

---

**CONSEJO INTERESTATAL DE ESTANDARIZACIÓN, METROLOGÍA Y  
CERTIFICACIÓN  
(ISC)**

---

**ESTÁNDAR  
INTERESTATAL**

**GOST  
31746-  
2012  
(ISO 6888-1:1999,  
ISO 6888-2:1999,  
ISO 6888-3:2003)**

---

**ALIMENTOS**

**Métodos de detección y determinación del número  
de estafilococos coagulasa positivos  
y Staphylococcus aureus**

**(ISO 6888-1:1999, MOD  
(ISO 6888-2:1999, MOD)  
(ISO 6888-3:2003, MOD)**

**Edición oficial**

**Moscú  
Standartinform  
2013**

**Preámbulo**

Los objetivos, principios generales y el orden principal para la celebración de los trabajos de estandarización interestatal están establecidos por el GOST 1.0-92 “Sistema interestatal de estandarización. Disposiciones principales” y el GOST 1.2-2009 “Sistema interestatal de estandarización. Estándares interestatales, reglas y recomendaciones en cuanto a la estandarización interestatal”. Reglas de elaboración, aprobación, aplicación, actualización y anulación”.

**Datos sobre el estándar**

1. ELABORADO por el Ente Estatal Científico “Instituto de Investigaciones Científicas de Rusia de la Industria de los Productos en Conserva y Secado de Verduras” (GNU “VNIICOP”), con base a traducciones auténticas al idioma ruso de los estándares internacionales indicados en el apartado 4.

2. PUESTO A ESTUDIO por la Agencia Federal de Reglamentación Técnica y Metrología.

3. ADOPTADO por el Consejo Interestatal de Estandarización, Metrología y Certificación (Acta № 42 del 15 de noviembre de 2012).

A favor de la aprobación votaron:

Nombre breve del país, de acuerdo a su código internacional (ISO 3166) 004 - 97	Código del país, de acuerdo a la codificación internacional (ISO 3166) 004 - 97	Nombre abreviado del ente nacional de estandarización
Belarús	BY	Gosstandart de la República de Belarús
Kirguistán	KG	Kirguizstandart
Federación de Rusia	RU	Rosstandart
Ucrania	UA	Gospotrebstandart de Ucrania
Kazajistán	KZ	Gosstandart de la República de Kazajistán
Tayikistán	TJ	Tayikistandart

4. El presente estándar ha sido modificado para estar conforme con los siguientes estándares internacionales:

- ISO 6888-1:1999 “Microbiología de alimentos, forrajes y piensos para animales. Métodos horizontales de recuento de los estafilococos coagulasa positivos (*Staphylococcus aureus* y otros tipos). Parte 1. Método con la aplicación del medio Baird-Parker Agar.

- ISO 6888-2:1999 “Microbiología de alimentos, forrajes y piensos para animales. Métodos horizontales de recuento de los estafilococos coagulasa positivos (*Staphylococcus aureus* y otros tipos). Parte 2. Método con la aplicación del medio agar, de plasma de conejo y fibrinógeno bovino.

- ISO 6888-3:2003 “Microbiología de alimentos, forrajes y piensos para animales. Método horizontal de recuento de los estafilococos coagulasa positivos (*Staphylococcus aureus* y otros tipos). Parte 3. Detección y método del número más probable (método para números pequeños) en la parte de los alimentos.

Asimismo, las disposiciones y requerimientos adicionales incluidos en el texto del estándar con el fin de considerar las necesidades de la economía nacional y los estados arriba indicados, así como particularidades de la estandarización interestatal, fueron resaltados en el texto del estándar con ayuda de letra itálica.

El nombre del presente estándar fue modificado en comparación con los nombres de los estándares internacionales indicados, con el fin de ponerlos de conformidad con el GOST 1.5 (subsección 3.6).

La comparación entre la estructura del presente estándar con la estructura de los estándares internacionales está indicada en el anexo adicional DA.

Nivel de conformidad – modificado (MOD).

El estándar ha sido elaborado con la aplicación del GOST P 52815-2007.

## II

### **GOST 31746-2012**

5. Por orden de la Agencia Federal de Reglamentación Técnica y Metrología del 29 de noviembre de 2012 № 1773-CT, el estándar interestatal GOST 31746-2012 entró en vigor en calidad de estándar nacional de la Federación de Rusia a partir del 1 de julio de 2013.

#### 6 ENTRÓ EN VIGOR POR PRIMERA VEZ

*La información sobre la entrada en vigor (cese de vigencia) del presente estándar se publica en un indicador informativo editado mensualmente “Estándares nacionales”.*

*La información sobre las modificaciones al presente estándar se publicará en el indicador anualmente editado “Estándares nacionales”, y los textos de modificaciones y enmiendas en el indicador de información editado de forma mensual “Estándares nacionales”. En caso de que el presente estándar sea revisado o anulado, la información respectiva será publicada en el indicador mensualmente editado “Estándares nacionales”.*

© Standartinform, 2013

En la Federación de Rusia el presente estándar no podrá ser reproducido de forma completa o parcial, editado y distribuido en calidad de una edición oficial, sin la autorización de la Agencia Federal de Reglamentación Técnica y Metrología.

## III

## Contenido

1 Campo de aplicación .....	5
2 Referencia a las normas .....	5
3 Términos y definiciones .....	6
4 Métodos de detección y determinación del número de estafilococos coagulasa positivos y los <i>S. aureus</i> .....	6
4.1 Método de detección y método del número más probable – determinación del número de estafilococos coagulasa positivos y los <i>S. aureus</i> con previo enriquecimiento.....	6
4.2 Método de detección de los estafilococos coagulasa positivos y los <i>S. aureus</i> .....	6
4.2 Métodos de determinación del número de los estafilococos coagulasa positivos y los <i>S. aureus</i> por medio del cultivo sobre (en) medios selectivos y de diagnóstico agarizados.....	8
5 Caldos de cultivo, disoluciones de agentes químicos, emulsiones y sangre defibrinada .....	8
6 Equipos, vajilla, material, agentes químicos .....	15
7 Muestreo y preparación de las pruebas .....	16
8 Realización de las pruebas.....	16
8.1. Método de detección de los estafilococos coagulasa positivos .....	16
8.2. Método del número más probable – determinación del número de los estafilococos coagulasa positivos .....	19
8.2. Método para determinar del número de los estafilococos coagulasa positivos por medio de su cultivo en caldo agarizado.....	19
8.4. Método para determinar del número de los estafilococos coagulasa positivos por medio de su cultivo en caldo agarizado.....	20
9 Confirmación de la pertenencia de los microorganismos detectados a los estafilococos coagulasa positivos .....	21
9.1. Tinción de Gram.....	21
9.2. Determinación de la catalasa .....	21
9.3. Determinación de la capacidad de coagular el plasma de la sangre de conejo .....	22
9.4. Evaluación de los resultados de confirmación de la pertenencia de las colonias peculiares a los estafilococos coagulasa positivos.....	23
9.5. Confirmación de la pertenencia de los estafilococos coagulasa positivos detectados a los <i>S. aureus</i> .....	23
9.6. Detección de la capacidad del <i>S. aureus</i> de formar nucleasa termoestable y presencia en la misma de actividad hemolítica .....	24
9.7. Evaluación de los resultados de confirmación de la pertenencia de los estafilococos coagulasa positivos a los <i>S. aureus</i> .....	24
10 Procesamiento de los resultados .....	25
11 Acta de investigaciones .....	28
Anexo A.....	29
(a título informativo) .....	29
Diferenciación de los tipos y subtipos coagulasa positivos de los estafilococos, de acuerdo a dos indicios, la formación de la acetoína y la fermentación de la maltosa en condiciones aerobias ...	29
Anexo DA.....	29
(a título informativo) .....	29
Comparación de la estructura del presente estándar con la estructura de los estándares internacionales que se hayan aplicado en el mismo .....	29

## ESTÁNDAR INTERESTATAL

## ALIMENTOS

**Métodos de detección y recuento del número  
de estafilococos coagulasa positivos  
y *Staphylococcus aureus***

Fecha de entrada en vigor: 01-07-2013

**1 Campo de aplicación**

El presente estándar se aplica a los alimentos, *a excepción de la leche y productos lácteos*, y establece los métodos de detección y recuento del número de estafilococos coagulasa positivos y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) con ayuda del cultivo: en un medio líquido selectivo (con enriquecimiento previo) y sobre (en) medios agar selectivos y de diagnóstico.

Se aceptará el uso de los medios cromogénicos para el recuento previo del número de estafilococos coagulasa positivos y *Staphylococcus aureus* en grasas y aceites.

El método para determinar el número más probable (NMP) de estafilococos coagulasa positivos y *S. aureus* por medio del cultivo en medio selectivo está destinado para los alimentos que contienen en 1 g de producto sólido menos de 150 o en 1 cm<sup>3</sup> de producto líquido menos de 15 unidades formadoras de colonias (UFC) de los estafilococos coagulasa positivos y *S. aureus*.

El método de recuento del número de estafilococos coagulasa positivos y *S. aureus* por medio del cultivo en medios agar selectivos y de diagnóstico está destinado para los alimentos que contienen en 1 g de producto sólido más de 1500 o en 1 cm<sup>3</sup> de producto líquido más de 150 unidades formadoras de colonias (UFC) de los estafilococos coagulasa positivos y *S. aureus*.

El método para el recuento del número de estafilococos coagulasa positivos y *S. aureus* por medio del cultivo en medio agar selectivo y de diagnóstico está destinado para los alimentos que contienen en 1 g de producto sólido más de 150 o en 1 cm<sup>3</sup> de producto líquido más de 15 unidades formadoras de colonias (UFC) de los estafilococos coagulasa positivos y *S. aureus*.

**2 Referencia a las normas**

En el presente estándar se hacen referencias normativas a los siguientes estándares:

*GOST 450 – 77 “Cloruro de calcio técnico. Condiciones técnicas”.*

*GOST 5962 – 67 “Alcohol etílico rectificado. Condiciones técnicas”.*

*GOST 6672 - 75 “Vidrios cubreobjetos para las micropreparaciones. Condiciones técnicas”.*

*GOST ISO 7218 – 2011 “Microbiología de alimentos, forrajes y piensos para animales. Requerimientos y recomendaciones generales para las investigaciones microbiológicas”.*

*GOST 9284 - 75 “Vidrios de objetos para las micropreparaciones. Condiciones técnicas”.*

*GOST 10444.1 – 84 “Conservas. Elaboración de soluciones de agentes químicos, pinturas, indicadores y medios alimenticios que se aplican en el análisis microbiológico”.*

*GOST 24104 – 2001 “Pesas de laboratorio. Requerimientos técnicos generales”.*

*GOST 24363 – 80 “Agentes químicos. Hidróxido de potasio. Condiciones técnicas”.*

*GOST 26668 – 85 “Alimentos y productos gustativos. Métodos de muestreo para análisis microbiológicos”.*

## GOST 31746 – 2012

*GOST 26669 – 85 “Alimentos y productos gustativos. Preparación de las pruebas para los análisis microbiológicos”.*

*GOST 26670-91 “Alimentos. Métodos de cultivo de los microorganismos”.*

*GOST 30425-97 “Conservas. Método de determinación de la esterilidad industrial”.*

Nota: Para usar el presente estándar, será oportuno verificar la acción de los estándares a los que se hacen referencias, de acuerdo al indicador “Estándares nacionales”, elaborado al 1 de enero del año en curso, y de conformidad con los indicadores informativos respectivos publicados el año en curso. En caso de que el estándar de referencia haya sido sustituido (modificado), al usar el presente estándar, será necesario guiarse por el estándar de sustitución (modificado). En caso de que el estándar de referencia sea anulado sin sustituirse, las disposiciones en las que se hace referencia al mismo se aplicarán en la parte que no tenga que ver con dicha referencia.

### 3 Términos y definiciones

En el presente estándar se aplican los siguientes términos junto con las definiciones respectivas.

**3.1 estafilococos coagulasa positivos:** *Se trata de microorganismos gram positivos, microorganismos catalasa positivos, los cuales forman colonias típicas y/o atípicas en un medio nutricional selectivo de diagnóstico y que emiten una reacción positiva a la coagulasa o específica para la plasma de sangre de conejos en el agar con plasma de conejo y fibrinógeno, realizándose el estudio con ayuda de los métodos indicados en el presente estándar.*

**3.2 Staphylococcus aureus (S. aureus):** *Se trata de estafilococos coagulasa positivos que forman la acetoina y producen la fermentación de la maltosa en condiciones aerobias, al determinarse dichas pruebas bioquímicas, de acuerdo a los métodos indicados en el presente estándar.*

**3.3 detección de los estafilococos coagulasa positivos y los S. aureus:** *Se trata de la detección de la presencia o ausencia de los estafilococos coagulasa positivos y los S. aureus en un peso determinado o volumen de producto usando los métodos indicados en el presente estándar.*

**3.4 recuento de los estafilococos coagulasa positivos y los S. aureus:** *Número de los estafilococos coagulasa positivos y los S. aureus que contiene 1 cm<sup>3</sup> o 1 g de producto, el cual se determina usando los métodos indicados en el presente estándar.*

### 4 Métodos de detección y recuento del número de estafilococos coagulasa positivos y los S. aureus

#### 4.1 Método de detección y método del número más probable – recuento del número de estafilococos coagulasa positivos y los S. aureus con previo enriquecimiento

Esencia de los métodos

El método de detección y método del número más probable que representa el recuento del número de los estafilococos coagulasa positivos y los *S. aureus* por medio del cultivo con enriquecimiento previo, están basados en la siembra de la muestra pesada del producto y (o) cultivos de la muestra pesada del producto en un medio selectivo líquido, incubación de los cultivos, resiembra del líquido cultural sobre la superficie de un medio agarizado selectivo y de diagnóstico, confirmación, de acuerdo a los indicios bioquímicos de la pertenencia de las colonias separadas típicas y (o) atípicas a los estafilococos coagulasa positivos y los *S. aureus*.

En el marco de la resiembra sobre un medio agarizado con plasma de conejo y fibrinógeno bovino, las colonias típicas que hayan crecido sin confirmarse sus indicios bioquímicos se considerarán estafilococos coagulasa positivos.

##### 4.1.1 Método de detección de los estafilococos coagulasa positivos y los *S. aureus*

4.1.1.1 Una determinada cantidad de producto líquido o una determinada cantidad de suspensión inicial, al usarse un producto de otra *consistencia*, se pone en un caldo líquido selectivo de cultivo.

Antes del cultivo las condiciones anaerobias dentro del caldo se crearán por medio de su hervor a una temperatura de  $(100\pm 1)^\circ\text{C}$  durante 15 minutos, la superposición de capas de agar o parafina en cada probeta después del cultivo, así como con ayuda de un procedimiento alternativo, la incubación de las probetas dentro de un reservorio o incubadora en condiciones anaerobias.

4.1.1.2 Las probetas con cultivos serán incubadas a una temperatura de  $37^\circ\text{C}$  durante 24-48 horas. La presencia supuesta de estafilococos coagulasa positivos en el caldo Giolitti-Cantoni se determinará por la reducción del telurito de potasio, y en *el caldo de glucosa o de sal, por la turbiedad del caldo*.

4.1.1.3 La superficie de uno de los caldos selectivos y de diagnóstico agarizados (agar Baird-Parker, *agar leche y sal, agar yema de huevo azídico, agar yema de huevo y sal azídico*

2

## GOST 31746 – 2012

agar con plasma de conejo y fibrinógeno bovino), se inocula de las probetas supuestamente positivas (ver. 4.1.1.4) después de transcurrir las 24 hs, y todas las probetas restantes después de transcurrir las 48 hs.

4.1.1.4 Las tazas de Petri con los cultivos se dejarán incubar a una temperatura de  $37^\circ\text{C}$  durante 24-48 hs.

La supuesta presencia de estafilococos coagulasa positivos se determinará por la reducción del telurito de potasio y la reacción de huevo y yema (actividad de la lecitinasa).

En el agar con plasma de conejo y fibrinógeno bovino después de la incubación, la presencia de estafilococos coagulasa positivos se detectará por las colonias típicas que demuestren reacción específica (fibrinógeno bovino/ plasma de conejo).

4.1.1.5 La confirmación de la pertenencia de las colonias típicas y (o) atípicas a los estafilococos coagulasa positivos se realizará por medio del estudio de la *relación entre los microorganismos detectados y la tinción de Gram, así como por medio de la detección de la presencia en los mismos de catalasa y coagulasa*.

*La confirmación de la pertenencia de los estafilococos coagulasa positivos y los S. aureus se llevará a cabo a través de la detección de la formación de la acetoina, detección de la fermentación en condiciones anaerobias de maltosa y, de ser necesario, detección de la nucleasa termoestable y la actividad hemolítica.*

4.1.1.6 Los resultados de la detección de los estafilococos coagulasa positivos y los *S. aureus* se expresarán de la siguiente forma: “detectados” o “no detectados” en  $x\text{ cm}^3$  o en  $x$  gramos de producto.

### **4.1.2 El método del número más probable, recuento del número de estafilococos coagulasa positivos y los *S. aureus***

4.1.2.1 Las muestras pesadas de producto y (o) serie de disoluciones del producto se introducen en un caldo de cultivo selectivo. *La incubación de los cultivos y confirmación de la presencia dentro de los mismos de estafilococos coagulasa positivos y los S. aureus son realizados, de acuerdo a los apartados 4.1.1.3-4.1.1.6.*

4.1.2.2 El número más probable de estafilococos coagulasa positivos y los *S. aureus* en  $1\text{ cm}^3$  o en 1 g de producto se determina para los cultivos confirmados, con el uso de un cuadro del número más probable, de acuerdo al GOST 26670.

## **4.2 Métodos de recuento del número de los estafilococos coagulasa positivos y los *S. aureus* por medio del cultivo sobre (en) medios selectivos y de diagnóstico agarizados**

Esencia de los métodos

Los métodos para el recuento del número de estafilococos coagulasa positivos y los *S. aureus* por medio del cultivo (en) medios selectivos y de diagnóstico agarizados están basados en la siembra de la muestra pesada del producto y/o cultivos de la muestra pesada del producto sobre (en) un medio selectivo y de diagnóstico agarizado, la incubación de los cultivos, el cálculo de las colonias separadas típicas y (o) atípicas, confirmación según los indicios bioquímicos de la pertenencia de las colonias a los estafilococos coagulasa positivos y los *S. aureus*.

4.2.1. Se realiza el cultivo de una cantidad determinada de producto líquido o cantidad determinada de suspensión inicial con el uso de producto de otra consistencia sobre (en) un medio selectivo y de diagnóstico agarizado en dos tazas Petri paralelas.

De forma similar, se realiza el cultivo de las diez disoluciones del producto investigado.

4.2.2 Los cultivos en las tazas Petri se dejan incubar a una temperatura de 37°C durante 24-48 horas.

4.2.3 El número de los estafilococos coagulasa positivos en 1 cm<sup>3</sup> o 1 g de producto se calcula por el número de las colonias típicas y/o atípicas que hayan crecido en las tazas Petri, cuya pertenencia a los estafilococos coagulasa positivos esté confirmada por medio de la *relación entre los microorganismos detectados y la tinción de Gram, determinación de presencia en los mismos de catalasa y coagulasa.*

En el marco del cultivo en (sobre) un medio agarizado con plasma de conejo y fibrinógeno bovino, serán determinadas únicamente las colonias típicas y sin confirmarse, de acuerdo a los indicios bioquímicos, éstas se considerarán estafilococos coagulasa positivos.

*El número de *S. aureus* en 1 cm<sup>3</sup> o 1 g de producto se calcula, partiendo del número de los estafilococos coagulasa positivos, cuya pertenencia a los *S. aureus* se confirma por medio de la formación de la acetoina, determinación de la fermentación en condiciones anaerobias de maltosa y, de ser necesario, la determinación de la maltosa termoestable y la actividad hemolítica.*

## **5 Caldos de cultivo, disoluciones de agentes químicos, emulsiones y sangre defibrinada**

*Las sustancias químicas utilizadas para la preparación de los caldos de cultivo, soluciones de agentes químicos y emulsiones, deberá ser de calidad analítica.*

## **GOST 31746 – 2012**

### **5.2 Medio agarizado Baird-Parker**

#### **5.1.1 Base del medio**

##### 5.1.1.1 Ingredientes:

hidrolizado fermentativo de caseína	10,0 g
extracto de levadura	1,0 g
extracto de carne	5,0 g
piruvato de sodio	10,0 g
L-glicina	12,0 g
cloruro de litio	5,0



agar de 12 a 22 g<sup>1)</sup>;  
agua 1000 cm<sup>3</sup>

### 5.1.1.2 Preparación

Con el calentamiento se disuelven en el agua *todos los componentes* o la base deshidratada. El pH se establece de forma para que después de la esterilización él alcance los (7,2±0,2) a una temperatura de 25°C.

Los medios se vierten en matraces de 100 cm<sup>3</sup> o frascos de respectivo volumen.

El medio se deja esterilizar en un autoclave a una temperatura de (121±1) °C durante 15 minutos.

### 5.1.2 Solución de telurito de potasio

#### 5.1.2.1 Composición:

telurito de potasio (K<sub>2</sub> TeO<sub>3</sub>) 1,0 g;  
agua 100 cm<sup>3</sup>

Nota: Es necesario revisar con anterioridad, si es que el telurito de potasio que está a disposición es apto para dicha prueba.

#### 5.1.2.2 Preparación

El telurito de potasio se disuelve por completo en el agua con un calentamiento mínimo.

La sustancia sólida deberá disolverse de forma fácil. En caso de que en el agua esté presente un sedimento blanco insoluble, dicho polvo no será utilizado.

La solución de telurito de potasio preparada será esterilizada por medio de su filtración a través de un filtro de membranas con un tamaño de los poros de 0,22 mkm.

La solución podrá guardarse durante no más de 1 mes a una temperatura de (3±2) °C.

En caso de que al almacenarse la solución se forme un sedimento blanco insoluble, dicha solución no será utilizada.

### 5.1.3 Emulsión de la yema de huevo (de una concentración aproximada de un 20%).

Los huevos frescos de gallina con cáscara dañada se lavan con cepillo usándose detergentes líquidos, se enjaguan con agua corriente, son desinfectados por medio de su sumersión por 30 segundos en alcohol etílico de un 70% (volumen/volumen) con un secado posterior al aire o, después de que la solución de alcohol chorree, los huevos se flambean en la llama de un soplete. Cumpliéndose las reglas asépticas, la cáscara del huevo se rompe y se separa la yema de la clara, y la yema se traslada de una mitad de la cáscara a la otra. La yema se pone en un matraz estéril y se le añade una cantidad cuádruple (por el volumen) de agua estéril. La mezcla obtenida se revierte minuciosamente, se deja a baño María a una temperatura de (47±1) °C durante 2 horas, y después se deja por 18-24 hs a una temperatura de (3±2) °C para formarse el sedimento.

Para su uso reúnen en condiciones asépticas en un matraz estéril el líquido que se forma sobre el sedimento. La emulsión preparada puede guardarse a una temperatura de (3±2) °C durante no más de 72 hs.

Se permite el uso de una emulsión de fabricación industrial lista para su uso. En dicho caso la emulsión se aplicará, de acuerdo a la instrucción del fabricante.

*Se permite preparar la emulsión de la yema, de acuerdo al GOST 10444.1.*

### 5.1.4 Solución de sulfametazina (sulfamezatina, sulfadimidina).

La solución se utiliza exclusivamente en caso de que haya sospecha de presencia en el producto investigado de bacterias del género Proteus o en caso de hacerse la prueba con productos fuertemente insemnados, por ejemplo, hechos de carne cruda:

#### 5.1.4.1 Composición:

sulfametazina 0,2 g;  
solución de hidróxido de sodio, con 10 cm<sup>3</sup>;  
(NaOH) = 0,1 mol/l  
agua 90 cm<sup>3</sup>.

#### 5.1.4.2 Preparación

La sulfametazina se disuelve en una solución de hidróxido de sodio. El volumen se consigue aumentar con agua hasta los 100 cm<sup>3</sup>.

Se esteriliza por medio de su filtración a través de un filtro de membranas con un tamaño de los poros de 0,22 mkm.

---

<sup>1)</sup> Dependiendo de la capacidad gelificante del agar.

4

## GOST 31746 – 2012

Se permite guardar la solución preparada durante no más de 1 mes a una temperatura de (3±2) °C.

### 5.1.2 Caldo de cultivo preparado

#### 5.1.5.1 Composición:

base del medio (ver 5.1.1)	100 cm <sup>3</sup> ;
solución de telurito de potasio (ver 5.1.2)	1,0 cm <sup>3</sup> ;
emulsión de yema de huevo (ver 5.1.3)	5,0 cm <sup>3</sup> ;
solución de sulfametazina (ver 5.1.4) (de ser necesario)	2,5 cm <sup>3</sup> .

#### 5.1.5.2 Preparación

Se derrite la base, después se deja enfriar hasta una temperatura de aproximadamente 47°C a baño María. En condiciones asépticas añaden dos otras soluciones y, de ser necesario, la solución de sulfametazina (ver 5.1.4). Previamente cada solución se calienta a baño María a una temperatura de 47°C, mezclándose minuciosamente el medio al añadirse la solución.

### 5.1.6 Preparación de las tazas de Petri con medio agarizado Baird-Parker

Una cantidad respectiva del medio preparado se vierte (ver 5.1.5) en las tazas estériles de Petri para obtenerse una capa de agar con un espesor de aproximadamente 4 mm, y se deja solidificarse. Las tazas preparadas pueden almacenarse hasta que se usen durante 24 horas a una temperatura de (3±2) °C.

Antes de usarse el medio en las tazas se seca en un armario de secado a una temperatura de 25 °C a 50 °C hasta que de la superficie del medio desaparezcan gotitas de humedad. Es preferible secar el medio con las tapas fuera y con la superficie para abajo.

### 5.2 Caldo a base de extracto del corazón y cerebro

producto de la hidrólisis fermentativa de los tejidos animales	10,0 g;
extracto deshidratado de cerebro de ternero	12,5 g;
extracto deshidratado de corazón de ternero	5,0 g;
glucosa	2,0 g;
cloruro de sodio	5,0 g;
fosfato disódico, sin agua (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2,5 g;
agua	1000 cm <sup>3</sup> .

#### 5.2.2 Preparación

Con el calentamiento se disuelven en el agua todos los componentes o la base deshidratada.

El pH se establece de forma para que después de la esterilización él alcance los (7,4±0,2) a una temperatura de 25°C.

El medio de cultivo se vierte en probetas de 5-10 cm<sup>3</sup>. El caldo se deja esterilizar a una temperatura de (121±1) °C durante 15 minutos.

### **5.3 Plasma de sangre de conejo**

*5.3.1 La sangre de conejo recién obtenida en condiciones asépticas se mezcla minuciosamente en una proporción de 4:1 con una solución estéril de citrato de sodio. La mezcla obtenida se centrifuga durante 15 minutos a una rotación de 3000 giros/minuto o se deja reposar en frío a una temperatura de (3±2) °C. Después el plasma se extrae con ayuda de una pipeta y lo disuelven en una proporción de 1 cm<sup>3</sup> de plasma en 4 cm<sup>3</sup> de solución fisiológica. El plasma disuelto se vierte en probetas estériles de 0,5 cm<sup>3</sup>.*

En caso de que en calidad de anticoagulante del plasma se hayan utilizado citratos de potasio o sodio, al plasma se le añade una solución de EDTA (ácido etilendiamintetraacético) hasta conseguirse una concentración del EDTA en el plasma de un 0,1%.

No se añade el EDTA a un plasma que contenga oxalato o heparina de EDTA.

Para preparar el agar con plasma de conejo o fibrinógeno bovino, al plasma se le añade la tripsina, a una proporción de 30 mg de tripsina por 30 cm<sup>3</sup> de plasma. El plasma se prepara directamente antes de su uso.

En caso de usarse un plasma preparado deshidratado, la restauración y uso de dicho plasma se realizan, de acuerdo al manual que se le anexa. El plasma se hace directamente antes de su uso.

La calidad del plasma se prueba con ayuda de las cepas coagulasa positivas y coagulasa negativas de los estafilococos.

### **5.3.2 Solución del citrato de sodio**

#### **5.3.2.1 Composición:**

citrato de sodio

5,0 g;

agua

100 cm<sup>3</sup>.

5

## **GOST 31746 – 2012**

### *5.3.2.2 Preparación*

*El citrato de sodio se vierte en un matraz y se disuelve en agua. La solución se hace llegar hasta la marca, se vierte en matraces o probetas y se deja esterilizar a una temperatura de (121±1) °C durante 20 minutos.*

### **5.4 Medio agarizado con plasma de conejo y fibrinógeno bovino**

Se debe considerar la experiencia de uso de los lotes preparados de los aditivos. Se recomienda que cada lote de solución de fibrinógeno bovino/plasma de conejo se someta a una prueba por medio de un control positivo y negativo.

#### **5.4.1 Base del medio**

La base del medio se prepara, de acuerdo al apartado 5.1. Sin embargo, antes de la esterilización el medio se vierte de a 90 cm<sup>3</sup> a matraces o frascos.

#### **5.4.2 Solución de fibrinógeno bovino**

fibrinógeno bovino

5-7 g<sup>1)</sup>;

agua estéril

100 cm<sup>3</sup>.

#### **5.4.2.2 Preparación**

Cumpléndose las reglas asépticas, el fibrinógeno bovino se disuelve en agua directamente antes de usarse.

#### **5.4.3 Plasma de conejo y solución inhibidora de tripsina**

##### **5.4.3.1 Composición:**

plasma de conejo con EDTA para

30 cm<sup>3</sup>;

coagulasa (plasma de coagulasa con EDTA)

inhibidor de tripsina

30 mg.

#### 5.4.3.2 Preparación

La solución se prepara cumpliéndose las reglas asépticas, los componentes se disuelven en el agua directamente antes de usarse.

En caso de usarse una solución de fibrinógeno bovino/plasma de conejo preparada, será necesario cumplir las instrucciones para preparar dicha solución y el medio preparado. Habrá que prestar especial atención a la temperatura de la base del medio. En caso de no observarse la temperatura, el medio puede perder su estado activo.

#### 5.4.4 Caldo preparado

##### 5.4.4.1 Composición:

base del medio (ver 5.4.1)

90 cm<sup>3</sup>;

solución de telurito de potasio (ver 5.1.2)

0,25 cm<sup>3</sup>;

solución de fibrinógeno bovino (ver 5.4.2)

7,5 cm<sup>3</sup>;

plasma de conejo y solución inhibidora de tripsina (ver 5.4.3)

2,5 cm<sup>3</sup>.

##### 5.4.4.2 Preparación

Se derrite la base del medio, después se deja enfriar hasta una temperatura de (47±1) °C a baño María. En condiciones asépticas se añaden tres soluciones que se calientan previamente hasta una temperatura de (47±1) °C a baño María. El medio se mezcla minuciosamente después de cada adición, de esta forma minimizando el efecto espuma.

El medio preparado se usa directamente después de su preparación, de esta forma, se evita la precipitación del plasma.

#### 5.5 Caldo modificado Giolitti-Cantoni

##### 5.5.1 Base del caldo

5.5.1.1 La composición del caldo modificado Giolitti-Cantoni se indica en el cuadro 1.

Cuadro 1

Nombre del ingrediente	Caldo de concentración doble	Caldo de concentración normal
Hidrolizado fermentativo de caseína	20,0 g	10,0 g
Extracto de carne	10,0 g	5,0 g
Extracto de levadura	10,0 g	5,0 g
Cloruro de litio	10,0 g	5,0 g
Mannit	40,0 g	20,0 g
Cloruro de sodio	10,0 g	5,0 g
Glicina	2,4 g	1,2 g
Piruvato de sodio	6,0 g	3,0 g
Monooleato de polioxietileno sorbitano (twin-80)	2,0 g	1,0 g
Agua	1000 cm <sup>3</sup>	1000 cm <sup>3</sup>

<sup>1)</sup> Dependiendo de la pureza del fibrinógeno bovino.

### 5.5.1.2 Preparación

Con el calentamiento y removimiento se disuelven los ingredientes o la base deshidratada en el agua. Lo obtenido se enfría hasta la temperatura del ambiente y el pH se establece de forma para que después de la esterilización él alcance los  $(6,9\pm 0,2)$  a una temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ .

El medio se vierte en cantidad respectiva en probetas de volumen respectivo –  $16\times 160$  mm para caldo de concentración normal y  $20\times 200$  mm – para caldo de concentración doble.

El medio se deja esterilizar en un autoclave a una temperatura de  $(121\pm 1)^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

### 5.5.2 Medio preparado

Antes de utilizarse, la base del medio se calienta a baño María a una temperatura de  $100^{\circ}$  durante 15 minutos para extraerse el aire.

Después se deja enfriar hasta  $44^{\circ}\text{C}$  -  $47^{\circ}\text{C}$ , se añade asépticamente la solución de telurito de potasio, de acuerdo al apartado 5.1.2, añadiéndose  $0,1\text{ cm}^3$  en probeta al medio de concentración normal y  $0,2\text{ cm}^3$  en una probeta de concentración doble.

### 5.6 Agar hambriente

*El agar hambriente se prepara, de acuerdo al GOST 10444.1.*

*Antes de usarse, se deja enfriar hasta los  $44^{\circ}\text{C}$  -  $47^{\circ}\text{C}$ . Después se vierte en probetas de volumen respectivo.*

### 5.7 Agar leche y sal

*El agar de leche y sal se prepara, de acuerdo al GOST 10444.1.*

### 5.8. Agar de carne-peptónico (caldo)

*El agar de carne-peptónico (caldo) se prepara, de acuerdo al GOST 10444.1.*

### 5.9 Caldo de sal o azúcar

#### 5.9.1 Composición:

*caldo de carne-peptónico, de acuerdo al GOST 10444.1* *100 cm<sup>3</sup>;*

*cloruro de sodio* *6,0 g;*

*o glucosa* *1,0 g.*

#### 5.9.2 Preparación

*En el caldo de carne-peptónico se disuelven 6,0 g de cloruro de sodio o 1,0 g de glucosa. El pH se establece de forma para que después de la esterilización él alcance los  $(6,9\pm 0,1)$  a una temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ . El caldo se vierte en matraces o probetas y se deja esterilizar a una temperatura de  $(121\pm 1)^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.*

### 5.10 HHP-agar (agar de cultivo seco para cultivar microorganismos con base al hidrolizado de harina de pescado)

*El caldo se prepara, de acuerdo a las instrucciones indicadas en la etiqueta.*

### 5.11 Medio con ADN

#### 5.11.1 Composición:

*trisaminometano* *6,1 g;*

*ácido desoxirribonucléico (ADN)* *0,3 g;*

*cloruro de sodio* *10,0 g;*

*solución de cloruro de calcio* *1,1 cm<sup>3</sup>;*

*agar* *15,0 g;*

*solución azul de toluidina* *9,2 cm<sup>3</sup>.*

#### 5.11.2 Preparación

*En el agua se disuelve el trisaminometano y el pH de la solución, de acuerdo al GOST 10444.1 se lleva hasta el nivel de  $(9,0\pm 0,1)$ .*

*A la solución se le añade el ADN, cloruro de sodio, solución de cloruro de calcio. Y el agar se calienta hasta que el agar se derrita por completo. Al medio enfriado hasta una temperatura de  $65^{\circ}\text{C}$ - $55^{\circ}\text{C}$  se añade la solución de azul de toluidina “C”, se remueve minuciosamente y se vierte en las placas de Petri esterilizadas.*

*Se permite conservar el caldo a una temperatura de  $(3\pm 2)^{\circ}\text{C}$  durante no más de 7 días.*

### **5.11.3. Solución de cloruro de calcio**

#### **5.11.3.1 Composición:**

cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 0,1 g;  
agua 100  $\text{cm}^3$ .

#### **5.11.3.2 Preparación:**

*El cloruro de calcio se vierte en un matraz de una capacidad de 100  $\text{cm}^3$  y se disuelve en el agua. La solución se aumenta con agua hasta alcanzar la marca.*

7

## **GOST 31746 – 2012**

### **5.11.4 Solución de azul de toluidina “C”**

#### **5.11.4.1 Composición**

azul de toluidina “C” 1,0 g;  
agua 100  $\text{cm}^3$ .

#### **5.11.4.2 Preparación**

*El azul de toluidina “C” se traslada a un matraz de 100  $\text{cm}^3$  y se disuelve en agua. La solución se aumenta con agua hasta alcanzar la marca.*

### **5.12 Solución alcohólica de $\alpha$ -naftol**

*La solución alcohólica de  $\alpha$ -naftol se elabora, de acuerdo al GOST 10444.1.*

### **5.13 Solución de peróxido de hidrógeno**

*La solución con 3% de peróxido de hidrógeno se prepara, de acuerdo al GOST 10444.1.*

### **5.14 Agar yema de huevo azídico**

*El agar de yema de huevo azídico se prepara, de acuerdo al GOST 10444.1.*

### **5.15 Agar yema de huevo y sal**

*El agar yema de huevo con sal se prepara, de acuerdo al GOST 10444.1.*

### **5.16 Agar sangre**

#### **5.16.1 Composición**

agar de carne-peptónico 100  $\text{cm}^3$ ;  
sangre defibrinada 5-10  $\text{cm}^3$ .

#### **5.16.2 Preparación**

*Al agar de carne-peptónico derretido y enfriado hasta los 45° C - 50° C se le añade un 5%-10% de sangre animal defibrinada (cordero, conejo, bovinos). El agar se mezcla minuciosamente con la sangre evitando la formación de espuma, y se vierte en las tazas.*

#### **5.16.3 Sangre defibrinada**

*La sangre de los animales se recoge en una vajilla estéril con collar de vidrio y se defibrina sacudiéndose durante 10-15 minutos. A raíz del sacudido la fibrina que se encuentra en la sangre se sedimenta, rodeando el collar, y la sangre defibrinada vertida en otro matraz pierde su capacidad de coagularse.*

### **5.17 Solución fisiológica**

*La solución fisiológica se prepara, de acuerdo al GOST 10444.1.*

### **5.18 Caldo de Hiss con maltosa**

*Se elabora en forma seca y se prepara, de acuerdo a la instrucción puesta en la etiqueta.*

### **5.19 Soluciones y agentes químicos para la tinción de Gram**

*Las soluciones y agentes químicos para la tinción de Gram son preparados, de acuerdo al GOST 10444.1.*

### **5.20 Solución de hidróxido de potasio (KOH)**

#### **5.20.1 Composición:**

hidróxido de potasio (KOH) 40,0 g;

agua de hasta 100 cm<sup>3</sup>.

### **5.20.2 Preparación**

*El hidróxido de potasio se traslada a un matraz aforado de un volumen de 100 cm<sup>3</sup> y se disuelve en el agua. A la solución se le añade agua hasta la marca.*

### **5.21 Solución de Clark**

#### **5.21.1 Composición:**

peptona	5,0 g;
glucosa	5,0 g;
dihidrógenofosfato de calcio (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	5,0 g;
agua	1000 cm <sup>3</sup> .

#### **5.21.2 Preparación**

*Con el calentamiento se disuelven los ingredientes en el agua, después lo obtenido se enfría hasta una temperatura de 45° C - 47° C y el pH se establece de forma para que después de la esterilización él alcance los (7,2±0,1) a una temperatura de 25°C. El medio se vierte en probetas y se somete a esterilización a una temperatura de (121±1) °C durante 15 minutos, o con ayuda de un método fraccionado, vapor fluente durante 30 minutos tres días seguidos.*

8

## **GOST 31746 – 2012**

*5.22 Se permite el uso de caldos de cultivo preparados y deshidratados, incluyendo los cromogénicos, registrados en el territorio del estado que haya adoptado el estándar.*

## **6 Equipos, vajilla, material, agentes químicos**

*Se permite utilizar la vajilla desechable en caso de estar conforme con los requerimientos respectivos.*

Los equipos de laboratorio y agentes químicos habituales para las investigaciones microbiológicas, de acuerdo al GOST 10444, son los señalados, con las siguientes adiciones:

- *pesas de laboratorio de destinación general con características metrológicas, de acuerdo al GOST 24104, con el límite superior de pesaje de 200 g (para pesar los agentes químicos) con un límite de margen de error absoluto para un pesaje singular de no más de ± 0,01 mg;*

- *pesas de laboratorio de destinación general con características metrológicas, de acuerdo al GOST 24104, con el límite superior de pesaje de 1 kg (para pesar los productos) con un límite de margen de error absoluto para un pesaje singular de no más de ± 20 mg;*

- *lupa con un aumento de 5<sup>x</sup> - 10<sup>x</sup> ;*

- *microscopio biológico que asegura la revisión a luz penetrante, con un aumento de 90<sup>x</sup> - 1000<sup>x</sup> ;*

- *bucle bacteriológico con un diámetro de cerca de 3 mm;*

- *dispositivo de filtración de membrana;*

- *vidrios de objetos, de acuerdo al GOST 9284;*

- *vidrios cubreobjeto, de acuerdo al GOST 6672;*

- *termostato con una banda de temperaturas de trabajo de 28° C - 50° C que permite mantener la temperatura establecida, con un error de margen admisible de ± 1° C;*

- *fibrinógeno bovino;*

- *ácido desoxirribonucleico (ADN);*

- *sangre defibrinada;*

- *extracto de levadura en polvo;*

- hidróxido de potasio, de acuerdo al GOST 24363;
- cloruro de calcio, de acuerdo al GOST 450;
- cepas coagulasa positivas y coagulasa negativas de los estafilococos;
- extracto de carne en polvo;
- hidrolizado pancreático de caseína;
- sulfametazina;
- extracto de cerebro de ternero en polvo;
- extracto de corazón de ternero en polvo;
- plasma de conejo en polvo;
- twin-80;
- azul de toluidina "C";
- trisaminometano;
- hidrolizado fermentativo de caseína;
- hidrolizado fermentativo de tejidos animales;
- ácido etilendiamintetraacético (EDTA).

## **7 Muestreo y preparación de las pruebas**

*Muestreo y preparación de las pruebas, de acuerdo al GOST 26668, GOST 26669.*

*Es importante que para la investigación se reciba una muestra representativa del producto sin deterioro y sin modificación en el marco de su traslado o almacenamiento.*

## **8 Realización de las pruebas**

### **8.1. Método de detección de los estafilococos coagulasa positivos**

8.1.1 Al detectarse los estafilococos coagulasa positivos en una muestra pesada determinada del producto investigado o en su disolución equivalente con enriquecimiento previo, dicha muestra pesada o su disolución serán puestas en uno de los caldos de cultivo preparado, de acuerdo a los apartados 5.5 o 5.9.

9

## **GOST 31746 – 2012**

Antes de utilizarse el caldo Giolitti-Cantoni se calentará hirviendo a una temperatura de  $(100 \pm 1)$  °C durante 15 minutos para eliminar el aire. Después el caldo se enfriará hasta los 44° C - 47° C y, cumpliéndose las reglas asépticas, se le añadirá la solución de telurio de potasio.

En 10 cm<sup>3</sup> de caldo Giolitti-Cantoni modificado de concentración normal o caldos (ver ap. 5.9) se colocará 1 cm<sup>3</sup> de producto líquido o 1 cm<sup>3</sup> de suspensión inicial (o sea, 0,1 g o 0,1 cm<sup>3</sup> de producto), o en 10 cm<sup>3</sup> de caldo Giolitti-Cantoni de concentración doble se colocarán 10 cm<sup>3</sup> de producto líquido o 10 cm<sup>3</sup> de suspensión inicial (o sea, 1 g o 1 cm<sup>3</sup> de producto). Para cultivar grandes volúmenes de muestra pesada del producto investigado, se preparará una suspensión inicial, para lo cual x cm<sup>3</sup> o x g de producto se añadirán a  $9 \cdot x$  cm<sup>3</sup> de diluyente. Después será añadida toda la suspensión inicial a los  $9 \cdot x \cdot 10$  cm<sup>3</sup> de caldo Giolitti-Cantoni modificado de concentración normal (por ejemplo, 5 cm<sup>3</sup> o 5 g se pondrán en 45 cm<sup>3</sup> de diluyente y posteriormente toda esa suspensión inicial se colocará en 450 cm<sup>3</sup> de caldo Giolitti-Cantoni modificado de concentración normal). Se dejará el mínimo de aire en la probeta o en el frasco.



Después del cultivo de la muestra pesada del producto y(o) sus disoluciones, la superficie del caldo Giolitti-Cantoni se cubrirá cuidadosamente por una capa de agar hambriento estéril o una capa de parafina estéril, preparados, de acuerdo al GOST 10444.1, y enfriados hasta una temperatura de 44° C - 47° C. La capa obtenida de agar o parafina se dejarán solidificarse y se cierran herméticamente.

La relación entre la cantidad del producto cultivado o su disolución y el caldo de cultivo de concentración normal es de 1:10. Al usarse el caldo de concentración doble, la relación entre la cantidad del producto cultivado y su disolución y el caldo de cultivo es de 1:1.

*En caso de que al confirmarse posteriormente la pertenencia de los estafilococos coagulasa positivos y S. aureus no se detecte la presencia de nucleasa termoestable y actividad hemolítica, se permitirá realizar el cultivo en caldo Giolitti-Cantoni sin calentamiento previo al cultivo y sin sobreponerse capas de agar hambriento o parafina después del cultivo.*

*El investigarse los productos altamente ácidos, para prevenir una brusca reducción del pH (en 0,5 o más) de los caldos de cultivo, el pH de los caldos de cultivo después de que se les introduzca el producto o sus diluciones será aumentado hasta lograrse valores admisibles con ayuda de una solución estéril de hidróxido de sodio preparada, de conformidad con el GOST 10444.1, o al prepararse los caldos de cultivo el pH se establecerá por encima del valor establecido, tomando en consideración su posterior reducción al introducirse el producto. La cantidad de la solución añadida de hidróxido de sodio o el valor que se le necesite aumentar al pH al prepararse los caldos de cultivo, se establecerán por medio de ensayos.*

*Se permitirá establecer un valor neutro de pH con ayuda de una solución estéril de hidróxido de sodio dentro del propio producto con alta acidez.*

*En el marco del análisis de los alimentos con alto contenido de cloruro de sodio (NaCl), no se realizará el cultivo del producto investigado o su disolución inicial en el caldo de sal. El contenido de cloruro de sodio (NaCl) en los cultivos no deberá superar un 6,5%-7%.*

8.1.2 Los cultivos se dejarán incubar a una temperatura de  $(37\pm 1)$  °C durante  $(24\pm 2)$  horas. En caso de que haya aparecido ennegrecimiento o un sedimento negro en el caldo Giolitti-Cantoni o turbidez en el caldo sal o azúcar, se realizará la verificación de la pertenencia de los microorganismos que hayan crecido a los estafilococos coagulasa positivos. En caso de ausencia de ennegrecimiento, sedimento negro o turbidez, los cultivos se dejarán incubar durante  $(24\pm 2)$  horas más.

8.1.3 Para obtenerse colonias aisladas, con ayuda de un bucle estéril se realizará la resiembra de las culturas desde cada cultivo (ver 8.1.2) sobre la superficie de las tazas de Petri contentivas de uno de los medios agarizados selectivos y de diagnóstico: agar Baird-Parker, agar Baird-Parker con plasma de conejo y fibrinógeno bovino, agar leche y sal, agar yema de huevo azídico o agar yema de huevo y sal (ver sección 5).

Se realizará, igualmente, una resiembra desde las probetas que no detecten indicios visibles de crecimiento.

En caso de que sobre la superficie del caldo Giolitti-Cantoni hayan colocado capas de agar hambriento o parafina, antes del cultivo, las mismas serán eliminadas cumpliéndose las reglas asépticas y utilizándose para ello una espátula estéril. Con la espátula la capa de agar se cortará en cuatro pedazos a lo largo y, de ser requerido, la espátula será introducida dentro de la probeta para moverse alrededor del agar a fin de liberarlo del vidrio de la probeta. La probeta se sacudirá, lo cual suscitará la ruptura de la capa y su sedimentación al fondo de la probeta para asegurar una superficie lisa de suspensión cultural.

Las tazas de Petri con las resiembras se dejarán incubar en el termostato a una temperatura de  $(37\pm 1)$  °C durante  $(24\pm 2)$  horas o  $(48\pm 2)$  horas.

8.1.4 Después de que las tazas de Petri se dejen incubar durante 24 horas, de acuerdo al apartado 8.1.3, se visualizará la presencia en el fondo de las tazas de colonias típicas y atípicas para los estafilococos coagulasa positivos.

Después de una incubación de 24 horas sobre el agar Baird-Parker los estafilococos coagulasa positivos formarán colonias típicas de color negro o gris, brillantes y protuberantes, rodeadas de

10

## GOST 31746 – 2012

una zona transparente, con un diámetro de las colonias de alrededor de 1,0-1,5 mm a 1,5-2,5 mm después de una incubación de 48 horas. Después de una incubación de 24 horas directamente cerca de la colonia en la zona transparente podrá aparecer un anillo opalescente que esté rodeando la colonia.

Sobre el agar Baird-Parker con plasma de conejo y fibrinógeno bovino los estafilococos coagulasa positivos formarán colonias negras o grises, o colonias blancas pequeñas lisas, rodeadas de una zona de precipitación que indicaría la actividad de la coagulasa.

Las bacterias del género *Proteus* pueden crecer y a principios de la incubación podrán parecerse a los estafilococos coagulasa positivos, pero después de las 24 o 48 horas de incubación aparecerán culturas rastreras de diferentes tonos de color marrón, lo cual permitirá distinguirlas de los estafilococos.

*En el agar leche y sal las colonias de estafilococos coagulasa positivos serán redondas, ligeramente alzadas sobre la superficie del agar, con bordes parejos, de un diámetro de 2,0-2,5 mm, y estarán teñidas de color amarillo, dorado, amarillo limón, crema, color paja o blanco.*

*En el agar yema de huevo azídico y el agar yema de huevo y sal las colonias de estafilococos coagulasa positivos estarán rodeadas de una zona de actividad de la lecitinasa.*

Además de las típicas, los estafilococos coagulasa positivos podrán crear colonias atípicas.

Las colonias atípicas pueden presentar una de las siguientes morfologías sobre el agar Baird-Parker:

- a) colonias brillantes de color negro, con un borde estrecho blanco o sin el mismo: no hay zona transparente o es poco visible, y el anillo opalescente está ausente o es difícilmente visible;
- b) colonias grises sin zonas transparentes.

Todas las colonias que posiblemente estén presentes en las tazas de Petri y que no hayan demostrado indicios típicos o atípicos, pertenecerán a la flora de fondo.

Los microorganismos que pertenecen a otros géneros diferentes de los estafilococos coagulasa positivos, podrán formar colonias que por su aspecto exterior puedan parecerse a las colonias de estafilococos coagulasa positivos. La investigación con microscopio de las preparaciones con tinción Gram y la detección de la presencia de la catalasa facilitarán la distinción de los estafilococos de los otros géneros de microorganismos.

Después de una incubación adicional de todas las tazas de Petri a una temperatura de 37 °C durante (24±2) horas se detectará la aparición de nuevas colonias típicas o atípicas.

8.1.5 Para confirmar la pertenencia de las colonias típicas y atípicas a los estafilococos coagulasa positivos, se seleccionarán no menos de cinco colonias típicas y/o atípicas.

Para confirmar la pertenencia de las colonias seleccionadas típicas y/o atípicas a los estafilococos coagulasa positivos, cada una de las colonias seleccionadas se resiembrará por separado en un medio líquido preparado, de acuerdo al apartado 5.2, y sobre la superficie de uno de los medios de cultivo segados: agar de carne-peptónico preparado, de acuerdo al apartado 5.8, o medio preparado a base de HHP-agar, de acuerdo al apartado 5.10.

Los cultivos se dejarán incubar a una temperatura de (37±1) °C durante (24±3) horas.

## **8.2. Método del número más probable – recuento del número de los estafilococos coagulasa positivos**

8.2.1 Cada muestra pesada del producto investigado y (o) su disolución se cultiva tres veces en probetas con uno de los medios preparados, de acuerdo a los apartados 5.5 o 5.9.

8.2.2 Al determinarse el número de los estafilococos coagulasa positivos con el uso del método del número más probable, se cultivan no menos de tres muestras pesadas consecutivas del producto investigado y (o) su disolución, que se distinguen 10 veces por la cantidad del producto dentro de las mismas.

En cada una de las tres probetas con caldo de doble concentración se introducen 10 cm<sup>3</sup> de la muestra de producto líquido o 10 cm<sup>3</sup> de disolución primaria (o sea, 1 g de muestra) del producto de otra consistencia.

En cada una de las tres probetas con caldo de concentración normal se introduce 1 cm<sup>3</sup> de la muestra de producto líquido o 1 cm<sup>3</sup> de disolución primaria (o sea, 0,1 g de muestra) de otros productos.

Para cada disolución posterior (o sea, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> - para productos líquidos, o 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> para los productos de otra consistencia) el procedimiento se repite, según lo arriba indicado, utilizándose una pipeta estéril para cada disolución.

Se prepara el número de las disoluciones que permita obtener en la disolución final tres resultados negativos.

Se mezcla cuidadosamente el inoculado con el caldo sin permitir la entrada de aire.

La preparación del caldo Giolitti-Cantoni para el cultivo y la creación de las condiciones anaerobias para el crecimiento de los microorganismos se hacen, de acuerdo al apartado 8.1.1.

8.2.3 La incubación de las probetas con los cultivos, la resiembra de las culturas que hayan crecido sobre los medios selectivos y de diagnóstico, la selección de las colonias típicas y atípicas y su resiembra para confirmar la presencia de los estafilococos coagulasa positivos se realizan, de acuerdo a los apartados 8.1.2-8.1.5.

## **GOST 31746 – 2012**

### **8.2. Método para el recuento del número de los estafilococos coagulasa positivos por medio de su cultivo en caldo agarizado**

8.3.1 *De la muestra pesada del producto se prepara una disolución inicial y una serie de disoluciones décuplas, de acuerdo al GOST 26669, tales como para poder determinar en 1 g (cm<sup>3</sup>) de producto el número supuesto de estafilococos coagulasa positivos o su número permitido, indicado en el documento para el producto investigado.*

Se traslada con ayuda de una pipeta estéril 0,1-0,2 cm<sup>3</sup> de producto, en caso de que el producto sea líquido, o 0,1-0,2 cm<sup>3</sup> de suspensión inicial en caso de que el producto tenga otra consistencia, sobre la superficie de uno de los caldos indicados en el apartado 8.1.3.

El agar Baird-Parker con plasma de conejo y fibrinógeno bovino se utiliza para cultivar productos altamente inseminados, por ejemplo, los elaborados de carne cruda.

Para cultivar el producto o cada disolución del mismo se utilizarán dos tazas de Petri paralelas con caldo. Los preparativos de las tazas de Petri con caldo de cultivo y el cultivo son realizados, de acuerdo al GOST 26670 y el apartado 5.1.6.

En caso de ser requerido, se realiza nuevamente el procedimiento para la disolución inicial, si el producto es líquido, o para la disolución décupla para otros productos, así como para las disoluciones décuplas posteriores.

*Para el cultivo, en calidad de medio arbitral se utiliza el agar Baird-Parker.*

8.3.2. En caso de que para ciertos productos se requiera determinar un número bajo de estafilococos coagulasa positivos, los límites de detección del método pueden ser aumentados 10 veces por cuenta del cultivo de 1 cm<sup>3</sup> del producto, caso el producto sea líquido, o 1 cm<sup>3</sup> de suspensión inicial, caso de que se trate de otros productos. Se cultiva el producto por 1 cm<sup>3</sup> sobre la superficie de los medios en una taza grande de Petri (de un diámetro de 140 mm), o sobre la superficie del medio en tres tazas de Petri (de un diámetro de 90 mm). En ambos casos se cultivan muestras pesadas paralelas, utilizándose para ello dos tazas grandes de Petri o seis pequeñas.

8.3.3. Con ayuda de una espátula estéril el material de cultivo se distribuye de forma rápida y cuidadosa sobre toda la superficie del medio agarizado en las tazas de Petri, tratándose no tocar las paredes de la taza. Aproximadamente durante 15 minutos se deja secar la superficie del caldo, de acuerdo al GOST 26670.

8.3.4. Las tazas de Petri con los cultivos se vierten tapas para abajo y se dejan incubar en el termostato a una temperatura de (37±1) °C durante 24-48 horas.

8.3.5. Después de la incubación durante (24±2) horas las tazas de Petri con los cultivos se revisan y en el lado opuesto de la taza se marca la posición de las colonias típicas y atípicas para los estafilococos coagulasa positivos.

Características de las colonias típicas y atípicas, de acuerdo al apartado 8.1.4.

8.3.6. Todas las tazas de Petri con cultivos, de conformidad con el apartado 8.3.5, siguen sometándose a incubación a una temperatura de (37±1) °C durante (24±2) horas, después de lo cual se señala la aparición de nuevas colonias típicas y atípicas.

Con el fin de realizarse el recuento, se toman las tazas de Petri, donde hayan crecido máximo 300 colonias: 150 típicas y/o atípicas para dos disoluciones posteriores. En los cultivos en las tazas de Petri no deberá haber menos de 15 colonias. Se seleccionan a fin de confirmar en cada taza de Petri cinco colonias típicas, en caso de que estén presentes exclusivamente las colonias típicas, y cinco atípicas, en caso de que estén presentes los dos tipos de colonias. En caso de que en las tazas de Petri cultivadas con producto líquido no diluido o la disolución más pequeña de otros productos, existen menos de 15 colonias típicas y (o) atípicas, se seleccionarán todas las tazas de Petri paralelas, donde haya colonias típicas y atípicas. Serán seleccionadas colonias para confirmar las cantidades arriba indicadas.

8.3.7. Cada colonia seleccionada se resiembrada de forma individual, de acuerdo al apartado 8.1.5. Los cultivos se dejan incubar a una temperatura de (37±1) °C durante (24±3) horas.

8.3.8. En caso de que 1 cm<sup>3</sup> de material de cultivo haya sido distribuido en tres tazas de Petri, de acuerdo a lo previsto en el apartado 8.3.2, dichas tazas de Petri se considerarán una sola en todas los cálculos posteriores y procedimientos de verificación.

#### **8.4. Método para el recuento del número de los estafilococos coagulasa positivos por medio de su cultivo en caldo agarizado**

8.4.1 A cada una de las dos tazas de Petri se traslada con ayuda de una pipeta estéril 1 cm<sup>3</sup> de producto, en caso de que el producto sea líquido, o 1 cm<sup>3</sup> de suspensión inicial en caso de que el producto tenga otra consistencia.

En cada una de las dos demás tazas de Petri estériles se coloca 1 cm<sup>3</sup> de suspensión inicial del producto líquido investigado o la primera de las disoluciones décuplas, en caso de tratarse de un producto de otra consistencia.

Dicho procedimiento se repite, igualmente, para posteriores disoluciones, utilizándose para cada disolución una nueva pipeta estéril.

El cultivo se llena por el caldo Baird-Parker con plasma de conejo y fibrinógeno bovino, o uno de los medios agarizados que se indican en el apartado 8.1.1. La capa deberá ser de más o menos 3-4 mm.

12

## GOST 31746 – 2012

El inoculado se mezcla con cuidado con el caldo y para solidificar lo obtenido se dejan las tazas de Petri en estado tranquilo en una superficie horizontal fría.

8.4.2. Las tazas de Petri con cultivos después de la solidificación del caldo se vuelcan y se colocan dentro del termostato a una temperatura de  $(37\pm 1)$  °C por un plazo de 18-24 hs. En caso de requerirse, se continua el proceso de incubación durante 18-24 horas más.

8.4.3. Después de la incubación se calculan las colonias típicas y atípicas para los estafilococos coagulasa positivos, de conformidad con el apartado 8.1.5.

Para confirmar la pertenencia de las colonias típicas y (o) atípicas a los estafilococos coagulasa positivos, las colonias son seleccionadas, de acuerdo al apartado 8.3.6.

8.4.4. Cada colonia seleccionada se resiembró por separado, de conformidad con lo indicado en el apartado 8.1.5.

Los cultivos se dejan incubar a una temperatura de  $(37\pm 1)$  °C por un plazo de  $(24\pm 3)$  hs.

8.4.5 *Se permite, asimismo, detectar los estafilococos coagulasa positivos por medio de su cultivo en o sobre un medio agarizado, a condición de que la muestra pesada del producto, donde se tenga previsto detectar los microorganismos, pueda ser cultivada con el uso de dicho método.*

*Al detectarse los estafilococos coagulasa positivos por medio del cultivo en o sobre un medio agarizado, no se realizará el recuento del número de sus colonias.*

## **9 Confirmación de la pertenencia de los microorganismos detectados a los estafilococos coagulasa positivos**

Para confirmar la pertenencia a los estafilococos coagulasa positivos de los microorganismos que hayan crecido y que hayan sido seleccionados, de acuerdo a los apartados 8.1.5, 8.2.3, 8.3.7 y 8.4.4., se les determina la *relación de la tinción de Gram*, la capacidad de coagular el plasma de la sangre del conejo y *la capacidad de formar la catalasa*.

### **9.1. Tinción de Gram**

*De las culturas preparan ensayos, los tiñen por la tinción de Gram, de acuerdo al GOST 30425, y someten a estudio bajo el microscopio.*

*Los estafilococos coagulasa positivos se tiñen positivamente por la tinción de Gram, son de forma de una bola, con células de un diámetro de 0,6-1,0 mkm, que en la mayoría de los casos (no en todos) se ubican en forma de concentraciones que parecen racimos de uva.*

### **9.2. Determinación de la catalasa**

*La capacidad de los microorganismos que hayan crecido de formar la catalasa se determina, de acuerdo al GOST 30425. Los estafilococos coagulasa positivos forman la catalasa.*

### 9.3. Determinación de la capacidad de coagular el plasma de la sangre de conejo

9.3.1. La capacidad de coagular el plasma de la sangre de conejo se determina para los microorganismos que se tiñen positivamente y que forman la catalasa.

9.3.2 Sobre el agar Baird-Parker con plasma de conejo y fibrinógeno bovino se hace el recuento de las colonias típicas con una zona de precipitación que indica una actividad de la coagulasa, y dichas colonias sin posterior verificación se considerarán estafilococos coagulasa positivos.

9.3.3 Cumpliéndose las reglas asepticas, en las probetas de tamaño respectivo (por ejemplo, de 10 x 75 mm) se añade 0,1 cm<sup>3</sup> de cada cultura que haya crecido en el caldo (ver 5.2), de acuerdo a los apartados 8.1.5, 8.2.3, 8.3.7 y 8.4.4, y 0,3 cm<sup>3</sup> de plasma de conejo (en caso de que el fabricante del plasma de conejo no haya establecido otras cantidades) y se dejan incubar a una temperatura de 37°C.

Al voltear la probeta, se investiga el plasma en relación a la coagulación después de un período de 4-6 horas de incubación, y en caso de que la prueba de resultado positivo, lo revisan 24 horas después de la incubación o lo investigan después de un período de incubación, cuya duración se establece por el fabricante del plasma de conejo.

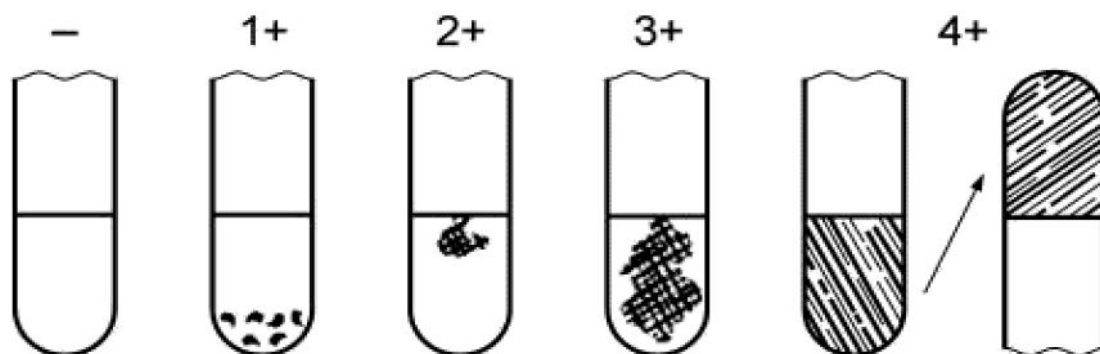
El test de la coagulasa se considerará positivo en caso de que la cultura haya demostrado, por lo menos, una evaluación de la reacción de la coagulasa de 3+, de acuerdo a lo indicado en el dibujo 1. Las reacciones 1+ y la 2+ se evalúan como intermedias.

Para controlar la calidad de cada lote de plasma, se añade 0,1 cm<sup>3</sup> de caldo esterilizado a base de extracto de corazón y cerebro a la cantidad recomendada del plasma de conejo, lo cual se deja incubar sin cultivo de la cultura de los microorganismos a una temperatura de 37 ° C. Asimismo, en el plasma controlado no debe haber indicios de coagulación.

9.3.4. Se permite añadir al plasma de la sangre de conejo, preparado y vertido en las probetas, un bucle de las culturas investigadas de los medios agarizados, dejando una probeta con plasma disuelto en calidad de control de la probeta sin cultivo adentro.

13

#### GOST 31746 – 2012



- evaluación negativa, no se detecta formación de fibrina;

1+ evaluación positiva, pequeñas bolitas no formadas;

2+ evaluación positiva, pequeña bolita formada;

3+ evaluación positiva, grande bolita formada;

4+ el contenido completo de la probeta está coagulado y no cambia su posición al voltearse la probeta.

## Dibujo 1 – Resultados de la prueba de la coagulasa

La cultura introducida se revuelve minuciosamente y se coloca dentro del termostato a una temperatura de  $(37\pm 1)$  °C. En caso de que en 6 horas no haya tenido lugar la coagulación del plasma, las probetas se dejan a una temperatura de  $(30\pm 1)$  °C por un plazo de 24 horas. En caso de que dentro de 24 horas el plasma no haya coagulado, la cultura investigada del estafilococo se reconoce como coagulasa negativa. La evaluación del nivel de coagulación del plasma se llevará a cabo, de acuerdo al apartado 9.3.3.

9.3.5 Con el fin de acelerar la detección de los estafilococos coagulasa positivos en vez de culturas de veinticuatro horas que hayan crecido en medios agarizados, se admite el uso de una cultura cultivada sobre el caldo de carne-peptónico o de corazón y cerebro y utilizarla para detectar la reacción de coagulación del plasma 2 horas después de haberse manifestado indicios evidentes del crecimiento de los microorganismos. Al detectarse la reacción de coagulación del plasma al 0,5 cm<sup>3</sup> del plasma diluido se le añaden dos gotas de cultura de caldo. El registro de los resultados de la coagulación del plasma en dicho caso se llevará a cabo en un tiempo de 30 minutos a 2-4 horas. La evaluación del nivel de coagulación del plasma se llevará a cabo, de acuerdo al apartado 9.3.3.

### 9.4. Evaluación de los resultados de confirmación de la pertenencia de las colonias peculiares a los estafilococos coagulasa positivos

En caso de que al investigarse las colonias típicas y atípicas en las mismas se detectan cocos *gram positivos que formen la catalasa* y capaces de coagular el plasma de sangre, se considerará que los microorganismos son estafilococos coagulasa positivos.

### 9.5. Confirmación de la pertenencia de los estafilococos coagulasa positivos detectados a los *S. aureus*

La pertenencia de los estafilococos coagulasa positivos detectados a los *S. aureus* se verificará determinándose su capacidad de formar la acetoína y fermentar la maltosa en condiciones aerobias.

En el anexo A se muestra la diferenciación de los tipos y subtipos coagulasa positivos de los estafilococos siguiendo dos características, la formación de la acetoína y la fermentación de maltosa en condiciones aerobias.

#### 9.5.1 Detección de la formación de la acetoína (reacción Voges-Proskauer)

La cultura se sembrará en probetas con caldo Clark. Los cultivos se dejarán incubar a una temperatura de  $(37\pm 1)$  °C durante 48 horas.

Después de incubar los cultivos, a 1 cm<sup>3</sup> de líquido con cultura seleccionado se añadirán 0,6 cm<sup>3</sup> de solución de  $\alpha$ -naftol, preparada, de acuerdo al apartado 5.1, y 0,2 cm<sup>3</sup> de solución de hidróxido de potasio preparada, de acuerdo al apartado 5.20.

Después de añadir cada agente químico, la probeta deberá sacudirse. La aparición de una tinción rosada dentro de 15-60 minutos indicará una reacción positiva.

*S. aureus* forma la acetoína.

### **9.5.2 Detección de la fermentación de la maltosa en condiciones aerobias**

La capacidad de fermentación de la maltosa en condiciones aerobias se detectará con el fin de diferenciar el *S. aureus* de los demás tipos coagulasa positivos, los *S. Intermedius* y *S. hyicus subsp hyicus*.

Para detectar la fermentación de la maltosa en condiciones aerobias, las culturas sujetas a estudio se cultivarán con inyección de bucle en el caldo de Hiss contentivo de maltosa.

Los cultivos se dejarán incubar a una temperatura de  $(37\pm 1)$  °C durante 48 horas.

Al fermentarse la maltosa en condiciones aerobias con formación de ácido, el color del caldo de Hiss cambiará .

El *S. aureus* fermentará la maltosa en condiciones aerobias.

### **9.6. Detección de la capacidad del *S. aureus* de formar nucleasa termoestable y detección de la presencia en la misma de actividad hemolítica**

La capacidad del *S. aureus* de formar la nucleasa termoestable y presencia en la misma de actividad hemolítica se verificarán en caso de haber necesidad de detectar su potencial enterotoxigenicidad, de acuerdo a los indicadores epidemiológicos.

#### **9.6.1 Detección de la nucleasa termoestable**

Para detectar la nucleasa termoestable en el caldo, de acuerdo al apartado 5.11, vertido en tasas estériles de Petri, se recortarán, con el cumplimiento de las reglas asépticas, pozos de un diámetro de no más de 4 mm, la distancia entre los cuales no deberá ser inferior a 7-8 mm. Las culturas que hayan crecido en caldo de carne-peptónico, después de dejarlas incubar a una temperatura de  $(37\pm 1)$  °C durante 24 horas, se calentarán a baño María hirviente durante 15 minutos, se dejarán enfriar hasta la temperatura del medio ambiente y serán introducidas en los pozos preparados dentro del caldo con ayuda de la pipeta de Pasteur de a 1-2 gotas. Las tazas de Petri con el cultivo se colocarán en el termostato a una temperatura de  $(37\pm 1)$  °C, los resultados se evaluarán dentro de 1, 2 y 5 horas. En caso de haber nucleasa termoestable, aparecerá una zona de color rosado chillón alrededor del pozo sobre el fondo azul del caldo.

#### **9.6.2 Detección de la actividad hemolítica**

La cultura se sembrará sobre la superficie del agar sangre. Los cultivos se dejarán incubar a una temperatura de  $(37\pm 1)$  °C durante 24 horas. Después de la incubación las tazas de Petri se revisarán a la luz penetrante, distinguiéndose las zonas de hemólisis.

La presencia de la nucleasa termoestable y actividad hemolítica confirmarán las peculiaridades enterotoxigénicas del *S. aureus*.

### **9.7. Evaluación de los resultados de confirmación de la pertenencia de los estafilococos coagulasa positivos a los *S. aureus***

9.7.1 En caso de que los estafilococos coagulasa positivos formen acetoína y fermenten la maltosa en condiciones aerobias, se considerará que los estafilococos coagulasa positivos detectados son *S. aureus*.



9.7.2 Para los fines de la identificación bioquímica se admitirá el uso de los sistemas de prueba (test) de fabricación industrial, registrados en el territorio del estado que haya adoptado el estándar.

## 10 Procesamiento de los resultados

10.1 Los resultados serán evaluados por separado para cada prueba.

### 10.2 Evaluación de los resultados de los cultivos en los caldos líquidos

Al determinarse el número más probable de los estafilococos coagulasa positivos o *S. aureus*, o en caso de detectarse los mismos en una muestra pesada determinada del producto, los cultivos se considerarán positivos (o sea, que los estafilococos coagulasa positivos o los *S. aureus* están detectados en la muestra pesada del producto investigado), en caso de que en el marco de la resiembra posterior en caldos agarizados selectivos y de diagnóstico y confirmación de colonias típicas y (o) atípicas que hayan crecido en los caldos, por lo menos, en una colonias se detecten estafilococos coagulasa positivos o los *S. aureus*.

El número más probable de los estafilococos coagulasa positivos o los *S. aureus* en 1 g (1 cm<sup>3</sup>) de producto se determinará partiendo del número de los cultivos positivos, de acuerdo al GOST 26670.

Los resultados de la detección de los estafilococos coagulasa positivos o los *S. aureus* se registran de forma siguiente:

detectados (no detectados) en x g (cm<sup>3</sup>) de producto;

x – peso o volumen de producto, donde se hayan detectado los estafilococos coagulasa positivos o los *S. aureus*.

15

## GOST 31746 – 2012

### 10.3 Evaluación de los resultados de los cultivos en o sobre caldos agarizados selectivos y de diagnóstico

El recuento del número de los estafilococos coagulasa positivos para cada taza de Petri a, donde se haya calculado el número de las colonias crecidas, se realizará, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$a = \frac{b_1}{B_T} N_T + \frac{b_{aT}}{B_{aT}} N_{aT} \quad (1)$$

donde  $b_1$  es el número de las colonias típicas, en las cuales fue confirmada la presencia de los estafilococos coagulasa positivos;

$B_T$  es el número de las colonias típicas que hayan sido seleccionadas para fines de confirmación;

$N_T$  es el número total de las colonias típicas calculado en la taza de Petri;

$b_{aT}$  es el número de las colonias atípicas, en las cuales fue confirmada la presencia de los estafilococos coagulasa positivos;

$B_{aT}$  es el número de las colonias atípicas que hayan sido seleccionadas para fines de confirmación;

$N_{aT}$  es el número total de las colonias atípicas calculado en la taza de Petri.

El resultado se redondea y se registra, de conformidad con el *GOST 26670*.

Al realizarse el cultivo en el agar Baird-Parker con plasma de conejo y fibrinógeno bovino, no se llevará a cabo la conformación de pertenencia a los estafilococos coagulasa positivos. En dicho caso todas las colonias típicas en la taza de Petri se considerarán estafilococos coagulasa positivos.

*La fórmula para calcular los estafilococos coagulasa positivos sirve, igualmente, para calcular los S. aureus. No obstante, al cálculo se añaden los siguientes datos:*

$b_1$  es el número de las colonias de los estafilococos coagulasa positivos, en las cuales fue confirmada la presencia de los *S. aureus*;

$B_T$  es el número de las colonias de los estafilococos seleccionadas para fines de confirmación;

$N_T$  es el número total de las colonias de los estafilococos coagulasa positivos calculado en la taza de Petri;

$b_{aT}$  es el número de las colonias atípicas de los estafilococos coagulasa positivos, en las cuales fue confirmada la presencia de los *S. aureus*;

$B_{aT}$  es el número de las colonias atípicas de los estafilococos coagulasa positivos que hayan sido seleccionadas para fines de confirmación;

$N_{aT}$  es el número total de las colonias atípicas de los estafilococos coagulasa positivos calculado en la taza de Petri.

Los valores calculados a se utilizarán para calcular el número de los estafilococos coagulasa positivos o *S. aureus* en 1 g o 1 cm<sup>3</sup> de producto, de conformidad con la siguiente fórmula:

$$N = \frac{\Sigma a}{Vnd}, \quad (2)$$

donde  $\Sigma a$  es la suma de colonias de los estafilococos coagulasa positivos o *S. aureus* en todas las tazas;

V es el volumen del material de cultivo colocado en cada taza de Petri, cm<sup>3</sup>;

n es el número de tazas de Petri en el cultivo, seleccionado para el cálculo;

d es el nivel de disolución que corresponde a la disolución seleccionada para el cálculo.

De conformidad con el *GOST 26670*, para el cálculo se seleccionan las tazas, donde hayan crecido no más de 300 colonias. Asimismo, el número de colonias típicas y (o) atípicas deberá encontrarse en el rango de 15-150 colonias. En caso de que en dos disoluciones continuas el número de las colonias típicas y (o) atípicas se encuentre en el rango de 15-150, en dicho caso el recuento del número de los estafilococos coagulasa positivos o *S. aureus* se realizará, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$N = \frac{\Sigma a}{V(n_1 + 0,1n_2)d}, \quad (3)$$

Donde  $\Sigma a$  es la suma de colonias de los estafilococos coagulasa positivos o *S. aureus* en todas las tazas;

V es el volumen del material de cultivo colocado en cada taza de Petri, cm<sup>3</sup>;

$n_1$  es el número de tazas de Petri con los cultivos de la primera disolución;

$n_2$  es el número de tazas de Petri con los cultivos de la segunda disolución;

d es el nivel de disolución que corresponde a la primera disolución (la disolución primaria también se tomará en cuenta).

Los resultados de la determinación del número de los estafilococos coagulasa positivos o *S. aureus* en 1 g (cm<sup>3</sup>) de producto son redondeados y se registrarán, de acuerdo al GOST 26670.

16

**GOST 31746 – 2012**

#### **10.4 Ejemplo**

El recuento del número de colonias de los estafilococos coagulasa positivos o *S. aureus* en el cultivo de 0,1 cm<sup>3</sup> de producto *investigado* dio los siguientes resultados:

- para la primera disolución seleccionada (10<sup>2</sup>): 140 colonias típicas y 125 colonias atípicas, sin colonias atípicas;

- para la segunda disolución seleccionada (10<sup>3</sup>): 16 colonias típicas y 14 colonias atípicas, sin colonias atípicas.

A objeto de reconfirmación, fue seleccionado el siguiente número de colonias:

- de las 140 colonias fueron seleccionadas cinco colonias, y todas ellas fueron reconfirmadas como estafilococos coagulasa positivos, a = 140;

- de las 125 colonias fueron seleccionadas cinco colonias, y todas ellas fueron reconfirmadas como estafilococos coagulasa positivos, a = 75;

- de las 16 colonias fueron seleccionadas cinco colonias, y todas ellas fueron reconfirmadas como estafilococos coagulasa positivos, a = 16;

- de las 15 colonias fueron seleccionadas cinco colonias, tres de ellas fueron reconfirmadas como estafilococos coagulasa positivos, a = 9.

$$N = \frac{140 + 75 + 16 + 9}{0,1 \cdot (2 + 0,1 \cdot 2) \cdot 10^{-2}} = 109091.$$

El resultado después de redondear será de  $1,1 \cdot 10^5$ .

#### **10.5 Evaluación de las pequeñas cantidades de colonias que se hayan acrecentado**

10.5.1. En caso de que en cada taza de Petri correspondiente al cultivo de la muestra pesada de la prueba investigada (productos líquidos) o suspensión inicial (productos de otra consistencia), hayan sido detectadas menos de 15 colonias de estafilococos coagulasa positivos o *S. aureus*, el resultado será calculado y expresado de forma siguiente:

a) al cultivarse productos líquidos; el número de los estafilococos coagulasa positivos o *S. aureus* en cm<sup>3</sup> se calcula, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$N_E = \frac{\Sigma a}{2V},$$

(4)

donde  $\Sigma a$  es la suma de colonias de los estafilococos coagulasa positivos o *S. aureus* en dos tazas de Petri;

V es el volumen del material de cultivo que haya sido colocado en cada taza de Petri.

b) al cultivarse productos de otra consistencia, el número de los estafilococos coagulasa positivos o *S. aureus* se calculará, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$N_{\Sigma} = \frac{\Sigma a}{2Vd}, \quad (5)$$

donde  $\Sigma a$  es la suma de colonias de los estafilococos coagulasa positivos o *S. aureus* en dos tazas de Petri;

V es el volumen del material de cultivo que haya sido colocado en cada taza de Petri:

d es el nivel de disolución de la suspensión inicial.

10.5.2. En caso de que en dos tazas de Petri al cultivarse 0,1 cm<sup>3</sup> de muestra investigada del producto líquido o suspensión inicial de producto de otra consistencia no se detecten colonias de estafilococos coagulasa positivos o *S. aureus*, el resultado será expresado de forma siguiente:

- menos de 10 UFC de estafilococos coagulasa positivos o *S. aureus* en 1 cm<sup>3</sup> de producto líquido;

- menos de 10/d UFC de estafilococos coagulasa positivos o *S. aureus* en 1 g de producto de otra consistencia (d es el nivel de disolución de la suspensión inicial).

En caso de cultivo de 1 cm<sup>3</sup> de muestra, el resultado será expresado de forma siguiente:

- menos de 1 UFC de estafilococos coagulasa positivos o *S. aureus* en 1 cm<sup>3</sup> de producto líquido;

- menos de 1/d UFC de estafilococos coagulasa positivos o *S. aureus* en 1 g de producto de otra consistencia.

## 11 Acta de investigaciones

Los resultados serán evaluados para cada prueba de forma aparte.

El acta de investigación deberá incluir lo siguiente:

- toda la información necesaria para identificar de forma completa el producto investigado;
- método utilizado para la selección de pruebas;
- método utilizado de la investigación, de conformidad con el presente estándar;
- todos los detalles de las operaciones no establecidas por el presente estándar;
- resultado(s) obtenido(s).

## Anexo A

### (a título informativo)

**Diferenciación de los tipos y subtipos coagulasa positivos de los estafilococos, de acuerdo a dos indicios, la formación de la acetoina y la fermentación de la maltosa en condiciones aerobias**

**Cuadro A.1**

Nombre de las pruebas	S. aureus		S.delphini	S.hyicus	S.intermedius	S. schleifen subsp. coagulans
	subsp. anaerobius	subsp. aureus				
Formación de la acetoina	-	+	-	-	-	+
Fermentación de la maltosa en condiciones aerobias	+	+		-	w	-

Nota: “+” significa que un 90% o más de cepas son positivas; “-“ significa que un 90% o más de cepas son negativas, “w” significa que la reacción es débil; “la ausencia de identificación” significa que la detección del indicador no se había realizado.

## Anexo DA

### (a título informativo)

**Comparación de la estructura del presente estándar con la estructura de los estándares internacionales que se hayan aplicado en el mismo**

DA.1 La comparación de la estructura del presente estándar con la estructura del ISO 6888-1:1999 se indica en el cuadro DA.1.

**Cuadro DA.1**

Estructura del estándar internacional ISO 6888-1:1999			Estructura del presente estándar		
Sección	Apartados	Incisos	Sección	Apartados	Incisos
1 Alcance de divulgación	1	-	1 Alcance de aplicación	1	-
2 Referencias a las normas	2	-	2 Referencias a las normas	2	-
3 Términos y definiciones	2	3.1, 3.2	3 Términos y definiciones	2	3.1, 3.2
4 Esencia del	4	4.1 – 4.3	4 Métodos de	4.1, 4.3	4.1.1 – 4.3.2

método			detección y determinación del número de los estafilococos coagulasa positivos y S.aureus		
5 Caldos de cultivo y disolución	5	-	5 Caldos de cultivo, soluciones, emulsiones, agentes químicos y sangre fibrinada	5	5.1.1 – 5.21.1
6 Equipos y vajilla	6	-	6 Equipos, vajilla, material, agentes químicos	6	-
7 Muestreo	7		7 Muestreo y preparación de las muestras	7	-
8 Preparación de las muestras	8				
9 Prueba	9	9.1 - 9.5	8 Realización de la prueba	8.1 – 8.4	8.1.1 – 8.4.3
10 Cálculo y expresión de los resultados	10	10.1, 10.2	9 Confirmación de la pertenencia de los microorganismos detectados a los estafilococos coagulasa positivos	9.1 – 9.7	9.1.1 – 9.7.1
11 Precisión	11	-	10 Procesamiento de los resultados	10.1 – 10.4	-
12 Acta de la investigación	12	-	12 Acta de la investigación	11	-
-	-	-	Anexo A	-	-

## GOST 31746 – 2012

DA.2 La comparación de la estructura del presente estándar con la estructura del ISO 6888-2:1999 se indica en el cuadro DA.2.

Cuadro DA.2

Estructura del estándar internacional ISO 6888-2:1999			Estructura del presente estándar		
Sección	Apartados	Incisos	Sección	Apartados	Incisos
1 Alcance de divulgación	1	-	1 Alcance de aplicación	1	-
2 Referencias a las normas	2	-	2 Referencias a las normas	2	-
3 Términos y definiciones	2	3.1, 3.2	3 Términos y definiciones	2	3.1, 3.2
4 Esencia del método	4	4.1 – 4.3	4 Métodos de detección y determinación del número de los estafilococos coagulasa positivos y S.aureus	4.1, 4.3	4.1.1 – 4.3.2
5 Caldos de cultivo y disolución	5	-	5 Caldos de cultivo, soluciones, emulsiones, agentes químicos y sangre fibrinada	5	5.1.1 – 5.21.1
6 Equipos y vajilla	6	-	6 Equipos, vajilla, material, agentes químicos	6	-
7 Muestreo	7	-	7 Muestreo y preparación de las muestras	7	-
8 Preparación de las muestras	8				
9 Prueba	9	9.1 - 9.3	8 Realización de la prueba	8.1 – 8.4	8.1.1 – 8.4.3
10 Cálculo y expresión de los resultados	10	10.1, 10.2	9 Confirmación de la pertenencia de los microorganismos detectados a los estafilococos coagulasa positivos	9.1 – 9.7	9.1.1 – 9.7.2
11 Precisión	11	-	10 Procesamiento de los resultados	10.1 – 10.4	-
12 Acta de la investigación	12	-	12 Acta de la investigación	11	-
-	-	-	Anexo A	-	-

DA.3 La comparación de la estructura del presente estándar con la estructura del ISO 6888-2:1999 se indica en el cuadro DA.3.

Cuadro DA.3

Estructura del estándar internacional ISO 6888-3:2003			Estructura del presente estándar		
Sección	Apartados	Incisos	Sección	Apartados	Incisos
1 Alcance de divulgación	1	-	1 Alcance de aplicación	1	-
2 Referencias a las normas	2	-	2 Referencias a las normas	2	-
3 Términos y definiciones	2	3.1, 3.2	3 Términos y definiciones	2	3.1, 3.2
4 Esencia del método	4	4.1 – 4.3	4 Métodos de detección y determinación del número de los estafilococos coagulasa positivos y S.aureus	4.1, 4.3	4.1.1 – 4.3.2
5 Caldos de cultivo y disolución	5	-	5 Caldos de cultivo, soluciones, emulsiones, agentes químicos y sangre fibrinada	5	5.1.1 – 5.21.1
6 Equipos y vajilla	6	-	6 Equipos, vajilla, material, agentes químicos	6	-
7 Muestreo	7	-	7 Muestreo y preparación de las muestras	7	-
8 Preparación de las muestras	8				
9 Prueba	9	9.1 - 9.3	8 Realización de la prueba	8.1 – 8.4	8.1.1 – 8.4.3
10 Cálculo y expresión de los resultados	10	10.1, 10.2	9 Confirmación de la pertenencia de los microorganismos detectados a los estafilococos coagulasa positivos	9.1 – 9.7	9.1.1 – 9.7.2
11 Precisión	11	-	10 Procesamiento de los resultados	10.1 – 10.4	-



12 Acta de la investigación	12	-	12 Acta de la investigación	11	-
-	-	-	Anexo A	-	-

21

## **GOST 31746 – 2012**

UDK 663.664.001.4:006.354    MKS 07.100.30

MOD

Palabras clave: estafilococos coagulasa positivos y *S. aureus*, unidades formadoras de colonias (UFC), colonias típicas y atípicas, caldos de cultivo, incubación de cultivos, reacción Voges-Proskauer, nucleasa termoestable, tinción de Gram, presencia de catalasa y coagulasa, número más probable (NMP).

22

Editor L.V. Koretnikova  
 Redactor técnico N.S. Grishanova  
 Correctora I.A. Koroleva  
 Compaginación computarizada I.A. Naleykina

Entregado para ser tipeado el 19.04.2013. Firmado para imprenta el 07.05.2013. Formato 60x84  
 1/5. Garnitura Arial.

Condiciones de impresión l. 3,26. Edición de estudios l. 2,70. Tirada 153 ejemplares. Pedido 468

FGUP STANDARTINFORM, 123995, Moscú, Granatniy per., 4

www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru

Tipeado por FGUP STANDARTINFORM en PC.

Impreso en la filial de FGUP STANDARTINFORM – imprenta “Moskovskiy pechatnik”,  
 105062, Moscú, Lialin per., 6