un líquido, o se hace contacto con la superficie de un cultivo en medio sólido.

El ansa fría, una vez cargada, puede contaminar cuando se producen vibraciones o rápidos movimientos de aire que causen desprendimiento de pequeñas gotas. Por esta razón, no agite ni sacuda el ansa mientras trabaja.

- **Placas de Petri con medio de cultivo**

La principal fuente de infección resulta cuando una placa de Petri con cultivo cae al suelo y se rompe. El mismo riesgo se corre cuando se utilizan tubos o botellas con agar. En esos casos, neutralice la contaminación con lavandina diluida al 10 % y después de unos minutos comience el operativo de limpieza usando guantes. Confine los restos de vidrio en un recipiente que luego será esterilizado.

- **Tapones y tapas**

La remoción de tapones de algodón, tapas a rosca, tapones de goma o plásticos desde tubos con caldo de cultivo, tubos de centrífuga, etc., puede crear aerosoles de material infectivo, sobre todo si después de agitar los cultivos, los tapones se han humedecido. En ese caso, oriente la boca del tubo

hacia el mechero en el momento de abrir. Si es necesario agitar el tubo, hágalo con suavidad para evitar este inconveniente.

Precauciones

Las medidas preventivas incluyen 6 categorías:

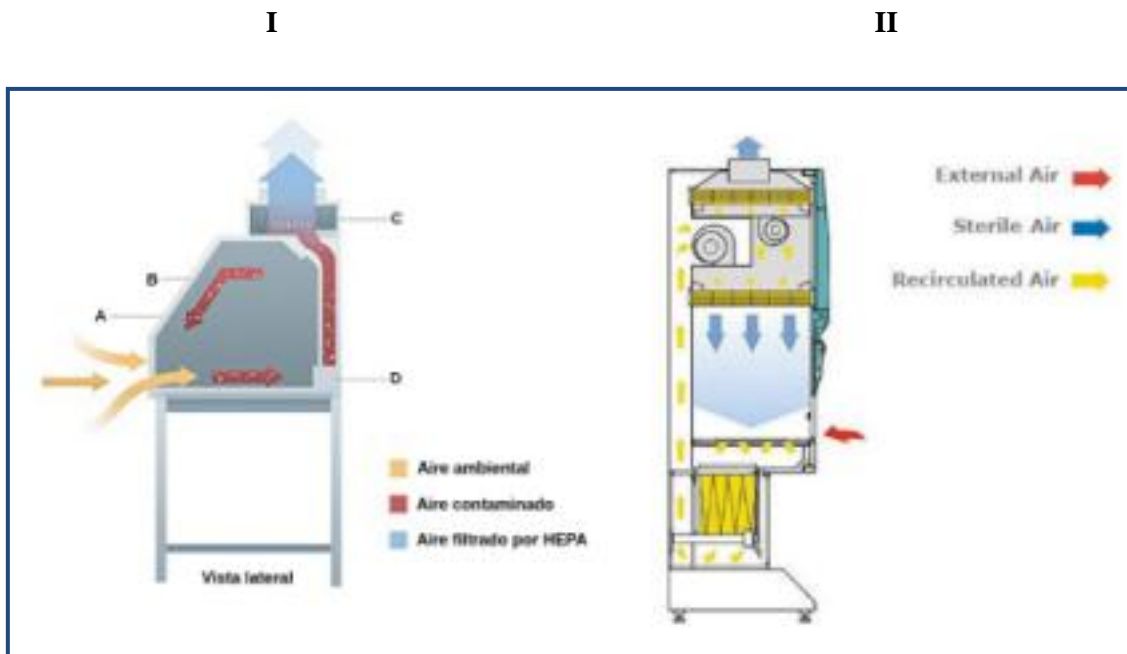
- **protección física del trabajador:** uso de guardapolvo, guantes, barbijo, gafas, propipeta, etc.
- **técnicas cuidadosas:** buen manejo de la técnica aséptica.
- **métodos de confinamiento del agente:** uso de cámaras de bioseguridad, flujo laminar vertical, ambientes aislados con presurización positiva o negativa, recipientes con desinfectante para descartar material contaminado, envases bien tapados, sin filtraciones.
- **barreras intangibles:** desinfección del aire por uso de lámparas UV, áreas estériles.
- **desinfección en general:** empleo de etanol al 70%, alcohol iodado, lavandina diluida u otros productos seleccionados según el caso: piel, superficies inertes, instrumentos metálicos, etc.
- **medidas inmunológicas:** vacunación del personal según normativas de Salud Pública.

Requerimientos de bioseguridad en el laboratorio de Microbiología (OMS, 2020)

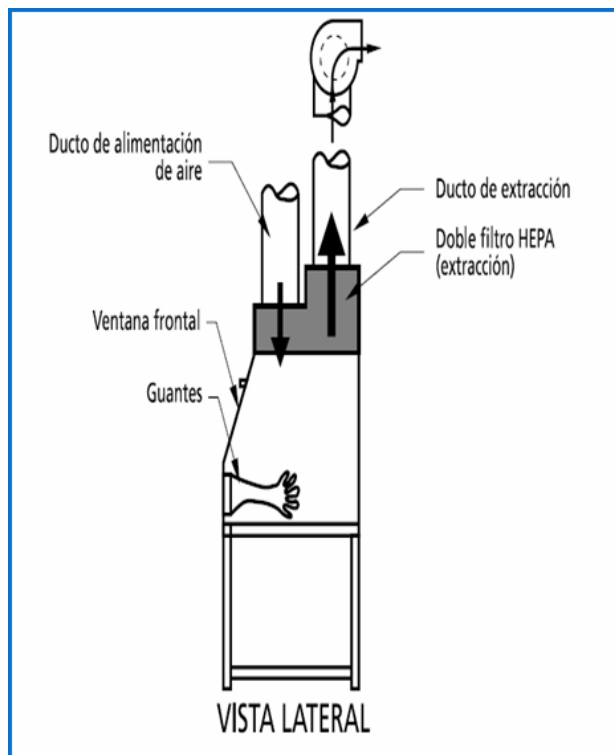
Prácticas y técnicas	Equipamiento	Alcance
Prácticas microbiológicas básicas.	Ninguno	Agentes bien caracterizados que presentan riesgo mínimo para el personal y el medio ambiente. Ej. <i>Bacillus subtilis</i> .
Prácticas microbiológicas con contención reforzada. Personal con entrenamiento específico. Acceso restringido.	GBS clase I ó II	Agentes de moderada peligrosidad para el personal y el medioambiente. Ej. <i>Salmonella</i> . Sangre, fluidos corporales, Tejido humano y animal.
Prácticas microbiológicas con contención muy reforzada. Acceso restringido. Registro de visitas y accidentes. Barreras de contención física: máscaras, guantes, rotores sellados, filtros HEPA.	GBS clase II	Agentes con potencial de transmisión aérea que pueden causar infección seria o potencialmente letal. Alto riesgo personal, bajo riesgo comunitario. Existen vacunas o terapia.. Ej. <i>Mycobacterium</i> , <i>Coxiella</i> .
Prácticas microbiológicas con contención máxima. Barreras de aire con el exterior. Cambio de ropa y ducha.	GBS tipo III Traje presurizado	Agentes exóticos productores de enfermedades letales para los que no existen vacunas ni terapia. Ej. virus Ébola.

GBS: gabinete de bioseguridad

Esquema de funcionamiento de los gabinetes de bioseguridad:



I) Cabina de bioseguridad de clase I. A: frontal abierto, B: ventana / panel transparente, C: HEPA de escape, D: plenum de escape. En esta cabina, el aire filtrado sale al medio exterior, la muestra está en contacto con aire contaminado. **II)** Cabina de seguridad clase II, el flujo de aire esteril toma contacto con la muestra, por consiguiente la misma no se contamina. *Imagen tomada de https://theory.labster.com/biosafety_cabinet_class_i-es/*



GBS tipo III

REGLAS A TENER EN CUENTA EN CADA SESIÓN DE LABORATORIO

1. Reportar los accidentes al docente a cargo del Trabajo Práctico, no importa lo insignificante que puedan parecer. Se debe reportar toda enfermedad o lastimadura tan rápido como sea posible. La pérdida de tiempo en la identificación de una infección de laboratorio puede tener graves consecuencias.
2. Tratar a todos los microorganismos como patógenos potenciales para el ser humano, o contaminantes para los cultivos vecinos. **Rotular todo el material infectivo para prevenir confusiones.** Los números en código no son adecuados.
3. Usar ropa y elementos de seguridad (ej. guardapolvo, guantes, máscara, etc).
4. Manejar los materiales cuyo potencial patógeno se desconoce (ej. esputo, suero, material fecal, microorganismos no identificados) como si fueran infectivos, ya que probablemente lo son.
5. El laboratorio debe permanecer siempre limpio. La mesada debe estar libre de todo material que no sea esencial. La superficie debe limpiarse antes y después de cada sesión de laboratorio con una solución germicida. Todo el material contaminado, cultivos, pipetas, taponés, etc., deberá ser esterilizado ANTES de ser lavado.
6. Al retirarse del laboratorio, sacarse el guardapolvo, lavarse cuidadosamente las manos con agua y jabón y desinfectarlas.
7. Tener un desinfectante listo para ser usado en suficiente volumen para llevar a cabo una descontaminación de emergencia en el caso de salpicaduras. Asegurarse que el desinfectante sea activo contra el organismo con el que se está trabajando.
8. Nunca comer, beber, fumar, maquillarse en el laboratorio, o pipetear con la boca. Usar propipetas o pipetas automáticas. Siempre recordar que las manos o los guantes pueden estar contaminados y pueden transferir microorganismos al rostro, ropa y resto del cuerpo.
9. Nunca llevar a cabo una acción apresuradamente, en particular aquéllas que pueden producir burbujeo, salpicaduras, derrames o contaminar superficies que es necesario mantener limpias (ej. las tapas de las botellas).

BIBLIOGRAFÍA

-Manual de bioseguridad en el laboratorio, 2020. Cuarta edición. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; USA. ISBN 978-92-4-001131-1.

-Ferrari S., Mattana C., Di Genaro M.S. y Favier G. 2017. Manual de Seguridad en el Laboratorio de Microbiología. Nueva Editorial Universitaria. UNSL, San Luis, Argentina. ISBN/ISSN 978-987-1595-68-6.

Trabajo Práctico de Laboratorio N° 1-A

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

OBJETIVOS

- Conocer los fundamentos de la técnica de PCR convencional y PCR en tiempo real.
- Analizar e interpretar imágenes de productos de PCR en geles de agarosa.
- Analizar e interpretar curvas de amplificación de productos de PCR en tiempo real.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR del inglés *polymerase chain reaction*) es en esencia la replicación del ADN *in vitro*. Mediante esta técnica se pueden copiar segmentos de ADN hasta miles de millones de veces, proceso llamado amplificación, que genera grandes cantidades de copias de genes específicos u otros segmentos de ADN para toda una serie de aplicaciones en biología molecular.

La PCR es una herramienta poderosa que ha revolucionado toda la biología. Es fácil de realizar, extremadamente sensible, específica y muy eficaz. Durante cada ciclo de amplificación la cantidad de ADN diana original se duplica, lo que provoca un aumento exponencial en el ADN. En pocas horas, se pueden obtener grandes cantidades de ADN a partir de unas pocas moléculas diana en un equipo para PCR llamado *termociclador*. En la práctica se realizan normalmente de 20 a 30 ciclos, lo que produce un aumento en la secuencia diana de 10^6 a 10^9 veces. Debido a las altas temperaturas necesarias para desnaturar las copias de doble cadena del ADN *in vitro*, se utiliza una polimerasa termoestable obtenida de la bacteria termófila, aislada de fuentes termales, *Thermus aquaticus*, llamada polimerasa *Taq* polimerasa, la cual es estable a 95°C y, por tanto, no se ve afectada por la fase de desnaturación utilizada.

Se han desarrollado variaciones de la técnica estándar de PCR, generalmente llamada convencional o de punto final, entre ellas:

- **PCR multiplex:** detección de 2 o más genes blanco, utilizando 2 o más pares de cebadores.
- **PCR en tiempo real o cuantitativa (PCR real time / qPCR):** es una PCR convencional en la que el equipo de amplificación (termociclador) se encuentra asociado a un sistema de detección que permite monitorear constantemente (en tiempo real) la cantidad de ADN

sintetizado. El sistema de detección consiste de un fluorímetro que detecta la emisión de un fluoróforo dentro de cada tubo de reacción.

- **PCR anidada o Nested PCR:** comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de cebadores en cada una, con el fin de incrementar la sensibilidad y la especificidad de la detección.

- **PCR con retrotranscriptasa / transcripción inversa o RT-PCR:** Permite estudiar la expresión de genes en un proceso por el cual el ARNm se puede convertir en ADNc (ADN copia o complementario), y este ADNc se amplifica por PCR. Primer paso de reacción: se sintetiza ADNc a partir de ARNm usando dNTPs y una enzima retrotranscriptasa. Los componentes se combinan con un iniciador en un buffer que contiene la enzima y la reacción se produce a 37°C durante 1 h. Segundo paso de la reacción: luego de que se sintetiza el ADNc, se continúa con una amplificación por PCR convencional o por PCR de tiempo real.

En microbiología, la PCR se aplica en múltiples ámbitos, por ejemplo: diagnóstico molecular, estudios filogenéticos, identificación, etc. Por ejemplo, se puede utilizar para realizar la identificación de un microorganismo por presencia de una secuencia específica del gen *16S ARNr*; establecer relaciones entre cepas durante brotes o en estudios epidemiológicos; seleccionar clones por la presencia de genes asociados a virulencia, resistencia a antibióticos; etc. Una de las grandes ventajas de esta técnica en el contexto de la microbiología es que no depende del aislamiento o del cultivo del microorganismo a estudiar, sino que se basa en la detección y amplificación de las secuencias de ácido nucleico específicas, lo cual acelera significativamente la obtención de los resultados.

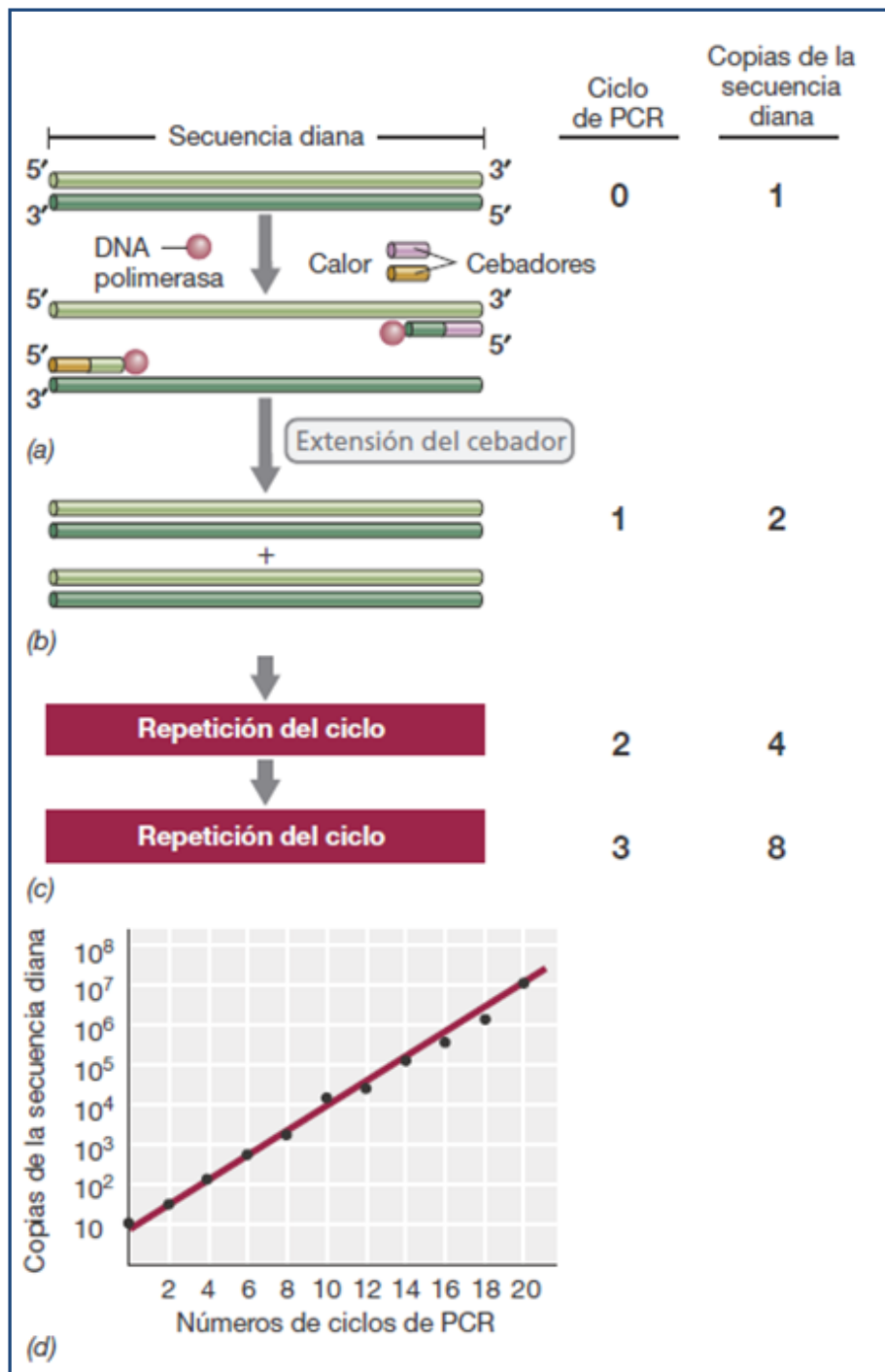
Todas las variantes de esta técnica están basadas en el mismo principio. Ciclos repetitivos de diferentes tiempos y temperaturas. Cada ciclo de PCR incluye 3 etapas que se suceden en la doble hélice de ADN (templado):

1. Desnaturalización a 95°C.

2. Hibridación de cebadores a las regiones específicas de la secuencia de ADN a amplificar, a 55-65°C.

3. Elongación de los primers por *Taq* polimerasa en presencia de dNTPs, a 72°C

Cada ciclo duplica la secuencia original de ADN. El ciclo se repite entre 25 a 40 veces según el tamaño del producto de PCR, llamado amplicón.



Etapas de la PCR. (a) Se calienta el ADN diana para separar las cadenas, y se añade ADN polimerasa junto con dos oligonucleótidos cebadores en exceso, uno complementario a cada cadena. (b) Después del primer apareamiento, la extensión del cebador proporciona una copia del ADN bicatenario original. (c) Dos ciclos más de PCR producen cuatro y ocho copias, respectivamente de la secuencia original de ADN. (d) Efecto de correr 20 ciclos de PCR en una preparación de ADN que originalmente contenía diez copias del gen diana. La gráfica es semilogarítmica. Imagen tomada de Brock 14^o Edición.

DISEÑO DEL ENSAYO DE PCR

Al plantear un ensayo de PCR debemos tener en cuenta ciertos puntos básicos para garantizar un resultado fiable. Entre ellos:

- Extracción del material genético.
- Diseño de los cebadores o primers.
- Optimización de las temperaturas y tiempos del programa de PCR.
- Tamaño del producto de PCR o amplicón que deseamos obtener.
- **CONTROLES** de reacción, ¡*MUY IMPORTANTES!* Para que un resultado de PCR sea **VÁLIDO** debe contar con los siguientes controles:

Control positivo: Se utiliza una muestra portadora del gen de interés, la cual sabemos que debe resultar positiva. Nos ayuda a evitar *falsos negativos*.

Control negativo: En lugar de la muestra se reemplaza por agua bidestilada. De esta forma corroboramos que los reactivos estén en buenas condiciones y evitamos *falsos positivos* por contaminación.

Para asegurar la buena calidad del material genético obtenido de la extracción se realiza el siguiente ensayo:

Determinación de la integridad del ADN extraído

- a. Preparar agarosa al 0,9 % en buffer TBE 0,5X, fundir y dejar solidificar.
- b. Tomar 2 µl de ADN y mezclarlos con 8 µl de buffer de corrida.
- c. Sembrar los 10 µl finales y realizar una electroforesis a 80V, 40 min.

Se debe observar una sola banda cuando el ADN se encuentra íntegro, cerca de la línea de siembra porque tiene un alto peso molecular. Si el ADN se ha disgregado se observa toda la zona de corrida como fluorescente

PROCEDIMIENTO TÉCNICO

1. PCR convencional o de punto final:

El proceso se desarrolla en un microtubo de PCR de 0,2 ml o en placas de 96 pocillos. En cada tubo o pocillo se coloca la mezcla de reacción (también llamada *Master Mix*), la cual contiene todos los reactivos necesarios:

- Agua bidestilada estéril
- Buffer de PCR
- dNTPs (desoxinucleótidos)
- MgCl₂
- Par de cebadores
- *Taq* polimerasa
- ADN blanco (también llamado templado)

Se llevan las muestras en estudio y los controles al termociclador que será programado según protocolo específico.

a. Análisis de los productos

El producto obtenido se somete a electroforesis en gel de agarosa. Al fundir la agarosa, se agrega GelRed (un colorante fluorescente que se intercala en la doble hebra de ADN), se arma el gel con un peine que da forma a los “wells” o pocillos, se colocan los productos de la amplificación, uno en cada pocillo, y se realiza la electroforesis. La separación de bandas se produce en función sólo de su tamaño, y no de la carga eléctrica porque en este caso el ADN siempre tiene carga negativa y por lo tanto migrará hacia el ánodo. Una vez terminada la corrida se coloca el gel en un transiluminador y se observa con luz UV. Una banda de masa molecular apropiada (por comparación con patrones de ADN en el mismo gel) sería indicativa de que el ADN blanco fue amplificado exitosamente.

b. Ventajas

- Rapidez en el diagnóstico.
- Mayor sensibilidad que los cultivos.
- A partir de una muestra pequeña de ADN se puede obtener una cantidad considerable de copias para el estudio que se vaya a realizar.
- El producto se puede utilizar para clonación, secuenciación y análisis.
- Se puede amplificar ADN de cualquier organismo vivo o muerto.

2. PCR en tiempo real o cuantitativa

Esta variante de PCR también se desarrolla en microtubos de 0,2 ml o en placas de 96 pocillos. La mezcla de reacción, está compuesta por los mismos reactivos de la PCR convencional, agregando sondas marcadas con un fluoróforo o un intercalante de ADN que emite fluorescencia. Estos agregados, le permiten al termociclador, específico de esta variante de PCR, captar la emisión de fluorescencia y así registrar la amplificación en tiempo real.

Componentes de la mezcla de reacción:

- Agua bidestilada estéril
- Buffer de PCR
- dNTPs
- MgCl₂
- Par de cebadores
- **Sondas específicas o intercalante de ADN**
- *Taq* polimerasa

- **ADN blanco**

Se llevan las muestras en estudio y los controles al termociclador que será programado según protocolo específico.

a. Análisis de los productos

El resultado de una PCR en tiempo real se visualiza en un gráfico de amplificación, en el cual se expresa la fluorescencia detectada por el equipo en el eje de las ordenadas y el número de ciclos de la PCR en el eje de las abscisas. De esta forma, la curva de amplificación consta de una *fase inicial* donde la producción de fluorescencia está por debajo del nivel de detección del equipo, una *segunda fase (fase exponencial)* en la que se da un incremento de la fluorescencia, el cual es en forma exponencial (en cada ciclo se duplica el número de copias del fragmento amplificado), y una *tercera fase (meseta o plateau)* donde finaliza la reacción y se estabiliza la fluorescencia. En este gráfico es posible establecer un valor de fluorescencia umbral que señala la zona de aumento exponencial. Este valor se representa en el gráfico con una recta horizontal y se denomina línea **Threshold o Umbral**. Un parámetro fundamental en una qPCR, y en función del cual se van a realizar los ensayos de cuantificación, es el denominado **Ciclo Umbral o Threshold Cycle (CT)**. Este se define como el ciclo en el cual la fluorescencia supera el valor umbral. El valor del **CT** se relaciona inversamente con la cantidad inicial de templado.

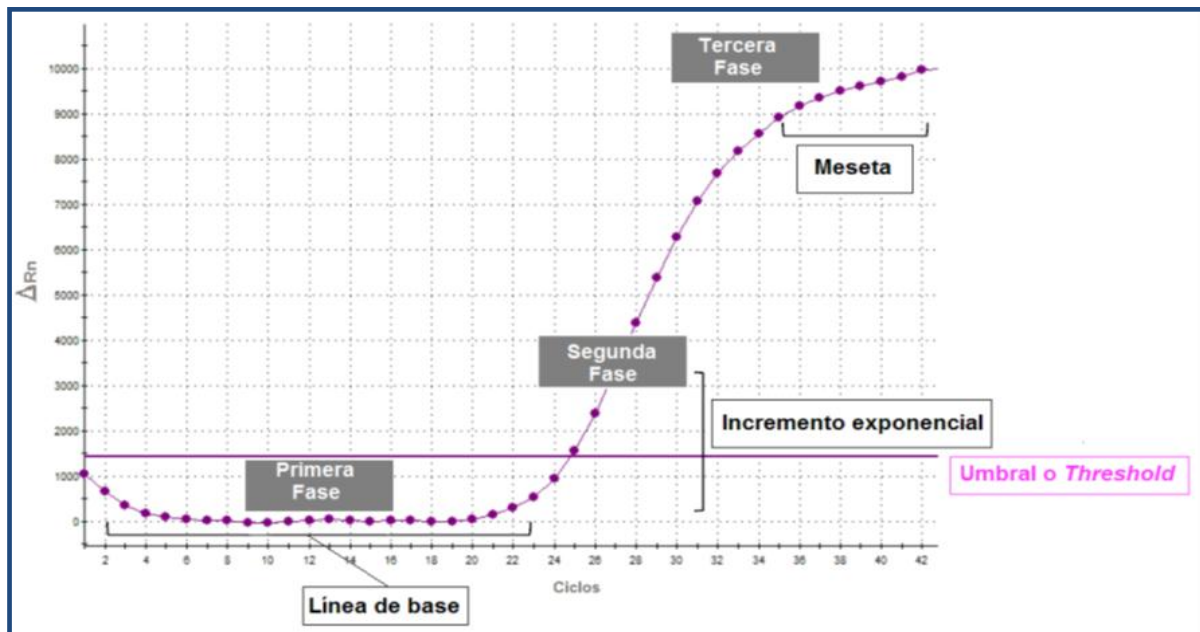
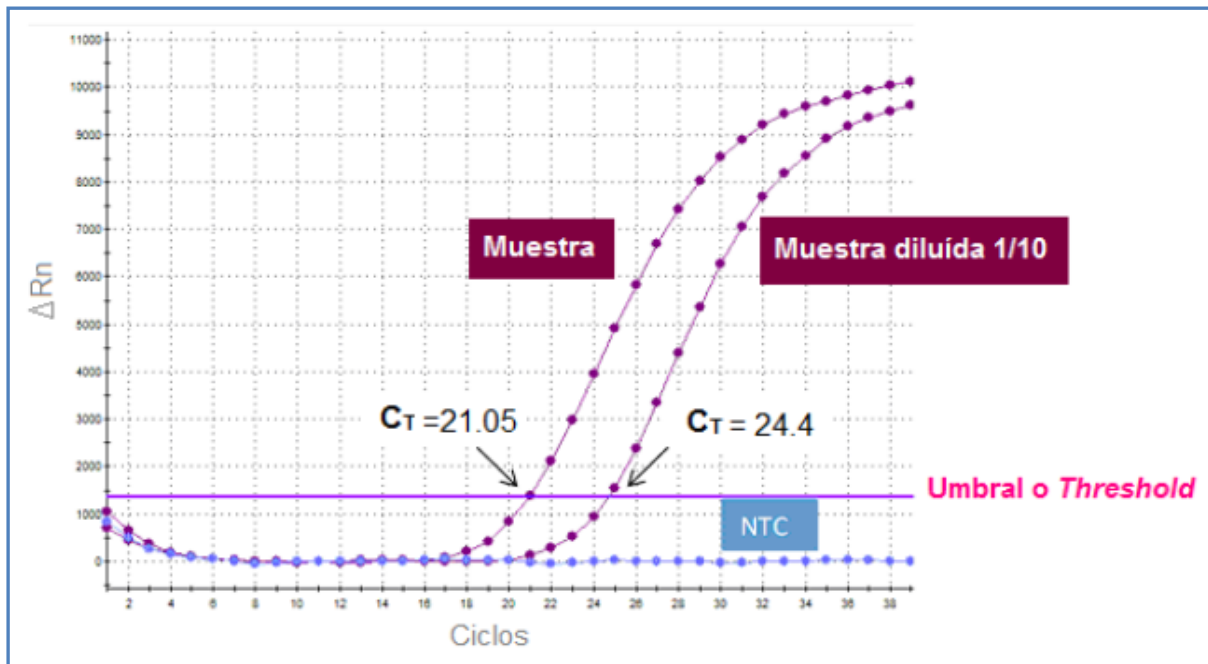


Gráfico de amplificación de PCR en tiempo real mostrando las tres fases de las que consta. Durante la primera fase la fluorescencia emitida no sobrepasa el límite de detección y corresponde a la línea de base. En la segunda fase se produce un aumento exponencial de la fluorescencia en la parte inicial y en la tercera fase la fluorescencia emitida se estabiliza llegando a una meseta. El umbral o threshold corresponde a la línea horizontal en la gráfica donde se produce un cambio significativo en la fluorescencia. *Imagen tomada de "Conceptos Básicos sobre PCR cuantitativa (Real Time)" - Lic. Belén Jerez - Dr. Maximiliano Juri Ayub.*



Ciclo Umbral o CT. El punto de intersección de una curva de amplificación con el umbral se denomina CT (Threshold Cycle). Este punto indica el ciclo en el que la fluorescencia generada dentro de la reacción alcanza el valor umbral. *Imagen tomada de "Conceptos Básicos sobre PCR cuantitativa (Real Time)" - Lic. Belén Jerez - Dr. Maximiliano Juri Ayub.*

Sistema de detección usados en PCR en tiempo real

Los fluoróforos utilizados en este método pueden ser de dos tipos:

- Intercalantes de ADN: Emiten fluorescencia cuando se unen a la molécula de ADN, y su intensidad aumenta de manera proporcional a la concentración de ADN de doble cadena. Existen distintos ejemplos actualmente utilizados como SYBR Green o EvaGreen. Permite el empleo de un solo fluoróforo en diferentes ensayos. Entre sus desventajas se encuentra que no permite amplificar varios genes en una misma reacción (PCR multiplex) y la señal emitida no es específica, ya que el fluoróforo se une a cualquier amplicón de ADN. Es por esto que previo a su uso, es obligatorio verificar la especificidad de la señal, analizar la curva y comprobar que la señal emitida se deba a la amplificación del ADN blanco.
- Sondas específicas para fragmentos de ADN (emiten fluorescencia cuando se amplifico el fragmento de interés): Dentro de este grupo, tenemos diversas opciones, pero todas se basan en el mismo principio, la transferencia de energía entre un fluoróforo, un donador o reportero de energía, y un aceptor o quencher. Cuando el reportero y el quencher están cerca, este último absorbe la fluorescencia del reportero y no puede ser detectada. Cuando están separados, el reportero emite fluorescencia la cual es detectada por un fotodetector.

b. Ventajas con respecto a la PCR convencional

- Altamente específica.
- Muy sensible.
- Rapidez en la visualización de los resultados (no es necesario realizar electroforesis en geles).
- Puede detectar diferencias en una sola copia de ADN.
-

c. Desventajas

- Reactivos costosos.

PCR CONVENCIONAL y PCR EN TIEMPO REAL

CONCEPTOS BÁSICOS

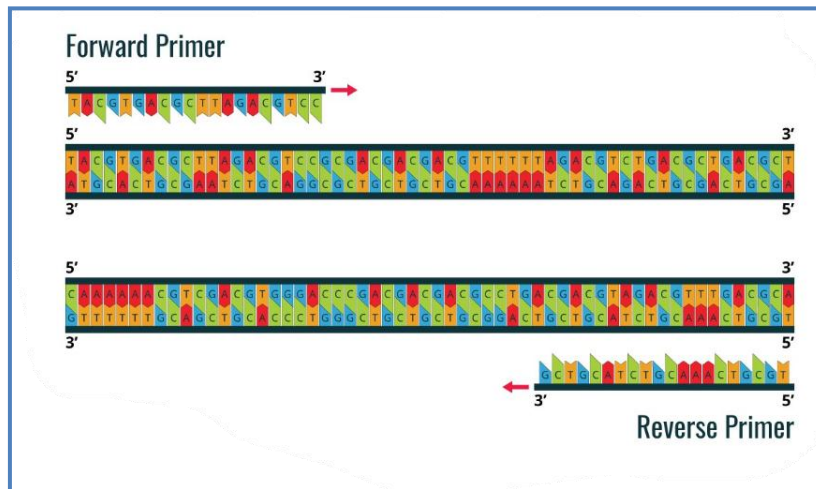
- Especificidad: Generación de un único producto de amplificación.
- Eficiencia: Máxima producción de amplificación en función del número de ciclos.
- Fidelidad: Número de errores que comete la DNA polimerasa durante la copia (menor número de errores, mayor fidelidad).
- Sensibilidad: Mínima cantidad de ADN que se necesita para obtener una gran cantidad de copias.

CARACTERÍSTICAS DE ALGUNOS COMPONENTES DE LA REACCIÓN DE PCR

Cebadores, primers, oligonucleótidos o iniciadores: fragmentos de cadena simple que se necesitan para iniciar la replicación ya que la enzima polimerasa utiliza un OH- libre para poder polimerizar. Reconocen una región específica en la secuencia a amplificar del ADN. Se requiere de dos pares de primers: uno *sense* y otro *antisense* (forward y reverse) para obtener una amplificación geométrica de la secuencia de interés.

Condiciones que debe cumplir un par de cebadores:

- Tamaño: 15 - 30 pares de bases.
- Porcentaje GC: 40 -60 %.
- No deben tener, entre ellos, una diferencia mayor a 5°C en la temperatura melting.



Pares de primers: uno sense y otro antisense (forward y reverse) para obtener una amplificación geométrica de la secuencia de interés.

El annealing o apareamiento de los primers con el templado (ADN a amplificar) depende de:

- Tiempo
- Temperatura
- Concentración de los primers
- Concentración del templado
- Longitud de los primers
- Bases que componen a los primers

Temperatura de fusión o “melting” (T_m) es la temperatura a la cual el 50% de los primers y su hebra complementaria de ADN forman un dúplex. Para oligonucleótidos de 20 bases de longitud o menos se calcula como:

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$$

Temperatura de “annealing” (T_a), hibridización o pegado de los primers al templado, es una temperatura más baja que la T_m, lo cual incrementa la probabilidad de pegado correcto de los primers a su secuencia blanco complementaria. Se calcula como:

$$T_a = T_m - 5^\circ \text{ a } 10^\circ \text{C}$$

Deoxinucleótidos (dNTPs), dATP, dCTP, dGTP, dTTP: Durante la realización de la PCR, los 4 nucleótidos tienen que encontrarse en igual concentración. La concentración óptima es entre 10 y 15 μM.

Mg²⁺: La concentración de Mg²⁺ influye en la unión de los primers al ADN molde, la especificidad del producto, la actividad de la enzima y la formación de dímeros de primer. Es por esto que debe ensayarse la concentración óptima para cada sistema.

Tabla comparativa entre PCR convencional y PCR en tiempo real:

	PCR convencional o de punto final	PCR en Tiempo Real
Tipo de análisis	Cualitativo	Cuantitativo
Zona de detección	Fase de meseta o <i>plateau</i>	Fase exponencial
Visualización de los productos de amplificación (amplicones)	Al final de la reacción Electroforesis en geles	Durante toda la reacción Gráficos de amplificación (escala lineal y logarítmica)
Manipulación post PCR	Si Riesgo de Contaminación con amplicones	No Menor riesgo de contaminación con amplicones
Equipamiento para la reacción	Termociclador	Equipo de PCR en Tiempo Real (termociclador, sistema óptico, computadora)
Ventajas	Más Barata	Mayor reproducibilidad Mayor especificidad Mayor sensibilidad

MATERIAL AUDIOVISUAL:

[PCR: Reacción en cadena de la polimerasa \[TEÓRICO Y PRÁCTICO\] - YouTube](https://www.youtube.com/watch?v=mpRy8CSAISs) :

[ELECTROFORESIS de ADN en GEL de AGAROSA \[TEÓRICO y PRÁCTICO\] - YouTube](https://www.youtube.com/watch?v=i4l-rVZ3--8) :

[Distintos tipos de PCR's \(PCR / RT-PCR / qPCR / RT-qPCR\) - YouTube](https://www.youtube.com/watch?v=inFedK-IVZM) :

MATERIALES Y MÉTODOS

PCR simple para genes *yst* de *Yersinia enterocolitica*

- Se utilizará ADN previamente extraído de una cepa de *Y. enterocolitica* del cepario de Microbiología, UNSL.
- Control positivo: ADN de *Y. enterocolitica* biotipo 1B, serotipo O:8, pYV+ (WAP), donada gentilmente por el Dr. Ingo Authenrieth, Tübingen, Alemania.
- Control negativo: ADN de cepa de *Streptococcus mutans* del cepario de Microbiología, UNSL.

Materiales:

- Material de plástico descartable: tubos Eppendorf, tips plásticos de diferentes volúmenes, microtubos de PCR.
- Reactivos necesarios para PCR y electroforesis en gel de agarosa.
- Termociclador.
- Cuba de electroforesis horizontal.
- Calculadora científica.

PROCEDIMIENTO:

Se utilizarán los siguientes primers:

PRIMER	SECUENCIA DEL OLIGONUCLEÓTIDO (5'-3')	TM (°C)	TAMAÑO AMPLICÓN
<i>yst F</i>	TTTTGGCTCTGGTATTAATGCTG	59,2	190 pb
<i>yst R</i>	CACAGGCAGGATTGCAACATA	60,6	

Preparación de la mezcla de reacción:

- Aplicando la fórmula $V_i \times C_i = V_f \times C_f$, completar la siguiente tabla de reactivos. Tomar un tubo Eppendorf para preparar la mezcla de reacción 10x. *Colocar todo en bandeja con hielo!!* Comenzar con el agua ultrapura.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN STOCK DEL REACTIVO	CONCENTRACIÓN DEL REACTIVO EN LA MEZCLA DE REACCIÓN	1X (µL)	10X (µL)
Buffer	10 x	1 x		
Mezcla dNTPs	2,5 mM	0,2 mM		
Mg Cl ₂	50 mM	1,5 mM		
Primer <i>yst F</i>	10 µM	0,1 µM		
Primer <i>yst R</i>	10 µM	0,1 µM		
<i>Taq</i> polimerasa	5 U/µl	0,04 U/µl		
Templado			2	
Agua ultrapura				
Vol. final			25	

- Rotular microtubos de PCR estériles según cantidad de grupos por comisión
- Fraccionar 23 µl de la mezcla de reacción en cada tubo.
- Agregar 2 µl de templado por tubo
- Control positivo: agregar 2 µl de templado de *Y. enterocolitica* WAP.
- Control negativo: agregar 2 µl de templado de *Streptococcus mutans*.
- Control de reactivos: agregar 2 µl de agua ultrapura estéril.

Programa de amplificación de PCR para el gen *yst* en el termociclador:

Pre-PCR: 94°C por 3 min (garantiza la completa desnaturalización del ADN)

PCR: 35 ciclos de: 94°C por 1,5 min, 59°C por 1,25 min y 72°C por 1 min

Post-PCR: extensión a 72°C por 7 min (asegura la completa extensión de las hebras de ADN)

Detección de los productos de amplificación:

Con tip estéril colocar 2 µl de buffer de siembra en cada tubo con producto de PCR (la muestra se tiñe de color azul y, por el glicerol del buffer, adquiere suficiente densidad para permanecer dentro del pocillo de agarosa), mezclar varias veces y, usando un tip diferente por muestra, sembrar 10 µl en cada pocillo del gel de agarosa al 2% ya preparado. Correr a 80 Volts por 40 min. Observar en un transiluminador UV. Fotografíar y analizar.

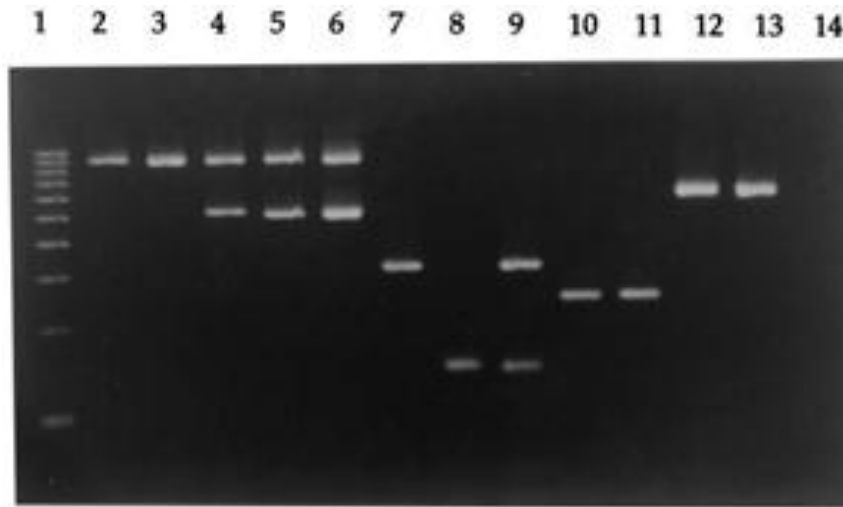
EJERCICIOS DE APLICACIÓN

1. Cepas patógenas de *Escherichia coli* son causa frecuente de diarrea infantil y deben ser diferenciadas de las cepas no patógenas que habitan normalmente el intestino. Una PCR múltiple que amplifica simultáneamente 6 genes fue realizada sobre 13 cepas para determinar la presencia de los siguientes genes de virulencia:

- de lesión al epitelio intestinal (*eae*, 900 pb)
- expresión de toxina Shiga (*stx*, 500 pb)
- expresión de *elt* (300 pb) y *est* (150 pb)
- factor de agregación (*aggR*, 250 pb)
- antígeno de invasión (*ipaH*, 600 pb)

Observando la fotografía del gel en la siguiente página:

- a) Determine qué genes están presentes en cada cepa
 b) Complete el siguiente cuadro



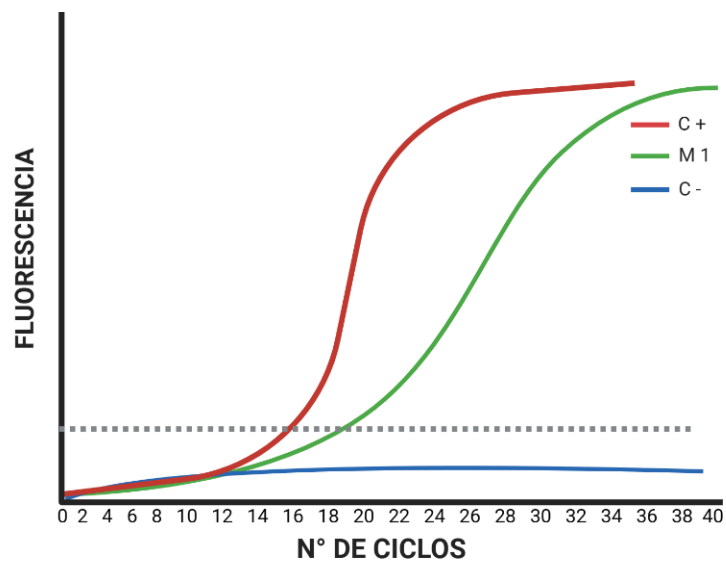
Fotografía del gel. Carril 1: marcador de ADN de 100 pb; carriles 2-14: cepas de *E. coli*. Se usaron controles positivos y negativos, pero no se muestran en la imagen.

Pocillo N°	<i>eae</i>	<i>stx</i>	<i>elt</i>	<i>est</i>	<i>aggR</i>	<i>ipaH</i>	Potencial patógeno
2	+	-	-	-	-	-	+
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							

2. Teniendo en cuenta lo visto sobre PCR en tiempo real, defina “*Ct*”.

3. A partir del siguiente gráfico, calcular:

- a. El valor de *Ct* del C+ y de la muestra 1 (M1)
 b. A partir del valor del *Ct*, ¿Cuál de las dos, C+ o M1, presenta mayor concentración de ADN?



BIBLIOGRAFÍA

- Mastrodonato A.C., Favier G.I., Lucero Estrada C.S.M., Vidal R., Escudero M.E. 2018. Bioserotypes, virulence genes, antimicrobial susceptibility and genomic diversity of *Yersinia enterocolitica* isolates from Argentina and Chile. J. Food Saf. doi.org/10.1111/jfs.12491.
- Tórtora G.J., Funke B.R., Case C.L. 2017. Introducción a la Microbiología. 12ª ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Bender K.S., Buckley D.H., Stahl D.A. 2015. Brock. Biología de los microorganismos, 14ª ed. Ed. Pearson, USA.

TRABAJO PRÁCTICO N° 1-B

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUA DE RED

OBJETIVOS

- Determinar la calidad microbiológica de agua potable por recuento de aerobios mesófilos, investigación de coliformes totales y fecales, y determinación de la presencia de *Pseudomonas aeruginosa*.

- Comparar los resultados obtenidos con los valores admitidos por el Código Alimentario Argentino (CAA), y establecer la aptitud de la muestra analizada.

INTRODUCCIÓN

Se considera **agua potable** de suministro público y agua potable de uso domiciliario la que es apta para la alimentación y uso doméstico: no deberá contener sustancias o cuerpos extraños de origen biológico, orgánico, inorgánico o radiactivo en tenores tales que la hagan peligrosa para la salud. Deberá presentar sabor agradable, y ser prácticamente incolora, inodora, límpida y transparente. El agua potable de uso domiciliario es la que proviene de un suministro público, pozo u otra fuente, ubicada en los depósitos o reservorios domiciliarios (CAA, Cap. XII, art. 982).

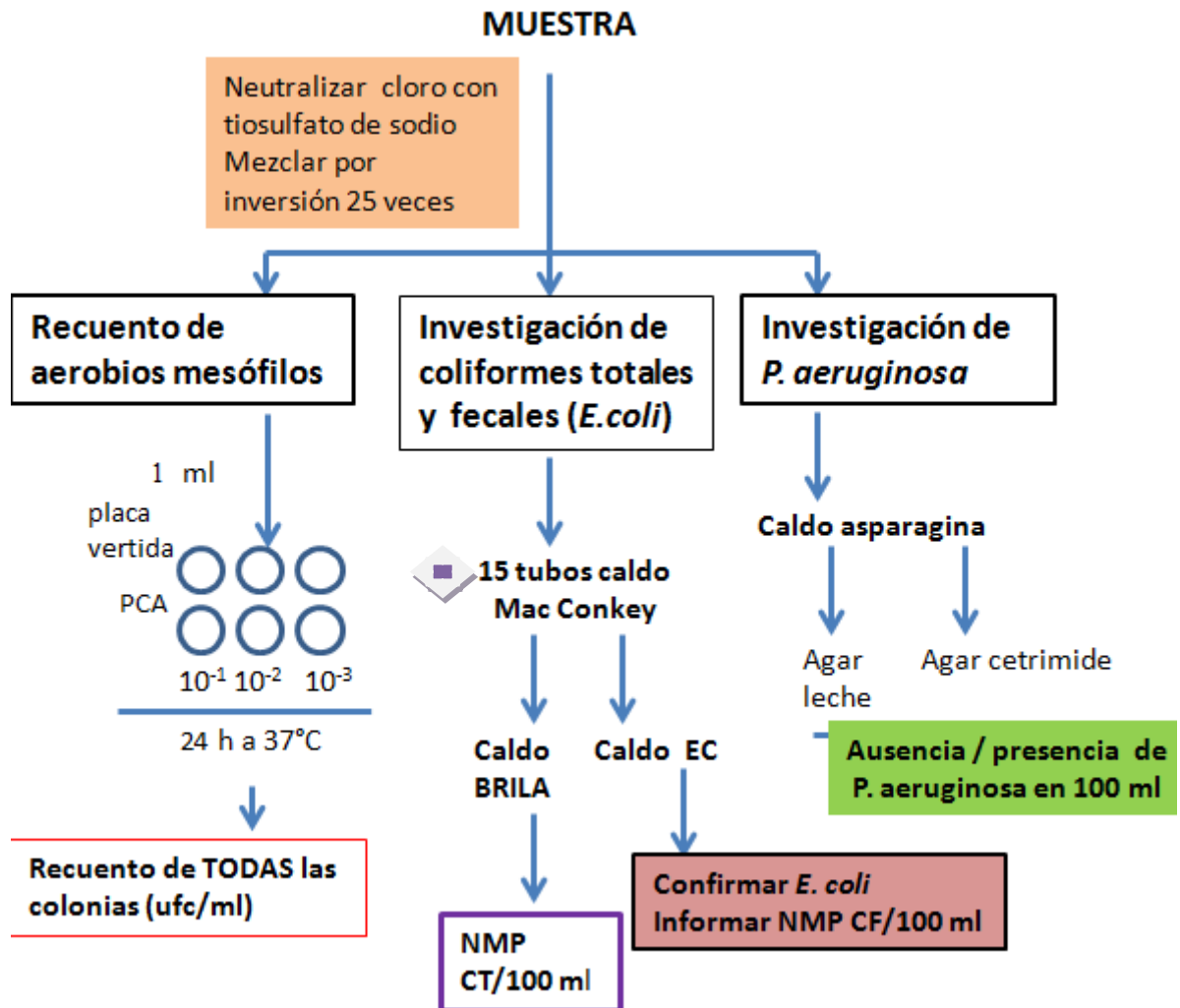
Según el CAA, las características microbiológicas a estudiar son:

- **bacterias aerobias mesófilas**, cuyo recuento refiere a la calidad general del agua potable,
- **bacterias coliformes totales** (*Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* *Escherichiacoli*) que son consideradas indicadores de contaminación fecal. Las tres primeras pueden tener origen ambiental. Sin embargo,

- *Escherichia coli*, considerada dentro **decoliformes fecales**, proviene del hábitat intestinal humano o animal, y su presencia en agua es inadmisibile.

- *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno sensible a la cloración, que debería estar ausente si el agua de bebida es adecuadamente clorada.

Diagrama de flujo para análisis microbiológico de agua potable



NOTA IMPORTANTE: EN ESTE DIAGRAMA DEBEN CONSIDERARSE EL USO DE SOLO 5 TUBOS DE CALDO MAC CONKEY, SEGÚN LAS ACTUALIZACIONES 2023 QUE SE DETALLAN A CONTINUACION.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Recolección de muestras

1.1. Toma de muestra: en botellas o frascos estériles

1.2. Neutralización de cloro en muestras cloradas: usar tiosulfato de sodio en las siguientes proporciones:

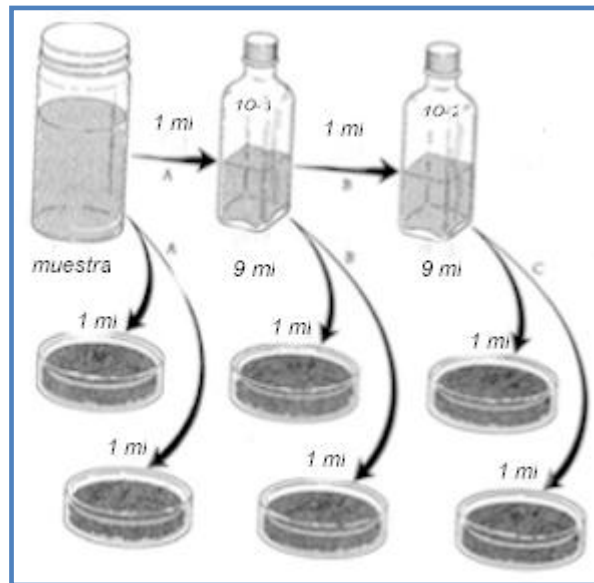
-**agua de bebida**: 0.1 ml de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 3% en 120 ml de muestra dará una concentración final de 18 mg/L y neutralizará 5 mg/L de cloro residual.

-**agua de efluentes cloacales clorados**: 0.1 ml de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 10% en 120 ml de volumen de muestra neutralizará 15 mg/L de cloro residual.

La muestra se debe mantener refrigerada y se debe procesar dentro de las 6 h después de la recolección.

2. Recuento de bacterias aerobias mesófilas

Procedimiento



-Preparar varias diluciones de la muestra (1/10, 1/100, etc).

-Colocar 1 ml de la muestra sin diluir, y de cada una de las diluciones en placas de Petri vacías y estériles, por duplicado.

-Verter 10 a 12 ml de agar tripton-glucosa-extracto de levadura (también llamado agar de recuento – PCA), fundido y enfriado a 50-55°C, en cada placa. Imprimir suaves movimientos de rotación para mezclar.

-Dejar solidificar. Incubar a 35°C durante 24 h.

Se consideran para el recuento aquellas cajas que contengan entre 30 y 300 colonias.

El recuento bacteriano resulta del promedio del número de colonias en 2 cajas pertenecientes a la misma dilución, multiplicado por la inversa de la dilución usada, expresado en ufc/ml.

Incluir en el informe el método usado, temperatura, tiempo de incubación y el medio de cultivo.

Medio de cultivo: agar triptona-glucosa-extracto de levadura o agar de recuento (PCA)

Triptona 5 g
Extracto de levadura..... 2.5 g
Glucosa..... 1 g
Agar..... 15 g
A.D. 1000 ml

pH: 7.0 ± 0.2

Autoclavar a 121°C durante 15 min.

Valor máximo admitido por el Código Alimentario Argentino: menor a 500 ufc/ ml.

3. Investigación de COLIFORMES TOTALES (géneros: *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Escherichia*)

3.1. ANÁLISIS PRESUNTIVO

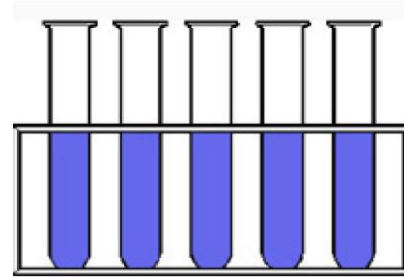
- Investigación de COLIFORMES TOTALES

Procedimiento

Técnica del número más probable (NMP) por fermentación en tubos

Agitar la muestra vigorosamente alrededor de 25 veces.

En una serie de 5 tubos conteniendo 20 ml de caldo Mac Conkey doble concentración (D.C), sembrar 20 ml de muestra en cada uno. El caldo Mac Conkey puede ser reemplazado por caldo Lauril sulfato.



Sembrar 20 ml de muestra
en cada tubo con pipeta estéril

Muestra de agua

Cinco tubos conteniendo
20 ml de Mac Conkey D.C.

Incubar a 37°C 24h. Observar gas y puede o **NO** observarse viraje de color del medio de verde a

Hacer una primera lectura a las 24 ± 2 h para observar producción de gas y producción de ácidos a partir de lactosa que se visualiza por viraje del indicador de violeta a amarillo. Esto constituye una reacción presuntiva positiva. Si fuera negativo, reincubar y reexaminar al final de 48 ± 3 h. Cada tubo positivo en Mac Conkey debe ser confirmado por repique (ansada) a caldo BRILA.



Interpretación: Producción de gas y viraje de color violeta a amarillo en caldo Mac Conkey a las **48 h \pm 3 h** constituye un test presuntivo **positivo**. Continuar con fase confirmativa (Fotografía tomada en nuestro laboratorio).

Medio de cultivo: caldo Mac Conkey

Bilis fresca de buey..... 5 g
Peptona.....20 g
Lactosa.....10 g
Púrpura de bromocresol 0.01 g
A.D.....1000 ml

pH =7.3 ± 0.2

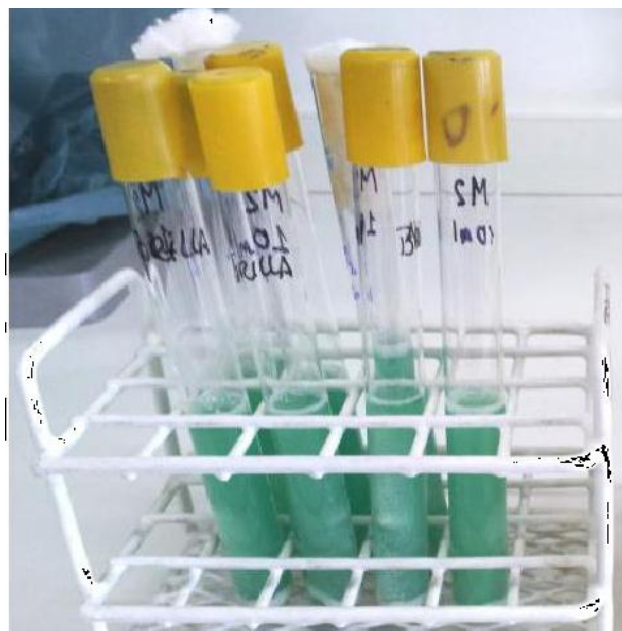
Envasar en tubos con campanita de Durham y esterilizar.

3.2. ANÁLISIS CONFIRMATIVO

3.2.1.-Confirmación de COLIFORMES TOTALES

Procedimiento

De los tubos de Mac Conkey que presentan gas y viraje de color a las 48 h, sembrar con ansa en anillo en caldo BRILA. Incubar 24 h a 35-37°C.



Interpretación: La producción de gas en caldo BRILA confirma la presencia de coliformes **totales**. Calcular NMP (número más probable en 100 ml) desde la Tabla de NMP (Fotografía tomada en nuestro laboratorio).

Medio de cultivo: Caldo bilis-lactosa-verde brillante (BRILA)

Peptona..... 10 g
 Lactosa 10 g
 Oxgall..... 20g
 Verde brillante..... 0.0133 g
 A.D..... 1000 ml

pH = 7.2 ± 0.2

Repartir 10 ml en tubos con campana de Durham y esterilizar.

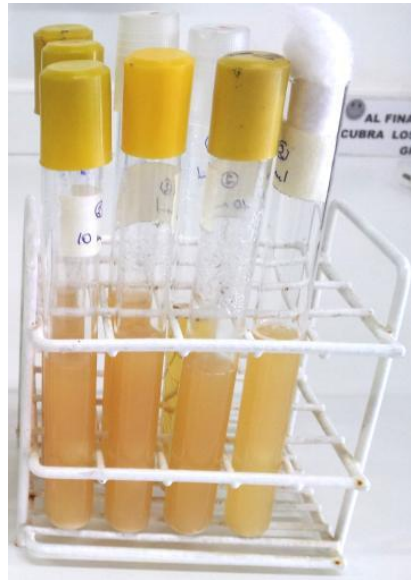
Finalmente, identificar mediante el uso de la siguiente tabla el NMP de coliformes totales /100 ml (APHA, American Public Health Association, actualización 2023):

No. of Tubes Giving Positive Reaction Out of 5 (20 mL Each)	MPN Index/ 100 mL	95% Confidence Limits (Exact)	
		Lower	Upper
0	<1.1	-	3.5
1	1.1	0.051	5.4
2	2.6	0.40	8.4
3	4.6	1.0	13
4	8.0	2.1	23
5	>8.0	3.4	-

El Código Alimentario Argentino admite <1,1 NMP de coliformes totales en 100 ml de muestra.

3.2.2.- Confirmación de COLIFORMES FECALES (*Escherichia coli*)

Procedimiento:



Interpretación: La ausencia de gas en caldo EC dentro de las 24 h de incubación indica **AUSENCIA** de coliformes fecales. El análisis de coliformes fecales finaliza aquí. La producción de gas y turbidez en caldo EC dentro de las 24 h o menos indica **PRESENCIA** de coliformes fecales y se debe continuar para confirmar *E. coli* (Fotografía tomada en nuestro laboratorio).

De cada uno de los tubos positivos de caldo Mac Conkey en la fase presuntiva, transferir cultivo con ansa estéril de 3-3.5 mm de diámetro a caldo EC. Incubar en baño de agua a 44.5 ± 0.2 °C por 24 ± 2 h.

Medio de cultivo: caldo EC

Triptosa	20 g
Lactosa	5 g
Sales biliares (mezcla) o salesbiliares N°3.....	1.5 g
K ₂ HPO ₄	4 g
KH ₂ PO ₄	1.5 g
NaCl	5 g
A.D.	1000 ml

pH = 6.9 ± 0.2 . Envasar con campanita de Durham y esterilizar.

3.2.2.1. Confirmación de *Escherichia coli*

Procedimiento

Desde cada uno de los tubos de caldo EC positivos, sembrar en agar eosina-azul de metileno (EMB) y observar el desarrollo de colonias características de *Escherichia coli*. Hacer Gram y pruebas bioquímicas principales [indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer, citrato (IMViC)].



Interpretación: El desarrollo de **colonias oscuras con brillo verde-metálico** en agar EMB, la observación de **bacilos y cocobacilos Gram negativos** al microscopio óptico, y un **IMViC ++ - -** confirman la presencia de *E. coli* (Fotografía tomada en nuestro laboratorio).

Computar los tubos EC donde se confirmó la presencia de *E. coli* con la nueva combinación de tubos positivos, calcular el NMP de coliformes fecales desde la Tabla de NMP.

El Código Alimentario Argentino recomienda ausencia de *E. coli* en 100ml de muestra.

Medio de cultivo: Agar Eosina Azul de Metileno (EMB)

- Peptona.....10.0 g
- Lactosa.....5.0 g
- Sacarosa..... 5.0 g
- Fosfato dipotásico..... 2.0 g
- Agar..... 13.5 g
- Eosina..... 0.4 g
- Azul de metileno.....0.065 g
- pH final: 7.2 ± 0.2

Disolver. Esterilizar en autoclave a no más de 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 45°C y distribuir agitando suavemente.

4. Investigación de *Pseudomonas aeruginosa*

4.1. TEST PRESUNTIVO

Procedimiento:

Medir 100 ml de muestra en recipiente estéril y sembrar en 100 ml de caldo asparagina doble concentración. Incubar hasta 5 días a 25°C. Observar bajo luz U.V.



Interpretación: El desarrollo de **fluorescencia verdosa por producción de pigmento en caldo asparagina** se considera test presuntivo positivo (Fotografía tomada en nuestro laboratorio).

Medio de cultivo: **caldo asparagina** (fórmula simple)

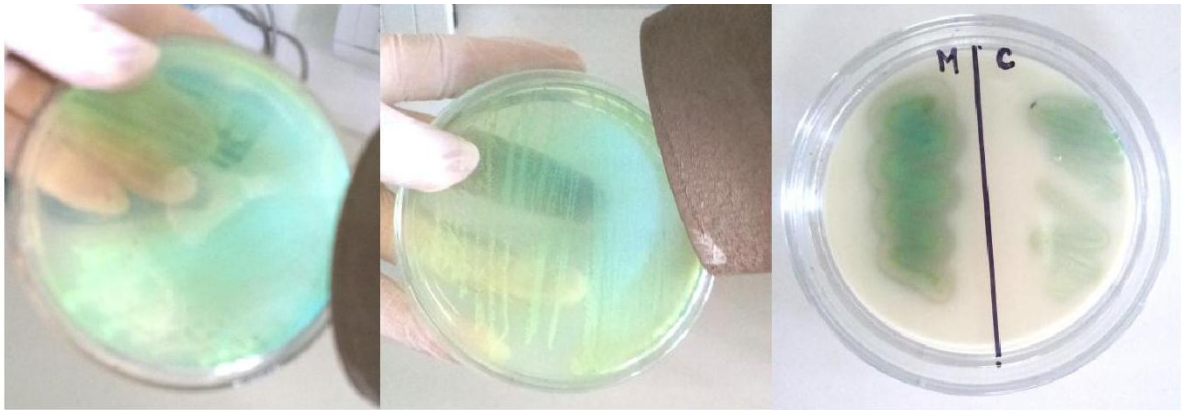
Asparagina.....	3 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
A.D.	1000 ml
pH = 6.9 a 7.2	

4.2. TEST CONFIRMATIVO

Desde caldo asparagina positivo, sembrar para las siguientes pruebas:

4.2.1. Digestión de caseína y producción de pigmento verde característico

Hacer una sola estría (de 2 a 4 cm de longitud) desde caldo asparagina sobre agar leche e incubar a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24-48 h.



Interpretación: *P. aeruginosa* hidroliza la caseína y produce un pigmento difusible verde o amarillento en agar leche (Fotografía tomada en nuestro laboratorio).

Medio de cultivo: Agar leche

A- Leche descremada 100 g
A.D. 500 ml

B- Caldo nutritivo..... 12.5 g
NaCl 2.5 g
Agar..... 15 g
A.D.500 ml

Esterilizar por separado las mezclas A y B, enfriar rápidamente a 55°C, combinar asépticamente las mezclas y verter en cajas de Petri.

4.2.2. Producción de pigmento verde característico

Sembrar con ansa desde caldo asparagina en agar King Ward Raney A, e incubar como se explicó para agar leche.



Interpretación: *P. aeruginosa* produce un pigmento fluorescente en agar King A, que se pone en evidencia bajo luz UV. El pigmento se puede extraer con cloroformo en medio alcalino (NH₄OH) y se observa de color azul (Fotografía tomada en nuestro laboratorio).

Medio de cultivo: Agar King Ward Raney “A”.

Peptona 2 g
Agar 1.5 g
Glicerol 1 g ó 1 ml
K₂SO₄ anhidro 1 g
MgCl₂ 0.14 g
Agua destilada 100 ml
pH: 7.2

4.2.3. Otros ensayos

Realizar Gram y prueba de oxidasa a colonias seleccionadas desde agar leche o King “A”.

- Prueba de la oxidasa

Se basa en que ciertos microorganismos contienen citocromo-oxidasas. Estas enzimas oxidan la dimetilparafenilendiamina en presencia de O₂ y citocromo y llevan alfa-naftol a indofenol de color azul.

Técnica: se emplean discos comerciales impregnados en los reactivos, que se introducen en una suspensión de la cepa a ensayar.

Interpretación: *P. aeruginosa* es un bacilo Gram negativo, que da positiva la prueba de la oxidasa.

El Código Alimentario Argentino recomienda ausencia de *P. aeruginosa* en 100 ml de muestra.

Según el CAA el agua de red domiciliaria debe cumplir los siguientes parámetros:

-Bacteria mesófilas aerobias < 500 UFC/ml

-Coliformes Totales: <1,1 NMP/100 ml

-Ausencia de *E. coli*

-Ausencia de *P. aeruginosa*

ACTIVIDADES A REALIZAR

1. Se procederá a realizar toma de muestra desde grifo de pileta del Laboratorio y se sembrará para las 3 determinaciones: recuento de aerobios mesófilos, coliformes totales e investigación de *P. aeruginosa*.

2. En medios de cultivo sembrados con una muestra de agua artificialmente contaminada, se realizará observación del desarrollo, y lectura e interpretación de los resultados obtenidos. Se informarán los resultados obtenidos.

3. Tomando como referencia los valores máximos admitidos por el CAA, se establecerá la calidad del agua analizada.

BIBLIOGRAFÍA

-Código Alimentario Argentino. Bebidas hídricas, agua y agua gasificada. http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_XII.pdf, actualizado 2023.

-Madigan, M.T; Martinko, J.M; Dunlap, P.V; Clark, D. P. 2015. Brock. Biología de los microorganismos. 14^a ed. Ed Prentice Hall, USA.

-Pubmed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>.

Informe de Laboratorio

ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO DE AGUA

Solicitado por:

Prodedencia de la muestra:

Fecha de recepción de la muestra:

Fecha de entrega del informe:

Resultados

Recuento de bacterias heterotróficas (método de placa vertida en agar triptona-glucosa-extracto de levadura, incubación a 37°C por 24 h)

Valor determinado: ufc/ml

Valor admitido por CAA: < 500 ufc/ml

Investigación de bacterias coliformes totales (NMP por la técnica de fermentación en tubos múltiples en caldo Mac Conkey, incubación a 37°C por 48 h)

Valor determinado:en 100 ml

Valor admitido por CAA: < 1,1 NMP de coliformes totales/100ml

Investigación de bacterias coliformes fecales (NMP por la técnica de fermentación en tubos múltiples en caldo EC, incubación a 44,5°C por 24 h)

Valor determinado:en 100 ml

Valor admitido por CAA: ausencia de coliformes fecales en 100ml

Investigación de *Pseudomonasaeruginosa*(en caldo asparagina, incubación a 22°C durante 5 días).

Valor determinado:en 100 ml

Valor admitido por CAA: ausencia en 100 ml

Conclusiones: La muestra de agua analizada **CUMPLE / NO CUMPLE** con las exigencias bacteriológicas establecidas para el consumo humano por el Art. 982 del Código Alimentario Argentino (CAA).

Firma y sello del profesional responsable:

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N° 2

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE PASTAS FRESCAS RELLENAS

OBJETIVOS

- Investigar la presencia de *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* sulfito reductores, hongos y levaduras, en una muestra de pasta fresca rellena.
- Informar presencia/ausencia o unidades formadoras de colonias (ufc)/g de los microorganismos investigados, según corresponda, y establecer la calidad microbiológica de la muestra analizada.

INTRODUCCIÓN

Los alimentos más altamente contaminados son los de origen animal (huevos, carnes rojas y blancas, leche). Entre las muestras con contenido de huevo se encuentran las pastas.

Todos los protocolos de investigación de microorganismos son esencialmente similares y comprenden:

- preenriquecimiento con fines de reparación de las células estresadas
- enriquecimiento selectivo
- aislamiento en medios selectivos y diferenciales
- estudio de las características bioquímicas de las colonias sospechosas
- análisis antigénico en dos fases: a) empleo de antisueros polivalentes, y b) utilización de antisueros específicos
- tipificación por medio de bacteriófagos

Los alimentos que han estado sometidos a desecación por calor, conservadores, congelamiento, alta presión osmótica, variaciones de pH, deben ser preenriquecidos en un medio no inhibitor para permitir el desarrollo de aquellas bacterias que hayan sufrido daño subletal.

Los alimentos crudos y productos terminados que hayan sido groseramente contaminados luego del procesamiento, pueden ser enriquecidos directamente en caldos selectivos para estimular el desarrollo de microorganismos de interés y prevenir el desarrollo de microorganismos de la flora acompañante.

Al realizar el análisis microbiológico de las pastas, debemos informar si se cumplimentan los requisitos del capítulo IX del Código Alimentario Argentino que reglamenta la producción y venta de alimentos farináceos- cereales, harinas y derivados, dentro de los cuales se encuentran los productos de fideería.

El Artículo 720 - (Res 305, 26.03.93) cita: "Las **pastas frescas no rellenas** en todos los casos deberán mantenerse refrigeradas y expendirse dentro de las 48 horas y responder a las siguientes exigencias microbiológicas:

***S. aureus* coagulasa positiva:** menor de 10^3 UFC/g

***Salmonella*:** ausencia: en 25 g".

El Artículo 720bis - (Res 305, 26.03.93) cita: "Las **pastas frescas rellenas** podrán ser elaboradas con rellenos preparados a base de ingredientes alimenticios de uso permitido, como por ejemplo carnes, verduras, papas, quesos, ricota, sesos. En todos los casos deberán mantenerse refrigeradas y expendirse dentro de las 48 horas. Responderán a las siguientes exigencias microbiológicas:

***S. aureus* coagulasa positiva:** menor de 10^3 UFC/g

***Clostridium* sulfito reductores:** menor de 10^3 UFC/g

***Salmonella*:** ausencia en 25 g".

Artículo 721 - (Res 687, 27.08.98) cita: "Las **pastas y las pastas frescas rellenas** podrán ser adicionadas de propionato de sodio y/o calcio entre otros conservantes. Los productos que hayan sido adicionados de las sustancias conservadoras mencionadas deberán expendirse en envases cerrados, bromatológicamente aptos y deberán llevar con caracteres bien visibles todos los requisitos de rotulación, la mención del conservador empleado, la indicación "Manténgase refrigerado" y la fecha de vencimiento (día, mes y año). Deberán mantenerse y transportarse refrigerados y cumplirán las siguientes exigencias microbiológicas:

a) Pastas frescas sin relleno:

***S. aureus* coagulasa positiva:** menor de 10^3 UCF/g

***Salmonella*:** ausencia en 25 g

Hongos y levaduras: menor de 10^4 UFC/g".

b) Pastas frescas rellenas:

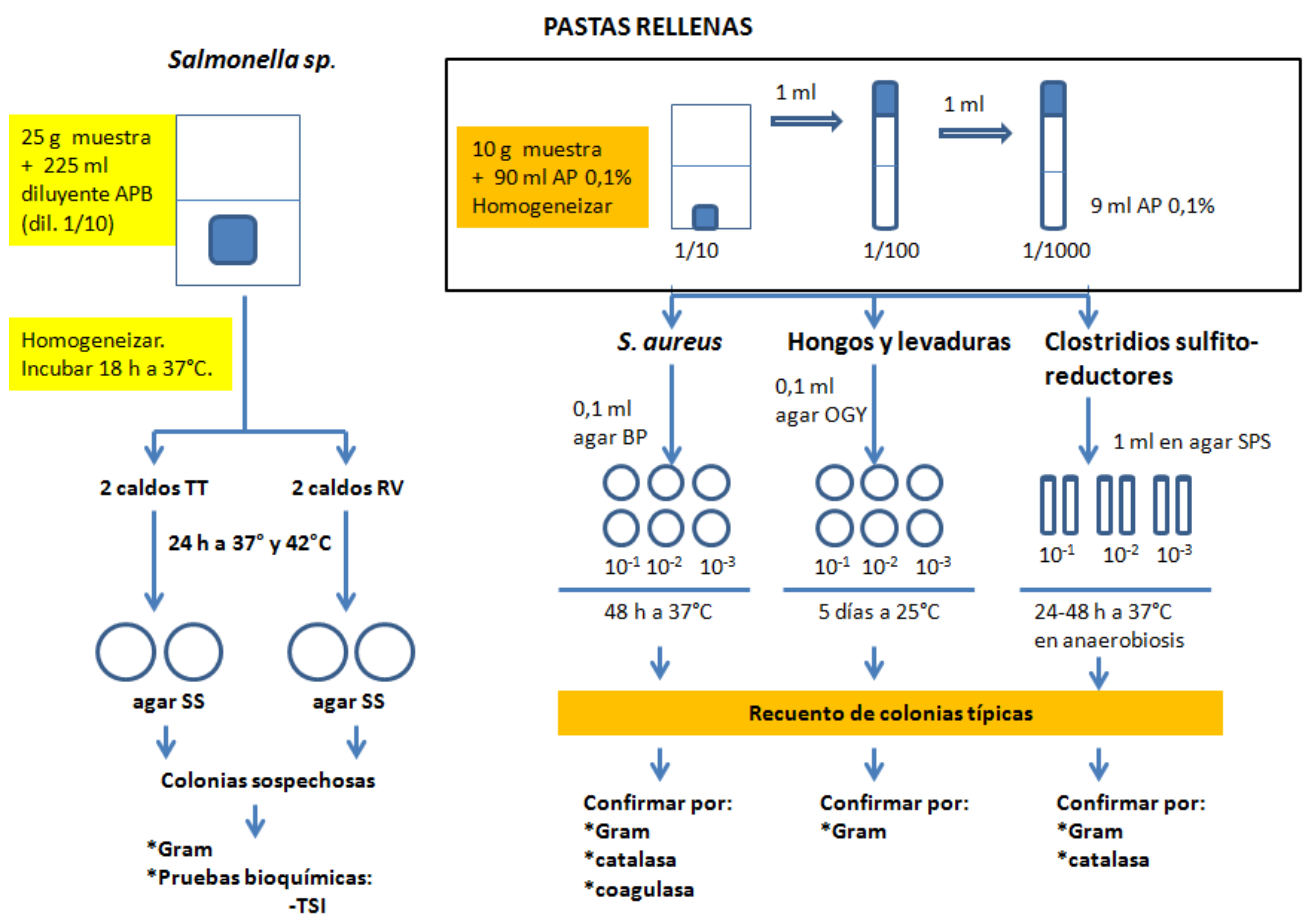
***S. aureus* coagulasa positiva:** menor de 10^3 UCF/g

***Salmonella*:** ausencia en 25 g

***Clostridium* sulfito reductores:** menor de 10^3 UFC/g

Hongos y levaduras: menor de 10^4 UFC/g".

Diagrama de flujo para investigar microorganismos patógenos y del deterioro en pastas frescas rellenas



MATERIALES Y MÉTODOS

A. Investigación de *Salmonella* sp.

Procedimiento

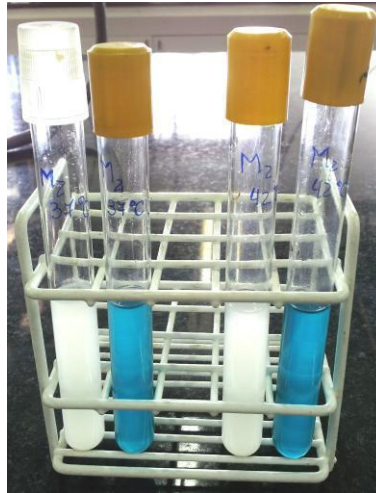
1° día: Preenriquecimiento

1. Pesar asépticamente 25 g de muestra en una bolsa de polietileno estéril.
2. Agregar una porción de un volumen total de 225 ml de agua peptonada bufferada (APB) estéril contenida en un frasco y homogeneizar en stomacher durante 1 min. Transferir el contenido de la bolsa al frasco que contiene el resto del medio de cultivo.
3. Incubar 18 h a 37°C.

2° día: Enriquecimiento

4. Desde APB transferir 1 ml de cultivo a 9 ml de caldo Rapaport-Vassiliadis (RV) y 1 ml a 9 ml de caldo tetrionato (TT). Hacerlo por duplicado.

5. Incubar un juego de RV y TT a 37°C, y el otro juego a 42°C durante 24 h.



Tubos de RV y TT (Fotografía tomada en nuestro laboratorio).

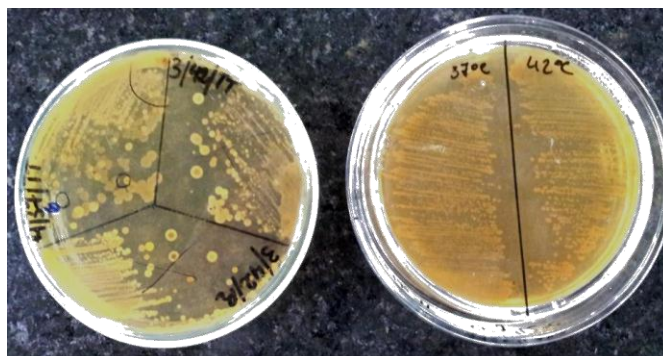
3° día: Aislamiento

6. A partir de cada tubo de RV y TT, sembrar en agar *Salmonella-Shigella* (SS)

7. Incubar 24 h a 37°C.

4° día: Identificación de colonias sospechosas de *Salmonella*

8. Observar la presencia de colonias sospechosas de *Salmonella* en agar SS: colonias no fermentadoras de lactosa con centro negro.



Colonias sospechosas de *Salmonella* en agar SS (Fotografía tomada en nuestro laboratorio).

9. Seleccionar por lo menos 3 colonias sospechosas de cada placa y sembrar en TSI y LIA. Incubar 24 h a 37°C. Los cultivos de *Salmonella* presentan:

- TSI: fondo amarillo (ácido), pico rojo (alcalino), con o sin H₂S.
- LIA: color púrpura (reacción alcalina) con ennegrecimiento del medio si hay producción de H₂S.

5° día: Ensayo de aglutinación en placa con antisueros y pruebas bioquímicas adicionales para *Salmonella*

10. De las cepas caracterizadas por TSI y LIA típicos de *Salmonella*, sembrar las siguientes pruebas bioquímicas:

Prueba bioquímica	Resultado
TSI	+K/A
ONPG	negativo
Lisina decarboxilasa	positiva
Ornitina decarboxilasa	positiva
Arginina decarboxilasa	positiva
Glicerol	negativa
SIM	+ - +
Rojo de metilo	positivo
Voges Proskauer	negativo

Ensayos sugeridos por el Centro Nacional de Referencia de Enterobacterias para identificar *Salmonella* (INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán, 2018).

11. Realizar ensayos de aglutinación en placa con antisueros polivalentes OA y OB. En caso de resultados positivos, enviar la cepa al Servicio Enterobacterias del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas “Dr. Carlos G. Malbrán”, Buenos Aires, para confirmación y determinación de serovariedad.

Informar PRESENCIA o AUSENCIA de *Salmonella* en 25 g de muestra.

El CAA establece AUSENCIA de *Salmonella* en 25 g de muestra.

Medios de cultivo empleados para investigar *Salmonella*

Agua peptonada bufferada (APB)

Peptona de caseína.....	10 g
NaCl.....	5 g
Fosfato disódico.12H ₂ O.....	9 g
Fosfato monopotásico.....	1,5 g
A.D.....	1000 ml

pH = 7,0 ± 0,2

Disolver, envasar en tubos. Esterilizar a 121°C durante 20 min.

Caldo Rapapport-Vassiliadis (RV)

Triptona.....	4,54 g
Cloruro de sodio.....	7,2 g
Cloruro de magnesio.6 H ₂ O.....	28,6g
Fosfato dipotásico.....	0,18 g
Fosfato monopotásico.....	1,26 g
Verde de malaquita.....	0,036 g
A.D.....	1000 ml

pH = 5,1 ± 0,2

Disolver, envasar en tubos. Esterilizar a 121°C durante 20 min.

Caldo tetratonato (TT)

Polipeptona.....	5 g
Sales biliares.....	1 g
Carbonato de calcio.....	10 g
Tiosulfato de sodio.....	30 g
A.D.....	1000 ml

pH= 7,0 ± 0,1

Mezclar los componentes. Calentar a ebullición. Enfriar a 45°C.

Agar *Salmonella Shigella* (SS)

Extracto de carne.....	5 g
Proteosa peptona o polipeptona.....	5 g
Lactosa	10 g
Mezcla de sales biliares.....	8.5 g
Tiosulfato de sodio	8.5 g
Citrato férrico	1 g
Agar.....	13.5 g
Verde brillante (0.33 ml de sol. al 0.1%)	0.33 mg
Rojo neutro (2.5 ml de sol. al 0.1%)	25 mg
A.D.....	1000 ml

pH = 7,0 ± 0,2

No esterilizar en autoclave. Se prepara asépticamente disolviendo los componentes en agua destilada estéril.

Medios diferenciales para pruebas bioquímicas empleadas para identificar *Salmonella*

-Agar TSI

Medio universalmente empleado para la diferenciación de enterobacterias, en base a la fermentación de glucosa, lactosa, sacarosa y a la producción de ácido sulfhídrico.

Fundamento

En el medio de cultivo, el extracto de carne y la pluripeptona, aportan los nutrientes adecuados para el desarrollo bacteriano. La lactosa, sacarosa y glucosa son los hidratos de carbono fermentables. El tiosulfato de sodio es el sustrato necesario para la producción de ácido sulfhídrico, el sulfato de hierro y amonio, es la fuente de iones Fe³⁺, los cuales se combinan con el ácido sulfhídrico y producen sulfuro de hierro, de color negro. El rojo de fenol es el indicador de pH, y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. Por fermentación de azúcares, se producen ácidos, que se detectan por medio del indicador rojo de fenol, el cual vira al color amarillo en medio ácido. El tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno el que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro.

Extracto de carne.....	3,0 g
Pluripeptona	20,0 g
Cloruro de sodio.....	5,0 g
Lactosa	10,0 g
Sacarosa.....	10,0 g
Glucosa.....	1,0 g
Sulfato de hierro y amonio.....	0,2 g
Tiosulfato de sodio.....	0,2 g
Rojo de fenol.....	0,025 g
Agar.....	13,0 g
AD.....	1000 ml

pH: $7,3 \pm 0,2$

Suspender 62,5 g del polvo por litro de agua destilada. Mezclar bien y calentar con agitación frecuente, hervir 1 o 2 minutos hasta disolución total. Llenar hasta la tercera parte de los tubos de ensayo. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Enfriar en pico de flauta profundo.

-Agar lisina hierro (LIA)

Este ensayo permite diferenciar los microorganismos que producen descarboxilación o desaminación de la lisina. Se puede detectar además la producción de H₂S. Es muy utilizado en las técnicas de búsqueda de Salmonella, principalmente para descartar otras bacterias que dan colonias de aspecto similar en los medios diferenciales utilizados durante el aislamiento selectivo.

Fundamento

Durante las primeras etapas de la incubación el fondo virará el indicador de pH del medio al ácido (amarillo) por la fermentación de glucosa. Luego, si el aminoácido es descarboxilado se formarán aminas que provocan un retorno al color original del medio o hacia un viraje al básico (color violeta). En la desaminación se produce un ácido carboxílico y NH₃ y se visualiza en la superficie la aparición de un color rojo intenso. La producción de H₂S a partir de tiosulfato se visualiza por la precipitación de sulfuro ferroso de color negro.

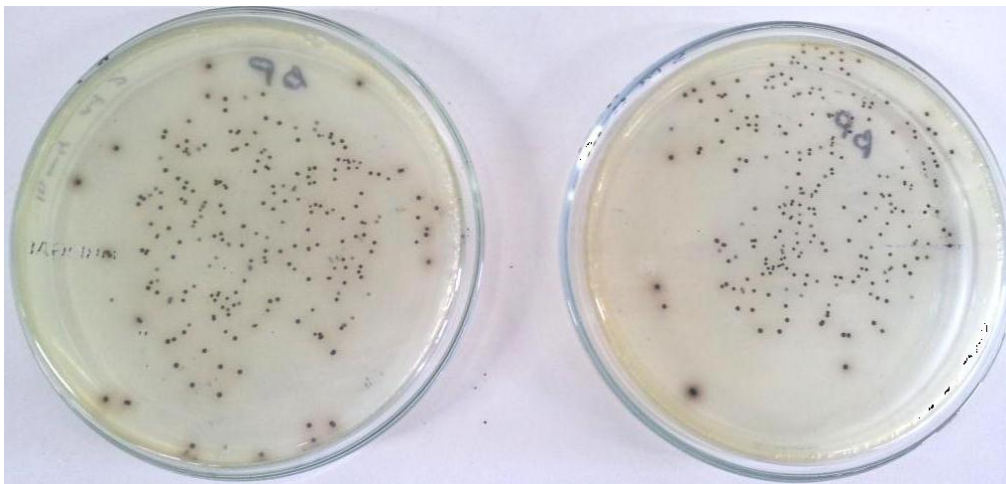
Peptona.....	5g
Extracto de levadura.....	3g
Glucosa	1g
L-lisina HCl.....	10 g
Citrato férrico amónico.....	0,5 g
Tiosulfato de sodio.....	0,04 g
Púrpura de bromocresol.....	0,02 g
Agar.....	15 g
Agua destilada.....	1000 ml

pH = 6,7± 0,2

B. Investigación de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva

Procedimiento

1. Preparación de la muestra: 10 g de muestra se colocan en una bolsa de plástico estéril y se homogeneizan en 90 ml de agua peptonada 0,1% (AP), usando un stomacher. Ésta es la dilución 10^{-1} .
2. Tomar 1 ml de la dilución 10^{-1} y colocarla en un tubo con 9 ml de AP 0,1% (dilución 10^{-2}). Del mismo modo se prepara hasta la dilución 10^{-3} .
3. Sembrar por extensión en superficie alícuotas de 0.1 ml de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , por duplicado, en placas de agar Baird Parker. Extender el inóculo con espátula de Drigalski. Mantener las placas 10 min hacia arriba para que el inóculo sea absorbido.
4. Invertir las placas e incubar a 37°C, 48 h.



Interpretación: Colonias sospechosas de *S. aureus* se caracterizan por ser circulares, lisas, convexas, negras, húmedas, rodeadas de zona opaca y frecuentemente una zona clara por fuera de la zona opaca (Fotografía tomada en nuestro laboratorio).

5. Realizar recuento provisorio y continuar confirmación de colonias presuntivas mediante pruebas bioquímicas.

6. Seleccionar colonias y realizar los siguientes ensayos con cada una de ellas:

- Gram
- Test de la coagulasa
- Test de la catalasa

-Test de la coagulasa

La coagulasa es una enzima con actividad semejante a la protrombina, capaz de transformar el fibrinógeno en fibrina, provocando la formación de un coágulo visible. Se cree que la coagulasa funciona in vivo, produciendo una barrera en el sitio de infección estafilocócica. En el laboratorio, la prueba de coagulasa se utiliza más comúnmente para diferenciar *S. aureus* (coagulasa positivo) de otros *Staphylococcus*.

Fundamento

La coagulasa se halla presente en dos formas, “libre” y “fija”, cada una de las cuales posee diferentes propiedades que requieren el uso de técnicas de determinación diferentes:

Coagulasa fija (prueba en portaobjetos): la coagulasa fija está unida a la pared celular bacteriana. Los hilos de fibrina formados entre las células suspendidas en plasma (que contiene fibrinógeno) provocan su aglutinación, indicada por la presencia de agregados visibles en el portaobjetos.

Coagulasa libre (prueba en tubo): la coagulasa libre es una enzima extracelular que se halla presente en los filtrados de cultivos. Cuando una suspensión de bacterias productoras de coagulasa se mezcla en partes iguales con plasma en un tubo de ensayo, se forma un coágulo visible como consecuencia de la utilización de los factores de coagulación del plasma de manera similar a cuando se añade trombina.

Procedimiento

Prueba en portaobjetos: colocar una gota de agua destilada sobre un portaobjetos, emulsionar suavemente el microorganismo en estudio en la gota de agua de manera de obtener una suspensión cargada homogénea. Agregar una gota de plasma reconstituido junto a la gota de la suspensión del microorganismo. Mezclar bien con el ansa. Inclinar el portaobjetos hacia uno y otro lado observando la formación inmediata de un precipitado granular o de grumos blancos.

Prueba en tubo: colocar asépticamente 0,5 ml de plasma reconstituido en el fondo de un tubo estéril. Añadir 0,5 ml de cultivo de *Staphylococcus* de 24 horas en caldo cerebro corazón (o suspensión en suero fisiológico de un cultivo en placa). Mezclar por rotación el tubo, evitando

remover o agitar el contenido. Colocar en baño de agua a 37°C y observar cada hora hasta 4 horas y luego a las 24 horas, la formación de un coágulo visible.

Interpretación: *S. aureus* es **positivo** para todas estas pruebas.

El CAA establece para *S. aureus* coagulasa positiva: valor admitido **menor de 1×10^3 ufc/g**

Medios de cultivo empleados para investigar *S. aureus*

Agua peptonada al 0,1% (AP)

Peptona.....1 g
A.D.1000 ml
pH = 7,0 ± 0,2

Disolver, envasar en tubos. Esterilizar a 121°C durante 20 min.

Agar Baird Parker (BP)

Triptona 1 g
Extracto de carne0,5 g
Extracto de levadura.....0,1 g
Piruvato de sodio..... 1 g
Glicina 1,2 g
LiCl.6H₂O.....0,5 g
Agar2 g
A.D.100 ml
pH = 7,0 ± 0,2

Suspender en 95 ml de agua destilada. Calentar a ebullición para disolver. Autoclavar 15 min a 121°C. Enfriar a 55-60°C y agregar aditivos.

Aditivos:

- a) Emulsión de yema: se adicionan 5 ml en 100 ml de agar BP. Usar pipeta con punta rota.
- b) Telurito de potasio al 3,5% en agua destilada (esterilizar por filtración): calentar antes de usar para disolver, y agregar 0,3 ml en 100 ml de agar BP.

Caldo cerebro corazón (CCC)

Infusión de cerebro de ternero.....	200 g
Infusión de corazón de vaca	250 g
Proteosa peptona	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato disódico anhidro	2,5 g
Glucosa.....	2 g
A.D.	1000 ml

pH = 7,4 ± 0,1

Autoclavar 15 min a 121°C.

Aditivo: plasma coagulasa (Difco o BBL)

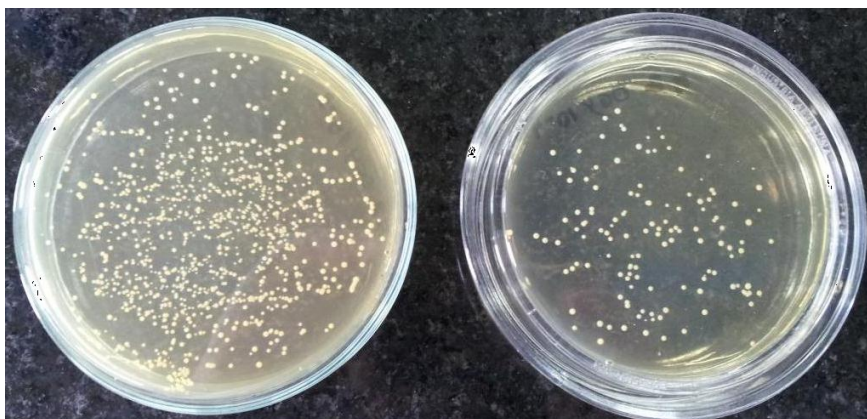
C. INVESTIGACIÓN DE HONGOS Y LEVADURAS

Procedimiento

1. Preparación de la muestra: 10 g de muestra se colocan en una bolsa de plástico estéril y se homogenizan en 90 ml de agua peptonada 0,1% (AP), usando un stomacher. Ésta es la dilución 10⁻¹.

2. Tomar 1 ml de la dilución 10⁻¹ y colocarla en un tubo con 9 ml de AP 1% (dilución 10⁻²). Del mismo modo se prepara hasta la dilución 10⁻³.

3. Sembrar alícuotas de 0.1 ml de cultivo a partir de diluciones 10⁻¹, 10⁻² y 10⁻³, por duplicado, en la superficie de placas con agar oxitetraciclina-glucosa-extracto de levadura (OGY). Extender el inóculo con espátula de Drigalski. Mantener las placas 10 min hacia arriba para que el inóculo sea absorbido. Invertir las placas e incubar a 22-25°C, 24-48 h.



Interpretación: **Colonias típicas de levaduras** son circulares, lisas, convexas, blancas y húmedas (levaduras). **Colonias típicas de hongos filamentosos** son secas, algodonosas, de diversos colores. Realizar Gram (Fotografía tomada en nuestro laboratorio).

Informar número de UFC de hongos y levaduras /g de alimento.
El CAA establece para hongos y levaduras: valor admitido menor de 10⁴ ufc/g.

Medio de cultivo empleado para investigar hongos y levaduras

Agar oxitetraciclina-glucosa-extracto de levadura (OGY)

Extracto de levadura.....	5g
Dextrosa.....	20g
Agar.....	15g
AD.....	1000 ml

pH = 6,5 ± 0.2

Calentar a ebullición para disolver. Autoclavar 15 min a 121°C. Dejar enfriar a 55°C y agregar aditivos: oxitetraciclina 0,1 g ó bien gentamicina 0,05 g. Mezclar y verter en placas de Petri.

Como alternativa se usa el **agar Sabouraud glucosa**.

4. Investigación de *Clostridium* sulfito reductores

PROCEDIMIENTO 1

-RECUENTO (sin enriquecimiento)

1. Preparación de la muestra: 10 g de muestra se colocan en una bolsa de plástico estéril y se homogenizan en 90 ml de agua peptonada 0,1% (AP), usando un stomacher. Ésta es la dilución 10⁻¹.

2. Tomar 1 ml de la dilución 10⁻¹ y colocarla en un tubo con 9 ml de AP 1⁰/₁₀ (dilución 10⁻²). Del mismo modo se prepara hasta la dilución 10⁻³.

3. Sembrar, por duplicado, 1 ml de cada dilución en tubos con 9 ml de agar sulfito polimixina sulfadiacina (SPS) a 50-55°C, haciendo círculos con pipeta mientras se coloca el inóculo. Estos tubos se tapan con vaselina estéril y se aseguran con cinta adhesiva. El agar SPS debe ser preparado en el momento. Las placas se incuban en anaerobiosis por evacuación-reemplazo.

4. Incubar a 37°C, 24-48 h hasta 3 días.



Interpretación *Clostridium* sulfito-reductores forma **colonias de color negro en SPS**. Realizar recuento en placas o tubos que contienen entre 5 y 50 colonias negras (Fotografía tomada en nuestro laboratorio).

5. Hacer pruebas confirmatorias desde cultivo: Gram, catalasa, medio hierro-leche, etc.

Informar UFC de *Clostridium* sulfito-reductores por gramo de alimento.

Clostridium sulfito reductores: valor admitido **menor de 10^3 ufc/g**

PROCEDIMIENTO 2

-ENRIQUECIMIENTO para determinación de PRESENCIA/AUSENCIA de *Clostridium* sulfito reductores

1. Preparación de la muestra: como se indicó en Procedimiento 1.
2. Sembrar por duplicado alícuotas de 1 ml de la dilución 10^{-1} en tubos conteniendo 9 ml de caldo tioglicolato hervido previamente 10 min, y enfriado rápidamente bajo canilla. Evitar agitación. Estos tubos se tapan con vaselina estéril y se aseguran con cinta adhesiva.
3. Incubar a 37°C , 24-48 h. Observar producción de gas y turbidez.
4. Desde los tubos de caldo tioglicolato que presentan turbidez y gas, sembrar alícuotas de 1 ml en tubos con 9 ml de agar SPS a $50-55^{\circ}\text{C}$, haciendo círculos mientras se coloca el inóculo con pipeta. Estos tubos se tapan con vaselina estéril y se aseguran con cinta adhesiva. El agar SPS debe ser preparado en el momento.
5. Incubar a 37°C , 24-48 h hasta 3 días.
6. Se observa el desarrollo **de colonias negras** que pueden confluir. Hacer pruebas confirmatorias desde cultivo: Gram, catalasa, medio hierro-leche, etc.

Informar PRESENCIA o AUSENCIA de *Clostridium* sulfito-reductores por gramo de alimento.

Medios de cultivo

-Caldo tioglicolato

Extracto de levadura.....	5 g
Casitone.....	15 g
Glucosa.....	5 g
NaCl.....	5 g
L-cisteína.....	0,75 g
Ácido tioglicólico.....	0,30 g
Agar.....	0,75 g
Resazurina.....	0,0001 g
AD.....	1000 ml

Ajustar el pH a $7\pm 0,2$

Envasar y esterilizar 15 min a 120°C. Antes de sembrar, hervir 15 min y enfriar rápidamente.

-Agar SPS

Peptona de caseína.....	15 g
Extracto de levadura.....	10 g
Fe (III) citrato.....	0.5 g
Sodio sulfito.....	0.5 g
Polimixina B sulfato.....	0.01 g
Sulfadiazina sódica.....	0.12 g
Agar.....	15 g
A.D.....	1000 ml

pH = $7,0 \pm 0,1$

Esterilizar durante 15 min a 121°C.

ACTIVIDADES A REALIZAR

En la primera jornada, se procederá a realizar toma de muestra desde pasta rellenas (ravioles), y se realizará la siembra en medios de enriquecimiento y aislamiento para *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, hongos-levaduras y *Clostridium* sulfito reductores.

En el segundo encuentro, se efectuará la lectura e interpretación de los resultados obtenidos hasta ese momento, y se mostrarán medios de cultivo y pruebas bioquímicas sembradas con muestras de pastas artificialmente contaminadas para obtener resultados positivos.

Se informarán los resultados para:

- la muestra sembrada por los alumnos
- las muestras artificialmente contaminadas

Tomando como referencia los valores máximos admitidos por el CAA, se establecerá la calidad del alimento analizado.

BIBLIOGRAFÍA

-http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_IX.pdf, 2023.

-Food and Drug Administration (FDA) Bacteriological Analytical Manual:

<http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm2006949.htm>, 2023.

-Proveedores de medios de cultivo en Argentina: www.britanialab.com.ar y www.merck.com.ar

Informe de Laboratorio

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE PASTAS FRESCAS RELLENAS

Solicitado por:

Procedencia de la muestra:

Muestra:

Características del envase:

Rótulo del envase: Fecha de elaboración:

Fecha de vencimiento:

Fecha de recepción de las muestras en el Laboratorio de Microbiología:

Fecha de entrega del informe:

RESULTADOS

Investigación de *Salmonella spp.*

Muestra: en 25 g

Valor admitido por CAA: **ausencia en 25 g**

Investigación de hongos y levaduras

Muestra: ufc/g

Valor admitido por CAA: **menor de 1×10^4 ufc/g**

Investigación de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva

Muestra: ufc/g

Valor admitido por CAA: **menor de 1×10^3 ufc/g**

Investigación de *Clostridium* sulfito reductores

Muestra: ufc/g

Valor admitido por CAA: **menor de 1×10^3 ufc/g**

Observaciones: la muestra analizada **cumple / no cumple** con las exigencias microbiológicas establecidas por el Código Alimentario Argentino (CAA, Art 721) para pastas frescas rellenas a los días de elaboración.

Firma y sello del profesional Responsable

TRABAJO PRÁCTICO DE AULA (A confirmar)

SEMINARIOS

OBJETIVOS

-Interpretar trabajos científicos relacionados con aspectos microbiológicos involucrados en procesos de producción de alimentos y/o métodos rápidos de investigación de patógenos en alimentos.

-Preparar la exposición oral del trabajo científico seleccionado con adecuada descripción de procedimientos y métodos de investigación microbiológica, incorporación de terminología científica, haciendo uso de recursos TICs

GUÍA PARA LA PREPARACIÓN DE SEMINARIOS

1. Cada seminario se preparará en grupos de 2 alumnos.
2. La presentación multimedia demandará no más de 20 min.
3. Se reservarán 5 min para preguntas, tanto por parte del personal docente de los compañeros alumnos.
4. Cada presentación debe constar de las siguientes secciones:
 - Título del trabajo, autores, revista dónde se publicó, año de publicación
 - Introducción, en no más de 2 diapositivas
 - Objetivos y/o hipótesis según lo planteado en el trabajo científico
 - Metodología: no siempre es necesario incluir esta sección, sólo se lo hace cuando es necesario explicar una técnica poco frecuente o que no fue desarrollada durante las clases teóricas del curso
 - Resultados
 - Conclusiones