

**NORMA VENEZOLANA  
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE  
*Salmonella* spp. PARTE 1: ALIMENTOS**

**COVENIN  
1291-1:2025  
(2da. Revisión)**

## **1. OBJETO**

Esta norma describe el método de ensayo para el aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. en los alimentos.

## **2. ALCANCE**

Esta norma se aplica al método para realizar el aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. en las muestras de alimentos para consumo humano y animal. Quedan excluidas del ámbito de aplicación de esta norma las muestras de agua y las muestras ambientales en el área de producción y manipulación de alimentos.

## **3. REFERENCIAS NORMATIVAS**

Las siguientes normas contienen disposiciones generales utilizadas para la elaboración de la norma o que, al ser citadas en este texto, constituyen requisitos de esta norma; las ediciones indicadas, estaban en vigencia en el momento de esta publicación. Como toda norma está sujeta a revisión, se recomienda a aquellos que realicen acuerdos con base en ellas, que analicen la conveniencia de usar las ediciones más recientes de las normas citadas seguidamente:

COVENIN 1126:2022	Toma, identificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico. (2da. Revisión).
Food and Drug Administration (FDA):2024	Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 5: <i>Salmonella</i> .

## **4. TÉRMINOS Y DEFINICIONES**

A los fines de este documento, se aplica el siguiente término y definición:

### ***Salmonella* spp.**

Es una bacteria que tiene forma de bacilos cortos pleomórficos, Gram-negativa, móvil, no formadora de esporas perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Existen algunas variantes no móviles que incluyen a *Salmonella Gallinarum* y *Salmonella Pullorum*. El género *Salmonella* está dividido en dos especies que pueden causar enfermedades en humanos: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*.

## **5. MÉTODO DE ENSAYO**

### **5.1. Etapas para el aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. en alimentos**

Para el aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. en alimentos, es necesario llevar a cabo un proceso que consta de varias etapas consecutivas. Esto se debe a que el microorganismo generalmente se encuentra en una concentración baja, debilitado por los procesos tecnológicos o por la presencia de otros microorganismos en el alimento. A continuación, se detallan las etapas que deben considerarse:

### **5.1.1. Pre-enriquecimiento**

Consiste en recuperar las células fisiológicamente dañadas permitiendo su multiplicación, para ello se incuban las muestras en un medio de cultivo líquido no selectivo.

### **5.1.2. Enriquecimiento**

Consiste en promover la multiplicación de *Salmonella* spp. y restringir la proliferación de la microbiota acompañante, para ello se inocula el caldo de pre-enriquecimiento en dos medios de cultivos selectivos.

### **5.1.3. Aislamiento**

Consiste en obtener colonias aisladas para observar las características típicas presuntivas de *Salmonella* spp., para ello se estrían los caldos de enriquecimiento en medios sólidos de diagnóstico selectivo y diferencial.

### **5.1.4. Confirmación**

Consiste en la determinación de las características bioquímicas y serológicas de las colonias presuntivas de *Salmonella* spp. Alternativamente se pueden emplear técnicas moleculares para la identificación.

## **5.2. Equipos**

- a) Equipos para la preparación de muestras (ver la COVENIN 1126).
- b) Contador de colonias o lupa (para visualización de las colonias).
- c) Refrigerador a  $(4 \pm 2)$  °C.
- d) Incubadora con temperatura controlada a  $(35 \pm 2)$  °C.
- e) Agitador de tubos vortex.
- f) Baño de agua con temperatura controlada a  $(42 \pm 0,2)$  °C o  $(43 \pm 0,2)$  °C.
- g) Homogeneizador mecánico de paletas que opere a 24,09 rad/s.
- h) Termómetro con escala graduada de 0 °C a 100 °C.
- i) Balanza con exactitud clase III y resolución mínima de 0,1 g.
- j) Balanza con exactitud clase I y resolución mínima de 0,001 g.
- k) Autoclave (esterilizador).
- l) Mechero Fisher o Bunsen.
- m) Plancha de calentamiento con agitación.
- n) pH metro.

## **5.3. Materiales**

- a) Cucharillas o instrumentos estériles para pesar las muestras.
- b) Matraz Erlenmeyer (fiolas) o frascos de boca ancha estériles con capacidad apropiada para la cantidad de muestra a analizar.
- c) Tubos de ensayo 16 mm x 125 mm.
- d) Tubos de ensayo 16 mm x 150 mm.
- e) Tubos de ensayo 20 mm x 150 mm.
- f) Tubos de ensayo 13 mm x 100 mm.
- g) Pipetas graduadas de 1 mL con graduación de 0,01 mL.
- h) Pipetas graduadas de 5 mL o 10 mL con graduación de 1 mL.
- i) Tubos de fermentación 6 mm x 50 mm (tubos Durham).
- j) Placas de Petri de 90 mm x 15 mm o 100 mm x 15 mm de plástico o vidrio, estériles.

- k) Papel indicador de pH, rango de 6 a 8 con graduaciones máximas de 0,4 unidades por cambio de color.
- l) Bolsas de plástico estériles de aproximadamente 28 cm x 37 cm.
- m) Bolsas de plástico estériles con filtro.
- n) Gradillas para tubos.
- o) Asa bacteriológica de platino o plástico de  $\pm$  3 mm de diámetro.
- p) Vaso de precipitado de plástico con capacidad para 4 L (para colocar las muestras en baño).
- q) Vaso de precipitado de plástico con capacidad para 5 L.
- r) Papel de aluminio.
- s) Tubos de ensayo con tapón de corcho.

#### **5.4. Medios de cultivo y reactivos (ver anexo A y B)**

##### **5.4.1. Etapa de pre-enriquecimiento (ver anexo C)**

- a) Agua destilada.
- b) Leche en polvo descremada reconstituida al 10 %.
- c) Caldo lactosado.
- d) Caldo nutritivo.
- e) Caldo tripticasa soya.
- f) Caldo tripticasa soya con sulfato ferroso.
- g) Caldo de enriquecimiento universal.
- h) Caldo de enriquecimiento universal sin citrato de amonio férrico.
- i) Agua peptonada tamponada.
- j) Agua peptonada tamponada modificada.

##### **5.4.2. Etapa de enriquecimiento**

- a) Caldo selenito cistina (SC).
- b) Caldo tetratiónato (TT).
- c) Medio Rappaport -Vassiliadis (RV).

##### **5.4.3. Etapa de aislamiento en agares diagnósticos**

- a) Agar xilosa- lisina-desoxicolato (XLD).
- b) Agar bismuto sulfito (BS) = Wilson Blaird. (WB).
- c) Agar Hektoen - entérico (HE).
- d) Agar EF-18.
- e) Agar xilosa lisina Tergitol 4.
- f) Agar Rambach.

##### **5.4.4. Etapa de confirmación**

- a) Agar nutritivo.
- b) Agar triple azúcar hierro (TSI).
- c) Agar lisina - hierro (LIA).
- d) Agar Mac Conkey.
- e) Agar triptosa sangre (base).
- f) Caldo triptosa-tripticasa de soya.
- g) Caldo tripticasa de soya.
- h) Caldo MR-VP.

- i) Caldo lisina descarboxilasa.
- j) Caldo carbohidrato rojo de fenol.
- k) Caldo carbohidrato púrpura de bromocresol.
- l) Caldo triptonado.
- m) Caldo malonato.
- n) Caldo KCN.
- o) Caldo urea.
- p) Infusión cerebro – corazón, (BD Brain Heart Infusion (BHI)).
- q) Medio movilidad (semisólido).
- r) Agar citrato de Simmons.

#### **5.4.5. Reactivos**

- a) Agua destilada estéril.
- b) Solución de hidróxido de sodio al 1 N.
- c) Solución de ácido clorhídrico al 1 N.
- d) Solución de verde brillante con una fracción de peso sobre volumen de 1 % o 2 %.
- e) Solución de verde brillante a una fracción de volumen de 0,1 %.
- f) Tergitol 7 aniónico o tritón X -100.
- g) Sulfito de potasio anhidro (polvo).
- h) Solución de papaína al 5 %.
- i) Solución de celulasa al 1 %.
- j) Solución con 200 mg/kg de cloro con 0,1 % de dodecil sulfato de sodio.
- k) Reactivo de Kovac's.
- l) Cristales de creatina fosfato.
- m) Parafina.
- n) Reactivos para la prueba de Voges-Proskauer.
- o) Indicador de pH rojo de metilo.
- p) Solución salina al 0,85 % estéril.
- q) Solución salina fisiológica formalizada.
- r) Etanol al 70 %.
- s) Solución de púrpura de bromocresol al 0,2 %.
- t) Antisuero somático O, polivalente grupo A-I, Vi.
- u) Antisuero polivalente flagelar H.

#### **5.5. Procedimiento**

Identificar y preparar la muestra cómo se especifica en la COVENIN 1126 tomando en cuenta la matriz o tipo de alimento.

##### **5.5.1. Pre-enriquecimiento**

**5.5.1.1.** Tomar 100 g como unidad mínima de muestreo. Pesar la porción de ensayo de 25 g o 25 mL, en bolsa de plástico estéril u otro envase adecuado. Para muestras que no puedan ser analizadas con base al peso exacto consultar la matriz específica para obtener instrucciones (ver anexo C).

**5.5.1.2.** Preparar una o varias muestras compuestas que no excedan los 375 g o 375 mL (equivalentes a 15 unidades analíticas), cuando se analicen varias muestras de un mismo lote para los siguientes alimentos: leche en polvo descremada instantánea, caseína láctica, cuajo de caseína, caseinato de sodio y huevo líquido homogeneizado.

**5.5.1.3.** Añadir 225 mL del medio de pre-enriquecimiento por cada 25 g o 25 mL de muestra y mezclar, (ver anexo C.).

**5.5.1.4.** Dejar en reposo durante ( $60 \pm 5$ ) min a temperatura ambiente y mezclar. En algunos casos, podría ser necesario medir el pH (ver anexo C.).

**5.5.1.5.** Incubar la muestra pre-enriquecida a una temperatura de 35 °C por ( $24 \pm 2$ ) h.

**5.5.1.6.** Refrigerar el caldo de pre-enriquecimiento y enriquecimiento ya incubados a una temperatura entre ( $4 \pm 2$ ) °C por un máximo de 72 h, para productos con baja humedad.

### **5.5.2. Enriquecimiento**

**5.5.2.1.** Agitar las muestras incubadas y transferir 0,1 mL de caldo de pre-enriquecimiento a 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis, y 1 mL a 10 mL de caldo tetrationato. Posteriormente, se debe agitar la mezcla en un vortex para asegurar la homogeneidad de la misma.

**5.5.2.2.** Incubar estos medios como se especifica en el anexo D.

**5.5.2.3.** Transferir 1 mL de la muestra a 10 mL de caldo selenito cistina y 1 mL a 10 mL de caldo tenerationato cuando se analice goma guar o si existe sospecha de la presencia de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovar Typhi, posteriormente, homogenizar en un vortex.

### **5.5.3. Aislamiento**

**5.5.3.1.** Agitar las muestras finalizado el periodo de incubación y transferir una asada utilizando un asa de 3 mm (10  $\mu$ L) de cada uno de los dos medios de enriquecimiento selectivo a la superficie de placas con: agar bismuto sulfito (BS o WB), agar xilosa-lisina desoxicolato (XLD) y agar Hektoen-entérico (HE) extendiendo el inóculo por agotamiento para obtener colonias aisladas.

**NOTA.** Se pueden utilizar de manera complementaria los siguientes medios de cultivo: agar EF-18, agar xilosa-lisina tergitol 4, agar verde brillante, agar Rambach u otros medios de agar cromogénicos.

**5.5.3.2.** Incubar las placas invertidas a una temperatura de 35 °C durante ( $24 \pm 2$ ) h. Incubar el medio bismuto sulfito (BS o WB) a 35 °C por un periodo de tiempo de (24 a 48) h.

**5.5.3.3.** Estriar en cada uno de los agares selectivos un control positivo típico de *Salmonella* spp. Además, utilizar controles adicionales para ayudar a la escogencia de colonias atípicas (ver nota 1.).

**5.5.3.4.** Observar al final de la incubación las colonias presuntivas de *Salmonella* spp. cuyas características en los medios diferenciales sean típicas (ver anexo E).

**5.5.3.5.** Efectuar un reaislamiento en alguno de los siguientes agares: MacConkey, Hektoen entérico o xilosa - lisina - desoxicolato, en caso de que las colonias no aparezcan bien aisladas. Es conveniente incubar las placas a una temperatura de 35 °C por un periodo de tiempo de ( $24 \pm 2$ ) h.

**NOTA 1.** Se recomienda utilizar cultivos de referencia para ayudar a la identificación de colonias atípicas durante el proceso de análisis, tales como: ATCC<sup>TM</sup> 13314 *Salmonella enterica* subespecie *arizona* (Borman) Le Minor et al., dulcitol (-) malonato (+) lactosa (+); ATCC<sup>TM</sup> 12325 *Salmonella enterica* subespecie *diarizonae* (Le Minor et al.) Le Minor and Popoff, lactosa (+) H<sub>2</sub>S (+); ATCC<sup>TM</sup> 9842 *Salmonella enterica* subespecie *enterica* (ex Kauffmann and Edwards) Le Minor and Popoff serovar Bispebjerg, lactosa (-), H<sub>2</sub>S (-) o ATCC<sup>TM</sup> 29934 *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* (Le Minor et al.) Le Minor and Popoff, lactosa (+) y H<sub>2</sub>S (-).

**NOTA 2.** Alternativamente se pueden utilizar métodos rápidos para despiste inicial que estén aprobados por la Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) y hayan sido verificados en laboratorio para la matriz de interés.

#### **5.5.4. Identificación de colonias presuntivas de *Salmonella* spp.**

##### **5.5.4.1. Pruebas bioquímicas preliminares**

**5.5.4.1.1.** Seleccionar dos o más colonias típicas de cada medio selectivo empleado. Si no se obtienen colonias típicas se deben escoger colonias atípicas de cada medio de cultivo (ver anexo E).

**5.5.4.1.2.** Transferir las colonias seleccionadas, a tubos con medios de agar TSI (Triple Sugar Iron) y LIA (Lysine Iron Agar). Para inocular en los tubos tocar el centro de la colonia y proceder de la siguiente manera:

- Agar TSI: estriar el bisel y hacer una punción en el taco. Cerrar el tubo sin ajustar la tapa para permitir una reacción aeróbica. Incubar a una temperatura de 35 °C por un periodo de tiempo de 24 h ± 2 h.
- Agar LIA: inmediatamente sin flamear el asa, realizar dos punciones de 4 cm de profundidad en el taco y estriar el bisel. Cerrar firmemente la tapa para promover una reacción anaeróbica. Incubar a una temperatura de 35 °C por un periodo de tiempo de 24 h ± 2h.

**5.5.4.1.3.** Mantener las placas con agares selectivos de las cuales se ha escogido las colonias a una temperatura entre 5 °C a 8 °C hasta culminar los ensayos.

**5.5.4.1.4.** Observar los tubos al final del período de incubación, los cultivos sospechosos de *Salmonella* spp. muestran las reacciones descritas en el anexo F.

**5.5.4.1.5.** Escoger colonias sospechosas adicionales a partir de las placas de aislamiento, si los cultivos en TSI no dan reacciones típicas e inocular nuevamente en los agares TSI y LIA, como se especifica en el apartado 5.5.4.1.2.

**5.5.4.1.6.** Realizar las pruebas bioquímicas confirmatorias si se obtienen resultados típicos en uno de los dos medios TSI o LIA.

##### **5.5.4.2. Pruebas bioquímicas confirmatorias**

**5.5.4.2.1.** Realizar pruebas a tres cultivos presuntivos en TSI, si están presentes, provenientes de caldo Rappaport y tres cultivos presuntivos en TSI, si están presentes, provenientes de caldo tetratiónato.

**5.5.4.2.2.** Examinar un mínimo de seis cultivos típicos en TSI, si los cultivos en TSI aparentan estar mezclados purificar como se especifica en el apartado 5.5.4.1.1.

**5.5.4.2.3.** Inocular los cultivos presuntivos en TSI en tubos con caldo urea e incubar durante un periodo de tiempo de (24 ± 2) h a una temperatura de 35 °C.

**5.5.4.2.4.** Incluir un tubo de caldo urea sin inocular como control. Opcional al uso de caldo de urea rápido, inocular dos asadas e incubar en baño de agua por un tiempo de 2 h a una temperatura de (37 ± 0,5) °C.

**5.5.4.2.5.** Continuar las pruebas de los siguientes cultivos de urea negativo: (ver anexo G).

- Caldo lisina descarboxilasa. Si la prueba de LIA fue satisfactoria no es necesaria esta prueba.

- b) Caldo dulcitol rojo de fenol o caldo base púrpura con 0,5 % de dulcitol.
- c) Caldo KCN.
- d) Caldo malonato.
- e) Indol.

**5.5.4.2.6.** Realizar la prueba serológica somática O, si las pruebas de LIA, TSI y urea sugieren la presencia de *Salmonella* spp., a partir de un cultivo de un periodo de tiempo de (24 - 48) h en agar TSI o en agar base triptosa sangre (sin sangre) con 2 mL de solución salina (0,85 %) y la prueba serológica polivalente flagelar H. Si las pruebas serológicas somáticas O y flagelar H son dudosas, continuar como se especifica en el apartado 5.5.4.3. (ver anexo H).

#### **5.5.4.3. Pruebas bioquímicas adicionales**

Realizar los siguientes ensayos adicionales en cultivos que no den reacciones bioquímicas y serológicas típicas dudosas y, por lo tanto, aún no clasifican como *Salmonella* spp. (ver anexo I):

- a) Caldo lactosa rojo de fenol o caldo lactosa púrpura.
- b) Caldo sacarosa rojo de fenol o caldo sacarosa púrpura.
- c) Caldo MR-VP.
- d) Agar citrato de Simmons.

#### **5.5.4.4. Identificación genérica presuntiva de *Salmonella* spp.**

Utilizar sistemas bioquímicos aprobados por la AOAC para la identificación presuntiva de *Salmonella* spp. en los alimentos como alternativa a los ensayos bioquímicos convencionales. Realizar las pruebas serológicas somática O y flagelar H establecidas en el anexo H para confirmar los cultivos presuntivos de *Salmonella* spp.

EJEMPLO:

VITEK GNI, enterotube 11. Enterobacteriaceae 11, MICRO ID o API 20E.

#### **5.5.4.5. Clasificación de los cultivos**

**5.5.4.5.1.** Clasificar como *Salmonella* spp., los cultivos que den reacciones típicas (ver anexo J tabla J.1. y J.2.). Observar anexo J tabla J.3. para descartar los cultivos sospechosos de no *Salmonella* spp. (ver anexo J).

**5.5.4.5.2.** Considerar un cultivo como *Salmonella* spp. cuando presente las siguientes condiciones:

**5.5.4.5.2.1.** Cepas que den reacciones bioquímicas típicas y reacciones serológicas características.

**5.5.4.5.2.2.** Cepas que presenten reacciones bioquímicas típicas, pero que no den reacciones serológicas positivas.

**5.5.4.5.2.3.** Cepas que presenten reacciones serológicas positivas; pero que no den reacciones bioquímicas típicas.

**5.5.4.5.2.4.** Cepas autoaglutinables que presentan reacciones bioquímicas típicas.

#### **5.5.4.6. Confirmación definitiva**

**5.5.4.6.1.** Tipificar las cepas que se han confirmado como *Salmonella* spp. a nivel de serovares, para esto, deben ser enviadas a un laboratorio autorizado o acreditado.

**5.5.4.6.2.** Realizar el envío acompañado de toda la información posible de la cepa incluyendo: los resultados de la confirmación y la fuente de origen. Este requisito es obligatorio en los casos de brotes por enfermedades transmitidas por alimentos, en el análisis de aves domésticas beneficiadas y aquellos alimentos analizados dentro de los programas de control del ente sanitario correspondiente.

### **6. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS**

**6.1.** Según la interpretación de los resultados, indicar la presencia o ausencia de *Salmonella* spp. en la cantidad de muestra utilizada para el análisis (gramos o mililitros).

EJEMPLO:

Si se utiliza 25 g para el análisis reportar: *Salmonella* spp. en 25 g: presente o ausente.

**6.2.** Cuando se trate de una muestra compuesta formada a partir de varias muestras provenientes de un mismo lote (ver 5.5.1.2.) indicar la presencia o ausencia de *Salmonella* spp. en la cantidad total pesada o medida.

EJEMPLO:

Si de 10 muestras se toman 25 g de cada una, reportar *Salmonella* spp. en 250 gr: presente o ausente.

**6.3.** Cuando se trate de huevos enteros se debe reportar la presencia o ausencia en el número de unidades analizadas.

EJEMPLO:

Si se utilizan 20 huevos, reportar *Salmonella* spp. en 250 en 20 unidades de huevos enteros: presente o ausente.

### **7. INFORME**

El informe general debe indicar los siguientes aspectos:

**7.1.** Datos del laboratorio (nombre, número de contacto, correo electrónico y dirección).

**7.2.** Fecha de emisión.

**7.3.** Identificación del informe, según la codificación interna del laboratorio.

**7.4.** Nombre de la institución o empresa que remite la muestra.

**7.5.** Número, título y año de la norma consultada.

**7.6.** Descripción de la muestra y su fecha de recepción.

**7.7.** Método de ensayo y procedimiento empleado.

**7.8.** Modificación del método (indicar justificación breve del cambio).

**7.9.** Descripción del procedimiento de muestreo.

**7.10.** Resultado y conclusiones.

**7.11.** En caso de obtener resultado positivo: fecha y número de control de envío de la cepa al ente de referencia (cuando aplique).

**7.12.** Firma del analista.

**7.13.** Firma del supervisor.

PROYECTO DE NORMA

## BIBLIOGRAFÍA

ISO 6579-1:2017. *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella — Part 1: Detection of Salmonella spp.* Switzerland: International Organization for Standardization.

AOAC [Association of Official Agricultural Chemists]. 2006. Capítulo 17. *Official Methods of Analysis of AOAC International. Microbiological Methods.*

COX, N.E.; FRYE, J.E.; MCMAHON, W.; et al. 2015. Chapter 36. *Salmonella* en: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.* APHA Press.

FDA [Food and Drug Administration]. 2012. *Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins.* Segunda edición. [Salmonella species 9-13 pp]

PROYECTO DE NORMA

**ANEXO A (Normativo)**  
**Preparación de medios de cultivo <sup>(1)</sup>**

**A.1. Leche en polvo descremada reconstituida (medio comercial)**

**A.1.1. Ingredientes**

- a) Leche en polvo descremada, 100 g.
- b) Agua destilada, 1 000 mL.

**A.1.2. Procedimiento**

- a) Suspender 100 g de la leche deshidratada en 1 litro de agua destilada.
- b) Agitar hasta su disolución completa.
- c) Esterilizar en autoclave a una temperatura de 121 °C por 15 min.

**A.2. Caldo lactosado**

**A.2.1. Ingredientes**

- a) Extracto de carne, 3 g.
- b) Peptona, 3 g.
- c) Lactosa, 5 g.
- d) Agua destilada, 1 000 mL.

**A.2.2. Procedimiento**

- a) Disolver los ingredientes en agua destilada.
- b) Dispensar en las porciones requeridas.
- c) Esterilizar en autoclave a una temperatura de 121 °C durante 15 min.
- d) Ajustar hasta un valor de pH final de  $6,9 \pm 0,2$ .

**A.3. Caldo nutritivo**

**A.3.1. Ingredientes**

- a) Extracto de carne, 3 g.
- b) Peptona, 5 g.
- c) Agua destilada, 1 000 mL.

**A.3.2. Procedimiento**

- a) Calentar para disolver.
- b) Dispensar en las porciones requeridas.
- c) Esterilizar en autoclave a una temperatura de 121 °C durante 15 min.
- d) Ajustar hasta un valor de pH final de  $6,8 \pm 0,2$ .

## **A.4. Caldo tripticasa soya**

### **A.4.1. Ingredientes**

- a) Trypticase peptona, 17 g.
- b) Fitona peptona, 3 g.
- c) Cloruro de sodio (NaCl), 5 g.
- d) Fosfato dipotásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 2,5 g.
- e) Glucosa, 2,5 g.
- f) Agua destilada, 1 000 mL.

### **A.4.2. Procedimiento**

- a) Calentar con agitación suave para disolver.
- b) Dispensar en porciones de 225 mL en frascos de 500 mL.
- c) Esterilizar en autoclave a una temperatura de 121 °C durante 15 min.
- d) Ajustar hasta un valor de pH final de 7,3 ± 0,2.

## **A.5. Caldo tripticasa soya suplementado con sulfato ferroso**

### **A.5.1. Ingredientes**

- a) Trypticase peptona, 17 g.
- b) Fitona peptona, 3 g.
- c) Cloruro de sodio (NaCl), 5 g.
- d) Fosfato dipotásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 2,5 g.
- e) Glucosa, 2,5 g.
- f) Sulfato ferroso, 35 mg.
- g) Agua destilada, 1 000 mL.

### **A.5.2. Procedimiento**

- a) Calentar, agitando suavemente para disolver.
- b) Dispensar en porciones de 225 mL en frascos de 500 mL.
- c) Esterilizar en autoclave a una temperatura de 121 °C durante 15 min.
- d) Ajustar hasta un valor de pH final de 7,3 ± 0,2.

## **A.6. Caldo de pre-enriquecimiento universal**

### **A.6.1. Ingredientes**

- a) Tryptona, 5 g.
- b) Proteosa peptona, 5 g.
- c) Fosfato dipotásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 15 g.
- d) Fosfato sódico, 7 g.
- e) Cloruro de sodio (NaCl), 5 g.
- f) Dextrosa, 0,5 g.
- g) Sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>), 0,25 g.
- h) Citrato de amonio férrico, 0,1 g.
- i) Piruvato de sodio, 0,2 g.
- j) Agua destilada, 1 000 mL.

<sup>1)</sup> Tomada de la Food and Drug Administration- BAM Chapter 5, 2024 p 8-9.  
COVENIN 1291-1:2025

### **A.6.2. Procedimiento**

- a) Calentar con agitación suave para disolver.
- b) Dispensar en las porciones requeridas.
- c) Esterilizar en autoclave a una temperatura de 121 °C por 15 min, pH final  $6,3 \pm 0,2$ .

### **A.7. Caldo de pre-enriquecimiento universal (sin citrato de amonio férrico)**

#### **A.7.1. Ingredientes**

- a) Triptona, 5 g.
- b) Proteosa peptona, 5 g.
- c) Fosfato dispotásico ( $K_2HPO_4$ ), 15 g.
- d) Fosfato disódico ( $Na_2HPO_4$ ), 7 g.
- e) Cloruro de sodio ( $NaCl$ ), 5 g.
- f) Dextrosa, 0,5 g.
- g) Sulfato de magnesio ( $MgSO_4$ ), 0,25 g.
- h) Piruvato de sodio, 0,2 g.
- i) Agua destilada, 1 000 mL.

#### **A.7.2. Procedimiento**

- a) Disolver los ingredientes en agua destilada.
- b) Dispensar en las porciones requeridas.
- c) Esterilizar en autoclave a una temperatura de 121 °C durante 15 min.
- d) Ajustar hasta un valor de pH final de  $7,2 \pm 0,2$ .

### **A.8. Agua peptonada tamponada**

#### **A.8.1. Ingredientes**

- a) Peptona, 10 g.
- b) Cloruro de sodio ( $NaCl$ ), 5 g.
- c) Fosfato dispotásico ( $K_2HPO_4$ ), 3,5 g.
- d) Fosfato disódico ( $Na_2HPO_4$ ), 1,5 g.
- e) Agua destilada, 1 000 mL.

#### **A.8.2. Procedimiento**

- a) Disolver los ingredientes en agua destilada.
- b) Dispensar en las porciones requeridas.
- c) Esterilizar en autoclave a una temperatura de 121 °C durante 15 min.
- d) Ajustar hasta un valor de pH final de  $7,2 \pm 0,2$ .

### **A.9. Agua peptonada tamponada modificada**

#### **A.9.1. Ingredientes**

- a) Digerido pancreático de gelatina (peptona de gelatina), 5 g.
- b) Extracto de carne, 5 g.
- c) Cloruro de sodio ( $NaCl$ ), 5 g.

<sup>1)</sup> Tomada de la Food and Drug Administration- BAM Chapter 5, 2024 p 8-9.  
COVENIN 1291-1:2025

- d) Fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 7 g.
- e) Fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 3 g.
- f) Agua destilada, 1 000 mL.

#### **A.9.2. Procedimiento**

- a) Disolver los ingredientes en agua destilada.
- b) Dispensar en las porciones requeridas.
- c) Esterilizar en autoclave a una temperatura de 121 °C durante 15 min.
- d) Ajustar hasta un valor de pH final de  $7,2 \pm 0,2$ .

### **A.10. Caldo tetratrationato**

#### **A.10.1. Caldo base tetratrationato**

##### **A.10.1.1. Ingredientes**

- a) Polipeptona, 5 g.
- b) Sales biliares, 1 g.
- c) Carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), 10 g.
- d) Tiosulfato de sodio pentahidrato ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), 30 g.
- e) Agua destilada, 1 000 mL.

##### **A.10.1.2. Procedimiento**

- a) Diluir los ingredientes en el agua destilada.
- b) Mezclar y calentar hasta su punto ebullición (el precipitado no disolverá por completo).
- c) No esterilizar en autoclave.
- d) Enfriar a una temperatura menor de 45 °C.
- e) Almacenar a una temperatura entre 5 °C a 8 °C, pH final  $8,4 \pm 0,2$ .

#### **A.10.2. Solución de yodo yoduro de potasio ( $\text{I}_2\text{-KI}$ )**

##### **A.10.2.1. Ingredientes**

- a) Yoduro de potasio (KI), 5 g.
- b) Yodo resublimado, 6 g.
- c) Agua destilada estéril, 20 mL.

##### **A.10.2.2. Procedimiento**

- a) Disolver el yoduro de potasio en 5 mL de agua destilada estéril.
- b) Añadir el yodo, agitar hasta disolver.
- c) Diluir a 20 mL en los mL restantes de agua destilada.

#### **A.10.3. Solución de verde brillante**

##### **A.10.3.1. Ingredientes**

- a) Colorante verde brillante, 0,1 g.
- b) Agua destilada estéril, 100 mL.

### **A.10.3.2. Procedimiento**

- a) Disolver el verde brillante en el agua destilada estéril y agitar hasta disolver.
- b) Añadir 20 mL de solución de yodo-yoduro y 10 mL de solución de verde brillante a 1 litro de caldo base tetratrationato, esto para preparar el medio completo.
- c) Resuspender el precipitado con agitación suave y dispensar porciones de 10 mL en tubos de ensayo estériles de 20 mm x 150 mm o 16 mm x 150 mm. No calentar el medio después de agregar las soluciones de yodo yoduro y verde brillante.

## **A.11. Medio Rappaport Vassiliadis**

### **A.11.1. Caldo base**

#### **A.11.1.1. Ingredientes**

- a) Triptona, 5 g.
- b) Cloruro de sodio (NaCl), 8 g.
- c) Fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 1,6 g.
- d) Agua destilada, 1 000 mL.

#### **A.11.1.2. Procedimiento**

- a) Disolver los ingredientes en el agua destilada.
- b) Preparar el caldo base al momento combinar con el resto de los ingredientes.

### **A.11.2. Solución de cloruro de magnesio**

#### **A.11.2.1. Ingredientes**

- a) Cloruro de magnesio hexahidratado ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), 400 g.
- b) Agua destilada estéril, 1 000 mL.

#### **A.11.2.2. Procedimiento**

- a) Disolver el contenido completo de un envase recién abierto (la sal es altamente higroscópica).
- b) Almacenar la solución en una botella protegida de la luz a temperatura ambiente, hasta por periodo de un 1 año.

### **A.11.3. Solución de verde de malaquita**

#### **A.11.3.1. Ingredientes**

- a) Oxalato de verde malaquita, 0,4 g.
- b) Agua destilada estéril, 100 mL.

#### **A.11.3.2. Procedimiento**

- a) Almacenar la solución a temperatura ambiente en una botella protegida de la luz, hasta por un periodo de tiempo de 6 meses.
- b) Añadir 100 mL de solución de cloruro de magnesio y 10 mL de solución de verde malaquita a 1 litro de caldo base para un volumen total de 1 110 mL para preparar el medio completo.

- c) Dispensar porciones de 10 mL en tubos de ensayo de 16 mm x 150 mm.
- d) Esterilizar en autoclave por 15 min a 115 °C, pH final  $5,5 \pm 0,2$ .
- e) Almacenar hasta por un periodo de tiempo de 1 mes en refrigeración.

## **A.12. Caldo selenito cistina**

### **A.12.1. Opción 1**

#### **A.12.1.1. Ingredientes**

- a) Triptona o polipeptona, 5 g.
- b) Lactosa, 4 g.
- c) Selenito ácido de sodio ( $\text{NaHSeO}_3$ ), 4 g.
- d) Fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 10 g.
- e) L-cistina, 0,01 g.
- f) Agua destilada, 1 000 mL.

#### **A.12.1.2. Procedimiento**

- a) Disolver los ingredientes en el agua destilada.
- b) Calentar hasta su punto de ebullición, dispensar porciones de 10 mL en tubos de ensayo de 16 mm x 150 mm.
- c) Calentar 10 min en vapor fluente (no esterilizar en autoclave porque el medio no será estéril).
- d) Ajustar hasta un valor de pH final de  $7,0 \pm 0,2$ .
- e) Utilizar el mismo día de la preparación.

### **A.12.2. Opción 2**

#### **A.12.2.1. Ingredientes**

- a) Polipeptona, 5 g.
- b) Lactosa, 4 g.
- c) Selenito ácido de sodio ( $\text{NaHSeO}_3$ ), 4 g.
- d) Fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 5,5 g.
- e) Fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 4,5 g.
- f) L-cistina, 0,01 g.
- g) Agua destilada, 1 000 mL.

#### **A.12.2.2. Procedimiento**

- a) Disolver los ingredientes en el agua destilada.
- b) Calentar hasta su punto de ebullición.
- c) Dispensar porciones de 10 mL en tubos de ensayo de 16 mm x 150 mm.
- d) Calentar 10 min en vapor fluente (no esterilizar en autoclave porque el medio no será estéril).
- e) Ajustar hasta un valor de pH final  $7,0 \pm 0,2$ .
- f) Utilizar el mismo día de la preparación.

## **A.13. Agar Bismuto Sulfito**

### **A.13.1. Ingredientes**

- a) Polipeptona (o peptona), 10 g.
- b) Extracto de carne, 5 g.
- c) Dextrosa, 5 g.
- d) Fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 4 g.
- e) Sulfato de hierro ( $\text{FeSO}_4$ ).
- f) Bismuto sulfito (indicador), 8 g.
- g) Verde brillante, 0,025 g.
- h) Agar, 20 g.
- i) Agua destilada, 1 000 mL.

### **A.13.2. Procedimiento**

- a) Diluir los ingredientes en el agua destilada.
- b) Calentar hasta su punto de ebullición.
- c) Dejar hervir por 1 min (el precipitado no disolverá por completo).
- d) No esterilizar en autoclave.
- e) Enfriar a una temperatura entre 45 °C a 50 °C y servir en placas de Petri de 100 mm x 15 mm o 90 mm x 15 mm en porciones de aproximadamente 20 mL.
- f) Dejar secar por un periodo de 2 h con la tapa parcialmente abierta.
- g) Cerrar bien y ajustar hasta un valor de pH final de  $7,7 \pm 0,2$ .
- h) Preparar las placas el día anterior al uso.
- i) Almacenar en la oscuridad por un tiempo no mayor a 48 h.

## **A.14. Agar Hektoen Entérico**

### **A.14.1. Ingredientes**

- a) Peptona, 12 g.
- b) Extracto de levadura, 3 g.
- c) Sales biliares N° 3, 9 g.
- d) Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ), 5 g.
- e) Tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ), 5 g.
- f) Citrato de amonio férrico, 1,5 g.
- g) Azul de bromotimol, 0,065 g.
- h) Fucsina ácida, 0,1 g.
- i) Agar, 14 g.
- j) Agua desilada, 1 000 mL.

### **A.14.2. Procedimiento**

- a) Diluir los ingredientes en el agua destilada, mezclar frecuentemente.
- b) Calentar hasta su punto de ebullición, dejar hervir por un tiempo no mayor de 1 min.
- c) No esterilizar en autoclave.
- d) Enfriar a una temperatura entre 45 °C a 50 °C.
- e) Servir en placas de Petri de 100 mm x 15 mm o 90 mm x 15 mm en porciones de aproximadamente 20 mL.
- f) Dejar secar por un tiempo de 2 h con la tapa parcialmente abierta.

<sup>1)</sup> Tomada de la Food and Drug Administration- BAM Chapter 5, 2024 p 8-9.  
COVENIN 1291-1:2025

- g) Cerrar bien y ajustar hasta un valor de pH final  $7,5 \pm 0,2$  pH final.
- h) Almacenar el medio hasta por un periodo de tiempo de 30 días en refrigeración a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

### **A.15. Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)**

#### **A.15.1. Ingredientes**

- a) Extracto de levadura, 3 g.
- b) L-lisina, 5 g.
- c) Xilosa, 3,75 g.
- d) Lactosa, 7,5 g.
- e) Sacarosa, 7,5 g.
- f) Desoxicolato de sodio, 2,5 g.
- g) Cloruro de sodio (NaCl), 5 g.
- h) Tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ), 6,8 g.
- i) Citrato de amonio férrico, 0,8 g.
- j) Rojo de fenol, 0,08 g.
- k) Agar, 15 g.
- l) Agua destilada, 1 000 mL.

#### **A.15.2. Procedimiento**

- a) Diluir los ingredientes en el agua destilada, mezclar y calentar hasta su punto de ebullición. No esterilizar en autoclave.
- b) Enfriar a una temperatura entre  $45^{\circ}\text{C}$  a  $50^{\circ}\text{C}$ .
- c) Servir en placas de Petri de 100 mm x 15 mm o 90 mm x 15 mm en porciones de aproximadamente 20 mL.
- d) Dejar secar por un tiempo de 2 h con la tapa parcialmente abierta
- e) Cerrar bien y ajustar hasta un valor de pH final  $7,4 \pm 0,2$ .
- f) Almacenar el medio hasta por un periodo de tiempo de 30 días en refrigeración entre una temperatura de  $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

### **A.16. Agar XLT4 (medio comercial)**

#### **A.16.1. Ingredientes**

- a) Proteosa peptona N° 3, 1,6 g.
- b) Extracto de levadura, 3 g.
- c) L-lisina, 5 g.
- d) Xilosa, 3,75 g.
- e) Lactosa, 7,5 g.
- f) Sacarosa, 7,5 g.
- g) Cloruro de sodio (NaCl), 5 g.
- h) Tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ), 6,8 g.
- i) Citrato de amonio férrico, 0,8 g.
- j) Rojo de fenol, 0,08 g.
- k) Agar, 18 g.
- l) Suplemento XLT4 (solución de tetradecil sulfato de sodio a una concentración de 26 % a 28 %), 4,6 mL.
- m) Agua destilada, 1 000 mL.

<sup>1)</sup> Tomada de la Food and Drug Administration- BAM Chapter 5, 2024 p 8-9.  
COVENIN 1291-1:2025

## **A.16.2. Procedimiento**

Seguir las instrucciones de preparación del fabricante.

## **A.17. Agar Rambach (medio comercial)**

### **A.17.1. Ingredientes**

- a) Peptona, 8 g.
- b) Cloruro de sodio (NaCl), 5 g.
- c) Desoxicolato de sodio, 1 g.
- d) Mezcla cromogénica, 1,5 g.
- e) Propilenglicol, 10,5 g.
- f) Agar, 15 g.
- g) Agua destilada, 1 000 mL.

## **A.17.2. Procedimiento**

Seguir las instrucciones de preparación del fabricante.

## **A.18. Agar EF-18 (medio comercial)**

### **A.18.1. Ingredientes**

- a) Polipeptona (o peptona), 5 g.
- b) Polipeptona (o peptona), 3 g.
- c) L-lisina, 10 g.
- d) Glucosa, 2,5 g.
- e) Sacarosa, 15 g.
- f) Sulfato de magnesio heptahidratado ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ), 1,5 g.
- g) Sales biliares, 1,5 g.
- h) Sulfapiridina, 1,5 g.
- i) Azul de bromotimol, 0,03 g.
- j) Novobiocina, 0,015 g.
- k) Agar, 15 g.
- l) Agua destilada, 1 000 mL.

## **A.18.2. Procedimiento**

Seguir las instrucciones de preparación del fabricante.

## **A.19. Agar verde brillante (medio comercial)**

### **A.19.1. Ingredientes**

- a) Peptona de carne, 5 g.
- b) Peptona de caseína, 5 g.
- c) Extracto de carne, 5 g.
- d) Lactosa, 10 g.
- e) Sacarosa, 10 g.

- f) Cloruro de sodio (NaCl), 5 g.
- g) Fosfato disódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 2 g.
- h) Rojo de fenol, 0,08 g.
- i) Verde brillante, 0,012 5 g.
- j) Agar, 12 g.
- k) Agua destilada, 1 000 mL.

#### **A.19.2. Procedimiento**

- a) Diluir los ingredientes en el agua destilada, mezclar.
- b) Calentar hasta su punto de ebullición.
- c) Esterilizar en autoclave a una temperatura de 121 °C por 15 min.
- d) Enfriar a una temperatura entre 45 °C a 50 °C.
- e) Servir en placas de Petri de 100 mm x 15 mm o 90 mm x 15 mm en porciones de aproximadamente 20 mL y ajustar hasta un valor de pH final 6,9 ± 0,2.

### **A.20. Agar nutritivo**

#### **A.20.1. Ingredientes**

- a) Extracto de carne, 3 g.
- b) Peptona, 5 g.
- c) Agar, 15 g.
- d) Agua destilada, 1 000 mL.

#### **A.20.2. Procedimiento**

- a) Calentar para disolver los ingredientes.
- b) Dispensar en tubos o frascos.
- c) Esterilizar en autoclave a una temperatura de 121 °C durante 15 min.
- d) Ajustar hasta un valor de pH final 6,8 ± 0,2.

### **A.21. Agar triple azúcar hierro (TSI)**

#### **A.21.1. Opción 1**

##### **A.21.1.1. Ingredientes**

- a) Polipeptona, 20 g.
- b) Cloruro de sodio (NaCl), 5 g.
- c) Lactosa, 10 g.
- d) Sacarosa, 10 g.
- e) Glucosa, 1 g.
- f) Sulfato ferroso amónico (Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O), 0,2 g.
- g) Tiosulfato de sodio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), 0,2 g.
- h) Rojo fenol, 0,025 g.
- i) Agar, 13 g.
- j) Agua destilada, 1 000 mL.

### **A.21.1.2. Procedimiento**

- a) Disolver cada uno de los componentes en el agua, aplicando calor hasta llevar a hervor por 1 min.
- b) Llenar 1/3 de tubos de 16 mm x 150 mm, tapar de tal manera de mantener condiciones aeróbicas.
- c) Esterilizar en autoclave durante 15 min a una temperatura de 118 °C.
- d) Inclinar los tubos para obtener una cuña de 4 cm a 5 cm del medio de cultivo y ajustar hasta un valor de pH final de  $7,3 \pm 0,2$ , luego solidificar.

### **A.21.2. Opción 2**

#### **A.21.2.1. Ingredientes**

- a) Extracto de carne, 3 g.
- b) Extracto de levadura, 3 g.
- c) Peptona, 15 g.
- d) Proteosa peptona, 5 g.
- e) Cloruro de sodio (NaCl), 5 g.
- f) Lactosa, 10 g.
- g) Sacarosa, 10 g.
- h) Glucosa, 1 g.
- i) Sulfato de hierro ( $FeSO_4$ ), 0,2 g.
- j) Tiosulfato de sodio ( $Na_2S_2O_3$ ), 0,3 g
- k) Rojo fenol, 0,024 g.
- l) Agar, 12 g.
- m) Agua destilada, 1 000 mL.

#### **A.21.2.2. Procedimiento**

- a) Disolver cada uno de los componentes en el agua, aplicando calor hasta llevar a hervor por 1 min.
- b) Llenar 1/3 de tubos de 16 mm x 150 mm, tapar de tal manera de mantener condiciones aeróbicas.
- c) Esterilizar en autoclave durante 15 min a una temperatura de 121 °C.
- d) Inclinar los tubos para obtener una cuña de 4 cm a 5 cm del medio de cultivo y ajustar hasta un valor de pH final de  $7,4 \pm 0,2$ , luego solidificar.

### **A.22. Agar lisina-hierro (LIA)**

#### **A.22.1. Ingredientes**

- a) Peptona o gelisato, 5 g.
- b) Extracto de levadura, 3 g.
- c) Glucosa, 1 g.
- d) L-lisina, 10 g.
- e) Glucosa, 1 g.
- f) Citrato de amonio férrico, 0,5 g.
- g) Tiosulfato de sodio ( $Na_2S_2O_3$ ), 0,04 g.
- h) Púrpura de bromocresol, 0,02 g.
- i) Agar, 15 g.
- j) Agua destilada, 1 000 mL.

## **A.22.2. Procedimiento**

- a) Disolver los componentes en agua, aplicando calor.
- b) Dispensar en porciones de 4 mL en tubos de 13 mm x 100 mm con tapa de rosca.
- c) Esterilizar en autoclave durante 12 min a una temperatura de 121 °C.
- d) Inclinar los tubos para obtener una cuña de 4 cm a 5 cm y ajustar el pH final del medio de cultivo a  $6,7 \pm 0,2$ , luego solidificar.

## **A.23. Caldo urea**

### **A.23.1. Ingredientes**

- a) Urea, 20 g.
- b) Extracto de levadura, 0,1 g.
- c) Fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 9,5 g.
- d) Fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 9,1 g.
- e) Rojo de fenol, 0,01 g.
- f) Agua destilada, 1 000 mL.

### **A.23.2. Procedimiento**

- a) Disolver los componentes en el agua.
- b) Esterilizar por filtración por membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ .
- c) Dispensar asépticamente en porciones de 1,5 mL a 3 mL en tubos estériles de 13 mm x 100 mm con tapa de rosca.
- d) Ajustar el pH final del medio de cultivo de  $6,8 \pm 0,2$ .

## **A.24. Agar MacConkey**

### **A.24.1. Ingredientes**

- a) Proteosa peptona o polipeptona, 3 g.
- b) Peptona o gelisato, 17 g.
- c) Sales biliares N° 3 o mezcla de sales biliares, 1,5 g.
- d) Lactosa, 10 g.
- e) Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ), 5 g.
- f) Rojo neutro, 0,03 g.
- g) Cristal violeta, 0,01 g.
- h) Agar, 13,5 g.
- i) Agua destilada, 1 000 mL.

### **A.24.2. Procedimiento**

- a) Diluir los ingredientes en el agua destilada, mezclar frecuentemente y calentar hasta su punto de ebullición, dejar hervir de (1 a 2) minutos.
- b) Esterilizar en autoclave a una temperatura de 121 °C durante un tiempo de 15 min y enfriar a una temperatura entre 45 °C a 50 °C.
- c) Servir en placas de Petri de 100 mm x 15 mm o 90 mm x 15 mm en porciones de aproximadamente 20 mL.
- d) Dejar secar con la tapa cerrada a temperatura ambiente y ajustar hasta un valor de pH final de  $7,1 \pm 0,2$ .

## **A.25. Caldo lisina descarboxilasa**

### **A.25.1. Ingredientes**

- a) Peptona o gelisato, 5 g.
- b) Extracto de levadura, 3 g.
- c) Glucosa, 1 g.
- d) L-lisina, 5 g.
- e) Púrpura de bromocresol, 0,02 g.
- f) Agua destilada, 1 000 mL.

### **A.25.2. Procedimiento**

- a) Calentar hasta diluir los ingredientes.
- b) Dispensar en porciones de 4 mL en tubos de 16 mm x 125 mm con tapa de rosca.
- c) Esterilizar en autoclave a una temperatura de 121 °C durante 15 min con las tapas flojas.
- d) Apretar la tapa para el almacenamiento o después de la inoculación y ajustar hasta un valor de pH final de  $6,8 \pm 0,2$ .

## **A.26. Caldo carbohidrato rojo de fenol**

### **A.26.1. Ingredientes**

- a) Trypticasa o peptona N° 3, 10 g.
- b) Cloruro de sodio (NaCl), 5 g.
- c) Extracto de carne (opcional), 1 g.
- d) Rojo fenol (7,2 mL de 0,25 % solución rojo de fenol), 0,018 g.
- e) Agua destilada, 1 000 mL.
- f) Carbohidrato (Disolver 5 g de dulcitol, 10 g de lactosa o 10 g de sacarosa (según se requiera) en el caldo base).

### **A.26.2. Procedimiento**

- a) Disolver cada uno de los componentes en el agua, aplicando calor si es necesario.
- b) Dispensar 2,5 mL en tubos de 13 mm x 100 mm que contengan tubos de fermentación de 6 mm x 50 mm invertidos (tubos Durham).
- c) Esterilizar en autoclave durante 10 min a una temperatura de 118 °C y ajustar el pH final del medio de cultivo a  $7,4 \pm 0,2$ .

### **A.26.3. Procedimiento alternativo**

- a) Disolver los ingredientes, sin incluir el carbohidrato, en 800 mL de agua destilada aplicando calor si es necesario.
- b) Dispensar 2,0 mL en tubos de 13 mm x 100 mm que contengan tubos de fermentación de 6 mm x 50 mm invertidos (tubos Durham).
- c) Esterilizar en autoclave durante 15 min a una temperatura de 118 °C y dejar enfriar hasta por debajo de la temperatura de 45 °C.
- d) Disolver el carbohidrato en 200 mL de agua destilada y esterilizar por filtración.
- e) Añadir, 0,5 mL de la solución de carbohidrato filtrada a cada tubo, manteniendo las condiciones de esterilidad.

- f) Agitar suavemente para mezclar el medio de cultivo y ajustar el valor de pH final de  $7,4 \pm 0,2$ .

### **A.27. Agar triptosa sangre**

#### **A.27.1. Ingredientes**

- a) Tryptose, 10 g.
- b) Extracto de carne, 3 g.
- c) Cloruro de sodio (NaCl), 5 g.
- d) Agar, 15 g.
- e) Agua destilada, 1 000 mL.

#### **A.27.2. Procedimiento**

- a) Diluir los ingredientes en el agua destilada, mezclar y calentar hasta su punto ebullición, dejar hervir por 1 min.
- b) Dispensar en tubos de 16 mm x 15 mm hasta 1/3 de su capacidad.
- c) Esterilizar en autoclave a una temperatura de 121 °C durante 15 min.
- d) Inclinar los tubos para obtener una cuña de 4 cm a 5 cm y solidificar.

### **A.28. Caldo triptosa-tripticasa de soya**

#### **A.28.1. Ingredientes**

- a) Caldo tripticase de soya (comercial, deshidratado), 15 g.
- b) Caldo triptosa (comercial, deshidratado), 13,5 g.
- c) Extracto de levadura, 3 g.
- d) Agua destilada, 1 000 mL.

#### **A.28.2. Procedimiento**

- a) Diluir los ingredientes en el agua destilada, mezclar y calentar.
- b) Dispensar porciones de 5 mL en tubos de 16 mm x 15 mm.
- c) Esterilizar en autoclave durante 15 min a una temperatura de 121 °C y ajustar el pH final del medio de cultivo a  $7,2 \pm 0,2$ .

### **A.29. Medio movilidad**

#### **A.29.1. Ingredientes**

- a) Extracto de carne, 3 g.
- b) Polipeptona o gelisato, 10 g.
- c) Cloruro de sodio (NaCl), 5 g.
- d) Agar, 4 g.
- e) Agua destilada, 1 000 mL.

#### **A.29.2. Procedimiento**

- a) Diluir los ingredientes en el agua destilada, mezclar y calentar hasta su punto de ebullición, dejar hervir por 1 min.
- b) Dispensar en tubos de 20 mm x 150 mm en porciones de 20 mL.
- c) Esterilizar en autoclave a una temperatura de 121 °C durante 15 min con las tapas flojas.

<sup>1)</sup> Tomada de la Food and Drug Administration- BAM Chapter 5, 2024 p 8-9.  
COVENIN 1291-1:2025

- d) Almacenar a una temperatura entre 5 °C a 8 °C.
- e) Antes de usar, volver a hervir en baño de calentamiento o vapor fluente y enfriar a una temperatura de 45 °C.
- f) Dispensar asépticamente 20 mL en placas de Petri de 15 mm x 90 mm, cubrir las placas y dejar solidificar, hasta obtener un pH final de  $7,4 \pm 0,2$ .
- g) Utilizar el día de la preparación.

### **A.30. Caldo triptonado (triptófano) 1 %**

#### **A.30.1. Ingredientes**

- a) Triptona o tripticasa, 10 g.
- b) Agua destilada, 1 000 mL.

#### **A.30.2. Procedimiento**

- a) Disolver y dispensar en porciones de 5 mL en tubos de 16 mm x 125 mm o 16 mm x 150 mm con tapa de rosca.
- b) Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 min, pH final  $6,9 \pm 0,2$ .

### **A.31. Caldo malonato**

#### **A.31.1. Ingredientes**

- a) Extracto de levadura, 1 g.
- b) Sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 g.
- c) Fosfato dipotásico  $(\text{K}_2\text{HPO}_4)$ , 0,6 g.
- d) Fosfato monopotásico  $(\text{KH}_2\text{PO}_4)$ , 0,4 g.
- e) Cloruro de sodio  $(\text{NaCl})$ , 2 g.
- f) Malonato de sodio, 3 g.
- g) Glucosa, 0,25 g.
- h) Azul de bromotimol, 0,025 g.
- i) Agua destilada, 1 000 mL.

#### **A.31.2. Procedimiento**

- a) Mezclar hasta diluir, utilizando calor si es necesario.
- b) Dispensar en porciones de 3 mL en tubos de 13 mm x 100 mm con tapa de rosca.
- c) Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 min, pH final  $6,7 \pm 0,2$ .

### **A.32. Caldo cianuro de potasio (KCN)**

#### **A.32.1. Caldo base**

##### **A.32.1.1. Ingredientes**

- a) Proteosa peptona o polipeptona, 3 g.
- b) Cloruro de sodio  $(\text{NaCl})$ , 5 g.
- c) Fosfato monopotásico  $(\text{KH}_2\text{PO}_4)$ , 0,225 g.
- d) Fosfato disódico  $(\text{Na}_2\text{HPO}_4)$ , 5,64 g.
- e) Agua destilada, 1 000 mL.

### **A.32.1.2. Procedimiento**

- a) Disolver todos los ingredientes menos el cianuro de potasio.
- b) Esterilizar en autoclave a una temperatura de 121 °C durante 15 min.
- c) Enfriar y refrigerar a una temperatura entre 5 °C a 8 °C, hasta obtener un pH final  $7,6 \pm 0,2$ .

### **A.32.2. Solución de cianuro de potasio**

#### **A.32.2.1. Ingredientes**

- a) Cianuro de potasio (KCN), 0,5 g.
- b) Agua destilada estéril fría, 100 mL.

#### **A.32.2.2. Procedimiento**

- a) Mezclar el KCN, utilizando guantes, con el agua destilada estéril enfriada a una temperatura entre 5 °C a 8 °C.
- b) Dispensar 15 mL de la solución de KCN fría a un litro de caldo base frío, utilizando una propipeta. No pipetear con la boca.
- c) Dispensar asépticamente, en porciones de 1 mL a 1,5 mL en tubos de 13 mm x 100 mm.
- d) Preparar los tapones de corchos hirviéndolos en parafina por 5 min.
- e) Colocar los corchos en el tubo de modo que la parafina no entre en contacto con el caldo, sino que se forme un sello entre el borde del tubo y el corcho.
- f) Almacenar entre un rango de temperatura entre 5 °C a 8 °C por un máximo de dos (2) semanas.

## **A.33. Infusión cerebro corazón**

### **A.33.1. Medio 1**

#### **A.33.1.1. Ingredientes**

- a) Infusión de cerebro de becerro, 250 g.
- b) Infusión de corazón de vaca, 250 g.
- c) Proteosa peptona o polipeptona, 10 g.
- d) Cloruro de sodio (NaCl), 5 g.
- e) Dextrosa, 2 g.
- f) Fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 2,5 g.
- g) Agua destilada, 1 000 mL.

#### **A.33.1.2. Procedimiento**

- a) Mezclar los ingredientes en agua destilada, calentándolos suavemente.
- b) Dispensar la solución en tubos o botellas según sea necesario.
- c) Esterilizar en autoclave a una temperatura de 121 °C durante 15 min y ajustar el valor pH final a  $7,4 \pm 0,2$ .

### **A.33.2. Medio 2**

#### **A.33.2.1. Ingredientes**

- a) Infusión cerebro corazón, 6 g.

- b) Digestivo peptídico de tejido animal, 6 g.
- c) Cloruro de sodio (NaCl), 5 g.
- d) Dextrosa, 3 g.
- e) Digestivo peptídico de gelatina, 14,5 g.
- f) Fosfato disódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 2,5 g.
- g) Agua destilada, 1 000 mL.

#### **A.33.2.2. Procedimiento**

- a) Mezclar los ingredientes en agua destilada y calentar hasta que hierva durante 1 minuto.
- b) Dispensar la solución en tubos o botellas según sea necesario.
- c) Esterilizar en autoclave a una temperatura de 121 °C durante 15 min y ajustar el valor de pH final a 7,4 ± 0,2.

#### **A.33.3. Caldo MRVP**

#### **A.33.4. Medio 1**

##### **A.33.4.1. Ingredientes**

- a) Agua peptonada tamponada (polvo), 7 g.
- b) Glucosa, 5 g.
- c) Fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 5 g.
- d) Agua destilada, 1 000 mL.

##### **A.33.4.2. Procedimiento**

- a) Mezclar los ingredientes en agua destilada, calentándolos suavemente.
- b) Dispensar la solución en porciones de 10 mL en tubos de 16 mm x 125 mm.
- c) Esterilizar en autoclave a una temperatura de 121 °C durante un tiempo de 12 min a 15 min, y ajustar el pH final a 6,9 ± 0,2.

#### **A.33.5. Medio 2**

##### **A.33.5.1. Ingredientes**

- a) Digestivo peptídico de caseína, 3,5 g.
- b) Digestivo peptídico de tejido animal, 3,5 g.
- c) Dextrosa, 5 g.
- d) Fosfato dipotásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 5 g.
- e) Agua desilada, 1 000 mL.

##### **A.33.5.2. Procedimiento**

- a) Mezclar los ingredientes en agua destilada, calentándolos suavemente. Dispensar en porciones de 10 mL en tubos de 16 mm x 125 mm.
- b) Esterilizar en autoclave a una temperatura de 121 °C durante un tiempo de 12 min a 15 min, y ajustar el valor de pH final a 6,9 ± 0,2.

## A.33.6. Medio 3

### A.33.6.1. Ingredientes

- a) Peptona, 5 g.
- b) Glucosa, 5 g.
- c) Tampon fosfato, 5 g.
- d) Agua destilada, 1 000 mL.

### A.33.6.2. Procedimiento

- a) Mezclar los ingredientes en agua destilada, calentándolos suavemente.
- b) Dispensar en porciones de 10 mL en tubos de 16 mm x 125 mm.
- c) Esterilizar en autoclave a una temperatura de 121 °C durante 15 min, y ajustar el valor de pH final de  $7,5 \pm 0,2$ .

## A.34. Agar citrato de Simmons

### A.34.1. Ingredientes

- a) Citrato de sodio, 2 g.
- b) Cloruro de sodio (NaCl), 5 g.
- c) Fosfato dipotásico ( $K_2HPO_4$ ), 1 g.
- d) Dihidrógeno fosfato de amonio ( $NH_4H_2PO_4$ ), 1 g.
- e) Sulfato de magnesio ( $MgSO_4$ ), 0,2 g.
- f) Azul de bromotimol, 0,08 g.
- g) Agar, 15 g.
- h) Agua destilada, 1 000 mL.

### A.34.2. Procedimiento

- a) Disolver los componentes en agua, aplicando calor hasta que el agar se disuelva por completo.
- b) Dispensar la solución en tubos con tapa de rosca, eligiendo entre medidas de 13 mm x 100 mm o 16 mm x 15 mm, llenándolos hasta alcanzar aproximadamente 1/3 de su capacidad.
- c) Esterilizar en autoclave a una temperatura de 121 °C durante un tiempo 15 min.
- d) Inclinar ligeramente los tubos para formar una cuña de 4 cm a 5 cm, antes de que la solución se solidifique.
- e) Asegúrese de que el pH final del medio de cultivo sea de  $6,8 \pm 0,2$ .

## A.35. Caldo carbohidrato púrpura de bromocresol

### A.35.1. Ingredientes

- a) Trypticasa o peptona N° 3, 10 g.
- b) Cloruro de sodio (NaCl), 5 g.
- c) Extracto de carne, 3 g.
- d) Púrpura de bromocresol, 0,02 g.
- e) Agua destilada, 1 000 mL.
- f) Carbohidrato (Disolver 5 g de dulcitol, 10 g de lactosa o 10 g de sacarosa (según se requiera) en el caldo base).

### **A.35.2. Procedimiento**

- a) Disolver cada uno de los componentes en el agua, aplicando calor si es necesario.
- b) Dispensar 2,5 mL en tubos de 13 mm x 100 mm que contengan tubos de fermentación de 6 mm x 50 mm invertidos (tubos Durham).
- c) Esterilizar en autoclave durante 10 min a una temperatura de 118 °C y ajustar el pH final del medio de cultivo a  $6,8 \pm 0,2$ .

### **A.35.3. Procedimiento alternativo**

- a) Disolver los ingredientes, sin incluir el carbohidrato, en 800 mL de agua destilada aplicando calor si es necesario.
- b) Dispensar 2,0 mL en tubos de 13 mm x 100 mm que contengan tubos de fermentación de 6 mm x 50 mm invertidos (tubos Durham).
- c) Esterilizar en autoclave durante 15 min a una temperatura de 118 °C y dejar enfriar por debajo de los 45 °C.
- d) Disolver el carbohidrato en 200 mL de agua destilada y esterilizar por filtración.
- e) Añadir 0,5 mL de la solución de carbohidrato filtrada a cada tubo, manteniendo las condiciones de esterilidad Agitar suavemente para mezclar y obtener el pH final de medio de cultivo a  $6,8 \pm 0,2$ .

**ANEXO B (Normativo)**  
**Preparación de reactivos <sup>(2)</sup>**

**B.1. Solución de hidróxido de sodio 1 N o hidróxido de potasio 1 N**

**B.1.1. Ingredientes**

- a) Hidróxido de sodio/potasio, 40 g.
- b) Agua destilada estéril, 1 L.

**B.1.2. Procedimiento**

- a) Disolver el hidróxido de sodio o el hidróxido de potasio en una porción de agua destilada.
- b) Completar a 1 litro.

**B.2. Solución de ácido clorhídrico 1 N**

**B.2.1. Ingredientes**

- a) Ácido clorhídrico concentrado, 89 mL.
- b) Agua destilada estéril, 1 L.

**B.2.2. Procedimiento**

Añadir 89 mL de ácido clorhídrico concentrado a 911 mL de destilado estéril para un volumen final de 1 litro.

**B.3. Solución verde brillante al 1 % o 2 %**

**B.3.1. Ingredientes**

- a) Verde brillante, (1 o 2) g.
- b) Agua destilada estéril, 100 mL.

**B.3.2. Procedimiento**

- a) Disolver (1 o 2) g de colorante en 10 mL de agua destilada estéril.
- b) Diluir a 100 mL antes del uso.
- c) Ensayar la toxicidad de los lotes de colorantes con microorganismos positivo y negativo.

**B.4. Solución verde brillante al 0,1 % volumen/volumen**

**B.4.1. Ingredientes**

- a) Verde brillante al 2 %, 5 mL.
- b) Agua destilada estéril, 100 mL.

**B.4.2. Procedimiento**

- a) Tomar 5 mL de solución de verde brillante al 2 %.
- b) Colocar en un balón aforado de 100 mL.

<sup>2)</sup> Tomada de la Food and Drug Administration- BAM Chapter 5, 2023 pág. 7-9.  
COVENIN 1291-1:2025

- c) Completar hasta la línea de aforo con agua destilada.
- d) Dispensar en tubos de 125 mm x 16 mm a razón de 5 mL por cada tubo.
- e) Esterilizar a una temperatura de 121 °C durante un tiempo de 15 min.

#### **B.5. Solución de papaína 5 %**

##### **B.5.1. Ingredientes**

- a) Papaína, 5 g.
- b) Agua destilada estéril, 95 mL.

##### **B.5.2. Procedimiento**

- a) Disolver la papaína en agua destilada estéril y agitar para disolver completamente.
- b) Dispensar en porciones de 10 mL.

#### **B.6. Solución de celulasa 1 %**

##### **B.6.1. Ingredientes**

- a) Celulasa, 1 g.
- b) Agua destilada estéril, 99 mL.

##### **B.6.2. Procedimiento**

- a) Disolver 1 g de celulasa en 99 mL de agua destilada estéril.
- b) Esterilizar por filtración con membrana filtrante de 0,45 nm de tamaño de poro.
- c) Almacenar la solución de celulasa a una temperatura entre 2 °C a 5 °C por un tiempo de dos (2) semanas.

#### **B.7. Solución con 200 mg/kg de cloro con 0,1 % de dodecil sulfato de sodio**

##### **B.7.1. Ingredientes**

- a) Cloro comercial (5,25 % de hipoclorito de sodio), 8 mL.
- b) Dodecil sulfato de sodio, 1 g.
- c) Agua destilada, 992 mL.

##### **B.7.2. Procedimiento**

- a) Disolver 1 g de dodecil sulfato de sodio en 992 mL de agua destilada.
- b) Añadir 8 mL de cloro comercial y mezclar bien.
- c) Preparar inmediatamente antes del uso.

#### **B.8. Reactivos de Kovacs'**

##### **B.8.1. Ingredientes**

- a) p-dímetilaminobenzaldehido, 5 g.
- b) Alcohol amílico, 75 mL.
- c) Agua destilada estéril, 25 mL.

<sup>2)</sup> Tomada de la Food and Drug Administration- BAM Chapter 5, 2023 pág. 7-9.  
COVENIN 1291-1:2025

### **B.8.2. Procedimiento**

- a) Disolver el p-dimetilaminobenzaldehido en alcohol amílico.
- b) Añadir ácido clorhídrico lentamente.
- c) Almacenar a una temperatura de 4 °C.

### **B.9. Solución salina fisiológica al 0,85 %**

#### **B.9.1. Ingredientes**

- a) Cloruro de sodio (NaCl), 8,5 g.
- b) Agua destilada, 1 L.

#### **B.9.2. Procedimiento**

- a) Disolver 8,5 g de cloruro de sodio en 1 litro de agua destilada.
- b) Esterilizar a 121 °C por un tiempo de 15 minutos.
- c) Enfriar a temperatura ambiente.

### **B.10. Solución salina fisiológica formalizada**

#### **B.10.1. Ingredientes**

- a) Cloruro de sodio (NaCl), 8,5 g.
- b) Solución de formaldehído de 36 % a 38 %, 6 mL.
- c) Agua destilada, 1 L.

#### **B.10.2. Procedimiento**

- a) Disolver 8,5 g de cloruro de sodio en 1 litro de agua destilada.
- b) Esterilizar a una temperatura de 121 °C durante un tiempo de 15 min.
- c) Enfriar a temperatura ambiente, añadir 6 mL de solución de formaldehído.
- d) No esterilizar después de la adición del formaldehído.

### **B.11. Etanol al 70 %**

#### **B.11.1. Ingredientes**

- a) Etanol 95 %, 700 mL.
- b) Agua destilada, 250 mL.

#### **B.11.2. Procedimiento**

Añadir a 700 mL de etanol de 95 % y 250 mL de agua destilada para un volumen final de 950 mL.

### **B.12. Solución de púrpura de bromocresol al 0,2 %**

#### **B.12.1. Ingredientes**

- a) Púrpura de bromocresol, 0,2 g.

- b) Agua destilada estéril, 100 mL.

#### **B.12.2. Procedimiento**

Disolver 0,2 g de colorante en agua destilada estéril y diluir a 100 mL.

### **B.13. Reactivos para la prueba de Voges-Proskauer**

#### **B.13.1. Solución 1**

##### **B.13.1.1. Ingredientes**

- a) Alfa-naftol, 5 g.
- b) Alcohol absoluto, 100 mL.

##### **B.13.1.2. Procedimiento**

Disolver el alfa-naftol en alcohol y diluir a 100 mL.

#### **B.13.2. Solución 2**

##### **B.13.2.1. Ingredientes**

- a) Hidróxido de potasio, 40 g.
- b) Agua destilada, 100 mL.

##### **B.13.2.2. Procedimiento**

- a) Disolver 40 g de hidróxido de potasio en una porción de agua destilada estéril
- b) Diluir a 100 mL.

**ANEXO C (Normativo)**  
**Pre-enriquecimiento de la muestra según el tipo de producto**

**TABLA C. Pre-enriquecimiento de la muestra según el tipo de producto**

<b>Producto</b>	<b>Medio de enriquecimiento</b>	<b>Preparación</b>
Huevos líquidos enteros (homogeneizados)	Caldo tripticasa de soya suplementado con sulfato ferroso.	Combinar quince (15) porciones de 25 mL en una muestra compuesta de 375 mL, contenida en una fiola de 6 L. Las muestras compuestas se pueden mantener a temperatura ambiente de 20 °C a 24 °C durante 96 h ± 2 h. Añadir 3 375 mL de caldo tripticasa de soya con sulfato ferroso, mezclar bien utilizando un instrumento estéril. Dejar reposar por 60 min ± 5 min a temperatura ambiente. Mezclar bien por rotación y medir el pH con una tira. Ajustar el pH a 6,8 ± 0,2; si es necesario, utilizando solución estéril 1 M de NaOH o HCl.
Huevos enteros deshidratados, yemas de huevo deshidratadas, claras de huevo deshidratadas, leche líquida (completa, descremada, leche 2 % de grasa, crema de leche), mezclas preparadas en polvo (tortas, galletas, panes, donas), fórmulas infantiles y alimentos por sonda y oral que contengan huevos	Caldo lactosado.	Es preferible no descongelar la muestra antes de su análisis; en caso de que fuera necesario descongelarla para obtener la porción analítica, descongelar por debajo de 45 °C durante máximo 15 min con agitación continua en un baño termostático; alternativamente, descongelar a temperatura entre 2 °C a 5 °C durante un tiempo menor a 18 h. Pesar asépticamente 25 g de muestra en un envase estéril de boca ancha con tapa de rosca o algún contenedor equivalente. Si el producto se presenta en forma de polvo, añadir 15 mL de caldo lactosado, mezclar para hacer una suspensión y añadir gradualmente 3 porciones adicionales de 10 mL, 10 mL y 190 mL de caldo lactosado, mezclando muy bien entre cada adición de caldo; agitar con cucharilla, varilla de vidrio u otro instrumento adecuado hasta obtener una mezcla sin grumos. Si el producto se encuentra en forma diferente al polvo, añadir 225 mL de caldo lactosado y agitar hasta homogenizar. En cualquier forma que se presente el producto, una vez agregado la totalidad del caldo, dejar reposar durante 60 min ± 5 min a temperatura ambiente. Mezclar bien por rotación y medir el pH con una tira. Ajustar el pH a 6,8 ± 0,2; si es necesario, utilizando solución estéril 1 M de NaOH o HCl. Mezclar bien y aflojar la tapa antes de incubar.

**TABLA C. Pre-enriquecimiento de la muestra según el tipo de producto**  
**(Continuación)**

Producto	Medio de enriquecimiento	Preparación
Huevos enteros naturales	Caldo tripticasa de soya.	<p>Una muestra debe contener 20 huevos. No utilizar huevos cuya cáscara esté resquebrajada, rota o astillada. Remover cualquier material adherido a la cáscara con ayuda de un cepillo. Desinfectar la superficie de los huevos con una solución que contenga 3 partes de alcohol al 70 % (etílico o isopropílico) y 1 parte de solución de yodo-yoduro de potasio, sumergiendo los huevos en la solución de desinfección durante, por lo menos, 10 segundos. Remover los huevos y dejar secar al aire.</p> <p>Romper los huevos asépticamente en un vaso de precipitado de 4 L, mezclar las claras y las yemas utilizando las manos enguantadas estériles, cambiando los guantes entre cada muestra de 20 unidades. Añadir 2 L de caldo tripticasa de soya, mezclar bien utilizando un instrumento estéril.</p>
Huevos duros hervidos (pato, pollo y otros)	Caldo tripticasa de soya.	Separar asépticamente la cáscara de los huevos. Triturar los huevos asépticamente, pesar 25 g y añadir 225 mL de tripticasa de soya y mezclar bien por rotación.
Leche en polvo descremada (instantánea y no instantánea). Leche en polvo completa	Agua destilada con solución de verde brillante (añadir 2 mL de solución de verde brillante al 1 % por cada 1 000 mL de agua).	Pesar asépticamente 25 g de muestra y verter lentamente, con un embudo estéril, sobre 225 mL de agua con verde brillante, ajustar la tapa y dejar reposar durante 60 min $\pm$ 5 min a temperatura ambiente. No mezclar ni ajustar pH. En el caso de la leche descremada instantánea, se pueden preparar muestras compuestas combinando hasta 15 unidades analíticas de 25 g c/u, sobre un volumen proporcionalmente mayor de agua con verde brillante.
Caseína láctica	Caldo de pre-enriquecimiento universal.	Pesar asépticamente 25 g de muestra y verter lentamente, con un embudo estéril, sobre 225 mL de caldo de pre-enriquecimiento universal. No mezclar ni ajustar pH. Se pueden preparar muestras compuestas combinando hasta 15 unidades analíticas de 25 g c/u.
Cuajo de caseína, harina de soya	Caldo lactosado.	Pesar asépticamente 25 g de muestra y verter con un embudo estéril sobre 225 mL de caldo lactosado. No mezclar ni ajustar pH. En el caso del cuajo de caseína, se pueden preparar muestras compuestas combinando hasta 15 unidades analíticas de 25 g c/u.
Caseinato de sodio	Caldo lactosado.	Pesar asépticamente 25 g de muestra, añadir 225 mL de caldo lactosado y mezclar bien. Dejar reposar durante 60 min $\pm$ 5 min a temperatura ambiente. Se pueden preparar muestras compuestas combinando hasta 15 unidades analíticas de 25 g c/u.

**TABLA C. Pre-enriquecimiento de la muestra según el tipo de producto**  
**(Continuación)**

<b>Producto</b>	<b>Medio de enriquecimiento</b>	<b>Preparación</b>
		Mezclar bien por rotación y medir el pH con una tira. Ajustar el pH a $6,8 \pm 0,2$ ; si es necesario, utilizando solución estéril 1 M de NaOH o HCl. Mezclar bien y aflojar la tapa antes de incubar.
Productos que contienen huevos (macarronís, espaguetis, lumpias y fideos), champiñones, crustáceos (langosta, langostino, camarón, cangrejos, cangrejos de río) pescados y ostras	Caldo de pre-enriquecimiento universal.	Pesar asépticamente 25 g de muestra, agregar 225 mL de caldo de pre-enriquecimiento universal y mezclar en homogeneizador mecánico de paletas durante 2 min. Transferir a un recipiente estéril apropiado y tapar. Mezclar bien y aflojar la tapa antes de incubar.
Quesos, masas, ensaladas preparadas (jamón, huevos, pollo, atún o pavo)	Caldo lactosado.	Pesar asépticamente 25 g de muestra, agregar 225 mL de caldo lactosado y mezclar en homogeneizador mecánico de paletas durante 2 min. Transferir a un recipiente estéril apropiado y tapar. Mezclar bien y dejar reposar durante $60 \text{ min} \pm 5 \text{ min}$ a temperatura ambiente. Mezclar bien por rotación y medir el pH con una tira. Ajustar el pH a $6,8 \pm 0,2$ , si es necesario, utilizando solución estéril 1 M de NaOH o HCl. Mezclar bien y aflojar la tapa.
Frutos secos enteros, pulpa de frutos secos, frutas y vegetales frescos, congelados o deshidratados	Caldo de pre-enriquecimiento universal.	Pesar asépticamente 25 g de muestra y añadir 225 mL de caldo de pre-enriquecimiento universal. Mezclar bien por rotación.
Mantequilla de frutos secos	Caldo de pre-enriquecimiento universal.	Pesar asépticamente 25 g de muestra, añadir 225 mL de caldo de pre-enriquecimiento universal y mezclar en homogeneizador mecánico de paletas durante 2 min. Transferir a un recipiente estéril apropiado, tapar. Mezclar bien y aflojar la tapa.
Levaduras deshidratadas activas e inactivas	Caldo tripticasa de soya.	Pesar asépticamente 25 g de muestra, añadir 225 mL de caldo tripticasa de soya y mezclar bien. Dejar reposar por un tiempo de $60 \text{ min} \pm 5 \text{ min}$ a temperatura ambiente. Mezclar bien por rotación y medir el pH con una tira. Ajustar el pH a $6,8 \pm 0,2$ ; si es necesario, utilizando solución estéril 1 M de NaOH o HCl. Mezclar bien y aflojar la tapa antes de incubar.
Mezcla con merengue y coberturas	Caldo nutritivo.	Pesar asépticamente 25 g de muestra, añadir 225 mL de caldo nutritivo y mezclar bien. Dejar reposar durante $60 \text{ min} \pm 5 \text{ min}$ a temperatura ambiente.

**TABLA C. Pre-enriquecimiento de la muestra según el tipo de producto**  
**(Continuación)**

Producto	Medio de enriquecimiento	Preparación
		Mezclar bien por rotación y medir el pH con una tira. Ajustar el pH a $6,8 \pm 0,2$ ; si es necesario, utilizando solución estéril 1 M de NaOH o HCl. Mezclar bien y aflojar la tapa antes de incubar.
Especias y condimentos (pimienta negra, pimienta blanca, semillas u hojuelas de célerí, polvo de chile, comino, pimentón, hojuelas de perejil, romero, semillas de sésamo, tomillo y hojuelas de vegetales)	Caldo tripticasa de soya.	Pesar asepticamente 25 g de muestra, añadir 225 mL de caldo tripticasa de soya y mezclar bien. Dejar reposar durante 60 min $\pm$ 5 min a temperatura ambiente. Mezclar bien por rotación y medir el pH con una tira. Ajustar el pH a $6,8 \pm 0,2$ ; si es necesario, utilizando solución estéril 1 M de NaOH o HCl. Mezclar bien y aflojar la tapa antes de incubar.
Cebolla en polvo y hojuelas, ajo en polvo y en hojuelas	Caldo tripticasa de soya adicionando tiosulfato de potasio ( $K_2SO_3$ ) en una concentración final de 0,5 % (5 g de $K_2SO_3$ por cada 1 000 mL de medio de pre-enriquecimiento).	Pesar asepticamente 25 g de muestra, añadir 225 mL de caldo tripticasa de soya con $K_2SO_3$ y mezclar bien. Dejar reposar durante 60 min $\pm$ 5 min a temperatura ambiente. Mezclar bien por rotación y medir el pH con una tira. Ajustar el pH a $6,8 \pm 0,2$ ; si es necesario, utilizando solución estéril 1 M de NaOH o HCl. Mezclar bien y aflojar la tapa antes de incubar.
Pimienta de Jamaica, orégano, canela (en presentación diferente al polvo; es decir, en granos, hojas, ramas, piezas; entre otros)	Caldo tripticasa de soya.	Pesar 25 g de muestra en una bolsa estéril con filtro o equivalente, colocar en un contenedor más grande o gradilla para soporte durante la incubación. Añadir 225 mL de caldo tripticasa de soya, mezclar bien por masaje manual por 60 s. Inmediatamente transferir el líquido a otra bolsa estéril Si la matriz absorbe líquido (como el caso del orégano) se puede agregar 475 mL por cada 25 g de muestra. Dejar reposar durante 60 min $\pm$ 5 min a temperatura ambiente. Mezclar bien por rotación y medir el pH con una tira. Ajustar el pH a $6,8 \pm 0,2$ ; si es necesario, utilizando solución estéril 1 M de NaOH o HCl. Mezclar bien y aflojar la tapa antes de incubar.
Pimienta de Jamaica, orégano, canela (presentación en polvo)	Caldo tripticasa de soya.	Para disminuir los niveles tóxicos de estas especias, examinar la pimienta de Jamaica, orégano y canela en una dilución de 1:100 muestra/diluente y los clavos, en una dilución 1:1000 muestra/diluente. Mezclar bien cada muestra y tomar 25 g de 15 sub-muestras para una muestra compuesta de 375 g. Mezclar bien para homogenizar. Para aquellas categorías que requieren 30 muestras, preparar dos

**TABLA C. Pre-enriquecimiento de la muestra según el tipo de producto**  
**(Continuación)**

<b>Producto</b>	<b>Medio de enriquecimiento</b>	<b>Preparación</b>
		<p>sets de muestra compuesta, cada una que contenga 15 sub-muestras. Para aquellas categorías que requieren 60 muestras, preparar cuatro sets de muestra compuesta, cada una que contenga 15 sub-muestras. Para el caso de la pimienta de Jamaica, orégano y canela, de la muestra compuesta tomar la unidad analítica, para ello pesar 37,5 g y añadirlos a 3 712,5 mL de caldo tripticasa de soya (dilución 1/100), mezclar bien. Dejar reposar durante 60 min <math>\pm</math> 5 min a temperatura ambiente.</p> <p>Para el caso del clavo, de la muestra compuesta tomar la unidad analítica, para ello pesar 3,75 g y añadirlos a 3 746,25 mL de caldo tripticasa de soya (dilución 1/1 000), mezclar bien. Dejar reposar durante 60 min <math>\pm</math> 5 min a temperatura ambiente.</p> <p>Mezclar bien por rotación y medir el pH con una tira. Ajustar el pH a 6,8 <math>\pm</math> 0,2; si es necesario, utilizando solución estéril 1 M de NaOH o HCl. Mezclar bien y aflojar la tapa antes de incubar.</p>
Chocolate, licor de cacao, cacao en polvo, caramelos, caramelos rellenos cubierta de caramelo y cubiertas de chocolate	Leche descremada en polvo (reconstituida al 10%) con verde brillante.	<p>Pesar asépticamente 25 g de muestra y añadir 225 mL de leche descremada en polvo reconstituida al 10 %, sin el verde brillante y dejar reposar 60 min <math>\pm</math> 5 min a temperatura ambiente.</p> <p>Mezclar bien por rotación y medir el pH con una tira. Ajustar el pH a 6,8 <math>\pm</math> 0,2; si es necesario, utilizando solución estéril 1 M de NaOH o HCl. Añadir 0,45 mL de solución acuosa de verde brillante al 1 %. Mezclar bien y aflojar la tapa antes de incubar.</p>
Colorante con pH $\geq$ 6 (suspensión acuosa al 10 %)	Caldo lactosado.	<p>Si el producto se presenta en forma de polvo, añadir 15 mL de caldo lactosado, mezclar para hacer una suspensión, añadir gradualmente 3 porciones adicionales de 10 mL, 10 mL y 190 mL de caldo lactosado, mezclando muy bien entre cada adición de caldo, agitar con cucharilla, varilla de vidrio u otro instrumento adecuado hasta obtener una mezcla sin grumos.</p> <p>Si el producto se encuentra en forma diferente al polvo, añadir 225 mL de caldo lactosado y agitar hasta homogenizar.</p> <p>En cualquier forma que se presente el producto, una vez agregado la totalidad del caldo, dejar reposar durante 60 min <math>\pm</math> 5 min a temperatura ambiente.</p> <p>Mezclar bien por rotación y medir el pH con una tira. Ajustar el pH</p>

**TABLA C. Pre-enriquecimiento de la muestra según el tipo de producto**  
**(Continuación)**

Producto	Medio de enriquecimiento	Preparación
Colorantes con pH < 6 o colorantes lacados	Caldo tetrationato con verde brillante.	<p>a <math>6,8 \pm 0,2</math>, si es necesario, utilizando solución estéril 1 M de NaOH o HCl. Mezclar bien y aflojar la tapa antes de incubar.</p> <p>Pesar asépticamente 25 g de muestra, añadir 225 mL de caldo tetrationato sin verde brillante, mezclar y dejar reposar por 60 min <math>\pm 5</math> min a temperatura ambiente.</p> <p>Mezclar bien por rotación y medir el pH con una tira. Ajustar el pH a <math>6,8 \pm 0,2</math>, si es necesario, utilizando solución estéril 1 M de NaOH o HCl.</p> <p>Añadir 2,25 mL de solución de verde brillante al 0,1 %. Mezclar bien y aflojar la tapa antes de incubar.</p>
Gelatina	Caldo lactosado con solución acuosa de papaína.	<p>Pesar asépticamente 25 g de muestra y añadir 225 mL de caldo lactosado con 5 mL de una solución acuosa de papaína al 5 %, incubar a 35 °C. durante 60 min <math>\pm 5</math> min.</p> <p>Mezclar bien por rotación y medir el pH con una tira. Ajustar el pH a <math>6,8 \pm 0,2</math>; si es necesario, utilizando solución estéril 1 M de NaOH o HCl. Mezclar bien y aflojar la tapa antes de incubar.</p>
Coco	Caldo lactosado con tergitol aniónico 7 o tritón X-100.	<p>Pesar asépticamente 25 g de muestra, añadir 225 mL de caldo lactosado, mezclar y dejar en reposo 60 min <math>\pm 5</math> min a temperatura ambiente.</p> <p>Mezclar bien por rotación y medir el pH con una tira. Ajustar el pH a <math>6,8 \pm 0,2</math>, si es necesario, utilizando solución estéril 1 M de NaOH o HCl.</p> <p>Añadir 2,25 mL de tergitol 7 aniónico o alternativamente Tritón X-100 (cualquiera esterilizado por vapor fluente por 15 min). Limitar el uso de los surfactantes al mínimo posible para iniciar la formación de espuma, para el Tritón X-100, esta cantidad puede ser de 2 gotas o 3 gotas. Mezclar bien y aflojar la tapa antes de incubar.</p>
Goma guar	Caldo lactosado con solución de celulasa al 1 %.	<p>Colocar en un vaso de precipitado o recipiente equivalente 225 mL de caldo lactosado y 2,25 mL de solución de celulasa al 1 %. Agitar vigorosamente con un agitador magnético. Sin dejar de agitar, añadir rápidamente y asépticamente 25 g de la muestra con ayuda de un embudo de vidrio. Dejar reposar durante 60 min <math>\pm 5</math> min a temperatura ambiente, no ajustar pH.</p> <p>Aflojar la tapa antes de incubar.</p>

**TABLA C. Pre-enriquecimiento de la muestra según el tipo de producto**  
**(Continuación)**

<b>Producto</b>	<b>Medio de enriquecimiento</b>	<b>Preparación</b>
Carne, sustitutos de la carne, productos a base de carne, sustancias animales, productos glandulares y comidas (pescado, carnes, huesos)	Caldo lactosado.	<p>Pesar asépticamente 25 g de muestra, añadir 225 mL de caldo lactosado y mezclar en homogeneizador mecánico de paletas durante 2 min. Transferir a un recipiente apropiado y dejar reposar durante 60 min <math>\pm</math> 5 min a temperatura ambiente. Si el producto es molido, triturado o en polvo, no se requiere el uso de homogeneizador mecánico.</p> <p>Mezclar bien por rotación y medir el pH con una tira. Ajustar el pH a <math>6,8 \pm 0,2</math>, si es necesario, utilizando solución estéril 1 M de NaOH o HCl.</p> <p>Añadir hasta 2,25 mL de tergitol 7 aniónico o alternativamente Tritón®X-100 (cualquiera esterilizado por vapor fluente por 15 min). Limitar el uso de los surfactantes al mínimo posible para iniciar la formación de espuma. Los surfactantes no son necesarios en productos glandulares en polvo. Mezclar bien y aflojar la tapa antes de incubar.</p>
Ancas de rana	Caldo lactosado.	<p>Colocar 15 pares de ancas de rana en una bolsa estéril y cubrir con caldo lactosado en una proporción 1:9 muestra/caldo (g/mL). Si se estima que las ancas pesan en promedio 25 g o más, analizar únicamente un anca de cada uno de los 15 pares. Colocar la bolsa en un vaso de precipitado plástico grande u otro recipiente adecuado. Mezclar bien y dejar reposar durante 60 min <math>\pm</math> 5 min a temperatura ambiente.</p> <p>Mezclar bien por rotación y medir el pH con una tira. Ajustar el pH a <math>6,8 \pm 0,2</math>, si es necesario, utilizando solución estéril 1 M de NaOH o HCl.</p>
Carcasas de conejo y pollo	Caldo lactosado.	<p>Colocar la carcasa en una bolsa estéril y cubrir con caldo lactosado en una proporción 1:9 muestra/caldo (g/mL). Colocar la bolsa en un vaso de precipitado plástico grande u otro recipiente adecuado. Mezclar bien por rotación y dejar reposar durante 60 min <math>\pm</math> 5 min a temperatura ambiente.</p> <p>Mezclar bien por rotación y medir el pH con una tira. Ajustar el pH a <math>6,8 \pm 0,2</math>, si es necesario, utilizando solución estéril 1 M de NaOH o HCl.</p>

**TABLA C. Pre-enriquecimiento de la muestra según el tipo de producto**  
**(Continuación)**

<b>Producto</b>	<b>Medio de enriquecimiento</b>	<b>Preparación</b>
Orejas de cochino y piezas para perros masticables	Caldo lactosado con tergitol aniónico 7 o tritón X-100.	<p>Colocar 1 pieza (o 2-3 piezas si son pequeñas) en una bolsa estéril y cubrir con caldo lactosado en una proporción 1:9 muestra/caldo (g/mL). Colocar la bolsa en un vaso de precipitado plástico grande u otro recipiente adecuado. Mezclar bien por rotación y dejar reposar durante 60 min <math>\pm</math> 5 min a temperatura ambiente.</p> <p>Mezclar bien por rotación y medir el pH con una tira. Ajustar el pH a <math>6,8 \pm 0,2</math>, si es necesario, utilizando solución estéril 1 M de NaOH o HCl.</p> <p>Añadir tergitol 7 aniónico o alternativamente Tritón X-100 (cualquiera esterilizado por vapor fluente por 15 min) en una proporción de hasta 1 %. Limitar el uso de los surfactantes al mínimo posible para iniciar la formación de espuma. Por ejemplo, para 225 mL de caldo lactosado el máximo volumen a añadir es de 2,25 mL de tergitol 7 aniónico.</p>
Jugo de naranja (pasteurizado o no pasteurizado), sidra de manzana (pasteurizada o no pasteurizada) y jugo de manzana (pasteurizado)	Caldo de pre-enriquecimiento universal.	<p>Añadir asepticamente 25 mL de muestra a 225 mL de caldo de pre-enriquecimiento universal en un frasco de boca ancha estéril o algún otro contenedor apropiado. Mezclar bien por rotación. Ajustar bien la tapa y dejar reposar durante 60 min <math>\pm</math> 5 min a temperatura ambiente. No ajustar pH. Aflojar la tapa ligeramente antes de incubar (tratar como un alimento de baja carga microbiana).</p>
Alimentos para animales (alimento seco para perros, alimento seco para gatos, alimento para caballos, alimento para ganado, alimento para cerdos, alimento para aves de corral)	Agua peptonada tamponada.	<p>Pesar asepticamente 25 g de muestra en una bolsa estéril con filtro o equivalente, colocar en un contenedor más grande o gradilla para soporte durante la incubación. Añadir 225 mL de agua peptonada tamponada, mezclar bien por rotación y masaje manual por 2 min.</p>
Melón	Caldo de pre-enriquecimiento universal.	<p>Es preferible no descongelar la muestra antes de su análisis; en caso de que fuera necesario descongelarla para obtener la porción analítica, descongelar por debajo de 45 °C durante un tiempo máximo de 15 minutos con agitación continua en un baño termostático; alternativamente, descongelar a temperatura de 2 °C a 5 °C durante un tiempo menor a 18 h.</p>

**TABLA C. Pre-enriquecimiento de la muestra según el tipo de producto**  
**(Continuación)**

<b>Producto</b>	<b>Medio de enriquecimiento</b>	<b>Preparación</b>
		<p>Para fruta picada o triturada, pesar asépticamente 25 g, añadir 225 mL de caldo de pre-enriquecimiento universal y mezclar durante 2 min. Transferir la mezcla homogénea a un envase estéril de boca ancha o algún otro contenedor apropiado. Ajustar bien la tapa y dejar reposar durante 60 min <math>\pm</math> 5 min a temperatura ambiente. No ajustar pH. Mezclar bien y aflojar la tapa antes de incubar.</p> <p>Para fruta entera, no enjuagar si se ve suciedad visible, examinar tal como se reciba. Colocar el melón en una bolsa plástica estéril, añadir suficiente caldo de preenriquecimiento universal para que permita que el melón flote. (el volumen de caldo puede ser hasta 1,5 veces el peso del melón). Colocar la bolsa plástica con la muestra y el caldo en un vaso de precipitado de 5 L o algún otro contenedor apropiado, a fin de dar soporte durante la incubación. Permitir que la solapa superior de la bolsa se doble, a fin de cerrar el envase de manera segura, pero sin hermeticidad, durante la incubación. Dejar reposar durante 60 min <math>\pm</math> 5 min a temperatura ambiente. No ajustar pH. Incubar con la bolsa ligeramente abierta.</p>
Mango	Agua peptonada tamponada.	<p>Es preferible no descongelar la muestra antes de su análisis; en caso de que fuera necesario descongelarla para obtener la porción analítica, descongelar por debajo de 45 °C durante un tiempo menor a 15 minutos con agitación continua en un baño termostático; alternativamente, descongelar a temperatura de 2 °C a 5 °C durante un tiempo menor a 18 h.</p> <p>Para fruta picada o triturada, pesar asépticamente 25 g de muestra, añadir 225 mL de agua peptonada tamponada y mezclar durante 2 min. Transferir la mezcla homogénea a un envase estéril de boca ancha o algún otro contenedor apropiado. Ajustar bien la tapa y dejar reposar durante 60 min <math>\pm</math> 5 min a temperatura ambiente. Mezclar bien por rotación y aflojar la tapa antes de incubar.</p> <p>Para mangos enteros, no enjuagar si se ve suciedad visible, examinar tal como se reciba. Colocar el mango en una bolsa plástica estéril, añadir suficiente agua peptonada tamponada para que permita que el mango flote. (el volumen de caldo puede ser hasta una vez el peso del mango).</p>

**TABLA C. Pre-enriquecimiento de la muestra según el tipo de producto**  
**(Continuación)**

<b>Producto</b>	<b>Medio de enriquecimiento</b>	<b>Preparación</b>
Mango	Agua peptonada tamponada.	Colocar la bolsa plástica con la muestra y el caldo en un vaso de precipitado de 5 L o algún otro contenedor apropiado, a fin de dar soporte durante la incubación. Permitir que la solapa superior de la bolsa se doble, con la finalidad de cerrar el envase de manera segura, pero sin hermeticidad, durante la incubación. Dejar reposar durante 60 min $\pm$ 5 min a temperatura ambiente. Incubar con la bolsa ligeramente abierta.
Tomate	Caldo de pre-enriquecimiento universal.	Para fruta picada o triturada, pesar asépticamente 25 g de muestra, añadir 225 mL de caldo de pre-enriquecimiento universal y mezclar durante 2 min. Transferir la mezcla homogénea a un envase estéril de boca ancha o algún otro contenedor apropiado. Ajustar bien la tapa y dejar reposar durante 60 min $\pm$ 5 min a temperatura ambiente. No ajustar pH. Mezclar bien por rotación y aflojar la tapa antes de incubar. Para tomates enteros, no enjuagar si se ve suciedad visible, examinar tal como se reciba. Colocar el tomate en una bolsa plástica estéril, añadir suficiente caldo de pre-enriquecimiento universal para que permita que el tomate flote (el volumen de caldo puede ser hasta una vez el peso del tomate). Colocar la bolsa plástica con la muestra y el caldo en un vaso de precipitado o algún otro contenedor apropiado, a fin de dar soporte durante la incubación. Permitir que la solapa superior de la bolsa se doble, con la finalidad de cerrar el envase de manera segura, pero sin hermeticidad, durante la incubación. Dejar reposar durante 60 min $\pm$ 5 min a temperatura ambiente. No ajustar pH. Incubar con la bolsa ligeramente abierta.
Semillas de alfalfa o de frijol mungo	Caldo lactosado.	Pesar asépticamente 25 g de muestra, añadir 225 mL de caldo lactosado y mezclar por rotación. Cubrir la boca de la fiola con papel de aluminio estéril y dejar reposar durante 60 min $\pm$ 5 min a temperatura ambiente. Medir el pH con una tira. Ajustar el pH a 6,8 $\pm$ 0,2, si es necesario, utilizando solución estéril 1 M de NaOH o HCl. Tratar como un alimento con alta carga microbiana.

**TABLA C. Pre-enriquecimiento de la muestra según el tipo de producto**  
**(Continuación)**

Producto	Medio de enriquecimiento	Preparación
Pulpa de mamey	Caldo de pre-enriquecimiento universal.	<p>En el caso que la muestra esté congelada, debe descongelarla para obtener la porción analítica. Descongelar por debajo de 45 °C durante un tiempo máximo de 15 minutos con agitación continua en un baño termostático; alternativamente, descongelar a temperatura de 2 °C a 5 °C durante un tiempo menor a 18 h.</p> <p>Pesar asépticamente 25 g de muestra, añadir 225 mL de caldo de pre-enriquecimiento universal, y mezclar por rotación. Ajustar bien la tapa y dejar a temperatura ambiente. No ajustar pH. Mezclar bien y aflojar la tapa ligeramente antes de incubar (tratar como un alimento de baja carga microbiana).</p> <p>Cuando se sospeche contaminación de la muestra con <i>Salmonella</i> Tiphy, proceder como se describió anteriormente, utilizando caldo de pre-enriquecimiento universal sin citrato de amonio férrico.</p>
Vegetales de hojas verdes, hierbas y brotes (espinaca, lechuga iceberg, lechuga romana, mezcla de primavera, albahaca, cilantro, eneldo, perejil rizado, culantro, perejil italiano, berro, alfalfa, frijol mungo, trébol, rábano y brotes de brócoli)	Caldo de pre-enriquecimiento universal.	<p>Pesar asépticamente 25 g de muestra, añadir 225 mL de caldo de pre-enriquecimiento universal y dejar sumergir la muestra sin ningún tipo de homogeneización.</p>
Repollo	Agua peptonada tamponada modificada.	<p>Pesar asépticamente 25 g de muestra, añadir 225 mL de agua peptonada tamponada modificada y dejar sumergir la muestra sin ningún tipo de homogeneización.</p>
Otros (no incluidos en las categorías anteriores)	Agua peptonada tamponada.	<p>Pesar asépticamente 25 g de muestra, añadir 225 mL de agua peptonada tamponada y mezclar bien. Dejar reposar durante 60 min <math>\pm</math> 5 min a temperatura ambiente.</p> <p>Mezclar bien por rotación y medir el pH con una tira. Ajustar el pH a <math>6,8 \pm 0,2</math>; si es necesario, utilizando solución estéril 1 M de NaOH o HCl. Mezclar bien y aflojar la tapa antes de incubar.</p>

[FUENTE: Elaboración propia del Subcomité Técnico de Normalización SC3 Microbiología de los alimentos adscrito al Comité Técnico de Normalización CT10  
 Productos Alimenticios a partir de Food and Drug Administration-BAM Chapter 5].

**ANEXO D (normativo)**  
**Temperatura y tiempo de incubación de los medios de enriquecimiento <sup>(3)</sup>**

**D.1. Alimentos con alta carga microbiana**

Incubar el caldo Rappaport Vassiliadis (RV) a una temperatura de  $(42 \pm 0,2)$  °C y el caldo tetratiónato (TT) a una temperatura de  $(43 \pm 0,2)$  °C por un periodo de tiempo de  $(24 \pm 2)$  h en baño de agua circulante, controlado termostáticamente.

**D.2. Alimentos con baja carga microbiana**

**D.2.1.** Incubar el caldo Rappaport Vassiliadis (RV) a una temperatura de  $(42 \pm 0,2)$  °C por un periodo de tiempo de  $(24 \pm 2)$  h en baño de agua circulante, controlado termostáticamente.

**D.2.2.** Incubar el caldo tetratiónato (TT) a una temperatura de  $(35 \pm 2)$  °C por un periodo de tiempo de  $(24 \pm 2)$  h.

PROYECTO DE NORMA

**ANEXO E (normativo)**  
**Reacciones típicas para *Salmonella* spp. en los medios diferenciales <sup>(4)</sup>**

**E.1. Agar bismuto sulfito (BS)**

Colonias planas, marrones, grises o negras con o sin brillo metálico, al principio el medio que rodea la colonia generalmente es marrón, cambiando a negro de acuerdo al tiempo de incubación produciéndose al efecto halo.

**E.2. Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)**

Colonias rosadas con o sin centro negro, algunas pueden presentar centro negro grande o pueden ser completamente negras.

**E.3. Agar Hektoen entérico (HE)**

Colonias azul verdosas o azules con o sin centro negro, algunas pueden presentar centro negro grande o pueden ser completamente negras.

**E.4. Agar Mac Conkey**

Colonias transparentes e incoloras, algunas veces con centro negro.

**E.5. Características de las colonias atípicas en los medios diferenciales**

**E.5.1.** Agar HE y XLD: colonias amarillas con o sin centro negro.

**E.5.2.** Agar BS: colonias verdes con o sin oscurecimiento alrededor del medio.

**ANEXO F (Normativo)**  
**Reacciones típicas para *Salmonella* spp. en las pruebas bioquímicas preliminares<sup>(5)</sup>**

**F.1. Agar triple azúcar hierro (TSI)**

Los cultivos típicos de *Salmonella* spp. producen reacción alcalina en el bisel, color rojo (no fermenta la lactosa y/o sacarosa) y taco de color amarillo (reacción ácida por fermentación de la glucosa) con o sin producción de sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) que se manifiesta por ennegrecimiento total o parcial del agar. Algunas cepas de *Salmonella* spp. pueden fermentar la lactosa y/o sacarosa y producir acidez (color amarillo) tanto en el taco como en el bisel.

**F.2. Agar lisina hierro (LIA)**

Los cultivos típicos de *Salmonella* spp. producen reacción alcalina en el bisel de color púrpura (descarboxilación de la lisina). En este medio también puede observarse ennegrecimiento total o parcial por la producción de  $H_2S$ . Color amarillo en el taco: reacción negativa. Las cepas de *Salmonella* fermentadoras de lactosa y/o sacarosa darán reacciones típicas en el agar lisina hierro ya que este medio no contiene estos azúcares. Hay cepas de *Salmonella* spp. que no descarboxilan la lisina y debido a esto muestran un taco amarillo y bisel púrpura en el medio agar lisina hierro. Sin embargo, estas cepas presentan reacciones típicas de *Salmonella* spp. en TSI.

**F.3. Interpretación de resultados negativos**

Los cultivos que den un taco ácido (amarillo) en LIA y un bisel y taco ácido (amarillo) en TSI, se descartan como no *Salmonella* spp. También se deben descartar cepas que resulten en taco alcalino en LIA y sin cambios en taco y bisel para TSI.

**ANEXO G (normativo)**  
**Reacciones típicas para *Salmonella* spp. en las pruebas bioquímicas confirmatorias<sup>(6)</sup>**

**G.1. Producción de ureasa**

**G.1.1.** Inocular una pequeña cantidad del crecimiento en agar TSI en el caldo urea. Dado que ocasionalmente, tubos sin inocular de caldo urea pueden tornarse morado-rojizo (positivo) incluir un tubo sin inocular como control. Incubar por un periodo de tiempo de (24 ± 2) h a una temperatura de 35 °C.

**G.1.2.** Observar la reacción después del período de incubación: los cultivos que producen amoniaco a partir de la urea (reacción positiva) alcalinizan el medio, reacción que se manifiesta por un viraje del indicador a color rojo-morado. El caldo urea incubado sin inocular debe conservar el color original del medio. *Salmonella* spp. produce una reacción negativa a esta prueba.

**G.2. Caldo lisina descarboxilasa**

**G.2.1.** Realizar la prueba si el ensayo en agar LIA no fue satisfactorio (si el ensayo en agar LIA fue satisfactorio no se debe realizar esta prueba).

**G.2.2.** Utilizar caldo lisina descarboxilasa en caso de resultar dudosa la determinación de descarboxilación de la lisina en agar LIA.

**G.2.3.** Inocular una pequeña cantidad del crecimiento en agar TSI en el caldo lisina descarboxilasa. Tapar fuertemente e incubar a 35 °C por (48 ± 2) h. Observar a las 24 h y re-incubar en caso de ser necesario.

**G.2.4.** Verificar la reacción alcalina (positiva) que produce la *Salmonella* spp., lo que se evidencia por un color púrpura en el medio. La reacción negativa se evidencia por un color amarillo en el medio.

**G.2.5.** Observar si el medio se decolora, no es púrpura ni amarillo, agregar unas gotas de púrpura de bromocresol al 0,2 % y leer nuevamente.

**G.3. Caldo dulcitol rojo de fenol o caldo base púrpura con 0,5 % dulcitol**

**G.3.1.** Inocular una pequeña cantidad del crecimiento en agar TSI, en el caldo dulcitol rojo de fenol o caldo base púrpura con 0,5 % dulcitol, dejar floja la tapa e incubar a 35 °C por un periodo de tiempo de (48 ± 2) h. Observar a las 24 h y re-incubar si es necesario.

**G.3.2.** Verificar las cepas de *Salmonella* spp. positivas a esta prueba, que se evidencia por la formación de gas en el tubo de fermentación interna y pH ácido, color amarillo del medio.

**G.3.3.** Verificar la reacción negativa, indicada por la ausencia de gas en el tubo de fermentación interno y el medio mantiene el color rojo, con rojo de fenol como indicador o púrpura con púrpura de bromocresol como indicador.

**G.4. Caldo Triptofano/Caldo malonato/Caldo KCN**

**G.4.1.** Inocular el caldo con una pequeña cantidad del crecimiento en agar TSI, incubar a 35 °C por un periodo de tiempo de (24 ± 2) h.

**G.4.2.** Transferir 5 mL del cultivo de 24 h a un tubo de ensayo estéril y añadir (0,2 – 0,3) mL de reactivo de Kovac's. Cuando no se observa cambio de color. *Salmonella* spp. da reacción negativa a esta prueba. Algunas cepas de *Salmonella* spp. pueden producir indol a partir de caldo triptofano.

**G.4.3.** Transferir con un asa de 3 mm, una asada del cultivo en caldo triptonado a caldo malonato. Incubar a 35 °C por (48 ± 2) h, pero observar el cultivo después de las 24 h para ver si hay cambio de color del indicador azul de bromotimol de verde a azul. La mayoría de *Salmonella* spp. no utilizan el malonato, por lo tanto, no se observa cambio de color en el medio. *Salmonella enterica* subespecie *arizona* es positiva a esta prueba. Incluir un tubo sin inocular como control.

**G.4.4.** Transferir con un asa de 3 mm, una asada del cultivo en caldo triptonado a caldo KCN. Calentar el borde del tubo para que se forme un buen sello cuando el tubo se tape con el tapón de corcho cubierto con parafina. Incubar por un periodo de tiempo de (48 ± 2) h a una temperatura de 35 °C, pero examinar después de 24 h. Interpretar el crecimiento (indicado como turbidez) como positivo. La mayor parte de las especies de *Salmonella* no crecen en este medio, indicado por la ausencia de turbidez.

PROYECTO DE NOKIMA

## ANEXO H (Normativo)

### Prueba serológica somática polivalente de grupo O y ensayo serológico polivalente flagelar H<sup>(6)</sup>

#### H.1. Prueba serológica somática polivalente de grupo O

**H.1.1.** Realizar la prueba con cultivos patrones de *Salmonella* spp.

**H.1.2.** Seguir el siguiente procedimiento:

**H.1.2.1.** Demarcar con un lápiz graso, en una lámina porta objeto limpia, dos secciones de 1 cm x 2 cm. Realizar en una sección una suspensión mezclando una asada de un cultivo de 24 h a 48 h en agar TSI o agar base triptona sangre (sin sangre) con una gota de antisuero polivalente somático (O) y en la otra sección con una gota de solución salina.

**H.1.2.2.** Rotar la lámina durante un período de tiempo que oscile entre 30 s y 60 s, observar el resultado sobre fondo oscuro, preferiblemente usando un espejo cóncavo, y anotar los resultados de la siguiente manera:

**H.1.2.1.1.** Positivo: cuando solo se produce aglutinación en la suspensión cultivo — suero polivalente. Cualquier grado de aglutinación se considera positivo.

**H.1.2.1.2.** Negativo: cuando no se produce aglutinación en ninguna de las dos suspensiones.

**H.1.2.1.3.** No especifica: cuando se produce aglutinación en ambas suspensiones (cepas autoaglutinables (ver I.1.3.). Enviar la cepa a un laboratorio de referencia.

**H.1.2.4.** Seguir las instrucciones del fabricante para el uso del antisuero somático polivalente O.

#### H.2. Tratamiento de las cepas autoaglutinables

Transferir una asada del cultivo a partir del medio TSI o agar nutritivo a caldo cerebro corazón o caldo tripticasa soya. Incubar a 35 °C por (24 ± 2) h y luego proceder de acuerdo con H.1. Enviar a un centro de referencia para una confirmación definitiva.

#### H.3. Prueba serológica somática de grupo O

**H.3.1.** Evaluar de acuerdo con H.1. utilizando antisueros somáticos (O) individuales, incluyendo Vi, si se encuentra disponible, en lugar de los antisueros somáticos polivalentes.

**H.3.2.** Registrar los cultivos en los que se obtenga aglutinación positiva con antisueros somáticos (O) individuales como positivos para ese grupo.

**H.3.3.** Registrar los cultivos que no reaccionen con los antisueros somáticos (O) como negativos para ese grupo.

#### H.4. Ensayo serológico polivalente flagelar H

**H.4.1.** Inocular una pequeña cantidad del crecimiento en agar TSI que dio negativa la prueba de producción de ureasa.

**H.4.2.** Seguir el siguiente procedimiento:

<sup>6)</sup> Tomado del Food and Drug Administration- BAM Chapter 5, 2023 pág. 22 a 27.  
COVENIN 1291-1:2025

**H.4.2.1.** Incubar a una temperatura de 35 °C por un periodo de tiempo entre 4 h a 6 h en el caldo infusión cerebro corazón (BHI) (para realizar el ensayo el mismo día) o incubar a una temperatura de 35 °C por un tiempo 24 h ± 2 h en caldo triptosa-tripticasa soya (para realizar el ensayo el día siguiente).

**H.4.2.2.** Añadir 2,5 mL de solución salina fisiológica formalizada a 5 mL de cualquiera de los dos caldos anteriores.

**H.4.2.3.** Seleccionar dos cultivos formalizados y ensayar con antisuero polivalente flagelar H. Colocar 0,5 mL del antisuero polivalente flagelar H diluido de acuerdo a las instrucciones del fabricante en tubos de ensayo serológicos de 10 mm x 75 mm o 13 mm x 100 mm. Añadir 0,5 mL del cultivo formalizado.

**H.4.2.4.** Realizar un control mezclando 0,5 mL de solución salina fisiológica formalizada con 0,5 mL de antígeno formalizado. Incubar la prueba y el control a una temperatura entre 48 °C a 50 °C en baño de agua, observar a intervalos de tiempo 15 min, leer el resultado final en 1 hora y según la reacción se debe:

**H.4.2.4.1.** Reacción positiva: aglutinación en la muestra y no aglutinación en el control.

**H.4.2.4.2.** Reacción negativa: no aglutinación ni en la muestra ni en el control.

**H.4.2.4.3.** Reacción no específica: aglutinación en la muestra y en el control. Enviar a un centro de referencia.

**H.4.2.4.4.** Continuar con las pruebas bioquímicas adicionales si la prueba del antígeno flagelar (H) es negativa pero el cultivo es ureasa negativo.

## **H.5. Tratamiento de los cultivos que dan la prueba flagelar H negativa**

**H.5.1.** Si, las reacciones bioquímicas de los cultivos flagelares H negativo evidencian que es una *Salmonella* spp., pero presenta un resultado negativo a la prueba flagelar H, esto indica que puede ser el resultado de organismos no móviles o que el antígeno flagelar no está bien desarrollado.

**H.5.2.** En caso de presentar un resultado negativo a la prueba flagelar H proceder de la siguiente manera:

**H.5.2.1.** Inocular por punción a 2 mm a 3 mm de profundidad pequeñas cantidades del crecimiento en biseles de agar TSI, en el centro de una placa que contiene el medio movilidad. No tocar el fondo de la placa. ni inocular en cualquier otra porción del agar.

**H.5.2.2.** Incubar a una temperatura de 35 °C por un periodo de tiempo de 24 h ± 2 h. Si el organismo ha migrado 40 mm o más, transferir con un asa de 3 mm el crecimiento que migró más lejos con respecto al punto de siembra, a caldo BHI o caldo tripticasa soya y repetir la prueba flagelar H de acuerdo con H.4.1. hasta H.4.3.

**H.5.2.3.** Revisar los cultivos pasadas las primeras 24 h ± 2 h, si los cultivos no son móviles, incubar la placa por 24 h adicionales a la misma temperatura, si aún no son móviles, incubar a una temperatura de 25 °C hasta 5 días.

**ANEXO I (Normativo)**  
**Pruebas bioquímicas adicionales<sup>(6)</sup>**

**I.1. Caldo lactosa rojo de fenol o caldo lactosa púrpura**

**I.1.1.** Inocular el caldo seleccionado, con una pequeña cantidad del crecimiento desde el agar TSI (ver 5.5.4.1.). Incubar a una temperatura de 35 °C durante un período de 24 h ± 2 h; si no se observa reacción, incubar durante 24 h adicionales.

**I.1.2.** Leer e interpretar resultados:

**I.1.2.1.** Reacción positiva: ácida, lo que se evidencia por desarrollo de color amarillo con o sin formación de gas en el tubo de fermentación interno (tubo Durham).

**I.1.2.2.** Reacción negativa: alcalina, por lo que se mantiene color rojo o púrpura en el medio. La mayoría de *Salmonella* spp. dan resultados negativos en esta prueba.

**I.1.3.** Descartar como no *Salmonella* cultivos que den una reacción positiva en lactosa, excepto aquellos cultivos en los que se obtenga cuña ácida en TSI y reacciones positivas en LIA o cultivos que den reacción positiva en caldo malonato. Realizar ensayos adicionales para determinar si se trata de *Salmonella* entérica subespecie *arizona*ae.

**I.2. Caldo sacarosa rojo de fenol o caldo sacarosa púrpura**

**I.2.1.** Seguir el procedimiento determinado en I.1.

**I.2.2.** Leer e interpretar resultados:

**I.2.2.1.** Reacción positiva: ácida, lo que se evidencia por desarrollo de color amarillo con o sin formación de gas en el tubo de fermentación interno (tubo Durham).

**I.2.2.2.** Reacción negativa: color rojo o púrpura en el medio. La mayoría de las especies de *Salmonella* spp. dan resultados negativos en esta prueba.

**I.2.3.** Descartar como no *Salmonella* cultivos que den una reacción positiva de sacarosa, excepto aquellos cultivos en los que se obtenga cuña ácida en TSI y reacciones positivas en LIA.

**I.3. Agar citrato de Simmons**

**I.3.1.** Inocular en agar citrato por punción con el taco y por estría en la cuña, con una pequeña cantidad del crecimiento desde el agar TSI (ver 5.5.4.1.). Incubar a 35 °C durante 96 h.

**I.3.2.** Leer e interpretar resultados:

**I.3.2.1.** Reacción positiva: Presencia de crecimiento, casi siempre acompañado por cambio de color de verde a azul. La mayoría de *Salmonella* spp. son citrato positivo.

**I.3.2.2.** Reacción negativa: Ausencia o poco crecimiento, no se observa cambio de color.

#### **I.4. Caldo MR-VP**

**I.4.1.** Inocular el medio MR-VP, con una pequeña cantidad del crecimiento desde el agar TSI (ver 5.5.4.1.). Incubar por un periodo de tiempo de  $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$  a una temperatura de  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**I.4.2.** Realizar la prueba de Voges-Proskauer (VP) a temperatura ambiente de la siguiente manera:

**I.4.2.1.** Transferir 1 mL del cultivo de 48 h a un tubo de ensayo e incubar el resto del medio MR-VP por 48 h adicionales a una temperatura de  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Añadir 0,6 mL de  $\alpha$ -naftol y agitar bien. Añadir 0,2 mL de una solución de KOH al 40 % y agitar. Para intensificar y acelerar la reacción, añadir algunos cristales de creatina. Esperar 4 horas.

**I.4.2.2.** Leer e interpretar los resultados:

**I.4.2.2.1.** Reacción positiva: desarrollo de un color rosado a rojo rubí a través del caldo

**I.4.2.2.2.** Reacción negativa: indicado por la ausencia de desarrollo de color rosado-rojo. La mayor parte de los cultivos de *Salmonella* son VP negativo.

**I.4.3.** Realizar la prueba rojo metilo:

**I.4.3.1.** Transferir 5 mL de caldo MR-VP incubado por 96 h. Añadir entre 5 gotas a 6 gotas de indicador de rojo de metilo a. Leer los resultados inmediatamente.

**I.4.3.2.** Interpretar los resultados:

**I.4.3.2.1.** Reacción positiva: desarrollo de un color rojo difuso en el medio. La mayor parte de las especies de *Salmonella* dan un resultado positivo en esta prueba.

**I.4.3.2.2.** Reacción negativa: desarrollo de un color amarillo.

**I.4.3.2.3.** Descartar como no *Salmonella*, aquellos cultivos que den un resultado positivo en las pruebas de KCN y VP y un resultado negativo de la prueba de rojo de metilo.

**ANEXO J (Normativo)**  
**Reacciones típicas de *Salmonella* spp.**

**TABLA J.1. Reacciones bioquímicas y serológicas de *Salmonella* spp.**

Prueba bioquímica	Resultado		Reacciones típicas de <i>Salmonella</i> spp. <sup>a</sup>
	Positivo	Negativo	
Glucosa (TSI)	Taco amarillo	Taco rojo	+
Lisina descarboxilasa (LIA)	Taco púrpura	Taco amarillo	+
H <sub>2</sub> S (TSI y LIA)	Ennegrecimiento	No ennegrecimiento	+
Ureasa	Caldo rojo púrpura	Sin cambio de color	-
Caldo lisina descarboxilasa	Color púrpura	Color amarillo	+
Caldo dulcitol rojo de fenol	Color amarillo y/o gas	No gas, no se observa cambio de color	+
Malonato	Color azul	No se observa cambio de color	- <sup>c</sup>
Indol	Color rojo en la superficie	Color amarillo en la superficie	-
Caldo KCN	Crecimiento	Sin crecimiento	-
Ensayo polivalente flagelar (H)	Aglutinación	No aglutinación	+
Antisuero polivalente somático (O)	Aglutinación	No aglutinación	+
Caldo lactosa rojo de fenol	Color amarillo y/o gas	No gas, no se observa cambio de color	- <sup>c</sup>
Caldo sacarosa rojo de fenol	Color amarillo y/o gas	No gas, no se observa cambio de color	-
Citrato de Simmons	Crecimiento, color azul	No crecimiento, no cambio de color	V <sup>d</sup>
Voges-Proskauer	Color rosado a rojo	No se observa cambio de color	-
Rojo de metilo	Color rojo difuso	Color amarillo difuso	+

<sup>a</sup> +: 90 % o más en uno o dos días, -: 90 % o más en uno o dos días.

<sup>b</sup> la mayoría de *Salmonella enterica* subespecie *arizona* son negativos.

<sup>c</sup> la mayoría de *Salmonella enterica* subespecie *arizona* son positivos.

<sup>d</sup> la variable.

[FUENTE: Elaboración propia del Subcomité Técnico de Normalización SC3 Microbiología de los Alimentos adscrito al Comité Técnico de Normalización CT10 Productos Alimenticios a partir de Food and Drug Administration-BAM Chapter 5].

**TABLA J.2. Reacciones bioquímicas y serológicas típicas y no típicas de *Salmonella* spp.**

Reacciones Bioquímicas	Reacciones Serológicas	Interpretación
Típicas	+	Presencia de <i>Salmonella</i> spp.
Típicas	-	Respuesta dudosa, enviar la cepa a un centro especializado para su identificación
Típicas o no típicas	Cepa autoaglutinable	
No típicas	-	Ausencia de <i>Salmonella</i> spp.

[FUENTE: Elaboración propia del Subcomité Técnico de Normalización SC3 Microbiología de los Alimentos adscrito al Comité Técnico de Normalización CT10 Productos Alimenticios a partir de Food and Drug Administration-BAM Chapter 5].

**TABLA J.3. Criterios para clasificar los cultivos como no-*Salmonella* spp.**

Ensayo o sustrato	Resultado
Ureasa	Positivo (color púrpura)
Indol	Positivo (color rojo en la superficie)
Prueba polivalente flagelar (H)	Negativo (no aglutinación)
Lisina descarboxilasa	Negativo (color amarillo)
Caldo KCN	Positivo (crecimiento)
Caldo lactosa rojo de fenol	Positivo (color amarillo y/o gas) <sup>a,b</sup>
Caldo sacaraosa rojo de fenol	Positivo (color amarillo y/o gas) <sup>a</sup>
Caldo KCN	Positivo (crecimiento)
Voges Proskauer	Positivo (color rosado-rojo)
Rojo de metilo	

<sup>a</sup> Cultivos positivos en caldo malonato. Determinar si son *Salmonella enterica* subespecie *arizona*.

<sup>b</sup> No descartar los cultivos positivos si se corresponden con LIA típico de *Salmonella* spp. realizar ensayos adicionales para determinar si se trata de *Salmonella* spp.

[FUENTE: Elaboración propia del Subcomité Técnico de Normalización SC3 Microbiología de los Alimentos adscrito al Comité Técnico de Normalización CT10 Productos Alimenticios a partir de Food and Drug Administration-BAM Chapter 5].