

### Especificación

Medio sólido, selectivo y diferencial para la detección y enumeración de *Escherichia coli* β-glucuronidasa-positivas, de acuerdo con las normas ISO.

### Presentación

10 Frascos  
Botella 250 ml  
con: 200 ± 5 ml

#### Encajado

1 caja con 10 botellas de 250 ml. Tapón inyectable:  
tapón plástico con rosca. No se recomienda la  
utilización de jeringas con agujas de diámetro  
superior a 0,8 mm.

#### Caducidad Almacenamiento

12 meses 2-25 °C

### Composición

Composición (g/l):

Triptona.....	20,000
Sales biliares nº3.....	1,500
Agar.....	15,00
5-Bromo-4-cloro-3- indoxil-β-D-glucuronido.....	0,075

## Descripción/Técnica

### Descripción:

*Escherichia coli* es la única bacteria coliforme que posee  $\beta$ -D-glucuronidasa y esta característica se aprovecha para diferenciarla de los otros coliformes. Sin embargo debe tenerse en cuenta que un 3-4% de cepas de la población total de *E. coli* son  $\beta$ -glucuronidasa-negativas y por lo tanto no pueden ser reconocidas por esta característica.

*E. coli* absorbe el substrato cromogénico (X- $\beta$ -D-glucurónido) y el enzima  $\beta$ -D-glucuronidasa rompe el enlace entre el  $\beta$ -D-glucurónido y la fracción-X, liberando el cromóforo (X = 5-bromo-4-cloro-3-indolil) que se manifiesta coloreando la colonia de un color azul-verdoso. El alto contenido de sales biliares impide el crecimiento de las bacterias Gram positivas acompañantes, mientras que la elevada temperatura de incubación inhibe casi totalmente el crecimiento de bacterias Gram negativas distintas a *E. coli*.

### Instrucciones de Uso:

Fundir el frasco (100°C), verter en placa y proceder según especificaciones internas.

#### 1. Inóculo directo en masa

Transferir asepticamente 1 mL de la muestra a dos placas Petri y repetir el proceso para cada dilución de la muestra, siempre por duplicado. A cada una de las placas así inoculadas se añaden asepticamente 15 mL de Agar TBX fundido y enfriado a 44-47°C. Se mezcla cuidadosamente el inóculo con el medio y se deja solidificar. El tiempo transcurrido entre la distribución del inóculo y la adición del medio no debe ser superior a los 15 minutos.

Las placas se invierten y se incuban a 44 $\pm$ 1°C durante 20-24 horas. Si se sospecha la presencia de células estresadas, se recomienda hacer una incubación inicial de 4h $\pm$ 0,25 a 37 $\pm$ 1°C y luego pasar ya a 44°C de forma que el tiempo total de incubación no exceda 24 horas. La temperatura de incubación no debe superar nunca los 45°C.

#### 2. Inóculo sobre membrana

Para esta técnica se recomiendan membranas filtrantes estériles de acetato de celulosa o de mezcla de ésteres de celulosa, de 85 mm de diámetro y de 0.45-1.2  $\mu$ m de tamaño de poro.

##### 2.1. Revitalización

De forma aseptica se disponen 2 membranas sobre sendas placas de Agar Mineral-Modificado Glutamato (MMGA) evitando atrapar burbujas de aire entre membrana y medio. Depositar 1 mL de muestra en el centro de la membrana y esparcirlo por toda la superficie de la membrana. Repetir la operación para todas y cada una de las diluciones de la muestra a examinar. Mantener las placas inoculadas a temperatura ambiente durante unos 15 minutos o hasta que todo el inóculo haya sido absorbido por el medio. Las placas se incuban sin invertir a 37 $\pm$ 1°C durante 4  $\pm$  0,25 horas.

##### 2.2. Paso al medio selectivo

Después del periodo de revitalización, se transfieren de forma aseptica las membranas desde el medio de revitalización hasta el Agar TBX, evitando en lo posible atrapar burbujas de aire entre la membrana y el medio. En ningún caso debe tocarse la superficie de la membrana. Las placas así preparadas se incuban, sin invertir, durante 20-24 horas a 44°C, sin que la temperatura exceda nunca los 45°C.

#### 3. Resultados

Las células de *E. coli*  $\beta$ -glucuronidasa-positivas producen colonias de color azul (o azul-verdoso), a veces y a pesar de los pasos de revitalización, algunas células dañadas de *E. coli* no consiguen crecer a 44°C y no son detectadas.

Nota: Los medios sólidos pueden fundirse de diferentes maneras: autoclave, baño y si el cliente lo ve conveniente también el microondas. Siempre que se escoja la opción del microondas es necesario tomar ciertas medidas de seguridad para evitar la rotura del frasco o tubo, tales como aflojar el tapón y poner la botella o tubo en un baño maría dentro del microondas. Las temperaturas y tiempos de fusión dependerán de la forma del envase, del volumen de medio y de la fuente calorífica. Deben evitarse tanto los sobrecalentamientos como los calentamientos prolongados.

## Control de Calidad

### Control Físico/Químico

Color : Amarillo pajizo

pH: 7,2 ± 0,2 a 25°C

### Control de Fertilidad

Fusión -Preparar placas- sembrar en productividad:rango práctico 100 ± 20 UFC. Min. 50 UFC/ 10<sup>4</sup>-10<sup>6</sup> UFC( Selectividad).

Control microbiológico según normativa ISO 11133:2014/ A1:2018.

Metodología analítica acorde con ISO 11133:2014/A1:2018; A2:2020.

Aerobiosis. Incubar a 44 °C ± 1 °C Lectura a las 20 - 24 h

#### **Microorganismo**

*Escherichia coli* ATCC® 25922, WDCM 00013

*Escherichia coli* ATCC® 8739, WDCM 00012

*Escherichia coli* NCTC® 13216, WDCM 00202

*Enterococcus faecalis* ATCC® 19433, WDCM 00009

*Citrobacter freundii* ATCC® 43864, WDCM 00006 (37/44°C)

#### **Desarrollo**

Bueno (≥ 50%) colonias azules

Bueno (≥ 50%) colonias azules

Bueno (≥ 50%) colonias azules

Inhibido

Bueno - Colonias incoloras

### Control de Esterilidad

Incubación 48 h a 30-35°C y 48 h a 20-25 °C: SIN CRECIMIENTO

Verificación a 7 días tras incubación en las mismas condiciones.

## Bibliografía

- DELISLE, G.L. & A. LEY (1989) Rapid detection of *E. coli* in urine samples by a new chromogenic β-glucuronidase assay. J. Clin. Microbiol. 27:778-779
- ISO Standard 16649-1:2018. Microbiology of foods chain- Horizontal method for the enumeration of β-glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 1: Colony count technique at 44°C using membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-glucoride.
- ISO 11133:2014. Microbiology of food, animal feed and water. Preparation, production, storage and performance testing of culture media.
- OGDEN, I.D. & A.J. WATT (1991) An evaluation of fluorogenic and chromogenic assays for the direct enumeration of *E. coli*. Letters in Appl. Microbiol. 13:212-215.
- SCHWEIZERISCHES LEBENSMITTELBUCH (2005) Kap.56 Mikrobiologie, Bundesamt für Gesundheit. Direktionsbereich Verbraucherschutz. Bern.