

Report on a visit to the  
Instituto Nacional  
de Tecnologia y Normalizacion (INTN),  
Asuncion, Paraguay,  
to provide technical assistance in the  
area of food microbiology.

21 July - 31 August 1990

by Linda Nicolaidis

Project No. T0226

Visit Report No. R1624 (R)

Natural Resources Institute  
Central Avenue  
Chatham Maritime  
Chatham, Kent  
ME4 4TB UK

<u>Index</u>	<u>Page</u>
1.0 Background	1
2.0 Terms of Reference	1
3.0 The HACCP system and its use by local industries	2
4.0 Microbiological methods	3
5.0 Seminar on HACCP	4
6.0 Microbiological media donated to INTN	4
7.0 Action required by INTN	4
8.0 Conclusions and Recommendations	4
9.0 List of places visited and people met	6
10.0 Acknowledgements	7
Appendices	8

Report on a visit to the Instituto Nacional de Tecnología y Normalización (INTN), Asunción, Paraguay by Linda Nicolaidis. 21 July - 31 August 1990 - T0226.

1.0 Background

A six week visit was made to provide technical assistance in the area of food microbiology to the staff at INTN. This follows the visits of two previous short term TCO's from the NRI, Dr R D Cooke (1984) and Mr D R Twiddy (1986 - R1321(R)).

2.0 Terms of Reference

The terms of reference for this TC funded visit by a Spanish speaking NRI food microbiologist to Paraguay were:-

- 2.1 To advise on the setting up of Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) systems in local industries. To train counterpart staff in the principles of HACCP systems and their use in preventative quality assurance.
- 2.2 To train INTN counterpart staff (5) on:-
  - (i) The isolation and identification of the newer bacterial food pathogens, Listeria monocytogenes, Campylobacter jejuni, Yersinia enterocolitica and Aeromonas hydrophila.
  - (ii) The enumeration and identification of the spore forming pathogens, Bacillus cereus, Clostridium perfringens and C. botulinum.
  - (iii) Measurement of the growth of lactic acid bacteria in yoghurt production.
  - (iv) The use of the Howard Mould Count in food mycology.
- 2.3 To design, prepare and present a two day seminar on HACCP systems in the food industry and how they are used to control the level of contamination of food by spoilage and pathogenic micro-organisms.

3.0 The HACCP system and its use by local industries

3.1 The HACCP system is a systematic approach to assure the microbiological safety of food products. Traditional methods of quality control have relied on inspection of food processes by taking random samples for microbiological testing. The use of a HACCP system combines the considerations of the overall design of a specific food process with continuous control of food production - a preventative approach to quality assurance.

3.2 Preliminary visits were made to the following industries:-

<u>Company</u>	<u>Product</u>
(i) Soda Seltz	Bottled mineral water, carbonated and non-carbonated.
(ii) Pollos Pechugon	Chilled and Frozen chickens, chicken portions, breaded products.
(iii) OSCHI	Meat products plant - a range of cooked, processed meat products.
(iv) Doña Angela	Milk and Yoghurt production plant.
(v) Alberdin	Manufacturers of a range of fresh pasta products, breads and cream cakes.

3.3 Visits to the above listed establishments were used to demonstrate to counterparts how to carry out an audit to set up a HACCP system. Following the preparation of flow diagrams and analysis of risks of specific processes, the critical control points were identified and methods for monitoring their control were discussed (Appendix I).

3.4 Counterpart staff at INTN will be returning to each of the industries visited to discuss the principles of the HACCP system and offer their advice on its application. If required, a HACCP team can then be set up

to discuss these preliminary results with the objective of establishing the HACCP system of monitoring the quality of food products.

- 3.5 A reference manual on HACCP systems has been prepared and is being typed at INTN.

#### 4.0 Microbiological Methods

- 4.1 Methods for the isolation and identification of Listeria monocytogenes, Yersinia enterocolitica, Campylobacter jejuni and Aeromonas hydrophila were demonstrated to counterpart staff. These methods have been translated into Spanish to provide a manual on the isolation and identification of these pathogenic bacteria (Appendix II).

A survey was started at INTN to determine the frequency of isolation of Listeria monocytogenes and other Listeria species present in "queso Paraguay", a soft cheese prepared from unpasteurised milk. Listeria monocytogenes is responsible for the illness listeriosis. In healthy human beings this is not a serious disorder. However, within certain groups of the population there is a life threatening risk. Groups at risk are the very young and old, pregnant women, neonates and immunocompromised persons.

It is planned to use the results of this survey to demonstrate to the manufacturers of "queso Paraguay" the importance of using pasteurised milk for its production and the maintenance of high levels of hygiene throughout production and distribution.

The method of preparation of "queso Paraguay" and the results of the first 5 samples tested are included in Appendix III.

- 4.2 Methods for the isolation, identification and enumeration of Bacillus cereus, Clostridium perfringens and C. botulinum.

These methods were demonstrated to counterpart staff and translated into Spanish. They are included as Appendix IV.

4.3 Lactic acid bacteria in yoghurt production. Techniques used for monitoring the growth of lactobacilli and streptococci used in yoghurt production were demonstrated on industrial samples of yoghurt (Appendix V).

4.4 The Howard Mould Count. This technique, which is used to determine the level of contamination of tomato products with fungi, was demonstrated.

#### 5.0 Seminar on HACCP

A two day seminar was prepared and presented on HACCP systems in the food industry and their use to control the level of contamination of food by spoilage and pathogenic micro-organisms. Course delegates (97) included lecturers and students of the University of Asunción, research workers in local government offices and quality assurance works in industry.

The course programme and list of delegates is included as Appendix VI.

6.0 A gift of microbiological media and chemicals to the value of £1,500 was made to INTN from ODA. A complete list is included as Appendix VII.

#### 7.0 Action required by INTN

7.1 The Microbiology Section of INTN require selected items of minor equipment and microbiological media to continue their work. A costed list, prepared by the author at the request of INTN, is attached in Appendix VIII.

7.2 A list of enquiries was received from local research workers and local industries. Information will be sent to these individuals (Appendix IX).

#### 8.0 Conclusions and Recommendations

8.1 In order to maintain a team of qualified microbiologists in the microbiology section of INTN it is recommended that two of the counterpart staff be considered for TC training awards to attend the Food Microbiology course held at NRI. The next course is scheduled to

begin in March 1992. This is subject to their passing the British Council English test and having the necessary funding.

## 8.2 Collaborative programmes with INTN

a) Dra Myriam de Segovia, is coordinator of the cassava programme at INTN, and is screening all varieties of cassava grown in Paraguay for levels of residual cyanide. She is also working with the University of Asunción who are looking at the fermentation of cassava to increase levels of protein. It was requested that there could be some contact between NRI and INTN. Following a discussion with Dr N Poulter, NRI, it was agreed to maintain contact with Dr Segovia with the aim of exchanging programme ideas in the future.

b. The Nutrition laboratory would like to investigate ways of improving nutritional aspects of a range of foods, e.g. fortified foods, pasta, yoghurts and oils. In order to obtain funding for this project the author suggested to Dra Segovia that she should submit a proposal to the Institute of Foundation for Science (IFS). NRI should be listed as a collaborating institute.

c. INTN will be responsible for co-ordinating the Paraguayan programme on residues in fresh meat for export to the EEC. They will require technical help in the setting up and running of this programme. This proposal is already being considered by NRI and ODA.

9. List of places visited and people met:

The British Embassy

Edificio Patria, 4th Floor  
Pte. Franco 706 esq. O'Leary  
444472-449146.

HMA T H Steggle - Ambassador  
Mr C Q G Jebb - First Secretary  
Miss Alison Sindon - Third Secretary  
Mr I Vergara - Secretary for Aid

Institute Nacional de Tecnologia y Normalizacion

Avda General Artigas y General Roa  
Cassila de correo 967, Asunción Paraguay  
290160 - 290266. Telex 306PY

Dr Jose Martino, Director  
Dr Thomas Duarte, Administrator  
Sta Josefa Milessi, General Secretary  
Dr Miguel Gonzales Moreira, Director of Central Laboratory  
Dr Miguel Conzales Cañete, Head of the Chemists Laboratory  
Dra Miriam Torres de Segovia, Head of the Instrument Laboratory  
Ing. Carmen Mallorquin de Quiñonez, Chemist  
Dra Dora Rivelli, Head of the Food Microbiology Laboratory  
Dra Adela de Roman, Head of the Milk and Milk Products Programme  
Quim Liusa de Palacios, Microbiology Laboratory  
Industrial Analyst Ana Aguayo, Microbiology Laboratory  
Sta Adelina Schettina, Head of Information Services  
Dr Zenon Romero Mora, Innovative Technology

Food Plants visited

Alberdin - Fresh pasta products, Snr Carlos Martinez, bread and pastries  
Doña Angela - Milk and Milk, Ing Diana Figueredo de Gonzalaz  
Seltz - Mineral and sodawater, Snr Jorge Solamoni  
Pollos Pechugon - Poultry, frozen and chilled.



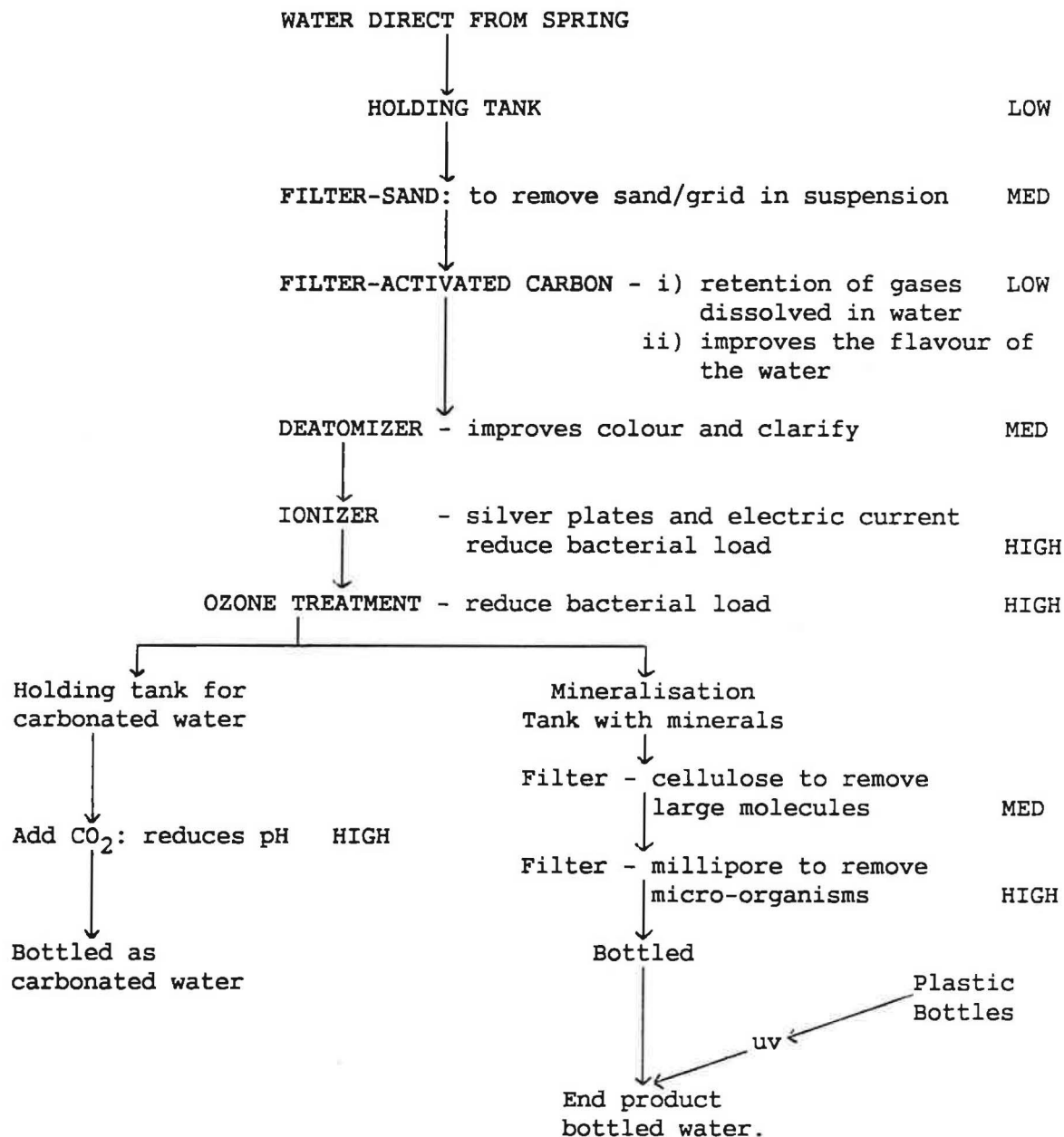
## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank all the staff at the British Embassy, Asunción and at INTN for their help and support during my visit. Special thanks are sent to Dora Rivelli, Luisa de Palacios, Adela de Roman, Ana Aguayo and Zenon Romero, my counterpart staff, and to Miriam Segovia and Carmen de Quinonez.

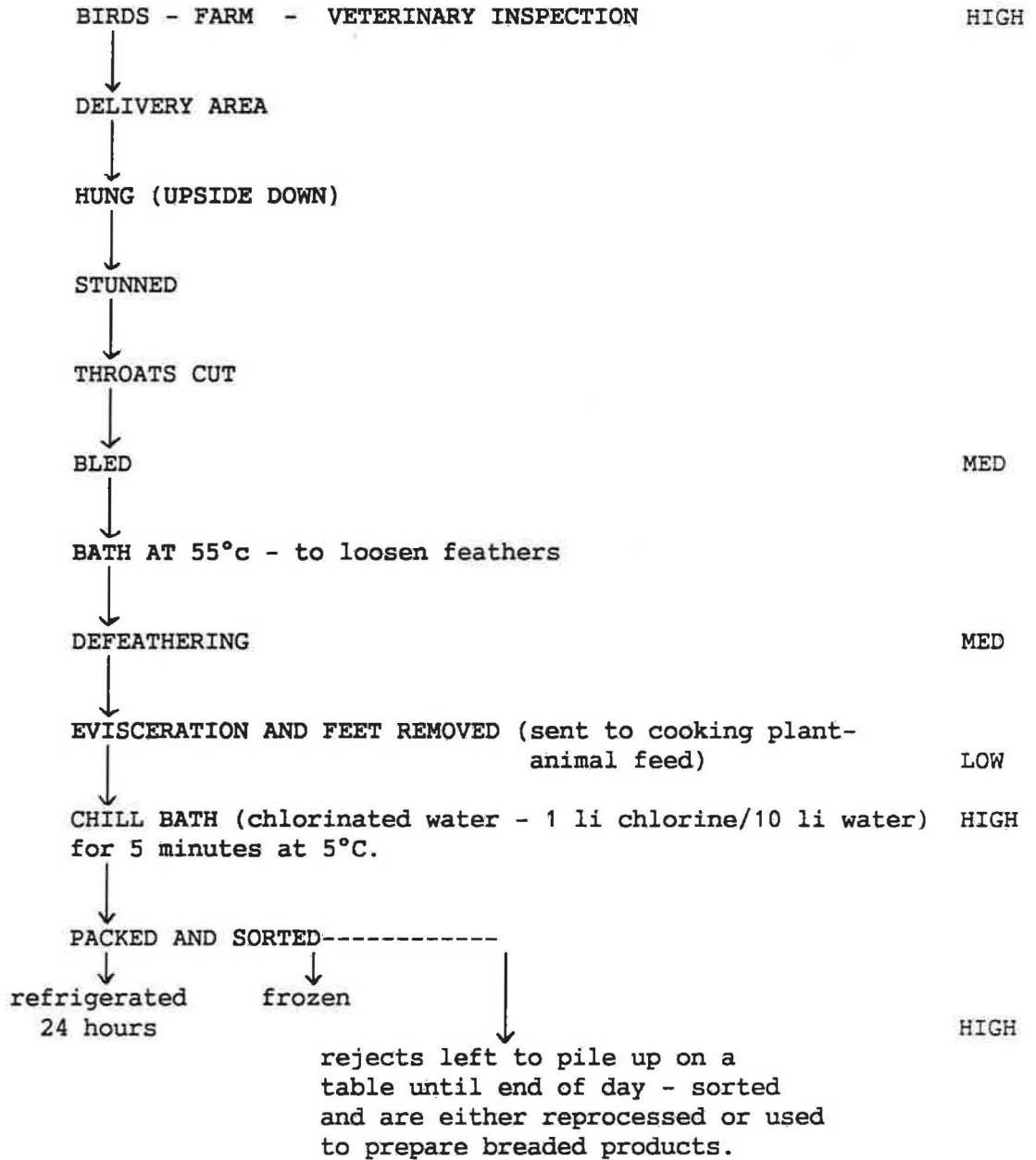
<u>List of Appendices</u>		<u>Page</u>
Appendix I	- Flow diagrams and Analysis of risks of food industries visited	9
Appendix II	- Manual for the isolation and identification of <u>Listeria monocytogenes</u> , <u>Campylobacter jejuni</u> , <u>Yersinia enterocolitica</u> and <u>Aeromonas hydrophila</u> . (In Spanish).	16
Appendix III	- "Queso Paraguay - Preparation and results of examination of examination of 5 samples for <u>Listeria spp.</u> and <u>Yersinia enterocolitica</u> .	48
Appendix IV	- Methods for the isolation and identification of <u>Bacillus cereus</u> , <u>Clostridium perfringens</u> and <u>Cl. botulinum</u> .	51
Appendix V	- Monitoring of lactobacilli and streptococci during yoghurt production.	57
Appendix VI	- Seminar on HACCP, programme and list of delegates.	60
Appendix VII	- List of microbiological media and chemicals donated to INTN.	65
Appendix VIII	- List of minor equipment and microbiological media needed to continue work at INTN. To be purchased by INTN.	67
Appendix IX	- Enquiries.	69

**APPENDIX I: FLOW DIAGRAMS AND ANALYSIS OF RISKS OF FOOD INDUSTRIES VISITED.**

**FLOW DIAGRAM 1: CARBONATED AND NON-CARBONATED WATER**

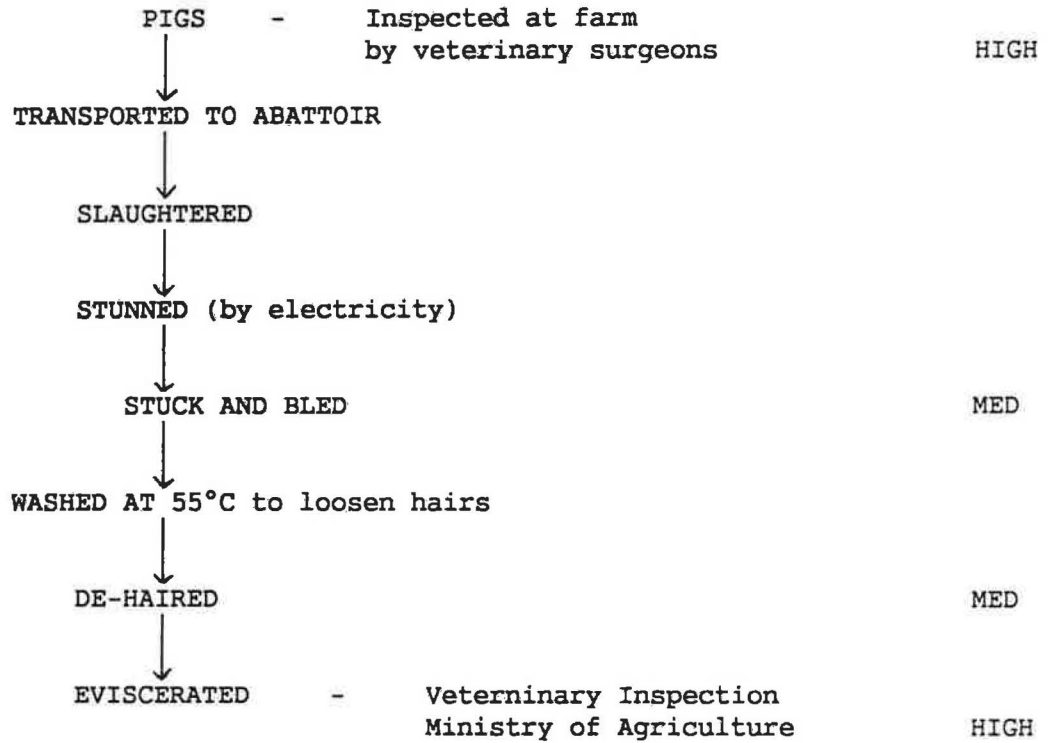


FLOW DIAGRAM 2: - CHILLED/FROZEN CHICKENS



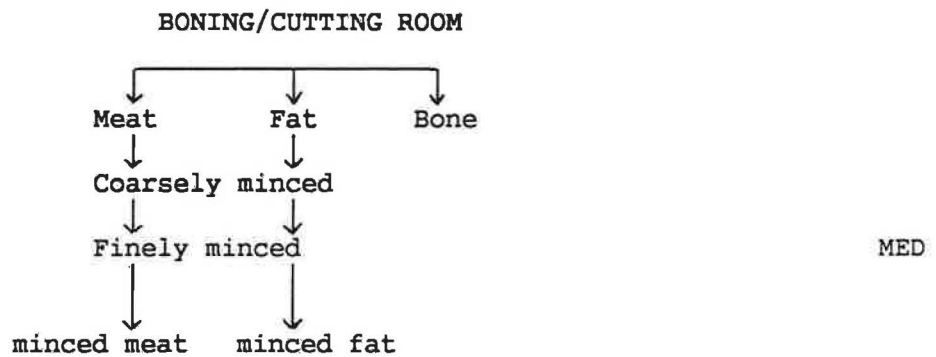
FLOW DIAGRAM 3: - PROCESSED MEAT PRODUCTS -

STAGE 1



STAGE 2

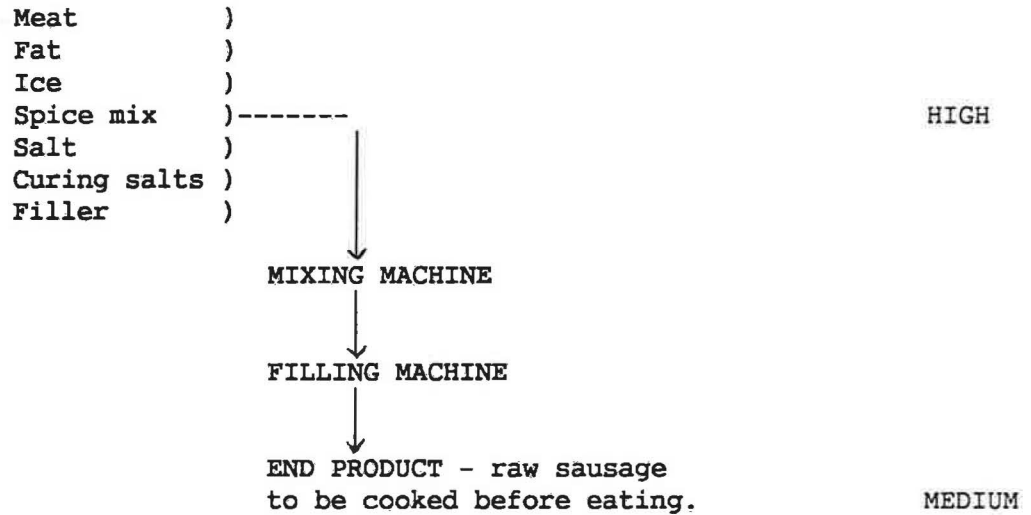
BEEF CARCASSES (With Veterinary Certificates) PORK CARCASSES HIGH



FLOW DIAGRAM 3: PROCESSED MEAT PRODUCTS (contd).

STAGE 3

a) Chorizo Parillero



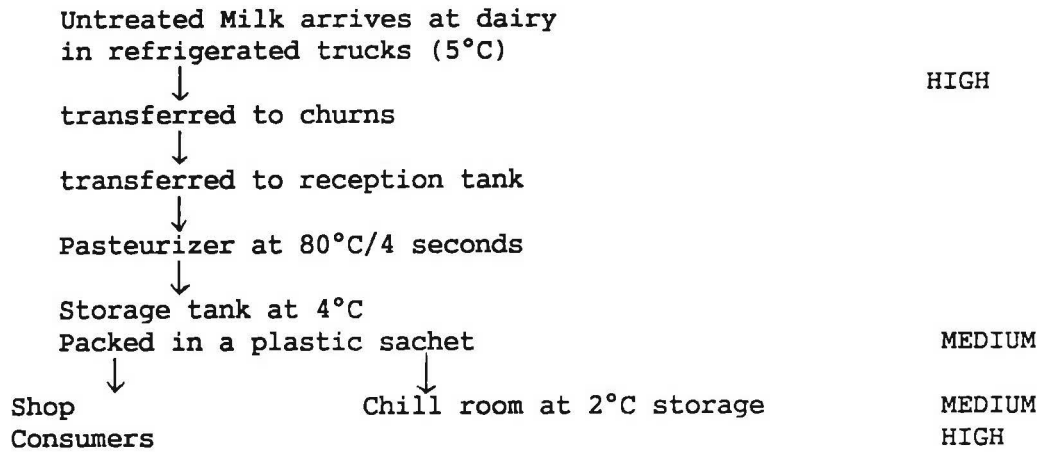
b) Smoked Products



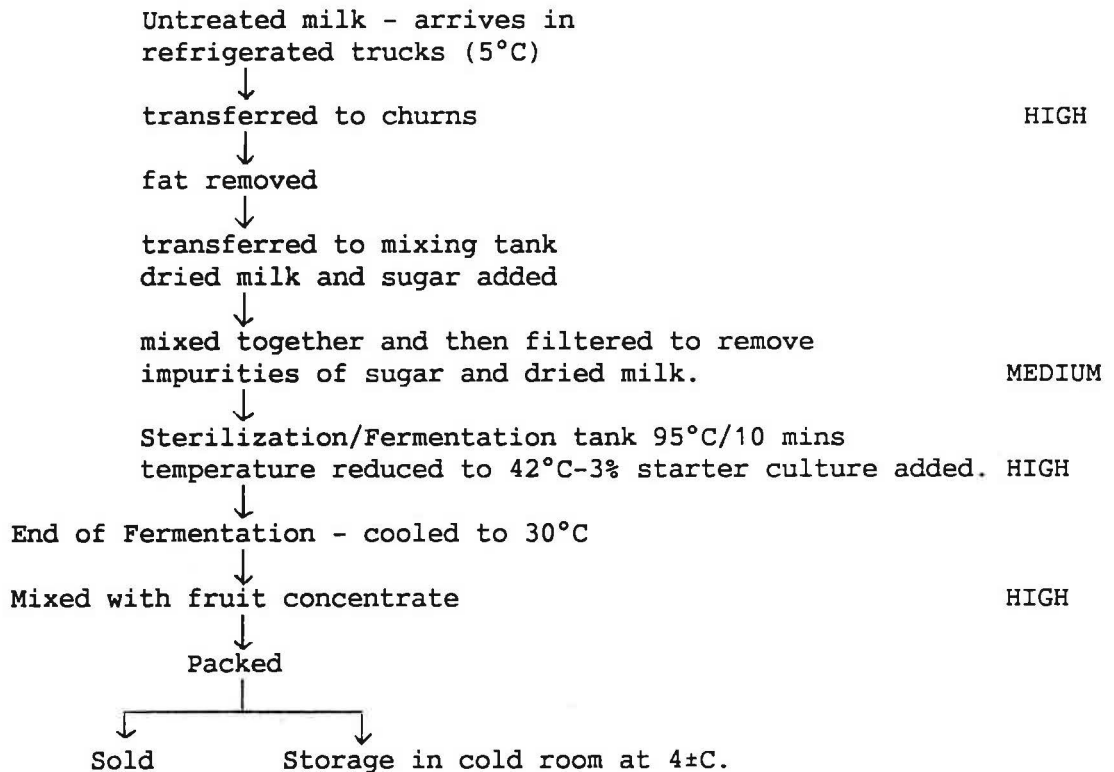
c) Ham



FLOW DIAGRAM 4a: PASTURISED MILK



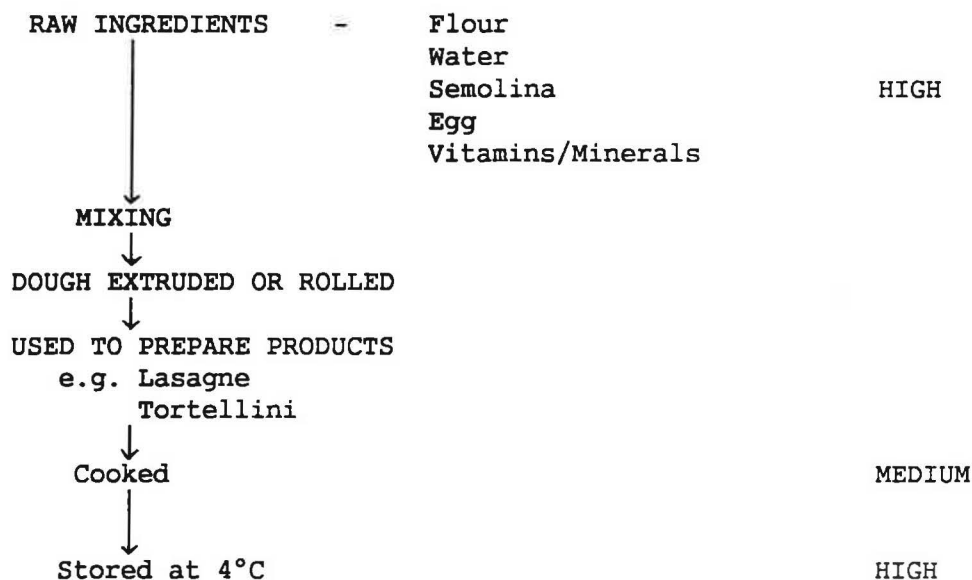
FLOW DIAGRAM 4b: YOGHURT PRODUCTION -



FLOW DIAGRAM 5: FRESH PASTA

STAGE I

Preparation of Pasta



THE NEXT STAGE

INTN staff should arrange a series of meetings with owners/staff of the various food industries visited. People present at these meetings should discuss procedures that need to be followed in order to set up control options for the control points identified:-

- (i) Most effort should be applied to the most critical areas
- (ii) There is a need to have on line control wherever possible
- (iii) A list should be prepared to demonstrate the consequence of failure
- (iv) Where possible the new system should integrate with existing factory systems
- (v) Consideration should be given to the ability of factory operatives to handle control operations.
- (vi) Legal considerations should not be ignored.

Examples of criteria for the control of CCP's are listed below:

- (i) Time/Temperature, e.g. preparation of food  
pasteurisation process  
chilling/freezing
- (ii) Acid content, e.g. fermented products



- (iii) Moisture content, e.g. dried products
- (iv) Chlorine levels in cooling water, e.g. measurement
- (v) Personal hygiene of operatives, e.g. education
- (vi) Microbiological testing.

#### Conclusions

Assurance of microbial safety and keepability of foods should be based on a preventative approach using CCP's identified by a hazard analysis of a particular food operation. All levels of management and operatives should be properly trained for the functions they perform. Procedures used for monitoring and control of critical points should be chosen for utility, reliability and accuracy. These should all be documented in operatives manuals as clear concise instructions.

Appendix II: MANUAL FOR THE ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *LISTERIA MONOCYTOGENES*, *CAMPYLOBACTER JEJUNI*, *YERSINIA ENTEROCOLITICA* AND *AEROMONAS HYDROPHILA*.

Aislamiento de *Listeria monocytogenes*

Metodo 1 - Lab M - medio de cultivo

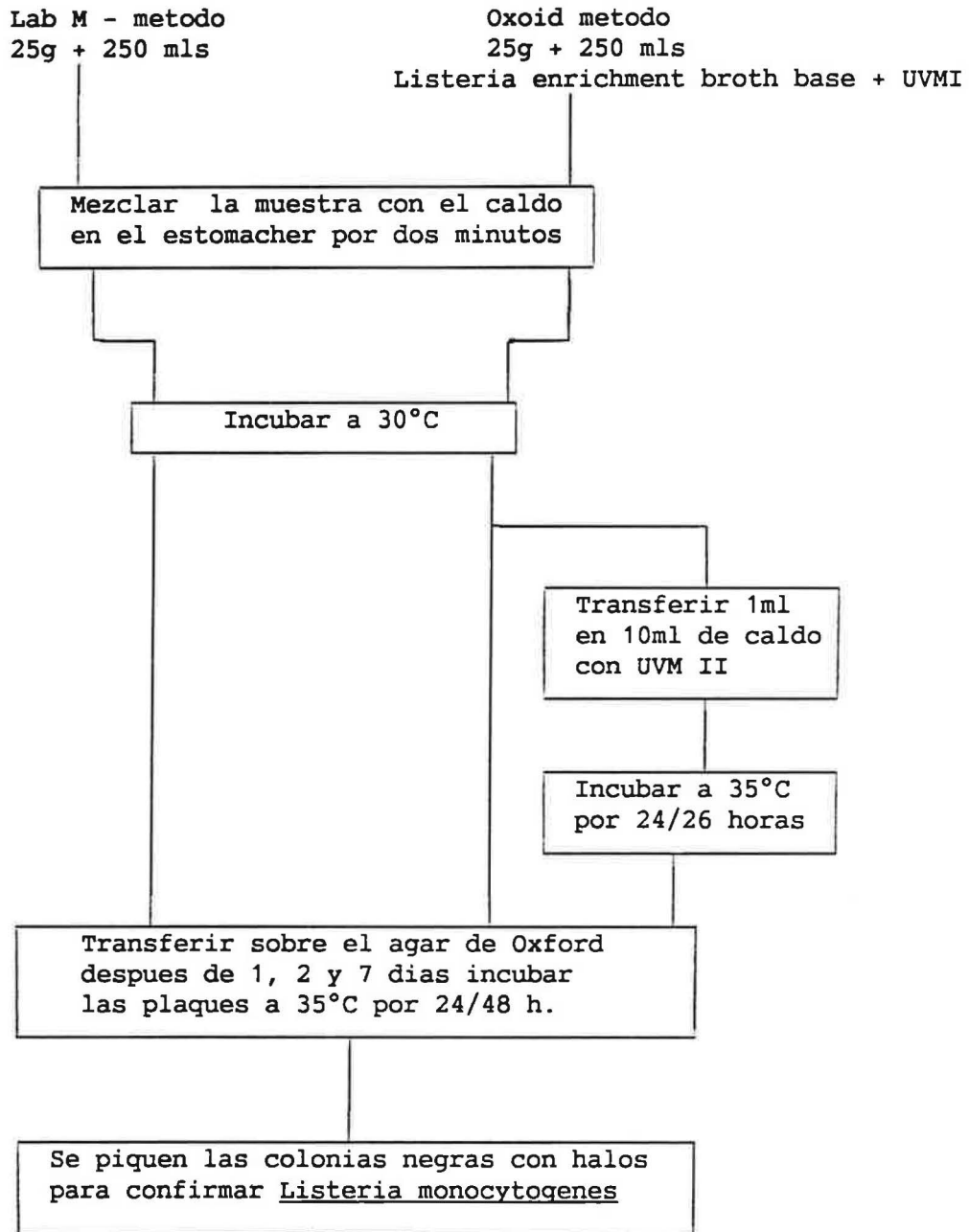
1. Agregue 25g de muestra a un recipiente de boca ancha de 500ml, el cual contenga 225ml de enriquecidos para *Listeria*. Si la muestra no se dispersa facilmente en el caldo entonces mezclala en una batidora o homogenizadora mecanica. Incube durante 24-48 horas a 30°C.
2. Transfiera con un asa de platino de la superficie del caldo enriquecidos a la superficie del medio para el aislamiento de *Listeria* (formulacion Oxford) despues de 1, 2 y 7 dias. Incube las placas a 35°C y observe si se presentan colonias caracteristicas de *Listeria spp.* despues de 24 y 48 horas.
3. Las colonias de *Listeria* tienen un color de negra con una zona de negra/cafe.
4. Recoja, con la asa de inocular estéril, dos o mas de cada tipo de colonia sospechosa de el agar para aislamiento de *Listeria* a los medios para hacer las pruebas bioquimicas.

Metado 2 - Oxoid medio de cultivo

1. Agregue 25g de muestra a un recipiente de boca ancha de 500ml, el cual contenga 225ml de enriquecidos para *Listeria* (formulacion de UVM). Si la muestra no se dispersa facilmente en el caldo entonces mezclala en una batidora o homogenizadora mecanica. Incube durante 24 horas a 30°C.
2. Transfiera con un asa de platino de la superficie del caldo enriquecidos a la superficie del caldo a la superficie del medio para el aislamiento de *Listeria* (formulacion Oxford) despues de 1, 2 y 7 dias.
3. Tambien transfiera 1ml del superficie del caldo de enriquecidos a 10ml de caldo de enriquecidos con UVM II. Se incube a 35°C.
4. Despues de 1, 2 y 7 dias transfiera con un asa de platino de la superficie del caldo de UVM II al medio para el aislamiento de *Listeria* (formulacion Oxford). Incubo las placas at 35°C y observe si se presentan colonias caracteristicas de *Listeria spp.* despues de 24-48 horas.

Listeria monocytogenes

Aislamiento de Listeria monocytogenes



## Las pruebas de caracterizacion de Listeria spp.

### 1. Caracterizacion de los colonias de Listeria spp.

Todos los grupos no tienen pigmentacion cuando crecen sobre agares non-selectivos y tienen un olor caracteristico de manteca-agrio-caramela.

Las colonias son de 1-2mm en diametro y tienen una apariencia de vidreo-cristalino-deslustrado. Casi todos forman un emulsion en solucion salina o bufer de fosfata para producir una suspencion uniforme.

### 2. Prueba para movilidad

Listeria son sacarolitica y cuando hay carbohidrato libre en el medio de cultivo va subir el pH durante la fermentacion. Por eso la mayoría de los grupos no sobreviven bajo de pH 4.3, los cultivos no tienen movilidad despues de la fermentacion.

Tambien, Listeria no producen flagellos por de bajo de 30-33°C. Por eso cuando se hace la prueba para movilidad, se usar un caldo de Infusion de cerebro y corazon a caldo nutriativo, bien inoculado y se incuba a temperaturas ambientes. Se examine la movilidad despues de 4-6 horas con la tecnica de gota suspendida. Si el cultivo no tienen movilidad, se re-examen el caldo despues de 18 horas. Todos las listerias tienen la caracteristica de movilidad - tombola. Se pueden demostrar la movilidad en un medio semi-solido. Los cultivos crecen a 2-4mm por de bajo de la superficie.

### 3. Prueba Catalasa

La mayoría de los grupos son catalasa positiva-fuerte, pero algunas condiciones pueden ser poco fuerte o ausente.

Formacion de peróxido de hidrógeno como producto final del desdoblamiento aérobico de azúcares. Este producto es toxico para las bacterias y si se deja acumular, provocara la muerte de las bacterias. La enzima catalasa desdobla el  $H_2O_2$  para formar  $H_2O$  y  $O_2$  haciendola menos peligrosa para las bacterias.

Colocar una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3.0%) en una colonia sobre agar nutritivo. La aparición de burbujas de gas en 5 minutos constituye una prueba positiva.

Nota: No se debe practicar esta prueba en agar sangre y otro medio conteniendo sangre.

#### 4. Hemolisis

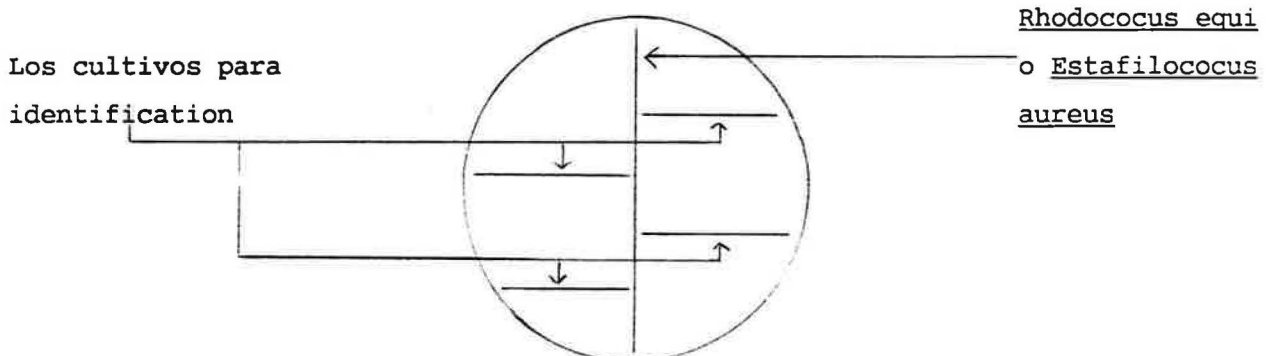
Las colonias de Listeria monocytogenes cuando crecen sobre agar sangre forman una zona cercana (1.2mm) rodeada de hemolisis con una orilla no bien diferenciada.

L. seeligeri producir una zona mas pequena de hemolisis que se puede ver solamente si se saca la colonia de la superficie del agar.

L. ivanovii producir una zona mas larga (3.5mm) y una zona mas clara que L monocytogenes y el borde de esta zona es en puntos.

#### 5. Prueba Camp

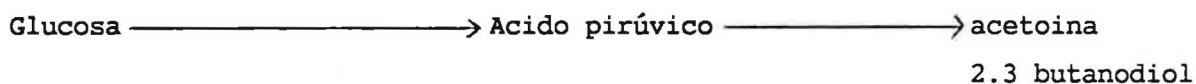
Preparar placas que contenga agar nutritivo se pone una capa de agar de sangre oveja (5%) secar los bien. Inocular el cultivo de Rhodococcus equi NCTC 1621 o Estafilococcus aureus NCTC 1803 en el centro del superficie del agar. Los cultivos para identificación se inocular a angulos rectos en relacion a R. equi o E. aureus:



Un resultado positiva esta indicado cuando hay una zona de hemolisis mas fuerte entre dos bacterias, por ejemplo L. monocytogenes tiene una reaccion positiva con Estafilococcus aureus y una reaccion negativa con Rhodococcus equi.

6. Prueba Voques-Proskaver (VP)

Inocular con cultivos puros tubos de caldo de glucosa buffer con mas peptona o extracto de levadura (1%) y incubar a 35°C por 48 horas. Transferir 1ml de cada cultivo a tubos de cultivo vacios y agregar 0.6ml de solucion de -naftol y 0.2ml de solucion de hidroxido de Potassio (40%) por 2-4 horas. Registra el desarrollo de color rosa a rojo profundo como resultado positivo.



7. Fermentación de azucars

Se usa el caldo purpura de BBL y se pone las azucars despues de esterilizacion. Poner las azucars en los caldos a las concentraciones finales salicina, D-mannitol, L-rhamnosa, D-xilosa a 1% y metil-D-mannosido a 0.5%.

Incubar los tubos a 35°C durante 7 dias.

MEDIOS DE CULTIVO

Caldo de enriqueamiento - Lab M

	Triptona	9 por litro	17.0
	Peptona de soja		3.0
	Cloruro de sodio		5.0
	Fosfato monopotasico		2.5
	Glucosa		2.5
	Extracto de levadura en polvo		6.0
	Acriflavina		0.015
Suplemento:	Acido nalidixico mg por litro		40
	Cicloheximido		50
	pH 7.3		

Disuelva los ingredientes en agua destilada y colocarlo en cantidades de 250ml en botellas con boca ancha de 500ml. Esterilize por medio de autoclave a 15 psi durante 15 minutos. Enfria a 45-50°C y pone el suplemento.

Medio para el aislamiento de Listeria

(formulacion de Oxford) - Lab M.

	Agar basal de Columbia	g por litro	41.0
	Aesculina		1.0
	Citrato de ferico ammonia		0.5
	Cloruro de sodio		15.0
	Acridflavina		0.005
Suplemento:	Cefotetan	mg por litro	2.0
	Cicloheximido		400.0
	Colistin		20.0
	Fosfomicino		10.0

Disolver los ingredientes en agua destilada y esterilize por medio de autoclave a 15 psi durante 15 minutos. Enfria a 45-50°C y pone el suplemento. Mezclarlo bien y vierta porciones de 20ml aproximadamente a cajas de Petri.

Caldo de enriquecimiento (formulacion - UVM) - Oxoid

	Peptona proteosa	5.0
	Triptona	5.0
	Polvo de 'lablemco'	5.0
	Extracto de Levaduras	5.0
	Cloruro de sodio	20.0
	Fosfato bipotasio	12.0
	Fosfato monopotasio	1.35
	'Aesculina'	1.0

pH 7.4 ±0.2

Disolver los ingredientes en agua destilada y colocarlo en cantidades de 250ml en botellas con boca ancha de 500ml. Esterilizar por medio de autoclave a 15 psi durante 15 minutos. Enfria a 45-50°C y pone el suplemento de UVM I.

Suplemento UVM 1

Acido Nalidixico 10.0mg  
hidriclorido de acriflavina 6.0mg

UVM II

Disolver los ingredients en agua destilada y colocarlo en cantidades de 10ml en botellas de 15ml (conteradores universales). Esterilizar por medio de autoclave a 15 psi durante 15 minutos. Enfria a 45-50°C y pone el suplemento de UVM II.

Suplemento UVM II

Acido nalidixico 10.0mg  
hidroclorido de acriflavina 12.5mg

Caldo de infusion de cerebro y corazon

Infusion de cerebro de ternera enforma solido a por litro	12.5
Infusion de corrazon de vaca en forma solido	5.0
Peptona proteosa	10.0
Dextrosa	2.0
Cloruro de sodico	5.0
Fosfato disodio	2.5

pH 7.4 ± 0.2

Disuelva los ingredientes en 1 litro de agua destilada. Hagase porciones de 10ml. Esterilize por medio de autoclave a 15 psi durante 15 minutos.



Agar base de sangre No. 2

Peptona proteosa g por litro	15.0
Digeridadi higado	2.5
Extracto de Levadura en polvo	5.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	12.0

pH 7.4 ± 0.2

Disolver los ingredientes en agua destilado caliente y hervir para disolver al agar. Esterilizar a 15 psi for 15 minutos. Enfriar a 50°C y agregar 7-10% de sangre de caballo desfibrinada. Vacias en cajas de Petri.

Caldo de nutritivo

Polvo de lab-lemco g por litro	1.
Extracto de Levadura en polvo	2
Peptona	5
Cloruro de Sodio	5

pH 7.4 ± 0.2

Disolver en agua destilada. Se mezcla bien y se distribuye en los recipientes definitivos. Se esteriliza en el autoclave durante 15 minutos.

Agar Nutritivo

Lab lemco en polvo g or litro	1
Extracto de Levadura	2
Peptona	5
Cloruro de Sodio	5
Agar	15

pH 7.4

Se suspenden los ingredientes en agua destilada y se hierve hasta disolver el medio por completo. Se esteriliza en el autoclave a 121°C durante 15 minutos.

## Referencias

1. McLaughlin J. Listeria monocytogenes, recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. J Appl Bact 1987; 63: 1-11.
2. McLaughlin J, Saunders, N A, Ridley A M, Taylor A G. Listeriosis and food-borne transmission. Lancet 1988; i: 177-8.
3. Anon. Report from the PHLS CDSC. Br Med J (Clin Res) 1986; 292: 1385-6.
4. Anon. Editorial: Listeria infections in farm animals. Vet Rec 1983; 112: 314.
5. Gitter M. A changing pattern of ovine listeriosis in Gt. Britain. In Proceedings of the 9th International Symposium on Problems of Listeriosis . ed Courtieu AL, Espase EP, Reynaud AE. 1986 Universite de Nantes. pp 294-9.
6. Fenlon D R. Wild birds and silage as reservoirs of Listeria in the agricultural environment. J. Appl Bact. 1985; 59: 537-43.
7. Burn O G. Clinical and pathological features of an infection caused by a new pathogen of the genus Listerella. Am J Pathol 1936; 12: 341-8.
8. Schlech W F, Lavigne, P M, Bortolussi R A et al. Epidemic listeriosis: Evidence for transmission by food. N. Engl. J Med 1983; 308: 203-6.
9. Fleming, D W, Cochi S L, MacDonald K L. et al. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. N. Engl J Med 1985; 312: 404-7.
- 10 James, W M, Fannin S L, Agree, B A, et al. Listeriosis outbreak associated with Mexican-style Cheese - California. Morb Mortal Wk Rep 1985; 34: 357-9.
11. Bannister B A. Listeria monocytogenes meningitis associated with eating soft cheese. J infect 1987; 15: 165-8.

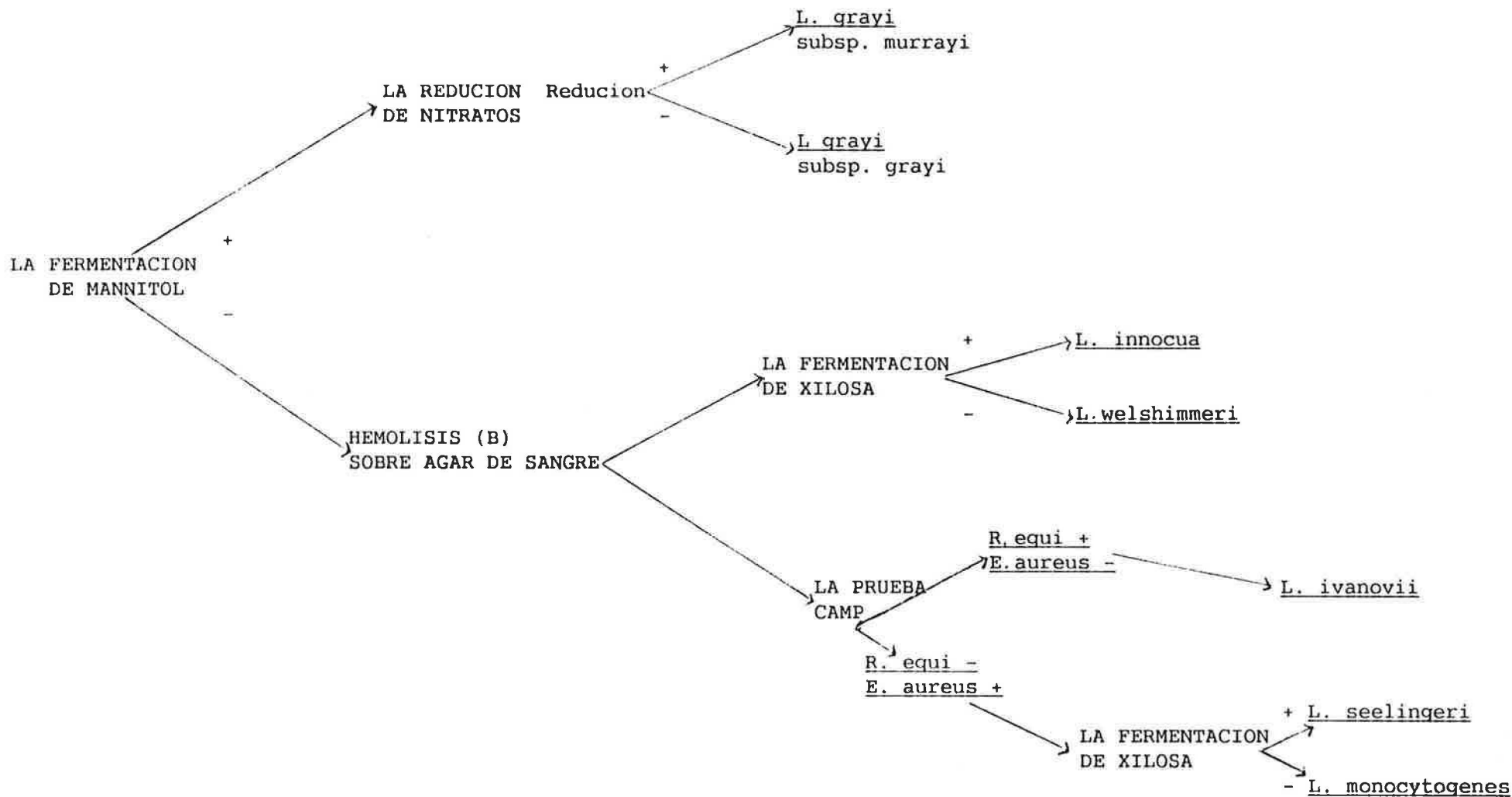
12. Rocourt J, Grimont F, Grimont P A D, Seeliger H P R. DNA relatedness among serovars of Listeria monocytogenes sensu lato. Curr Microbiol 1982; 7: 383-8.
13. Skerman V B D, McGowan V, Sneath P H A. Approved lists of bacterial names. Int J Syst Bact 1980; 30: 225-420.
14. Moor W E C, Cato E P, Moore L V H. Index of the bacterial and yeast nomenclatural changes published in the International Journal of Systematic Bacteriology since the 1980 approved lists of bacterial names (1 January 1980 to 1 January 1985). Int. J Syst Bact 1985; 35: 382-407.
15. Rocourt J, Seeliger H P R. Distribution des especes du genre Listeria. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol (A) 1985; 259: 317-30.
16. Busch L A. Human listeriosis in the United States: 1967-1969. J. Infect Dis 1971; 123: 328-32.
17. Rocourt J, Schreutenbrunner A, Hof H, Espaze E P. Une nouvelle espece du genre Listeria: Listeria seeligeri. Path Biol 1987; 35: 1075-80.
18. Rocourt J, Schrettenbrunner A, Seeliger H P R. Differentiation biochimique des groupes genomiques de Listeria monocytogenes (sensu lato). Ann Microbiol (Paris) 1983; 134A: 65-71.
19. PHLS. Safety Precautions: Notes for guidance. Third Edition, 1988.

La diferenciación de los especies del genero de Listeria

	<u>L.monocytogenes</u>	<u>L. ivanovii</u>	<u>L.innocua</u>	<u>L.welshimeri</u>	<u>L.seeligeri</u>	<u>L. grayi</u> subsp. grayi	<u>L. grayi</u> subsp. murrayi
Tincion de Gram	+ bacillus	+ bacillus	+ bacillus	+ bacillus	+ bacillus	+ bacillus	+ bacillus
Movilidad a 22°C	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+
Hemolisis (B) sobre agar de sangre	+	++	-	-	(+)	-	-
Los nitratos se reducen a nitritos	-	-	-	-	-	-	+
Prueba de CAMP							
(i) con <u>Estaphilococcus aureus</u>	+	-	-	-	(+)	-	-
(ii) con <u>Rhodococcus equi</u>	-	+	-	-	-	-	-
Produccion de acido de:-							
(i) D-mannitol	-	-	-	-	-	+	+
(ii) L-rhamnosa	+	-	v	v	-	-	v
(iii) D-xilosa	-	+	+	+	+	-	-
(iv) α - methyl D-mannido	+	-	+	+	v	NS	NS

V = reacion variable    ( ) = reacion flojo    ns = no es en la literatura

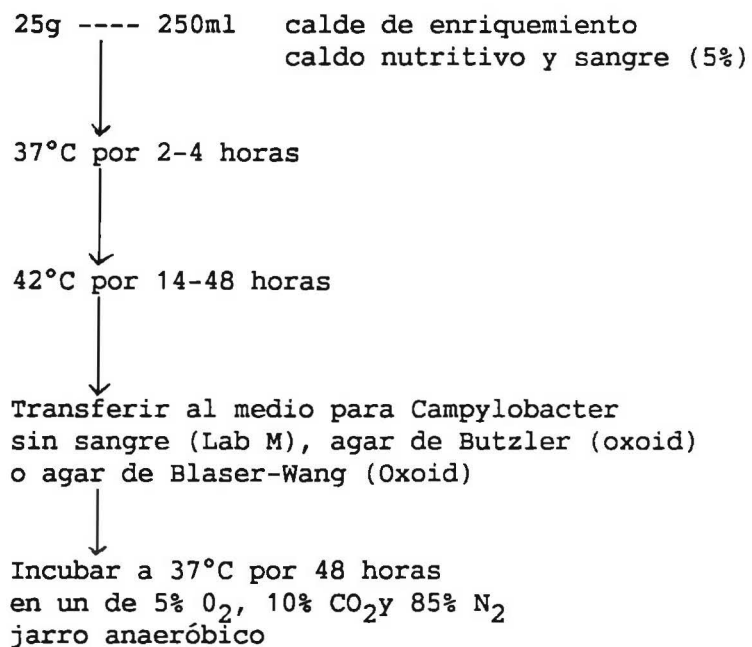
Clave dicotomo para la identificacion de los especies de Listeria



Aislamiento de Campylobacter jejuni

1. Agregue 25g de muestra a un recipiente de boca ancha de 500ml, el cual contenga 225ml caldo nutritivo con 5% sangre de caballo. Si la muestra no se dispersa facilmente en el caldo de enriquecimiento entonces mezcla la en una batidora o homogenizadora mecanica por 2 minutos. Incube durante 2 a 4 horas a 37°C y despues durante 14-48 horas a 42°C.
2. Transfiera con un asa de platino de la superficie del caldo enriquecido a la superficie de agar para Campylobacter sin sangre (Lab M), al agar de Butzler (Oxoid) y al agar de Blaser-Wang (Oxoid). Incube las placas a 35°C y observe si se presentan colonias caracteristicas de Campylobacter despues de 24 horas.

Aislamiento de Campylobacter jejuni



### Pruebas confirmatorias

Tinción de Gram	negativo - bacili
Catalasa	positivo
Crecimiento a 42°C	positivo
"    33°C	negativo
"    25°C	negativo
Hidrolisis del hipurito	positivo
Producción de DNase	positivo

### MEDIO DE CULTIVO

#### Caldo de enriquecimiento - Campylobacter

Peptona de carne	g por litro	10.0
Hidrolisada de leche y huevos		5.0
Extracto de Levadura en polvo		5.0
Cloruro de sodio		5.0
Hemin		10.0
Pyruvato de Sodio		0.5
Acido Ketoglutamico		1.0
Metabisulfito de Sodio		0.5
Carbonate de sodio		0.6

pH 7.4 ± 0.2

#### Suplemento

Concentracion final:-

Cefoperazona	mg per litro	20
Vancomycin		20
Trimethoprim		20
Ciclohexamida		50

Disuelva el polvo en agua deionizada y mezcla lo bien. Se pone 250ml en botellas con boca ancha de 500ml. Esteriliza a 121°C por 15 minutos. Enfria a 50°C y pone el suplemento y sangre de caballo (lysed).

Medio para Campylobacter sin sangre

Peptona	g per litro	25.0
Carbon-bacteriologico		4.0
Cloruro de sodio		3.0
Desoxycolato de sodio		1.0
Sulfato de hierro		0.25
Pyruvata de sodio		0.25
Agar		12.0

pH 7.4 ± 0.2

Suplemento:

Concentracion final:-

Cerfoperazona	mg per litro	32
Amfoteracin		10

Disuelva los ingredientes en agua deionizada. Esteriliza a 121°C por 15 minutos. Enfria a 47°C y se pone el suplemento. Agregarlo a cajas de Petri estériles.

Medio selectivo para Campylobacter - Butzler

Se prepara 500 ml de Agar Columbia, Base de agar sangre No. 20 Base de Medio para Brucella. Esteriliza a 121°C por 15 minutos y enfria a 50°C Se pone. Sangre desfibrinada de caballo (5-7%) y un vial del suplemento. Se mezcla suavemente y se distribuye en placas de Petri esteriles.



Suplemento:-

per vial (500ml)

Bacitracina	12,500 unidades
Cicloheximida	25 mg
Sufato de colistina	5,000 unidades
Cefazolina sodica	7.5 mg
Novobiocina	2.5 mg

Para rehidratar el vial se anaden de forma aseptica 3 ml de una solucion al 50% de etanol en agua y se gira a través de un eje imaginario en perpendicular el vial hasta disolver.

Medio selectivo para Campylobacter (Blazer-Wanq)

Se prepara 500 ml de agar Columbia, base de agar sangre No. 2 o Base de medio para Brucella. Esteriliza a 121°C por 15 minutos y enfria a 50°C. Se pone sangre desfibrinada de caballo (5-7%) y un vial del suplemento. Se mezcla suavemente y se distribuye en placas de Petri esteriles.

Suplemento:-

por vial (500ml)

Vancomicina	5mg
Polimixina B	1,250 IU
Trimetoprim	2.5mg
Amfotericin B	1.0mg
Cephalothin	7.5mg

Para rehidratar el vial se anaden de forma aseptica 2ml de agua destilada esterile.

### Caldo nutritivo

Lab-lemco en polvo	g por litro	1
Extracto de levadura en polvo		2
Peptona		5
Cloruro de sodio		5

pH 7.4

Disuelva los ingredientes en agua destilada. Mezcla lo bien y se distribuye en los recipientes en cantidades de 10 mls. Esterilize a 121°C por 15 minutos.

### Agar nutritivo

Lab lemco en polvo	g per litro	1
Extracts de levadura		2
Peptona		5
Cloruro de sodio		5
Agar		15

pH 7.4 (aprox)

Disuelva los ingredientes en agua destilada y se hierve hasta disolver el medio por completo. Se esteriliza en el autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se distribuye en placas de Petri esteriles.

### DNase agar

Triptosa	g por litro	20
Acido desoxirribonucleico		2
Cloruro de sodio		5
Agar		12

pH 7.3

Se disuelva los ingredientes en agua destilada y se hierre hasta disolver el medio por completo. Se esteriliza en el autoclave a 121°C durante 15 minutos.

### Tecnica

Se inoculan las placas sembrando en boton el microorganismo sobre la superficie del agar de forma que se produzca un crecimiento denso despues de 18 horas de incubacion. Se inundan las placas con acido clorhidrico IN y se observa si se forman zonas de aclaramiento alrededor de los botones (DNasa positivo).

### Caldo de hipurito de sodio

(Caldo de Cerebro Corazon)	g per litre
Infusion de cerebro de ternero en forma solida	12.5
Infusion de corazon de vaca en forma solida	5.0
Peptona proteosa	10.0
Dextrosa	2.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato disodico	2.5

pH 7.4

Se pone hipurito de sodio (1%)

### Reactive de cloruro acido ferrico

Cloruro ferrico, aqueous $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	13.9g
HCL conc	2.5 ml
Agua destilada	100.0 ml

### Control de calidad de reactivo

1. Se necesita hacer esto antes de poner el reactivo en algunes tubos tests con microorganismos puros.

## 2. Control negativo

- (a) Se pone 0.8ml de caldo con cultivo
- (b) Se pone 0.2ml de reactivo  $\text{FeCl}_3$  (12%)
- (c) Se agita lentamente - inmediatamente
- (d) se deja por 10-15 minutos antes de interpretar los resultados, se agita a veces.

### Si es negativa

- (a) No hay precipitacion dentro de los 15 minutos. O el precipitado se va a desolver cuando se agita.
- (b) El ion hierro esta presente en exceso
- (c) Hacer la prueba con las bacterias.

### Si es positiva

- (a) La precipitacion no se va a disolver o ser clara dentro de 10-15 minutos de agitar.
- (b) Los iones de hierro no estan en exceso
- (c) Se titula  $\text{FeCl}_3$  para determinar la cantidad optima de reactivo que se necesita para va si esta en exceso.

## 3. Titulacion de reactivo de $\text{FeCl}_3$

- (a) Se preparan tubos con cultivos puros de 1.0 ml luego se agrigan rapidamente a cada uno de ellos 0.2, 0.3, 0.4 y, 0.5ml.
- (b) Se agita inmediatamente
- (c) Se deja por 10-15 minutos antes de interpretar los resultados - se agitan ocasionalmentre
- (d) El nivel de concentracion mas pequeno de  $\text{FeCl}_3$  que produce una solucion clara se indica como iones  $\text{Fe}^{\text{III}}$  en exceso. Se usa esta cantidad para a preuba (muestra problema)
- (e) Hacer la prueba sobres los microorganismos.

#### 4. Control Positivo

- (a) Hay un precipitado muy pesado despues de 10 a 15 minutos se agita ocasionalmente
- (b) El hipurato se hidrolisa.

El metodo para los microorganismas en preuba

1. Se pone una cantidad apropiada del reactivo a todos los tubos
2. Se agitan lentamente
3. Se deja 10 a 15 minutos antes de la interpretacion de los resultados con agitacion.

#### REFERENCIAS

- Blaser, M J., Hardesty, H.L., Powers, B. and Wang, W-L. 1980 Survival of Campylobacter fetus subsp. jejuni in biological milieus. Journal of Clinical Microbiology 11, 309-313.
- Blaser, M J., Cravens, J., Powers, B.W., Laforce, F.M. and Wang, W-L. L. 1979. Campylobacter enteritis associated with unpasteurized milk. The American Journal of Medicine 67, 715-718.
- Butzler, J. P and Skirrow, M.B. 1979. Campylobacter enteritis. Clinics in Gastroenterology 8, 737-765.
- Guerrant, M.D., Lahita, R.G., Winn Jr., W.C., Roberts, R.B. 1978. Campylobacteriosis in man: Pathogenic mechnisms and review in 91 bloodstream infections. The American Journal of Medicine 65, 584-592.
- Harvey, S.M. 1980. Hippurate hydrolysis by Campylobacter fetus. Journal of Clinical Microbiology 11, 435-437.
- Karmali, M.A. and Fleming, P.C. 1979. Campylobacter enteritis. Canadian Medical Association Journal 120, 1525-1532.

- Morris, J. A. and Park, R.W.A. 1971. The isolation of microaerophilic vibrios. "Isolation of Anaerobes" Edited by Shapton, D.A. and Board, R.G. Academic Press, London. Pages 207-217.
- Smibert, R.M. 1978. The genus Campylobacter. Annual Review of Microbiology 32, 673-709.
- Ullman, U. 1979 Methods in Campylobacter. Methods in Microbiology 13, 435-452 (chapter 10), Edited by Bergan, T. and Norris, J.R. Academic Press, London.
- Veron, M. and Chatelain, R. 1973. Taxonomic study of the genus Campylobacter Sebald and Veron and designation of the neotype strain for the type species, Campylobacter fetus (Smith and Taylor) Sebald and Veron. International Journal of Systematic Bacteriology 23, 122-134.
- Botton, F.J., Hutchinson, D.N., Parker, G. 1988. Reassessment of Selective agars and Filtration Technique for Isolation of Campylobacter species from faeces. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis 7 p155-160.
- Botton, F.J., Hutchinson, D.N., Parker G (1987) Campylobacter: What are we missing J Clin. Path. 40 p702-703.
- Goosens, H., De Boeck, M., Coignau, H., Vlaes, L., Van Der Borne, C., Butzler, J.P. 1986. Modified Selective Medium for isolation of Campylobacter spp from faeces. Comparison with Preston Medium A Blood Free Medium and a Filtration System. J. Clin. Micro. 24 p840-843.
- Gun-Munro, J., Rennie, R.P., Thornley, J.H., Richardson, H.L., Hodge, D., Lynch, J. 1987. Laboratory and Clinical Evaluation of Isolation Media for Campylobacter jejuni. J. Clin. Micro 25, p2274-2277.
- Herbert, G.A., Hollis, D.G., Weaver, R.E., Karmali, M.A., Simor, A.E., Roscoe, M., Fleming, P.C., Smith, S.S., Lane, J., 1986. Evaluation of a Blood Free, Charcoal based, Selective Medium for the Isolation of Campylobacter organisms from faeces. J. Clinical Microbiology 23, 456-459.

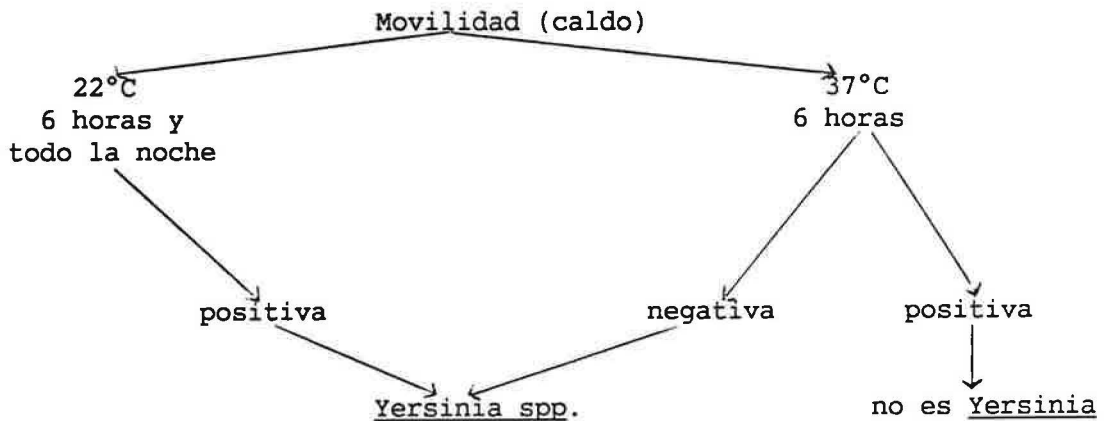
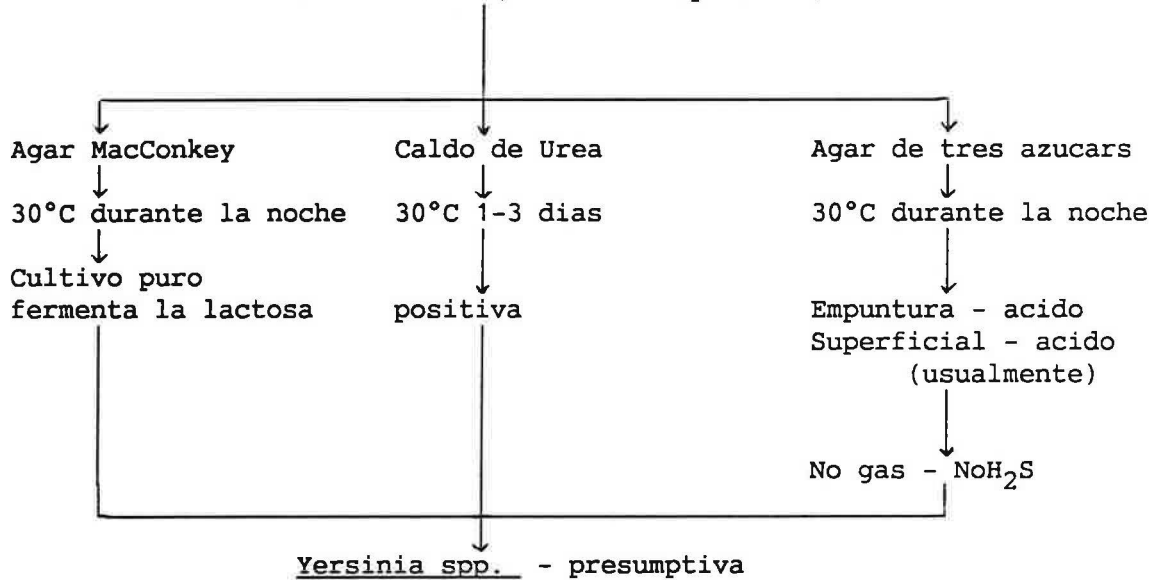
### Aislamiento de Yersinia enterocolitica

1. Agregue 25g de muestra a un recipiente de boca ancha de 500ml, el cual contenga 225ml de agua de peptona buffer (BPW). Si la muestra no se dispersa facilmente en la BPW entonces mézclala en una batidora o homogenizadora mecanica por 2 minutos. Incube durante 3 semanas a 4°C.
2. Transfiera con un asa de platino de la superficie del caldo enriquecido a la superficie de agar C.I.N. despues de 1, 2 y 3 semanas. Incube las placas a 30°C y observe si se presentan colonias caracteristicas de Yersinia despues de 24 horas.
3. Recoja, con la asa de inocular estéril, dos o mas de cada tipo de colonia sospechosa de el agar C.I.N. a medio inclinado de agar triple de azacury hierro (TSI), a una placa del medio MacConkey agar y a un caldo de urea.
4. Incube los medios a 30°C durante 24-72 horas. Anote las reacciones describas a continuación.

Aislamiento de Yersinia enterocolitica

25g + 225 ml agua de peptona buffer (1%)  
 ↓  
 Incubar a 4°C por 3 semanas  
 ↓  
 Transferir sobre C I N agar  
 despues de 1, 2 y 3 semanas.  
 ↓  
 Incubar a 30°C por 24 horas  
 Colonias tipicas - oscura rojo, como ojos de vaca con una zona clara rodeandolas; con un margen entero y la superficie llana; algunos especies tiene margenes y superficies irregulares.

Pruebas de confirmación (Pruebas bioquimicas)





Identification de Yersinia spp.

	saccharosa	rhamnosa	melibiosa	Movilidad a 22°C	a 37°C	Urea
<u>Y. enterocolitica</u>	+	-	-	+	-	+
<u>Y. frederiksenii</u>	+	+	-	+	-	+
<u>Y. intermedia</u>	+	+	+	+	-	+
<u>Y. kristensenii</u>	-	-	-	+	-	+
<u>Y. pseudotuberculosis</u>	-	+	+	+	-	+

Medios de cultivo

Aqua de Peptona Buffer

Peptona	g per litro	10.0
Cloruro de sodio		5.0
Fosfato disódico		3.5
Fosfato monoposásico anhidro		1.5

pH 7.2 (aproximadamente)

Disuelva los ingredientes en agua destilada y vierta porciones de 225 ml de la solución en botellas de boca ancha y tapa de rosca de 500ml. Esterilize por medio de autoclave a 15 psi durante 15 minutos.

Agar de C.I.N.

(Agar de Cefsulodine - Irgazan - Novobiocin)

Peptona	g per litro	20.0
extracto de levaduras		2.0
mannitol		20.0
acido pyruvico (sal de sodio)		2.0
cloruro de sodio		1.0
Sulfato de magnesio 7.H <sub>2</sub> O		0.01
desoxycholato de sodio		0.5
agar		12.0
agua distilada		949.0

Calenta para disuelva los ingredientes. Enfria a 80°C y se pone 1.0ml de una soln solución (0.04%) de Irgasan (Ciba-Geigy) en etanol (95%). Mezcla lo bien y enfria a 50-55°C. Se pone las siguientes soluciones.

hydroxido de sodio 5N	1.0
rojo neutro 3 mg/ml	10.0
Violeta cristal 1.0 mg/ml	10.0
Cefsulodin (Abbott o Takeda) 1.5 mg/ml	10.0
Novobiocin (Upjohn) 0.25 mg/ml	10.0

Se pone 10ml de chloro de strontio (10%), esterilizado por filtro. Modifica el pH a 7.4

### Agar Triple de Azucar y Hierro

Extracto de carne	g per litro	3.0
Extracto de levadura		3.0
Peptona		20.0
Cloruro de sodio		5.0
Lactosa		10.0
Sucrosa		10.0
Glucosa		1.0
Citrato férrico		0.3
Tiosulfato de sodio		0.3
Rojo de fenol (solución 0.2%)		12.0 ml
Agar		12.0

pH 7.4

Disuelva los ingredientes en agua tibia lleve la solución a punto de ebullición para disolver al agua. Ponga porciones de 10ml en totalles tipo universal y esterilize en autoclave a 15 psi ( $1.0\text{kg}/\text{cm}^2$ ) durante 15 minutos). Incline las botellas a enfriar para producir medios inclinados.

### Fermentacion de azucars

#### Caldo de rojo fenol

Peptona	g per litro	10
extracto de carne		1
Cloruro de sodio		5
rojo fenol		0.018

Disuelva los ingredientes en agua destilada. Ponga porciones de 9 ml en totales tipo Universales y esterilize en autoclave a 15 psi durante 15 minutos. Preparar los azucars y esteriliza los en (i) autoclave 10 psi durante 20 minutos o (ii) con filtración Millipore. Se pone la cantidad de azucar a concentracion final a 0.5 - 1.0%.

## REFERENCIAS

- Aulisio, C C G, Mehlman, I J and Sanders, A C. 1980. Alkali method for rapid recovery of Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis from foods. *Appl. & Env. Microbiol.* 39, 135-140.
- Berche, P A and Carter, P B. 1982. Calcium requirement and virulence of Yersinia enterocolitica *J. Med. Microbiol.* 15, 277-284.
- Bhaduri, S., Conway, L K and Lachica, R V. 1987. Assay of crystal violet binding for rapid determination of virulent plasmid-bearing clones of Yersinia enterocolitica. *J. Clin. Microbiol.* 25. 1039-1042.
- deBoer, E and Seldam, W M 1987. Comparison of methods for the isolation of Yersinia enterocolitica from porcine tonsils and pork. *Int. J. Food Microbio.* 5, 95-101.
- Fukushima, H. 1985. Direct isolation of Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis from meat. *Appl. & Env. Microbiol.* 50, 710-712.
- Fukushima, H. 1987. New selective agar medium for isolation of virulent Yersinia enterocolitica. *J. Clin. Microbiol.* 39, 135-140.
- Greenwood, M H and Hooper, W.L. 1985. Yersinia spp. in foods and related environments. *Food Microbiology*, 2 163-269.
- Greenwood, M H and Hooper, W L. 1988. The use of alkalinity and incubation at 9°C for improved recovery of Yersinia spp. *Epidemiology and Infection*, in the press.
- Greenwood, M H and Hooper W L. Improved recovery of Yersinia spp. from milk. In preparation.
- Jagow, J and Hill, W E, 1986. Enumeration by DNA colony hybridization of virulent Yersinia enterocolitica colonies in artificially contaminated food. *Appl. & Env. Microbiol.* 51 441-443.

- Schiemann, D A 1982. Development of a two-step enrichment procedure for recovery of Yersinia enterocolitica from food. Appl. & Env. Microbiol. 43, 14-27.
- Schiemann, D A 1982. Comparison of enrichment and plating media for recovery of virulent strains of Yersinia enterocolitica from inoculated beef stew. J. Food Prot. 46, 957-964.
- Walker, S J and Gilmour, A. 1986. A comparison of media and methods for the recovery of Yersinia enterocolitica and Yersinia enterocolitica-like bacteria from milk containing simulated raw milk microfloras. J. Appl. Bact. 60, 175-183.

## Enumeracion de Aeromonas hydrofila

### Preparar la muestra

Pesar 30 g de muestra a analizar, agregar 270ml de diluyente esteril (peptona 0.1%) y macerar la mezcla en un atomix blender o en un Stomacher Colworth, dandonos una dilución de  $10^{-1}$ . Utilizando una pipeta esteril se transfiere 1ml de la dilución  $10^{-1}$  a una botella o tubo conteniendo 9 ml de diluyente esteril, esto nos proporciara una dilución de  $10^{-2}$ . Repitiendo el proceso se preparan diluciones de  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , y  $10^{-5}$ .

### Conteo Total

Se usa el método de siembra por extencion en superficie.

Utilizar cajas de Petri que contengan 15 ml de agar de almidón - ampicillina o agar de aeromonas (Oxoid).

Pipetear 0.1ml de muestro diluida en la superficie del agar y extender el inócula utilizando un bastón de cristal estéril (hockey stick). Placas enduplicados deben ser preparadas para cada dilución luego deben secarse a incubarse a  $28^{\circ}\text{C}$  (temperatura ambient) por 24 horas.

### Agar de almidón

Al final de incubacion se pone cerca de 5 ml de iodo de lugol sobre las colonias. Se cuente todas que sean 3-5mm en diametro que producir amylasa (con una zona clara) y con un color de amarillo a miel.

### Agar de Aeromonas (Ryans)

Se cuente las colonias con un color verde oscuro. Recoja, con la asa de inocular estéril, dos o mas de cada tipo de colonia sospechosa de el agar AAA o AA, a medio para las pruebas bioquimicas.

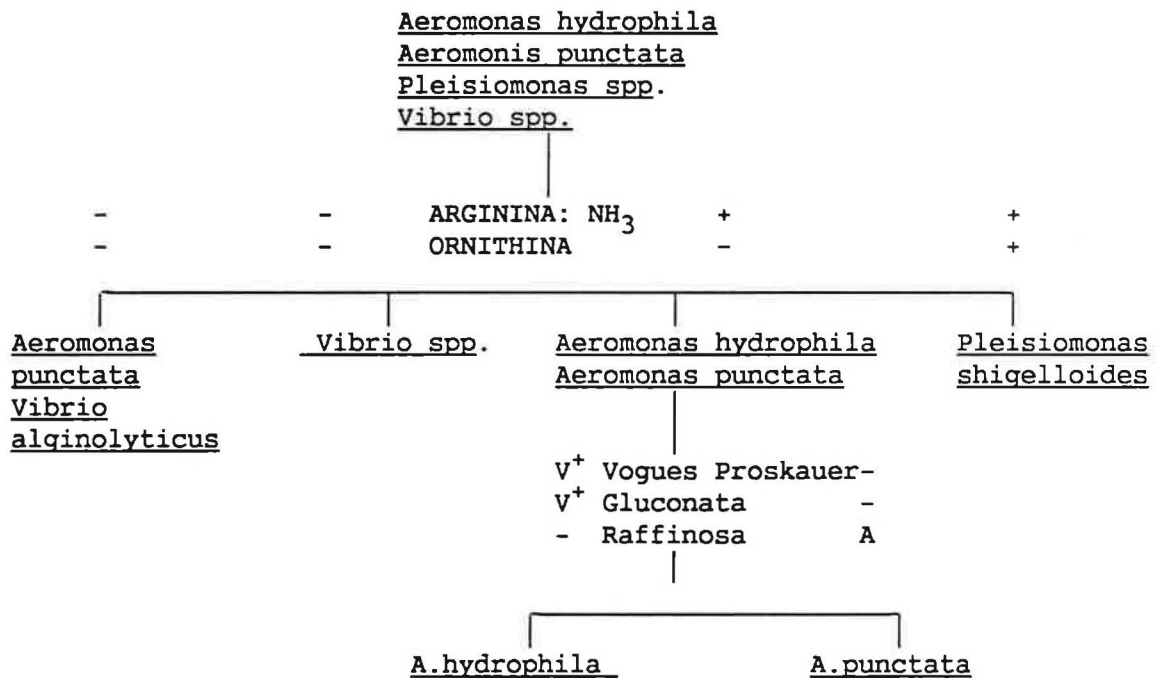
Pruebas bioquímicas

Tinción de Gram - negative - bacilli  
 Movilidad - positiva  
 Oxidasa - positiva  
 Catalasa - positiva  
 DNase - positiva

Resistente a agente vibriostat 0/129

Resistente a novobiocin

La diferenciación de otras bacili, Gram negativa que son movile, oxidasa positiva, fermentativa en el medio de O-F, y sin pigmentacion.



## Referencias

1. Burke, U., J. Robinson, M. Gracey, D. Peterson and K. Patridge (1984) Isolation of A. hydrophila from metropolitan water supply: seasonal correlation with clinical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 48 (2) 361-366.
2. Burke, V., J. Robinson, M. Gracey, D. Peterson, N. Meyer and V. Haley (1984) Isolation of A. hydrophila from unchlorinated domestic water supply. *Applied and Environmental Microbiology* 48: 367-370.
3. Callister, S.M. and Aggar, W.A. (1987) Enumeration of and characterisation of A. hydrophila and A. cariae isolated from grocery store produce. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 249-253.
4. Gram, L., G. Trolle and H.H. Huss (1987). Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0°C) and high (20°C) temperature. *International Journal of Food Microbiology* 4: 65-62.
5. Hazen, T.C., C.B. Fliemans, R.P. Hirsch and Gwesch (1978). Prevalence and distribution of A. hydrophila in United States. *Applied and Environmental Microbiology* 36: 731-738.
6. Joseph, S.W., M. Janda and A. Carnahaw (1988) Isolation, enumeration and identification of Aeromonas spp. *Journal Food Safety* 9: 23-25.
7. Kaper, J., R.J. Seidler, H. Lockman and R R Colwell (1979). Medium for presumptive identification of A. hydrophila and Enterobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 38: 1023-26.
8. Kaper, J.B., H. Lockman and R. R. Colwell (1981). Aeromonas hydrophila: ecology toxigenicity of isolates from an estuary. *Journal of Applied Bacteriology* 50: 359-377.
9. McCoy, R.H. and K.S. Pilcher (1974). Peptone beef extract glycogen aga, a selective and differential Aeromonas medium. *Journal of the Fisheries Research Board - Canada* 31: 1553-1555.
10. Morgan, D.R. and L.V. Wood (1988). Aeromonas species a pathogen: Review of the clinical data. *Journal of Food Safety* 9 (1) 59-72.
11. Palumbo, S.A., F. Maxino, A.C. Williams, R.L. Buchanan and D.W. Thayer (1985). Starch-ampicillin agar for the quantitative detection of A. hydrophila. *Applied and Environmental Microbiology*, 50: 1027-1030.
12. Stern, N.J., E.S. Drazek and S.W. Joseph (1987). Low incidence of Aeromonas spp. in livestock faeces. *Journal of Food Protection* 50 (1) 66-69.
13. Shotts, E.B. Jr. and Rimler, R. (1973). Medium for the isolation of A. hydrophila. *Applied Microbiology* 26: 550-553.



14. Von Graevenitz, A. and L. Zinterhofer (1970) The detection of A. hydrophila in stool specimens. Health and Laboratory Science 7: 124-126.

APPENDIX III - "Queso Paraguay" Preparation and results of examination of 5 samples for Listeria spp. and Yersinia enterocolitica

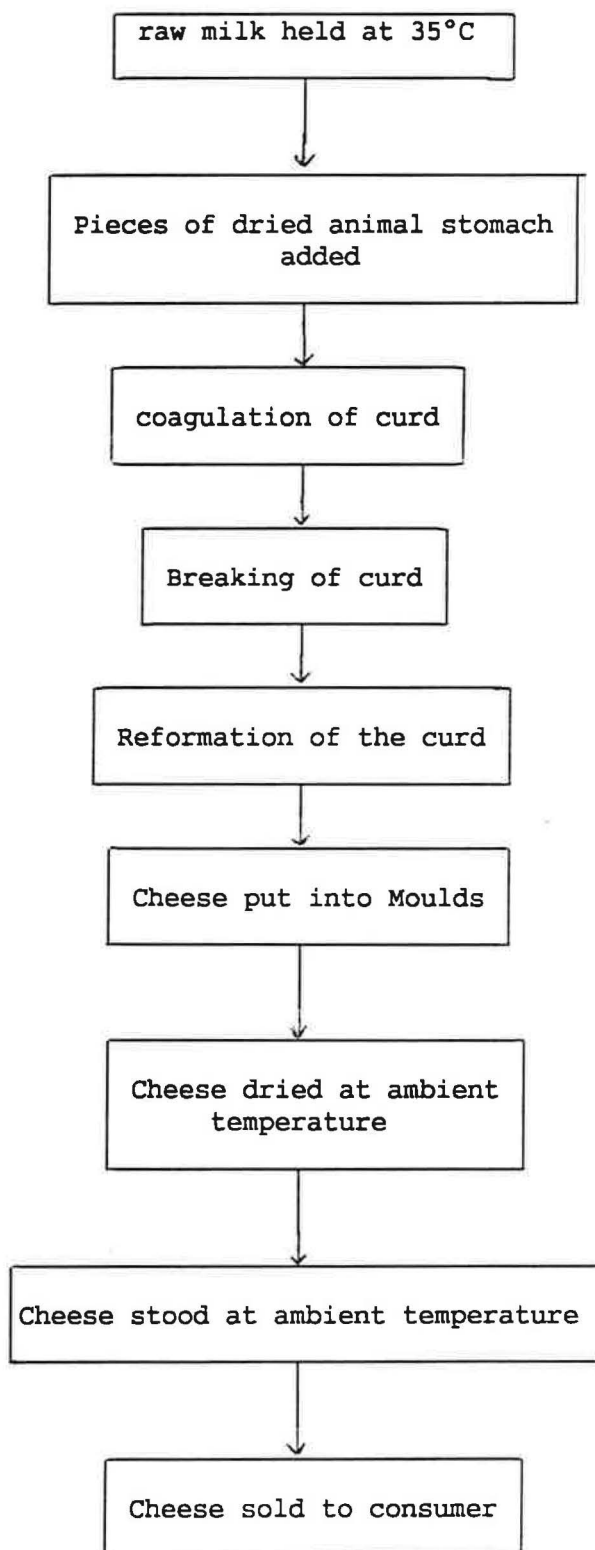


Table 1 Listeria spp. in Paraguayan Cheese - Presumptive positive samples.

<u>Samples</u>	<u>Lab M Method</u>			<u>Oxoid @ 30°C</u>			<u>Oxoid @ 35°C</u>		
	1	2	7	1	2	7	1	2	7
1	-	-	-	-	-	-	+*	+	+
2	-	-	-	-	+	+	+	+	+
3	-	-	-	+	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	+	+	+	+
5	-	-	-	-	+	+	+	+	+

\* Listeria monocytogenes confirmed in this sample.

Table 2

Yersinia enterocolitica in Paraguayan Cheese - Presumptive positive samples.

<u>Samples</u>	<u>Wk</u>		
	1	2	3
1	+	+	+
2	+	+	+
3	-	-	-
4	+	+	+

Table 3

Identification of *Listeria spp* isolated from "Queso Paraguay"

No de Cultivo	Tincion de Gram	Movilidad	Catalasa	Hemolisis	Camp Test		VP	D. mannitol	Rhamnosa	Xilosa	metil D mannsido
L. monocytogenes NCTC 11994	Bacilos pequenos Gram positivo	tombola	+	B	S G	R P	+	-	+	-	+
Oxoid 7(2)a	"	"	+	B			+	+	+	+	+
Ox 7(2)b	"	"	+	B			+	+	+	+	+
Ox 7(4)	"	"	+	B			+	+	+	+	+
Ox 7(5)	"	"	+	B			+	+	-	+	+
UVM II 1	"	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
UVM II 2	"	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
UVM II 4	"	+ tombola	+	B	-	-	-	-	-	-	-
UVM II 5	"	+ tombola	+	B	+	-	+	-	+	-	+
UVM II (2) 1	"	-	-	B			-	-	-	-	-
UVM II (2) 2	"	-	+	-			+	-	-	-	-
UVM II(2) 4	"	-	+	-			+	-	-	-	-
UVM II(2) 5	"	+ tombola	+	B			+	-	+	-	+
UVM I 2 30°C	"	+ tombola	+	B			+	+	+	-	+
UVM I 5	"	+ tombola	+	B			+	+	-	-	-
UVM II 4	"	+ tombola	-	B			+	+	-	-	-
UVM II 5	"	+ tombola	+	B			-	+	-	-	+
LIL OX	"	"									
UVM 7 1a											
1b											
UVM 7 2											
UVM 7 4a											
UVM 7 4b											
UVM II 9(5)											

**APPENDIX IV:      Methods for the isolation and identification of *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* and *Cl. botulinum*.**

**Enumeracion de *Bacillus cereus***

1.      Preparacion de las muestras.

Pesar 30g de muestra a analizar, agregar 270 ml de diluyente esteril (peptona, 0.1%) y macerar la mezcla en un Atomix Blender, dandonos una dilución de  $10^{-1}$ . Utilizando una pipeta esteril se transfiere 1 ml de la dilución  $10^{-1}$  a una botella a tubo centeniendo 9ml de diluyente esteril, esto nos proporciona una dilución de  $10^{-2}$ . Reptiendo el proceso\_ se preparan diluciones de  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ .

2.      Pipetear 0.1 ml de cada una de las diluciones decimales a cajas de Petri en duplicado, los cuales contienen agar de *Bacillus cereus* selective agar (Oxoid). Extender la muestra sobre la superficie del agar usando un baston de vidrio esteril.

3.      Incubar las cajas en forma aeróbica a 35°C por 24 horas.

4.      Contar el numero de colonias irregulares y planos con un color de azul-verde.

5.      Dejar las placas a temperatura ambiente durante 24 horas.

6.      Confirmar los colonias de *Bacillus cereus* del metodo de tinción.

7.      Calcular el numero de colonias formando unidades de *Bacillus cereus* por gramo de muestra.

8. Método de tincion

1. Prepara un frotis del cultivo.
2. Seca en el aire.
3. Se pone el sobre agua hervidero y poner verde de malachito (5% n/v).
4. Despues de 2 minutos, se lava y secar.
5. Se pone negro de Sudan (0.3% w/v en 70% ethanol) por 15 minutos.
6. Lavar la preparación con xylol por 5 segundos y secar.
7. Se pone saffrinin (0.5% w/v) por 20 segundos.
8. Lavar y examine en el microscopia.

La apariencia de las cellulas vegetivas de Bacillus cereus:-

- (i) 4-5 pm largo y 1.0 - 1.5 pm ancho
- (ii) Las esporas son verde, y estan e la posición central a sub terminal. No cambiar la forma de la cellula.
- (iii) Los lipidos son negros y el cytoplasmo es rojo.

Con la apariencia juntos con la colonia tipica se puede confirmar la presencia de Bacillus cereus.

## Medio

### Agar para Bacillus cereus

Peptona	g per litro	1.0
Manitol		10.0
Cloruro de Sodio		2.0
Sulfato de magnesio		0.1
Fosfato disodico		2.5
Fosfato monopotasio		0.25
Azul bromothymol		0.12
pyruvata de sodio		10.00
Agar		14.0

7.2 ± 0.2

Disuelva los ingredientes en agua destilado (475ml) y esterilize en autoclave a 15 psi durante 15 minutos. Enfriar a 45-50°C.

Se pone 25 ml de emulsion de yema y el suplemento de telurito de potasio. Mezcla lo bien y pone lo en cajas de Petri.

## Referencias

1. Holbeck, R and Anderson, J.K. (1980) Canadian Journal Microbiology, 26 (7), 753-759.
2. Donovan, K.O. (1958) J Appl. Bacteriol., 21 (1) 100-103.
3. Mossel D A A., Koopman, M. J and Jongerius, E. (1967) J. Appl. Microbiol 15 (3), 650-653.
4. Ashby G K. (1938) Science 87, 433-435.
5. Burton, K L (1946) J Bacterial 52 665-678.

### Enumeración de Clostridium perfringens

1. Preparar muestras de alimento como se describe en la sección 1, de Bacillus cereus.
2. Pipetear 0.1 ml de cada dilución decimal a cajas de Petri en duplicado, los cuales contienen agar de lactosa y yema (Leya). Extender la muestra sobre la superficie del agar usando un bastón de vidrio esteril.
3. Incubar los cajas en forma anaeróbica a 35°C por 24 horas.
4. Contar el número de colonias rodeadas de opalescencia, con un fondo rosa-rojo (debido a la fermentación de lactosa). Calcular el número de colonias de Cl. perfringens formando unidades por gramo de muestra.
5. Para confirmación, se cubre la mitad de una caja de Petri que contiene LEYA con una mezcla de antitoxinas A's de Cl. perfringens y Cl. oedematiens. Se toma una de las colonias sospechosas y se hace una estria en el agar empezando por el lado donde no hay anti-toxina. Incubar las cajas en forma anaeróbica a 35°C por 24 horas. Si aparece opalescencia en la parte de la caja donde no hay antitoxina y sin embargo no aparece en la otra parte se confirma la presencia de Cl. perfringens.



### Aislamiento de Clostridium botulinum

Cl. botulinum produce una de las mas toxicas substancias conocidos y es responsable de la mas peligrosa forma de envenenamiento por alimentos.

Cl. botulinum crece en el mismo medio descrito para la enumeracion de Cl. perfringens colonias sospechosas de Cl. botulinum produce opalesencia y capa perlada en agar LEYA y no fermentan la lactosa. Ver hoja de identificación en la tabla C 1. El unico método de diferenciación entre Cl. botulinum y Cl. sporogenes es inyectando el sobre natante de caldo de carne cocida a ratones. Si el raton muere, entonces de cultivo es confirmado como Cl. botulinum; si el raton sigue viviendo es cultivo probablemente Cl. sporogenes.

### Medio

Agar de lactosa y yema (Willis and Hobbs, 1962).

Agar infusión de cerebroy corazon	800ml
Lactosa	9.6mg
Rojo neutro (solución 1%)	2.6g

Disolver los ingredients en agua distilada y hervir para disolver el agar. Transferirlo a botellas con tapon de rosca en volumenes de 80ml. Esterilizar en autoclave a 15 psi por 20 minutes. Enfriar a 45-50°C.

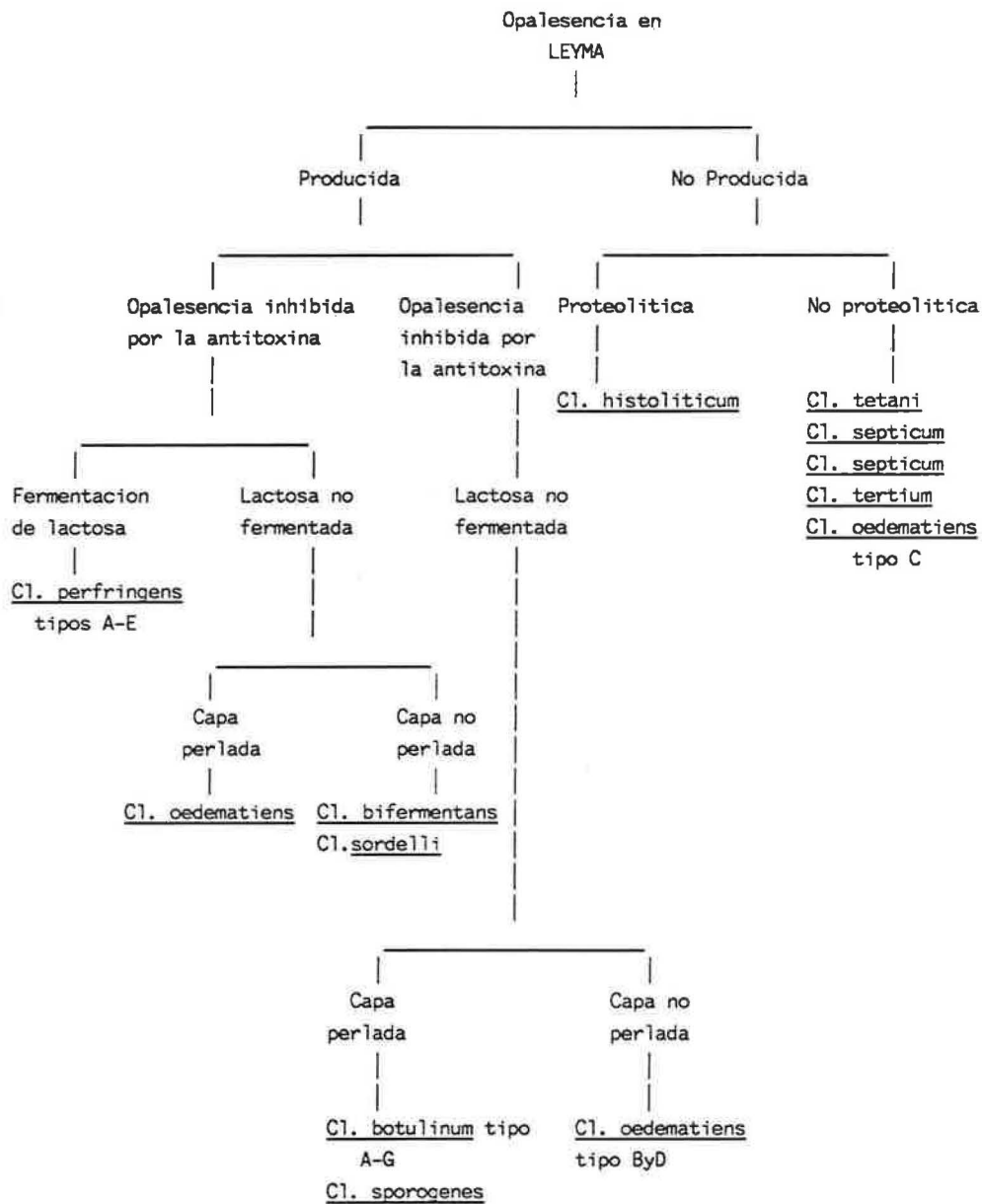
Se pone 3 ml de emulsión de yema de huevo recien preparada (mezclar) la yema con 5-10 ml de solucion salina 0.85%).

### Referencias

Willis, A T, 1962 Some diagnostic reactions of clostridia, Lab Practice, II, 526.

Willis, A T, 1972. Anaerobic Infections Public Health Laboratory Service Monograph Series, No. 3., 72pp.

Table C1: Identificación de Clostridium spp. en cajas con  $\frac{1}{2}$  antitoxina \*



\* una mezcla de antitoxinas de Cl. perfringens tipo A y Cl. oedematiens tipo A, Willis, A T, 1972.

APPENDIX V: Monitoring of lactobacilli and streptococci during yoghurt production.

- a) Utilando una pipeta estéril se transfiere 1ml del yogurt a una botella o tuba conteniendo 9ml de diluyente esteril, esto nos proporciona una dilución de  $10^{-1}$ . Repitiendo el proceso se preparan diluciones de  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ .
- b) Transferir 1ml de alícuota de la muestra diluida a cajas de Petri en duplicado. Agregar 15ml de agar, el cual ha sido licuado a una temperatura de 45°C. Mezclar la muestra y el agar, dejar enfriar hasta completa coagulación del agar. Antes de transferir las cajas de Petri a la incubadora asegurarse de que estén bien secas.

Medios de cultivo

1) Medio diferencial L-S

Triptona	g por litro	10.0
'Lab-lemco' en polvo		5.0
Peptona de soja		5.0
Extracto de levadura		5.0
Dextrosa		20.0
Cloruro de sodio		5.0
Clorhidrato de L-cisteína		0.3
Agar		13.0

pH 6.1

Técnica

Se añaden muestras de yogur o del cultivo de arranque al Medio Diferencial L-S fundido y enfriado. Se mezcla bien y se vierte en placas.

Se pueden hacer diluciones en una solución de peptona al 0.1% p/v y se añaden volúmenes iguales al Medio de L-S de doble concentración.

El medio se incuba a 43°C durante 48 horas. Se pueden estudiar los recuentos viables totales y los recuentos diferenciales.

Organismo	Aspecto de las colonias (después de 48 horas)
Especies de lactobacilos	Colonias irregulares, rojas en forma de un diámetro de 1.0 - 1.5 mm rodeadas de una zona blanca y opaca.
Especies de estreptococos	Colonias redondas u ovales de color rojo, de un diámetro de 0.2 - 0.5 mm, rodeadas de una zona pequeña y clara

2) Agar de Rogosa

Triptona	g per litro	10.0
Extracto de levadura		5.0
Dextrosa		20.0
"Tween" 80		1.0
Fosfato monopot-sico		6.0
Citrato de amonio		2.0
Acetato de sodio		25.0
Acido acético glacial		1.32ml
SO <sub>4</sub> Mg 7H <sub>2</sub> O		0.575
SO <sub>4</sub> Mn 2H <sub>2</sub> O		0.12
SO <sub>4</sub> Fe 7H <sub>2</sub> O		0.034
Agar		20.0

y agua destilada hasta 1 litro  
pH 5.4

Tecnica

Para el aislamiento de los lactobacilos, Sharpe (1960) recomienda incubar las placas de Rogosa durante 3 días a 37°C ó durante 5 días a 30°C. Es preferible incubarlos en una atmósfera que contenga 95% de hidrógeno y 5% de anhídrido carbónico, lo cual impide la evaporación, proporciona unas condiciones microaerofilicas que favorecen a los lactobacilos y el anhídrido carbonica posee un efecto estimulante sobre su crecimiento. Si no se dispone de un recipiente adecuado se vierte una segunda capa de Agar de Rogosa sobre la unicial antes de la incubación.

3) Agar de MRS

Peptona bacteriológica g por litro	10
'Lab lemco' en polvo	8
Extracto de levadura	4
Dextrosa	20
Tween 80	1ml
Fosfato dipot-sico de hidrógeno	2
Acetato de Sodio 3H <sub>2</sub> O	5
Citratode tri-amonio	2
Sulfato de magnesio 7.G <sub>2</sub> O	0.3
Sulfatode manganeso 4.H <sub>2</sub> O	0.05

pH 6.2

Tecnica

Para el aislamiento de los lactobacilos. Se añaden columnes de 1ml de las muestras diluidas a placas de Petri esteriles, vertiendos agar de MRS fundido (a 45°C) dentro de la placa y se mezcla bien. Cuando el medio se haya solidificado, se vierte otra capa de agar MRS no inoculado sobre la superficie para producir una placa don capas.

Las placas se incuban a 37°C durante 3 días ó a 30°C durante 5 días. El medio de MRS es selectivo para los lactobacilos, pero puede producirse un ligero crecimiento de lcuconostocos y pedicocos.

Se seleccionan colonias aisladas sobre el medio de agar y se tiñe una extensión to cada una para identificar las supuestas colonias de lactobacilos; se repican éstas a un caldo MRS y se incuban a la temperatura y tiempos similares a los utilizados para el agar MRS; entonces se examinan microscópicamente y se subcultivan en agar MRS para hacer una confirmación subsiguiente y una identificación de especies.

#### Agar de M17

Triptona	g per litro	5.0
Peptonade soja		5.0
Digerido de carne		5.0
Extracto de levaduras		2.5
Acidode ascorbico		0.5
Sulfato de magnesio		0.25
Glicorofosfato di sodio		19.0
Agar		11.0

pH 6.9 ± 0.2

Después de esterilización se ponen una solución estéril de lactosa (10%).

#### Técnica

Para la enumeración de *Streptococcus thermophilus* en yogur.

Se inoculan placas de agar M17 con la muestra. Se incuban las placas a 37°C por 48 horas.

## SEMINARIO SOBRE MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS

El Instituto Nacional de Tecnología y Normalización (INTN) y el Instituto de Recursos Naturales (NRI) de Inglaterra, organizan un Seminario sobre "Microbiología de Alimentos" destinado a profesionales y técnicos involucrados en control de calidad sanitaria y microbiológica de alimentos naturales o procesados para consumo humano.

El evento se realizará en el local del INTN los días miércoles 22 y jueves 23 de agosto próximo, y será dictado por la Dra. Linda Nicolaides del NRI.

El horario y los temas a ser tratados son:

### Miércoles, 22/VIII/90

- |                 |   |
|-----------------|---|
| 08.00-09.30 hs. | -Introducción al Sistema HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point - Análisis de Agentes Peligrosos en Puntos de Control Crítico).<br>El diseño de la planta con respecto al HACCP.<br>Higiene y entrenamiento de los trabajadores. |
| 10.00-11.30 hs. | -Los patógenos Gram negativos en alimentos que pueden causar enfermedades: <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , Enteropatógeno, <i>E. Coli</i> , Salmonellas, Shygellas.        |

### Jueves, 23/VIII/90

- |                 |  |
|-----------------|--|
| 08.00-09.30 hs. | -El Sistema HACCP con respecto a la reducción de pérdidas durante la producción de alimentos.<br>Un resumen de Sistemas de calidad.  |
| 10.00-11.30 hs. | -Los patógenos Gram positivos en alimentos que pueden causar enfermedades: <i>Staphilococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> . |

### INSCRIPCION

Profesionales: 15.000 ₡.  
Estudiantes: 10.000 ₡.

Se expediran Certificado de Asistencia y distribución de material bibliográfico.

Para mayor información llamar a los teléfonos: 290-160; 290-266.

LISTA DE PARTICIPANTES DEL "SEMINARIO SOBRE MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS"

Organizado por el INTA de Paraguay y NRI de Inglaterra.

Dictado por la Dra. LINDA NICOLAIDES-NRI

Docentes Universitarios

- 1.- Prof. Dr. Miguel Angel González Moreira - INTA y Fac. Ciencias Químicas.
- 2.- " Dra. Adela Renna de Román-INTA y Fac. de Ciencias Químicas.
- 3.- " Dr. Benón Romero Mora - INTA y Fac. de Ciencias Químicas.
- 4.- " Dra. Elizabeth Elizeche de Larré-Fac. de Ciencias Químicas.
- 5.- " Dra. Blanca Estela Gompertt-Fac. de Ciencias Químicas y KCVEX.
- 6.- " Ing°. Quím. Beatriz Nunes de Mendoza - Fac. de Ciencias Químicas.
- 7.- " Dr. Juan Carlos Zanotti Cavazzoni- Fac. de Ciencias Químicas.
- 8.- " Ing°. Quím. Licie M. Samaniego de Bojanovich-Fac. de Ciencias Químicas.
- 9.- " Dra. Concepción Benitez Pavetti-Fac. de Ciencias Veterinarias.
- 10.- " Dra. Georgina Morel Garay - Fac. de Ciencias Veterinarias.

Profesionales, Investigadores, Técnicos.

- 1.- Quím. Dora E. Rivelli - INTA.
- 2.- Quím. Luisa Colman de Palacios - INTA.
- 3.- Dr. Carlos Armando Paiva - INTA.
- 4.- Dra. Laura Amanda Fracchia - INTA.
- 5.- Quím. Julia Gladys Oviedo de Ayala - INTA.
- 6.- Tecnólogo de Alimentos María Delfina Ortigoza de Franco - INTA.
- 7.- Analista Industrial Ana Asunción Aguayo - INTA.
- 8.- Dra. Graciela Mazacote de Mengual - L.A.C.I.M.E.T.
- 9.- Ing°. Quím. Raquel Gómez Insfran
- 10.- Dra. Miryam Camacho de Estigarrubia-Laboratorio Veterinario-Ministerio de Agricultura y Ganadería.
- 11.- Dra. Rose Marie Alborn - Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (I.I.C.S.)
- 12.- Dra. Mirta Graciela Ocampos Cartes - L.A.C.I.M.E.T.
- 13.- Ing°. Quím. Carmen Galeano de González - Industrializadora Maná.
- 14.- Ing°. Quím. Rosalba Catalina Rodríguez G. - Colegio Técnico Nacional.
- 15.- Ing°. Quím. Myrian Victoria Bogado Mena - Colegio Técnico Nacional.
- 16.- Ing°. María Raquel Blasco de Lezcano - Mickey S.R.L.
- 17.- Ing°. Ignacio de Barros Barreto - Mickey S.R.L.
- 18.- Ing°. Celia Vazquez Molas
- 19.- Dra. María Beatriz Soilán de Mendieta - Laboratorio Díaz-Meyer.
- 20.- Dra. Leonidas Elena Enciso de Ayala - Fac. de Ciencias Veterinarias.
- 21.- Ing°. Rosa Elena Jara Zaracho - Colegio Técnico Nacional.
- 22.- Ing°. Quím. Raquel Gómez Insfran (REPETIDO).
- 22.- Licenciado en Tecnología de Alimentos Griselda Margarita Peña Vera.
- 23.- " " " " " Celeste Aida Cabrera Porta.
- 24.- " " " " " Nancy Elizabeth Yaluff de Cantero.
- 25.- " " " " " Gerda María Martens Durand.
- 26.- " " " " " Dora Concepción Ovelar-Cervecería Paraguaya.
- 27.- " " " " " Martha Susana Meza de Smith-Cervecería Paraguaya.

INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA Y NORMALIZACION  
ASUNCION - PARAGUAY

- 28.- Tecnólogo de Alimentos Oscar Armando Feltes Gómez.  
 29.- " " " Nidia Granados de Galeano-Programa de Alimentación y Educación Nutricional (PAEN).  
 30.- " " " María Elena Granados Guerrero.  
 31.- " " " María Doralicia Cuevas - Centro Agrícola S.A.  
 32.- Licenciado en Tecnología de Alimentos Lourdes Backer Adorno  
 33.- Tecnólogo de Alimentos Griselda Miranda Peña - L.A.C.I.M.E.T.  
 34.- " " " María Ninfa Fernández Irala-Laboratorio Oficina Química Municipal.  
 35.- Analista Industrial María Concepción Martínez - Laboratorio Veterinario-Ministerio de Agricultura y Ganadería.  
 36.- " " Juan Ramón Recalde LLano-Industrias Lacteas "Guaraní".  
 37.- " " Gladys Ferreira de Estigarribia-Laboratorio Oficina Química Municipal.  
 38.- " " Rosalba Gavilán - Servicio Nacional de Saneamiento Ambiental (SENASA).  
 39.- Licenciado Ana María M. de Bogado - Gran Hospital Nacional (Itauguá).  
 40.- " Ramona Celestina Tellez de Cardozo.

Estudiantes

- 1.- María Jazmin Noguez - Tecnología de Alimentos-Fac.Ciencias Químicas.  
 2.- Natalie Gaona - " " " " " "  
 3.- Cinthia Arenas - " " " " " "  
 4.- Nelson Yunis - " " " " " "  
 5.- Alicia Cotas - " " " " " "  
 6.- Ruben Vera - " " " " " "  
 7.- Carla Lorena Lacarruba Da Silva " " " " " "  
 8.- Ada Lelia Maria Valiente Davala " " " " " "  
 9.- Sandra Elizabeth mongelos Vielma " " " " " "  
 10.- Beatriz Martin Mateos " " " " " "  
 11.- Sadye Viviana Gregor Yampey " " " " " "  
 12.- Gabriela Casabianca Kuebler " " " " " "  
 13.- Susana B.Morales Caballero " " " " " "  
 14.- María Luz Fátima Lezcano Flores " " " " " "  
 15.- Elva Antonia Medina Adorno " " " " " "  
 16.- María Irene González Achinelli " " " " " "  
 17.- Elsi Carolina Ovelar Santacruz " " " " " "  
 18.- Gloria Emi Watanabe Takashina " " " " " "  
 19.- Lourdes Liz Santacruz Scappini " " " " " "  
 20.- Cecilia Coello Riquelme " " " " " "  
 21.- Javier Kallsen " " " " " "  
 22.- Dino Danielle Portillo Acevedo " " " " " "  
 23.- Liliana Estigarribia Villalba " " " " " "  
 24.- Rita Marisol Cáceres Troche " " " " " "  
 25.- Sonia Beatriz Rolón Ledesma " " " " " "  
 26.- Luis Fernando Ruiz Díaz Mersán " " " " " "  
 27.- José Luis Arias Diez Perez " " " " " "  
 28.- Jorge Acuña Sotomayor - Estudiante de Química Analítica Industrial.



INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA Y NORMALIZACION  
ASUNCION - PARAGUAY

Alumnos del Colegio Técnico Nacional

- 1.- Sandra Patricia Avalos Peralta
- 2.- Delia Ferreira Ramirez
- 3.- Sonia Elizabeth Ayala Künzle
- 4.- Lourdes Monserrate Cano Canela
- 5.- Hugo Alejandro Esquivel Pereira
- 6.- Martha Elizabeth Lezcano Yegros
- 7.- Dulma Elizabeth Segovia Figueroa
- 8.- Carlos Javier Arteta Pintos
- 9.- Fátima A. Ramirez Duré
- 10.- Longe Rocío Bader García
- 11.- Lisa Mabel Vera Rodríguez
- 12.- María Griselda Villalba Díaz
- 13.- Tomás Walter Benitez Gaona
- 14.- Bélgica Castro A.

Técnicos

- 1.- Quim. Anal. Ind. Gladys Benitez Rojas-L.A.C.I.M.T.T.
- 2.- Srta. Lilian Marin
- 3.- Sra. Marta de Jimenez - ALBERDIN ICOSA
- 4.- Srta. Alida M. Martinez - ALBERDIN ICOSA
- 5.- Alejandro Luis Ludojoski - Cooperativa Colonias Unidas Agr.Ltda.



**INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA Y NORMALIZACION  
PARAGUAY**

**INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES — NRI  
Administración de Desarrollo de Ultramar (ODA)  
INGLATERRA**

64

**Certificado Conferido a .....**

**por su participación en el Seminario sobre MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS (22 y 23 de Agosto de 1990).**

*Asunción, Agosto de 1990*

**DR. JOSE MARTINO VARGAS**  
Director General del INTN

**DRA. LINDA NICOLAIDES**  
NRI

INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA Y NORMALIZACION  
ASUNCION - PARAGUAY

MEDIOS DE CULTIVO

1.- Aeromonas agar.....	1x500 g.
2.- Ampicillin Supplement SR 136.....	30x2 mls.
3.- Bacillus cereus agar base.....	1x500 g.
4.- Egg yolk emulsion.....	2x100 mls.
5.- Antibiotic supplement SR 99.....	20x2 mls.
6.- Brain heart infusion.....	1x500 g.
7.- Brain Heart Infusion Agar.....	1x500 g.
8.- Brucella medium base.....	1x500 g.
9.- Buffered peptone water.....	1x500 g.
10.- Campylobacter enrichment broth.....	1x500 g.
11.- Campylobacter blood free selective medium.....	1x500 g.
12.- Campylobacter antibiotic supplement.....	20x2 ml.
13.- Campylobacter Blaser-Wing supplement SR 98.....	20x2 ml.
14.- Campylobacter Butzler Supplement.....	20x2 ml.
15.- CIN Yersinia selective agar.....	1x500 g.
16.- CIN selective supplements.....	20x2 ml.
17.- DNase agar.....	1x500 g.
18.- Kligler iron agar.....	1x500 g.
19.- Listeria enrichment broth.....	1x500 g.
20.- UVM I supplement.....	20x2 ml.
21.- UVM II supplement.....	10x2 ml.
22.- Listeria isolation medium.....	1x500 g.
23.- Listeria antibiotic supplement.....	20x2 ml.
24.- Listeria enrichment broth.....	1x500 g.
25.- Listeria antibiotic supplement.....	20x2 ml.
26.- MacConkey Agar.....	1x500 g.
27.- ARS agar.....	1x500 g.
28.- M17 agar.....	1x500 g.
29.- Nutrient agar.....	1x500 g.
30.- Phenol red peptone water.....	1x100 g.
31.- Purple broth base.....	1x500 g.
32.- Rogosa agar.....	1x500 g.
33.- Todd Hewitt broth.....	1x500 g.
34.- Triple Sugar Iron Agar.....	1x500 g.
35.- Urea Agar base.....	1x500 g.
36.- Urea broth base.....	1x500 g.
37.- 40% urea supplement SR 20.....	20x5 ml.
38.- Horse Blood.....	200 ml.
39.- Sheep Blood.....	25 ml.

MISC. SUGARS

D-Mannitol.....	500 g.
D-glucose.....	500 g.
Methyl $\alpha$ D Mannopyranoside.....	25 g.
D-Xylose.....	25 g.
Hippuric Acid.....	25 g.
Rhamnose.....	1.0 g.
Salicin.....	10 g.
Aesculin.....	25 g.
Novobiocin.....	25 g.
Arabinose.....	100 g.
Polymixin B Sulphate.....	5 millones de unidades.

INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA Y NORMALIZACION  
ASUNCION - PARAGUAY

Neutral red..... 5 g.  
O/129 (vibriostat)..... 1 g.  
L-Cysteine HCl..... 25 g.  
Ampicillin..... 5 g.  
MUG supplement (to follow)  
Neutral red..... 5 g.  
1 Volac pippeter 1-10 mls..... 500 x 5 ml plastic tip;  
500 x 10 ml plastic tips  
(to follows).  
Bile salts..... 1x100 g.  
Potato starch..... 1.kilo

FREEZE DRIED CULTURES - Cepas puras liofilizadas

- *Listeria monocytogenes.*
- *Campylobacter jejuni.*
- *Aeromonas hydrophila.*
- *Yersinia enterocolitica.*
- *Rhodococcus equi.*
- *Staphylococcus aureus.*
- *Clostridium perfringens*
- *Bacillus cereus.*
- *Bacillus subtilis.*

ooooo O ooooo

**APPENDIX VIII: List of Minor Equipment and microbiological media needed to continue work at INTN - To be purchased by INTN.**

From: Phillip Harris Scientific  
618 Western Avenue  
Park Royal  
London S3 OTE

		£ Sterling
T16-140g	Autoclave tape 12 rolls @ £4.10 per roll	49.20
B53-248g	Caps for universal containers @ £1.45/12 - 2 gross	34.80
B53-2409	Universal containers - 1 gross	50.40
D46-1949	Forceps - straight - 4 pairs @ £1.61 each	6.44
D46-358h	Scalpel blade holder - Swann-Morton No. 4 4 @ 2.92	7.64
D46-340h	Scalpel blades No. 24 " " 0.34 - 20	6.80
156-210g	Inoculating loop x 10	17.50
B10-454b	Autoclave bags 406 x 625mm @ 28.00 per 200 -2 packets	56.00

From: Unipath Limited  
Wade Road  
Basingstoke  
Hants  
RG24 OPW

Listeria Enrichment medium (UVM formulation)	CM863B	22.14
Supplement UVM I	SR142E	10.12
Supplement UVM II	SR143E	10.12
Listeria selective medium	CM856B	34.34
Supplement for LSM	SR140E	13.16
Nutrient Agar	CM003B	15.66
Horse Blood x 6 bottles @ £1.92 each	SR050B	11.52
Sheep Blood x 3 bottles @ 2.33 each	SR051B	6.99
Skin Milk Powder	LP031B	4.43

---

Total £128.49

From: Becton Dickinson, UK Limited  
Between Towns Road  
Cawley  
Oxford OX43LY

Purple Broth base	BBL 11558 - 500g	21.39
-------------------	------------------	-------

From: Difco Laboratories Limited  
PO Box 14B  
Central Avenue  
East Molesey  
Surrey KT8 OSE

Nitrate bath	0268-01-6	48.50
--------------	-----------	-------

From: Sigma Chemical Co. Limited  
Fancy Road  
Poole  
Dorset  
BH17 7TG

Triphenyl tetrazolium chloride T8877 - 25g 16.00

From: Bassaire Air Equipment  
Duncan Road  
Swanick  
Southampton  
Hampshire

Filters for laminaire flow cabinet

Model No: 03VB  
Serial No. 7271  
Volts: 230/250  
Phase: Cycle 50-60

Prefilter	6.00
Main filter	152.00
	<hr/>
	£158.00

From: Seward Medical Limited  
131 Great Suffolk Street  
London SE1 1pp

5 packs of 500 Bags for use with Stomacher Lab Blender  
model 400 @ £18.70 per bag 93.50

	<hr/>
TOTAL	£694.66
	<hr/>

**APPENDIX IX - ENQUIRIES**

**Enquiries**

- |    |  |   |
|----|--|---|
| 1. | Ignacio de Barros Barreto Jnr:<br>Mickey SRL   | More references<br>on HACCP   |
| 2. | Soda Seltz   | Information on rapid<br>kits for coliforms and<br>anaerobes.                            |
| 3. | Ing. Quim, Licie Samaniego Ayala<br>Facultad de Ciencias Quimicas<br>CC 1055<br>Asuncion<br>Paraguay | Information on the NRI<br>Food Microbiology<br>Course.                                  |
| 4. | Dra Miriam Segovia<br>INTN<br>Asuncion.  | Cost of Florisil 60/100<br>per Kg (Information<br>requested from Pesticide<br>Section). |