

Contacto CONAMER JCR1-CCF-AMMDC-AMB-B000214107

De: Microbiólogos de Alimentos <microbiologosdealimentos@gmail.com>
Enviado el: sábado, 18 de diciembre de 2021 12:05 p. m.
Para: rfs@cofepris.gob.mx; Contacto CONAMER
Asunto: Comentarios al Proyecto de Modificación NOM-210 (5)
Datos adjuntos: Comentarios a la modificación de la NORMA-210.pdf; Comentarios a la modificación de la NORMA-210.docx

Marca de seguimiento: Seguimiento
Estado de marca: Completado

Con relación a la publicación del PROYECTO de modificación de los incisos 5.3, 6.7, 7.1, 7.2, 9.1 y 9.5; así como de diversos incisos de los apéndices normativos A, B, C, G, H, I y J, de la Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.

Nos permitimos compartir con ustedes una tercer ronda de comentarios.

Reiteramos nuestra respetuosa solicitud de una copia del documento "Propuestas para la Modificación NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos." Indicado como anexo al AIR mirs/52253 (<https://cofemersimir.gob.mx/mirs/52253>) pero no disponible en el Sistema de Manifestación de Impacto Regulatorio

Nos mantenemos atentos a su atención, y reiteramos nuestro interés en participar en las mesas de trabajo que sean necesarias para la implementación de las modificaciones a la NORMA.

Atentamente
Microbiólogos de análisis de alimentos.



| Dice // Numeral | Comentario: |
|--|---|
| <p>Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- SALUD.- Secretaría de Salud.</p> <p>ALEJANDRO ERNESTO SVARCH PÉREZ, Comisionado Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en lo dispuesto por los artículos 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 4 de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo; 3o, fracciones XXII y XXIV, 13, apartado A, fracciones I y II, 17 bis, fracciones II y III, 194, fracción I, 195, párrafo primero, 197, 199, 201, 210 y 214 de la Ley General de Salud; 38, fracción II, 40, fracciones I, III, VII, XI y XIII, 47, fracción I y 51 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 28 y 33 del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 4 y 15 del Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios; 3, fracciones I, literal s y II, así como 10, fracciones IV y VIII del Reglamento de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, he tenido a bien ordenar la publicación en el Diario Oficial de la Federación, del</p> | <p>Se observa que se hace referencia a la Ley federal sobre metrología y normalización misma que fue abrogada por el DECRETO por el que se expide la Ley de Infraestructura de la Calidad y se abroga la Ley Federal sobre Metrología y Normalización. DOF 01-07-2020</p> |
| <p>CONSIDERANDO</p> <p>Que el 26 de junio de 2015, se publicó en el Diario Oficial de la Federación la Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos;</p> <p>Que dicha Norma entró en vigor a los 180 días naturales, contados a partir del día siguiente al de su publicación; salvo sus apéndices C y J; H e I; A, B y F, así como D, E y G, mismos que entraron en vigor a los 180, 270, 360 y 460 días naturales posteriores al inicio de su vigencia, respectivamente;</p> <p>Que durante la implementación de los métodos previstos en la Norma, se han encontrado diferentes errores tipográficos en la descripción de las formulaciones de los medios de cultivo, que pueden generar problemas durante la implementación al no encontrar disponibilidad de los componentes que se señalan;</p> <p>Que el 15 de mayo de 2015, a través del portal electrónico de la Organización Internacional de Estandarización (https://www.iso.org/home.html) se publicó la actualización de la Norma Internacional. ISO 16649-3:2015 Microbiología de los alimentos y alimento de animales. Método horizontal para el recuento de E. coli -glucuronidasa positivo. Parte 3. Técnica utilizando 5-bromo-4-cloro-3-indol--D-glucuronido. 2015 (https://www.iso.org/standard/56824.html), la cual se usa como referencia del</p> | <p>En los considerandos se hace la mención a la actualización de las normas ISO 16649-3 e ISO 6888-1 sin embargo estos métodos son la referencia de los apéndices B y J, hace falta completar los considerandos por los que se modifican, eliminan los numerales en los apéndices A, C, H e I.</p> <p>Dado que el motivador o considerando de esta modificación es la actualización de las normas ISO de referencia, se debe atender también la actualización de de los siguientes métodos:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Apéndice A Normativo, por la actualización de la ISO 6579-1 actualizada en 2017. ● Apéndice C Normativo, por la actualización de la ISO 11290 actualizada en 2017. <p>Adicionalmente se solicita a la autoridad, que en lugar de utilizar la versión de 1999 de la norma ISO 6888-1 considere la versión publicada en 2021.</p> <p>Así mismo, considerando que los métodos microbiológicos ISO citados como equivalentes en el numeral 9 de la NORMA en cuestión hacen referencia a la preparación de la muestras según se describe en la serie de normas ISO 6887 en es</p> |

apéndice J de esta Norma. La actualización hace el cambio del medio de cultivo TBGA a TBX, mismo que ya se encontraba descrito en la Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos;

Que la referida Norma Internacional ISO 6888 ISO 6888-1:1999. Microbiología-Guía general para la enumeración de *S. aureus*-técnica de recuento de colonias, 1a. edición (05-1983), fue publicada en 1983, y que en 1999, se emitió una versión actualizada de la misma, publicada en la página de Internet <https://www.iso.org/standard/23036.html>, como Norma Internacional ISO 6888-1. Microbiología de los alimentos y alimentos para animales-Método horizontal para la enumeración de estafilococos coagulasa positivo (*S. aureus* y otras especies)-Parte 1 Técnica usando Agar Baird Parker (1999). Y que no presenta requisitos adicionales, pero si una explicación más clara de los cálculos que se requieren para la interpretación de los resultados y, por lo tanto, la inclusión de estas modificaciones a la Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos, por lo que es necesaria la clarificación del cálculo ya descrito.

Que derivado de las publicaciones mencionadas anteriormente, es necesario realizar las modificaciones a los siguientes incisos 5.3, 6.7, 7.1, 7.2, 9.1 y 9.5, Apéndice A normativo, Apéndice B normativo, Apéndice C normativo, Apéndice G normativo, Apéndice H normativo, Apéndice I normativo y Apéndice J normativo.

ARTÍCULO ÚNICO.- Se MODIFICAN los incisos 5.3, 6.7, 7.1, 7.2, 9.1 y 9.5; A.6.2.7.1, A.10, A.10.2.4.2, A.10.6.1, A.10.6.2 del Apéndice A Normativo; B.2.6, B.5.4, B.6.4, B.6.5, B.6.6, B.6.8.1, B.7.2, B.7.3, B.7.4, B.7.5, B.7.7 y B.9.9 del Apéndice B Normativo; C.9.1.1, C.9.1.1.1, C.9.1.1.2, C.9.1.6, C.9.2.1, C.9.3.1.1, C.9.4.5.1, C.9.5.1, C.9.6.1 y C.9.7.2 del Apéndice C Normativo; G.7.1.2, G.7.3.1, G.7.4.1 y G.7.5.2 del Apéndice G Normativo; H.7.1.1.1, H.7.1.2, H.8.4.2, H.8.4.6, H.14.8 y H.14.8.1 del Apéndice H Normativo; I.1, I.4.2, I.4.3, I.4.4, I.4.5, I.6.1, I.6.14.1, I.7.1, I.7.2, I.7.3, I.8.1, I.8.3, I.8.4, I.13.1, I.13.1.1, I.13.2, I.13.2.1 e I.13.3 del Apéndice I Normativo; así como J.5.1.1 del Apéndice J Normativo; se ADICIONAN los incisos B.6.4.1, B.6.4.2, B.6.5.1, B.6.5.2, B.6.5.3, B.6.5.4, B.7.2.1, B.7.3.1, B.7.5.1, B.7.7.1 y B.7.7.2 del Apéndice B Normativo; así como I.4.6 e I.13.4 del Apéndice I Normativo, y se ELIMINAN dos párrafos del inciso A.10 del Apéndice A Normativo; así como los incisos H.7.1.4, H.8.4.7 y H.8.4.8 del Apéndice H Normativo de la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-210-SSA1-2014, PRODUCTOS Y SERVICIOS. MÉTODOS DE PRUEBA MICROBIOLÓGICOS. DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS INDICADORES. DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS, PUBLICADA EN EL DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN EL 26 DE JUNIO DE 2015, para quedar como sigue:

necesario que la autoridad considere la inclusión de un apéndice normativo que describa la preparación de las muestras y que ese sea equivalente a la ISO 6887.

De no hacer referencia a las actualizaciones a las normas ISO de referencia entonces México caería en un retraso tecnológico y por lo tanto no equivalente a los estándares actuales en materia analítica.

ÍNDICE

Apéndice I Normativo. Método aprobado para la estimación de la densidad de E. coli por la técnica del NMP.

Sin comentarios

5.3 Para aquellos casos en los que las personas físicas o morales que soliciten la validación de los métodos que utilicen para fines de control, inspección o programa específico, la COFEPRIS, los validará conforme a lo dispuesto en las "Guías para la aprobación de métodos alternativos", disponibles para su consulta en la página de internet <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/236920/CCAYAC-CR-02.pdf>

El numeral 5.3 hace referencia a un procedimiento interno de la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura que en el momento de la consulta 23 de octubre de 2021 a las 09:30 hrs aparece como obsoleto



| | | |
|---|--|--|
| COMISIÓN DE CONTROL ANALÍTICO Y AMPLIACIÓN DE COBERTURA | | Clave: CCAYAC-CR-02/1 |
| GUÍAS PARA LA APROBACIÓN DE MÉTODOS ALTERNATIVOS | | Hoja: 3 de 18 |
| VIGENTE A PARTIR DE: 2016-06-24 | FECHA DE PROXIMA REVISIÓN: 2019-06-24 | SUSTITUYE A: CCAYAC-CR-02/0 FECHA DE: 2013-07-15 |

5.4 Métodos de análisis. Es responsabilidad del laboratorio verificar que ya que la fecha de revisión es de 2019.

Al ser citado el documento en una norma oficial mexicana eleva sus requerimientos equivalentes a los de una norma oficial mexicana pero sin el escrutinio de Los Comités Consultivos Nacionales de Normalización y lo indicado en los artículos 29, 30 y 31 de la Ley de Infraestructura de la Calidad.

El numeral también impone o no es claro sobre la necesidad de un trámite, en caso de que este trámite sea necesario ni el documento nombrado "Guías para la aprobación de métodos alternativos" ni otro lugar accesible de la página de la cofepris indica cómo se debe realizar determinado trámite.

Considerando lo anterior al imponer un requisito y trámite se debe hacer una evaluación del impacto regulatorio de la aplicación del requisito.

6.1 Todos los equipos deberán estar incluidos en un programa de calibración, mantenimiento preventivo y verificación, de acuerdo a las características del equipo.

Considerando que el objetivo de Esta Norma es establecer los métodos generales y alternativos de prueba para la determinación de los siguientes indicadores microbianos y patógenos en alimentos, bebidas y agua para uso y consumo humano.

| | |
|--|--|
| | <p>Se considera que el este numeral queda fuera del objetivo, pues impone un requisito específico de aseguramiento de calidad y la norma no tiene en su objetivo definir los criterios de aseguramiento de calidad que deberían implementar los laboratorios de prueba para la aplicación de los métodos de prueba. En todo caso la norma puede hacer referencia a otras normatividades vigentes que ya definen los criterios para los sistemas de calidad que deben implementar los laboratorios de evaluación de la conformidad como la NMX-17025.</p> <p>Se sugiere modificar a:</p> <p>6.1 Los laboratorios que utilicen los métodos de prueba descritos en los apéndices normativos deberán contar con un sistema de gestión de calidad implementado basado en la NMX-17025-INMC vigente.</p> |
| | <p>6.2 Los potenciómetros deben tener una precisión de verificación mínima de ± 0.1 pH a 20 °C-25 °C. Deben verificarse el día de uso con soluciones amortiguadoras trazables al CENAM u otro patrón nacional emitido por un Instituto Nacional de Metrología incorporado al Arreglo de Reconocimiento Mutuo del Comité Internacional de Pesas y Medidas.</p> <p>Considerando que el objetivo de Esta Norma es establecer los métodos generales y alternativos de prueba para la determinación de los siguientes indicadores microbianos y patógenos en alimentos, bebidas y agua para uso y consumo humano.</p> <p>Se considera que el este numeral queda fuera del objetivo, pues impone un requisito específico de aseguramiento de calidad y la norma no tiene en su objetivo definir los criterios de aseguramiento de calidad que deberían implementar los laboratorios de prueba para la aplicación de los métodos de prueba. En todo caso la norma puede hacer referencia a otras normatividades vigentes que ya definen los criterios para los sistemas de calidad que deben implementar los laboratorios de evaluación de la conformidad como la NMX-17025.</p> <p>Que la COFEPRIS quien es la autoridad que emite la NOM-210-SSA1-2014 tampoco es la autoridad competente para regular sobre aspectos metrológicos pues esa facultad está delegada a la Secretaria de Economía, según en lo dispuesto en el capítulo II del REGLAMENTO DE LA LEY FEDERAL SOBRE METROLOGÍA Y NORMALIZACIÓN</p> <p>se sugiere eliminar lo referido a lo indicado en términos de calibración, para quedar como:</p> |

| | |
|--|--|
| | <p>6.2 Los potenciómetros deben tener una precisión de verificación mínima de ± 0.1 unidades pH a 20 °C-25 °C.</p> |
| | <p>6.3 Las balanzas deberán ser verificadas el día de uso utilizando un marco de pesas calibrado o verificado.</p> <p>Considerando que el objetivo de Esta Norma es establecer los métodos generales y alternativos de prueba para la determinación de los siguientes indicadores microbianos y patógenos en alimentos, bebidas y agua para uso y consumo humano.</p> <p>Se considera que el este numeral queda fuera del objetivo, pues impone un requisito específico de aseguramiento de calidad y la norma no tiene en su objetivo definir los criterios de aseguramiento de calidad que deberían implementar los laboratorios de prueba para la aplicación de los métodos de prueba. En todo caso la norma puede hacer referencia a otras normatividades vigentes que ya definen los criterios para los sistemas de calidad que deben implementar los laboratorios de evaluación de la conformidad como la NMX-17025.</p> <p>Que la COFEPRIS quien es la autoridad que emite la NOM-210-SSA1-2014 tampoco es la autoridad competente para regular sobre aspectos metroológicos pues esa facultad está delegada a la Secretaria de Economía, según en lo dispuesto en el capítulo II del REGLAMENTO DE LA LEY FEDERAL SOBRE METROLOGÍA Y NORMALIZACIÓN</p> <p>Se sugiere eliminar lo referido a lo indicado en términos de calibración, para quedar como:</p> <p>6.3 Las balanzas deberán tener una sensibilidad de hasta 0.1 g.</p> |
| | <p>6.4 Los equipos para incubación tales como incubadoras y baños de agua, deberán demostrar muestreando diferentes puntos de la cámara, durante un tiempo determinado, que asegure las condiciones de incubación de la prueba que pueden trabajar a los intervalos de temperatura indicados en los métodos.</p> <p>Considerando que el objetivo de Esta Norma es establecer los métodos generales y alternativos de prueba para la determinación de los siguientes indicadores microbianos y patógenos en alimentos, bebidas y agua para uso y consumo humano.</p> <p>Se considera que el este numeral queda fuera del objetivo, pues impone un requisito específico de aseguramiento de calidad y la norma no tiene en su objetivo definir los criterios de aseguramiento de calidad que deberían implementar los laboratorios de prueba para la aplicación de los métodos de prueba. En todo caso la norma puede</p> |

| | |
|--|---|
| | <p>hacer referencia a otras normatividades vigentes que ya definen los criterios para los sistemas de calidad que deben implementar los laboratorios de evaluación de la conformidad como la NMX-17025.</p> <p>Que la COFEPRIS quien es la autoridad que emite la NOM-210-SSA1-2014 tampoco es la autoridad competente para regular sobre aspectos metrológicos pues esa facultad está delegada a la Secretaria de Economía, según en lo dispuesto en el capítulo II del REGLAMENTO DE LA LEY FEDERAL SOBRE METROLOGÍA Y NORMALIZACIÓN</p> <p>Se sugiere eliminar lo referido a lo indicado en términos de calibración, para quedar como:</p> <p>6.4 Los equipos de incubación deberán operar en las condiciones indicadas en el apéndice normativo.</p> |
| | <p>6.5 Cuando se indique el uso de un termómetro, éste deberá estar dentro de un programa de calibración y/o verificación vigente, esta última contra un termómetro patrón.</p> <p>Considerando que el objetivo de Esta Norma es establecer los métodos generales y alternativos de prueba para la determinación de los siguientes indicadores microbianos y patógenos en alimentos, bebidas y agua para uso y consumo humano.</p> <p>Se considera que el este numeral queda fuera del objetivo, pues impone un requisito específico de aseguramiento de calidad y la norma no tiene en su objetivo definir los criterios de aseguramiento de calidad que deberían implementar los laboratorios de prueba para la aplicación de los métodos de prueba. En todo caso la norma puede hacer referencia a otras normatividades vigentes que ya definen los criterios para los sistemas de calidad que deben implementar los laboratorios de evaluación de la conformidad como la NMX-17025.</p> <p>Que la COFEPRIS quien es la autoridad que emite la NOM-210-SSA1-2014 tampoco es la autoridad competente para regular sobre aspectos metrológicos pues esa facultad está delegada a la Secretaria de Economía, según en lo dispuesto en el capítulo II del REGLAMENTO DE LA LEY FEDERAL SOBRE METROLOGÍA Y NORMALIZACIÓN</p> <p>Se sugiere eliminar lo referido a lo indicado en términos de calibración, para quedar como:</p> |

| | |
|---|--|
| | <p>6.5 Cuando se indique el uso de un termómetro este deberá tener la resolución indicada en el apéndice normativo.</p> |
| | <p>6.6 Las autoclaves y hornos, que se utilicen para la esterilización de material y medios de cultivo, deberán contar con instrumentos de medición calibrados. Cada ciclo de esterilización debe estar controlado paramétricamente (temperatura y presión) y con indicadores biológicos o contar con un programa de monitoreo con indicadores biológicos, considerando la frecuencia de uso y las condiciones de mantenimiento. El laboratorio debe contar con ciclos de esterilización que garanticen la esterilidad de los materiales sometidos a esterilización sin afectación de sus características, con el propósito de demostrar la distribución y la penetración del calor.</p> <p>Considerando que el objetivo de Esta Norma es establecer los métodos generales y alternativos de prueba para la determinación de los siguientes indicadores microbianos y patógenos en alimentos, bebidas y agua para uso y consumo humano.</p> <p>Se considera que el este numeral queda fuera del objetivo, pues impone un requisito específico de aseguramiento de calidad y la norma no tiene en su objetivo definir los criterios de aseguramiento de calidad que deberían implementar los laboratorios de prueba para la aplicación de los métodos de prueba. En todo caso la norma puede hacer referencia a otras normatividades vigentes que ya definen los criterios para los sistemas de calidad que deben implementar los laboratorios de evaluación de la conformidad como la NMX-17025.</p> <p>Que la COFEPRIS quien es la autoridad que emite la NOM-210-SSA1-2014 tampoco es la autoridad competente para regular sobre aspectos metroológicos pues esa facultad está delegada a la Secretaría de Economía, según en lo dispuesto en el capítulo II del REGLAMENTO DE LA LEY FEDERAL SOBRE METROLOGÍA Y NORMALIZACIÓN</p> <p>Se sugiere eliminar lo referido a lo indicado en términos de calibración, para quedar como:</p> <p>6.6 Los equipos de esterilización deben garantizar su operación en las condiciones requeridas en el apéndice normativo.</p> |
| <p>6.7 Los equipos de incubación deberán contar con termómetros con división mínima no mayor a la mitad de la variación requerida en el método de prueba, por ejemplo cuando se indique una variación de ± 1 ° C, el termómetro deberá tener una división mínima de 0.5 ° C.</p> | <p>Se sugiere cambiar la redacción para quedar como:</p> <p>6.7 Los termómetros deben ser adecuados para medir las variaciones de operación de los equipos de incubación conforme se indica en los apéndices normativos.</p> |

| | |
|--|--|
| | <p>La sugerencia se hace para poder incluir la operación de baños de incubación que operan con una variación de 0.2 °C.</p> |
| | <p>6.8 La calibración de los equipos deberá ser trazable a un patrón nacional (CENAM).</p> <p>Se sugiere eliminar el numeral ya que este queda fuera del objetivo de la norma.</p> <p>Considerando que el objetivo de Esta Norma es establecer los métodos generales y alternativos de prueba para la determinación de los siguientes indicadores microbianos y patógenos en alimentos, bebidas y agua para uso y consumo humano.</p> <p>Se considera que el este numeral queda fuera del objetivo, pues impone un requisito específico de aseguramiento de calidad y la norma no tiene en su objetivo definir los criterios de aseguramiento de calidad que deberían implementar los laboratorios de prueba para la aplicación de los métodos de prueba. En todo caso la norma puede hacer referencia a otras normatividades vigentes que ya definen los criterios para los sistemas de calidad que deben implementar los laboratorios de evaluación de la conformidad como la NMX-17025.</p> <p>Que la COFEPRIS quien es la autoridad que emite la NOM-210-SSA1-2014 tampoco es la autoridad competente para regular sobre aspectos metrológicos pues esa facultad está delegada al CENAM.</p> |
| <p>7.1 Todos los medios de cultivo deberán usarse hasta haber aprobado el control de calidad adecuado para su uso, con excepción de los medios de cultivo que tengan como restricción el tiempo de uso, en esos casos los resultados del análisis no podrán ser emitidos hasta haber completado el control de calidad de los medios de cultivo. La caducidad de los medios de cultivo una vez preparados deberá ser demostrada en el laboratorio bajo las condiciones de almacenamiento particulares establecidas por el propio laboratorio.</p> | <p>Se sugiere cambiar la redacción del párrafo ya que impone un nuevo requisito “demostrar la caducidad de los medios de cultivo” y no fue considerada en el Análisis de Impacto Regulatorio (.mirs/52253)</p> <p>7.1 Todos los medios de cultivo deberán usarse hasta haber aprobado el control de calidad adecuado para su uso, con excepción de los medios de cultivo que tengan como restricción el tiempo de uso, en esos casos los resultados del análisis no podrán ser emitidos hasta haber completado el control de calidad de los medios de cultivo. La caducidad de los medios de cultivo deberá ser demostrada en el laboratorio bajo las condiciones de almacenamiento particulares establecidas por el propio laboratorio.</p> |
| <p>9.1 Norma Internacional ISO 16649-3:2015. Microbiología de los alimentos y alimento de animales. Método horizontal para el recuento de E. coli -glucuronidasa positivo. Parte 3. Técnica utilizando 5-bromo-4-cloro-3-indol--D-glucuronido. Primera edición 2015.</p> | |

| | |
|--|---|
| <p>9.4 Norma Internacional ISO 11290 Microbiología de los alimentos y alimento para animales - Método horizontal para la detección y recuento de <i>L. monocytogenes</i>. Parte 1: Método de detección. 1a. edición (1996).</p> | <p>ISO 11290-1:2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of <i>Listeria monocytogenes</i> and of <i>Listeria</i> spp. — Part 1: Detection method</p> <p>Es necesario que utilicen referencias vigentes disponibles en el momento de modificación y actualización de la normatividad nacional.</p> <p>Dado que son diversos cambios, se propone el establecimiento de un grupo de trabajo con la participación de todas las partes interesadas.</p> |
| <p>9.5 Norma Internacional ISO 6888-1:1999. Microbiología de los alimentos y alimentos para animales-Método horizontal para la enumeración de estafilococos coagulasa positivo (<i>S. aureus</i> y otras especies)-Parte 1 Técnica usando Baird Parker Agar Medium (1999).</p> | <p>La norma vigentes es : ISO 6888-1:2021 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (<i>Staphylococcus aureus</i> and other species) — Part 1: Method using Baird-Parker agar medium</p> <p>Es necesario que utilicen referencias vigentes disponibles en el momento de modificación y actualización de la normatividad nacional.</p> <p>Dado que son diversos cambios, se propone el establecimiento de un grupo de trabajo con la participación de todas las partes interesadas.</p> |
| <p>9.6 Norma Internacional ISO 6579 Microbiología de los alimentos y alimento para animales - Método horizontal para la detección de <i>Salmonella</i> spp. 4a. edición (2002).</p> | <p>La norma vigentes es : ISO 6579-1:2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of <i>Salmonella</i> — Part 1: Detection of <i>Salmonella</i> spp.</p> <p>Es necesario que utilicen referencias vigentes disponibles en el momento de modificación y actualización de la normatividad nacional.</p> <p>Dado que son diversos cambios, se propone el establecimiento de un grupo de trabajo con la participación de todas las partes interesadas.</p> |
| | <p>Se propone a la autoridad que considere la equivalencia con el estándar "Bacteriological Analytical Manual" publicado por la FDA de lo Estados Unidos, esto debido a los diversos acuerdos que se tienen en al región de norteamérica, la demanda de productores nacionales que exportan sus productos a Norteamérica y diversas empresas con plantas productivas en México que requieren cumplir con los estándares de sus corporativos situados en Norteamérica, que actualmente los</p> |

| | |
|--|--|
| | <p>apéndices normativos A, B y C han perdido la equivalencia con las normas internacionales, ya que los métodos de referencia han sido actualizados.</p> |
| <p>13. Apéndices Apéndice A Normativo. Método de referencia para el aislamiento de Salmonella spp. A.6.2.7.1 Huevo en cascarón. Eliminar cualquier material ajeno adherido a la superficie del cascarón. Desinfección del cascarón: Preparar la solución desinfectante (1:3) que consiste en adicionar tres partes de una solución de etanol o isopropanol al 70% a una parte de solución de yodo/yoduro de potasio. Preparar una solución de alcohol al 70% diluyendo 700mL de etanol al 100% hasta completar un volumen final de 1000mL de agua destilada estéril o bien diluir 700mL de alcohol al 95% con agua destilada estéril hasta completar un volumen final de 950mL. La solución de yodo/yoduro de potasio se prepara como sigue: Pesar 100g de yoduro de potasio y disolver en 200mL-300mL de agua destilada estéril. Adicionar 50g de yodo y calentar suavemente con agitación constante hasta disolver el yodo. Disolver esta solución hasta completar un volumen final de 1000mL de agua destilada estéril y almacenar en una botella ámbar con tapón de vidrio en la oscuridad. Sumergir los huevos en esta solución por al menos 10s, sacarlos y dejar secar al aire. La muestra de laboratorio consiste de 20 huevos, de una muestra de 50 huevos tomados en el punto de muestreo o punto de venta. Abrir los huevos en condiciones asépticas con guantes estériles y pasar a un recipiente estéril, cambiar guantes entre cada muestra. Evitar que fragmentos del cascarón caigan en el contenedor. Mezclar completamente las yemas y claras con una cuchara o cualquier otro instrumento estéril. Mantener las muestras a temperatura ambiente (20°C-24°C) por 96h ± 2h. Después de este tiempo, tomar 25mL o 25g de la mezcla anterior y 25mL de un CST de prueba (testigo) en un contenedor de 500mL y agregar 225mL de CST suplementado con sulfato ferroso (35mg de sulfato ferroso a 1000mL de CST). Mezclar bien por agitación. Dejar en reposo durante 60 min ± 5min a temperatura ambiente. Mezclar nuevamente por agitación y determinar pH con papel indicador. Ajustar el pH, si es necesario, a 6.8 ± 0.2. Incubar 24h ± 2h a 36°C ± 1°C. Continuar como se indica en el inciso A.7.2. de esta Norma.</p> | <p>El texto propuesto indican pasos o requisitos para el muestreo, sin embargo esta norma tiene por alcance describir sólo los métodos de prueba, los métodos de prueba se limitan a la manipulación del ítem de ensayo una vez recibida la muestra en el laboratorio de análisis.</p> <p>Por el alcance de la norma no se puede regular el tamaño de la muestra tomada en gallineros o puntos de venta.</p> <p>Dado que la norma es emitida por la Secretaría de Salud se debe ponderar si es competencia de esta describir el muestreo en Gallineros, o corresponde a la responsabilidad de otra secretaría.</p> <p>No se tiene una definición de gallinero en la sección de definiciones de la norma.</p> <p>La temperatura de incubación de 35°C ± 2 por 24 h ± 2 h Se propone según lo descrito por el BAM, o el ISO 6579 que indica un temperatura de 37 °C ± 2°C, en caso de no considerar esta temperatura favor de citar la referencia donde se justifica que la temperatura de incubación debe ser de 36°C ± 1°C, esta justificación es necesaria ya que impone un requisito de operación más estricto a los impuestos por normas internacionales.</p> <p>Las temperaturas de incubación de los enriquecimientos primarios de todo el apéndice A deben ser revisados ya que las actuales al ser diferentes a las descritas en las normas de referencia, perderían la equivalencia con las mismas.</p> <p>La medición de pH, según la preparación indicada en el BAM, no es requerida.</p> <p>Se propone la siguiente redacción:</p> <p>Cada unidad analítica deberá tomarse de veinte (20) huevos, los cuales deben colectarse asépticamente en una bolsa plástica estéril. Los huevos con cascarones astillados, fracturados o rotos no deben ser incluidos en la muestra. Retire cualquier material adherido a la superficie del cascarón del huevo. Desinfecte la superficie del cascarón con una solución de 3 partes de alcohol etílico o isopropílico al 70% y 1 parte de solución yodo/yoduro de potasio. Sumerja los huevos en la solución desinfectante durante al menos 10 segundos. Retire los huevos de la solución y permita secar al aire. Los huevos se parten asépticamente usando guantes estériles, con un cambio de guantes entre muestras (20 huevos). Mezcle suavemente las</p> |

| | |
|--|--|
| | yemas y las claras utilizando un utensilio estéril (utilice guantes para esta actividad y cámbielos entre muestra y muestra). Preenriquecer la muestra de 20 huevos adicionando 2 L de TSB (a temperatura ambiente) y mezcle bien con un utensilio esteril. Cierre el contenedor e incube a 35°C ± 2 por 24 h ± 2 h. |
| | Con base a los comentarios anteriores se proponen los siguientes textos basados en el BAM para reemplazar los numerales A.6.2.2 a A.6.2.30 |

Preparación de alimentos para Aislamiento de salmonella

1. Los siguientes métodos de preparación de muestras se basan en el análisis de una unidad analítica de 25 g en una muestra / caldo en proporción de 1:9.
2. Dependiendo de la cantidad de muestra, agregue suficiente caldo para mantener esta proporción de 1:9 a menos que esté indicado de otra manera. Para muestras no analizadas en base al peso exacto, por ejemplo, ancas de rana, frutas, consulte el método de preparación específico, para las instrucciones.
3. De preferencia, no descongele las muestras congeladas antes de su análisis. Si las muestras congeladas deben ser temperadas para obtener la porción de muestra, descongele una una porción apropiada tan rápidamente como sea posible para minimizar el incremento en el número de organismos competidores o para reducir el daño potencial a los organismos de Salmonella. Descongele por debajo de 45 grados centígrados por 15 minutos con agitación continua en un en un baño de agua controlado termostáticamente o descongele en un período de 18 horas a 2-5°C.
4. Cuando se indique, se debe hacer el ajuste de pH a 6.8 +/- 0.2, usando NaOH 1 N o HCl 1 N estéril, el volumen no debe
5. exceder el 1 % del volumen total de la preparación. El pH es medido usando tiras de papel pH adecuado, se debe tener cuidado en que las muestras coloridas pueden interferir en la interpretación. Antes de hacer la medición de pH tome precauciones de agitar la muestra.

dejar que la solapa del extremo abierto de la bolsa de plástico se "doble" para formar un cierre seguro, pero no hermético, durante la incubación.

En general las muestras deben ser incubadas dejando las tapas o los cierres de los contenedores parcialmente abiertos.

| Tipo de matriz | Método de preparación |
|--|---|
| Yema de huevo en polvo, clara de huevo en polvo, huevo entero en polvo. Leche líquida (leche descremada, leche con 2% de grasa leche entera y suero de leche) Mezclas de polvos preparados (pasteles, galletas, donas, | <ul style="list-style-type: none"> ● Pesar 25 g de muestra <ul style="list-style-type: none"> ○ Para muestras que no están en polvo, agregue 225 mL de caldo de lactosado ○ Para muestras en polvo agregue aproximadamente de 15 mL de caldo lactosado y agite con una varilla de vidrio estéril cuchara o abatelenguas para facilitar la suspensión. Añada tres porciones adicionales de caldo lactosado de 10 mL, 10 mL y 190 mL para un total de 225 mL. Homogenice bien hasta que la muestra se suspenda sin grumos. ● Homogeneizar por enjuague. ● Dejar reposar por 60 +/- 5 minutos. |

| | |
|--|--|
| <p>bizcochos y pan). que contengan huevo y no contengan huevo.</p> <p>Fórmulas infantiles y alimentación oral o parenteral que contenga huevo.</p> | <ul style="list-style-type: none"> ● Medir y ajustar el pH a 6.8 +/- 0.2 si es necesario. (ver 4) ● Incubar por 24 h a 35 °C +/- 2°C. |
| <p>Huevo en cascarón.</p> | <ul style="list-style-type: none"> ● Seleccionar aleatoriamente veinte (20) huevos, los cuales deben colectarse asépticamente en una bolsa plástica estéril. Los huevos con cascarones astillados, fracturados o rotos no deben ser incluidos en la muestra. ● Retirar cualquier material adherido a la superficie del cascarón del huevo. ● Desinfectar la superficie del cascarón con una solución de 3 partes de alcohol etílico o isopropílico al 70% y 1 parte de solución yodo/yoduro de potasio. ● Sumergir los huevos en la solución desinfectante durante al menos 10 segundos. ● Retirar los huevos de la solución y permitir secar al aire. ● Partir los huevos asépticamente usando guantes estériles, con un cambio de guantes entre muestras (20 huevos). ● Mezclar suavemente las yemas y las claras utilizando un utensilio estéril (utilizar guantes para esta actividad y cambiarlos entre muestra y muestra). ● Pre Enriquecer la muestra de 20 huevos adicionando 2 L de CST (a temperatura ambiente) y mezcle bien con un utensilio esteril. ● Cerrar el contenedor ● Incubar a 35°C ± 2 por 24 h ± 2 h |
| <p>Huevos enteros líquidos (homogeneizados).</p> | <ul style="list-style-type: none"> ● Combinar quince (15) porciones de prueba de 25 mL para obtener una muestra compuesta de 375 mL. ● Mantener la muestra compuesta a temperatura ambiente (20-24 °C) durante 96 ± 2 h. ● Después de 96 ± 2 h, agregar 3375 mL de CST con FeSO₄ ● Homogeneizar por agitación. ● Dejar reposar por 60 ± 5 min a temperatura ambiente. ● Determinar el pH y ajustar a 6.8 +/- 0.2 si es necesario. ● Incubar 24 h ± 2 h a 35 °C ± 2°C |

| | |
|--|---|
| <p>Huevos duros o cocidos (pollo, pato y otros).</p> | <ul style="list-style-type: none"> ● Si los cascarones de huevo aún están intactos, desinfectar las cascarones como se describió anteriormente y separar asépticamente los cascarones de los huevos. ● Homogeneizar los huevos asépticamente y pesar 25 g ● Agregue 225 mL de CST (sin sulfato ferroso) y mezcle bien agitando. ● Deje reposar 60 ± 5 min a temperatura ambiente. ● Mezcle bien y determine el pH con papel de prueba. Ajuste el pH, si es necesario, a $6,8 \pm 0,2$. Incubar 24 ± 2 h a $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ |
| <p>Leche en polvo sin grasa (instantánea). Leche en polvo sin grasa (no instantánea) Leche entera en polvo</p> | <ul style="list-style-type: none"> ● Pesar 25 g de muestra. ● Transfiera lentamente los 25 g de muestra a 225 mL de agua estéril, evitando la formación de grumos hasta disolución total. ● Adicionar 0.45 mL de disolución verde brillante al 1 %. <p>Alternativamente en lugar del agua estéril se puede preparar el agua con verde brillante añadiendo 2 mL de solución verde brillante al 1% a 1000 ml de agua estéril destilada.</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Deje reposar, sin mover por 60 ± 5 min. ● Incubar, sin mezclar o ajustar el pH, por 24 ± 2 h a 35°C. |
| <p>Caseína de leche</p> | <ul style="list-style-type: none"> ● Pesar 25 g de muestra. ● Transfiera lentamente a 225 mL de caldo universal, evite la formación de grumos y disuelva completamente ● Dejar reposar, sin mover por 60 ± 5 min. ● Incubar sin mezclar o ajustar el pH por 24 ± 2 h a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ |
| <p>Caseína Rennet Harina de soya.</p> | <ul style="list-style-type: none"> ● Pesar 25 g de muestra ● Con ayuda de embudo estéril de papel o de vidrio verter lentamente la unidad analítica a 225 ml de CL ● Dejar reposar el recipiente sin moverlo por 60 ± 5 min. ● Incubar sin mezclar o ajustar el pH por 24 ± 2 h a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ <p>NOTA: NO realizar muestras compuestas para harina de soya.</p> |
| <p>Caseinato de sodio.</p> | <ul style="list-style-type: none"> ● Pesar 25 g de muestra ● Añadir 225 ml de CL ● Homogeneizar ● Dejar reposar 60 min a temperatura ambiente ● Medir y ajustar el pH a 6.8 ± 0.2, si es necesario. ● Incubar a 24 ± 2 h a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ |

| | |
|---|--|
| <p>Productos que contienen huevo (noodles, rollos de huevo, macaroni, spaghetti), Queso, dough, Ensaladas preparadas (jamón, huevo, pollo, atún, pavo), Frutas, crustáceos (camarón, cangrejo, crayfish, langostinos, langosta), y Pescado.</p> | <ul style="list-style-type: none"> ● Pesar 25 g de muestra ● Añadir 225 ml de CL ● Mezclar. ● Dejar reposar 60 ± 5 min a temperatura ambiente ● Medir y ajustar el pH a 6.8 ± 0.2, si es necesario. ● Incubar a 24 ± 2 h a 35°C |
| <p>Nueces</p> | <ul style="list-style-type: none"> ● Pesar 25 g de muestra ● Añadir 225 ml de CU ● Mezclar por agitación ● Incubar a 24 ± 2 h a 35°C |
| <p>Mantequilla de nuez</p> | <ul style="list-style-type: none"> ● Pesar 25 g de muestra ● Añadir 225 ml de CU ● Homogeneizar ● Incubar a 24 ± 2 h a 35°C |
| <p>Vegetales.</p> | <ul style="list-style-type: none"> ● Pesar 25 g de muestra ● Añadir 225 mL de CU ● Mezclar por agitación ● Incubar 24 ± 2 h a 35°C. |
| <p>Levadura en polvo (levadura activa e inactiva).</p> | <ul style="list-style-type: none"> ● Pesar 25 g de muestra ● Añadir 225 ml de CST. ● Mezcle suavemente para obtener una suspensión. ● Dejar reposar a temperatura ambiente durante 60 ± 5 min a temperatura ambiente. ● Determinar el pH con papel pH. Ajustar el pH si es necesario a 6.8 ± 0.2, ● Incubar a 24 ± 2 h a 35°C. |
| <p>Crema y coberturas mixtas</p> | <ul style="list-style-type: none"> ● Pesar asépticamente 25 g ● Añadir 225 ml de caldo nutritivo y mezclar bien. ● Cerrar el frasco y dejar reposar 60 ± 5 min a temperatura ambiente, ● Mezclar mediante agitación y |

| | |
|---|--|
| | <ul style="list-style-type: none"> ● Determinar el pH con papel de prueba. Ajustar el pH si es necesario a 6.8 ± 0.2. ● Incubar 24 ± 2 h a 35°C |
| <p>Espicias</p> <p>Pimienta negra, pimienta blanca, semillas u hojuelas de apio, chile en polvo, cominos, paprika, perejil en hojuelas, romero, semillas de sésamo, tomillo, verduras en hojuelas</p> | <ul style="list-style-type: none"> ● Pesar 25 g de muestra ● Adicionar 225 mL de caldo soya tripticaseína (TSB) y mezcle bien. ● Cerrar el recipiente y deje a temperatura ambiente por 60 ± 5 min. ● Mezclar bien por agitación ● Determinar el pH con papel de prueba, ajuste el pH si es necesario a 6.8 ± 0.2. ● Incubar por 24 ± 2 h a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. |
| <p>Cebolla en hojuelas, cebolla en polvo, ajo en hojuelas.</p> | <ul style="list-style-type: none"> ● Pesar 25 g de muestra. ● Adicionar 225 ml caldo soya tripticaseína (TSB) con K_2SO_3 (5 g K_2SO_3 por 1000 mL de caldo soya tripticaseína, dando como resultado una concentración final de 0.5% de K_2SO_3) Añadir el K_2SO_3 al caldo antes de esterilizar a 121°C por 15 minutos. Después de esterilizar, determinar asépticamente y, si es necesario, ajustar el volumen final a 225 ml. ● mezclar y determine el pH con papel de prueba, ajuste el pH si es necesario a 6.8 ± 0.2. ● Incubar $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ a 35°C. |
| <p>Pimienta gorda, canela, clavo, y orégano</p> | <p>No hay métodos conocidos para neutralizar la toxicidad de estas 4 especies (en polvo o completas) en este momento.</p> <p>Diluya las especies más allá de sus niveles tóxicos para realizar los análisis en busca de Salmonella.</p> <p>Analice la pimienta gorda, canela y orégano en proporción 1:100 muestra/caldo y el clavo en proporción 1:1000 muestra/caldo.</p> <p>Si utiliza contenedores de tapa de rosca cierre el envase hasta el tope y regrese $\frac{1}{4}$ de vuelta de la tapa. Si utiliza bolsas, estas deberán ser de tamaño suficiente, de modo que se evite que exploten por la acumulación de gases.</p> <p>Incube por $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ a 35°C.</p> <p>Para las especias enteras canela, clavo y orégano (entero, trozos, piezas, hojas), asépticamente pese 25g de muestra en una bolsa estéril con filtro, adicione 225 mL de TSB y agite vigorosamente por 60 segundos. Transfiera el agua de enjuague inmediatamente a una bolsa estéril. Es muy importante adicionar el TSB a la muestra inmediatamente antes de agitar y transferir inmediatamente el agua de enjuague a la bolsa estéril, después de agitar.</p> |

| | |
|--|--|
| | <p>Para muestras secas (como el orégano) que absorben el medio de cultivo pese 25 g de muestra y adicione 475 mL de caldo TSB. Cierre el recipiente y deje a temperatura ambiente por 60 +/- 5 minutos. Mezcle bien por agitación y determine el pH con papel de prueba, ajuste el pH si es necesario a 6.8 +/- 0.2</p> <p>Si utiliza contenedores de tapa de rosca cierre el envase hasta el tope y regrese ¼ de vuelta de la tapa. Si utiliza bolsas, estas deberán ser de tamaño suficiente, de modo que se evite que exploten por la acumulación de gases.</p> <p>Incube por 24 h ± 2 h a 35°C.</p> |
| <p>Dulces, dulces cubiertos (incluyendo chocolate)</p> | <ul style="list-style-type: none"> ● Pesar 25 g de muestra ● Adicionar 225 mL de leche sin grasa o baja en grasa y homogenice. ● Cerrar el recipiente y dejarlo a temperatura ambiente por 60 ± 5 min. ● Mezclar bien por agitación ● Determinar el pH con papel de prueba, ajuste el pH si es necesario a 6.8± 0.2. ● Adicionar 0.45 mL de una solución acuosa de verde brillante al 1%. ● Incubar por 24 ± 2h a 35°C ± 2 °C. |
| <p>Coco.</p> | <ul style="list-style-type: none"> ● Pesar 25 g de muestra ● Adicionar 225 mL de caldo lactosado y homogenice. ● Cerrar el recipiente y dejarlo a temperatura ambiente por 60 ± 5 min. ● Mezclar. ● Determinar el pH con papel de prueba, ajuste el pH si es necesario a 6.8± 0.2. ● Adicionar 0.45 mL de una solución acuosa de verde brillante al 1%. ● Añadir hasta 2.25 mL de Tergitol Anionico 7 (esterilizado a vapor fluyente por 15 min) y mezclar bien. Alternativamente, utilice Triton X-100 al (esterilizado al vapor fluyente por 15 min). Otros tensoactivos como el tween pueden ser utilizados, la concentración y cantidad de este debe ser verificada por el laboratorio usando un protocolo aceptado y demostrando la recuperación del microorganismo de interés. Limite el uso de estos tensoactivos a la cantidad mínima necesaria para iniciar la formación de espuma. Para Triton X-100 esta cantidad puede ser tan poco como 2 o 3 gotas. ● Incubar por 24 h ± 2 h a 35°C ± 2°C. |
| <p>9. Colorantes y sustancias colorantes para alimentos:</p> | <ul style="list-style-type: none"> ● En el caso de colorantes con pH mayor a 6.0 (suspensiones acuosas al 10%), aplicar el método descrito para huevo entero deshidratado. ● Para colorantes (lacas) con pH inferior a 6.0, pesar 25 g de muestra en un frasco estéril apropiado. |

| | |
|---|---|
| | <ul style="list-style-type: none"> ● Agregar 225 mL de caldo de tetrionato sin verde brillante. ● Mezclar bien y dejar reposar 60 ± 5 min a temperatura ambiente. ● Con el medidor de pH, ajuste el pH a 6.8 ± 0.2. ● Añadir 2.25 mL solución al 0.1% de verde brillante mezcle con agitación. ● Incubar por $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. |
| Gelatina. | <ul style="list-style-type: none"> ● Pesar 25 g ● Añadir 225 ml de caldo lactosado estéril y 5 ml de solución acuosa al 5% de papaína y mezcle bien. ● Incubar a 35°C por 60 ± 5 min. ● Mezclar bien mediante agitación y determine el pH con papel pH. Ajuste el pH si es necesario a 6.8 ± 0.2. ● Incubar a $24 \pm 2 \text{ h}$ a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. |
| Carnes, sustitutos de carne, productos cárnicos, sustancias de origen animal, productos glandulares y harinas (pescado, carne, huesos). | <ul style="list-style-type: none"> ● Pesar 25 g de muestra en un vaso de licuadora estéril o procesador de alimentos. Agregue 225 mL de caldo lactosado estéril y homogenice por 2 min. ● Transferir asépticamente la mezcla homogeneizada y dejar reposar 60 ± 5 min a temperatura ambiente. Si la mezcla es en polvo o está triturada, se puede omitir la homogeneización. Para las muestras que no requieren homogeneización, agregue caldo lactosado y mezcle bien; déjelo reposar durante 60 ± 5 minutos a temperatura ambiente con el frasco bien cerrado. ● Mezcle bien y determine el pH con papel de prueba. Ajuste el pH, si es necesario, a 6.8 ± 0.2. ● Añada hasta 2.25 mL de Tergitol aniónico 7 (esterilizado en vapor fluente por 15 min) y mezcle bien. Alternativamente, se puede usar Triton X-100 (esterilizado en vapor fluente por 15 min). Limite el uso de estos tensioactivos a la cantidad mínima necesaria para iniciar la formación de espuma. La cantidad real dependerá de la composición del material de prueba. No se necesitan tensioactivos en el análisis de productos glandulares en polvo. ● Incubar a $24 \pm 2 \text{ h}$ a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ |
| Ancas de rana | <ul style="list-style-type: none"> ● Poner 15 pares de ancas de rana dentro de una bolsa de plástico estéril y cubrir con caldo lactosado estéril en proporción 1:9 (muestra:caldo g/g). Si el peso de un anca individual es de 25 g o más, analice una sola anca. |

| | |
|---|---|
| | <ul style="list-style-type: none"> ● Colocar la bolsa en un vaso plástico grande o en un contenedor adecuado. Mezcle bien y deje reposar 60 ± 5 min a temperatura ambiente. ● Mezcle bien por agitación y determine el pH con papel de prueba. Ajuste el pH si es necesario a 6.8 ± 0.2. ● Poner la bolsa plástica conteniendo las ancas de rana y el caldo lactosado en un contenedor adecuado. ● Incubar a 24 ± 2 h a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ |
| Canales de conejo. | <ul style="list-style-type: none"> ● (Este método se utiliza para todas las canales de conejo). ● Coloque la canal de conejo en una bolsa de plástico estéril. Coloque la bolsa en un vaso de precipitados u otro recipiente adecuado y registre el peso. ● Agregue caldo lactosado estéril en una proporción de 1:9 (muestra:caldo, g/g) de 1:9 para cubrir la canal ● Mezclar bien y dejar reposar 60 ± 5 min a temperatura ambiente. ● Determine el pH con papel de prueba . Ajuste el pH, si es necesario, a 6.8 ± 0.2. ● Incubar $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ a 35°C. |
| Goma guar | <ul style="list-style-type: none"> ● Pesar 25 g de muestra ● Prepare una solución de celulosa al 1.0% (agregue 1 g de celulosa a 99 mL de agua destilada estéril). Dispensar en botellas de 150 ml. (La solución de celulosa se puede almacenar a $2-5^{\circ} \text{C}$ hasta por 2 semanas). ● Añadir 225 mL de Caldo lactosado estéril y 2,25 ml de solución de celulosa estéril al 1% en un frasco estéril de boca ancha con tapa de rosca (500 mL) u otro recipiente apropiado. ● Mientras agita vigorosamente el caldo de celulosa / lactosado vierta 25 g de unidad analítica rápidamente a través de un embudo de vidrio estéril en el caldo de celulosa / lactosa. ● Tape bien el frasco y déjelo reposar 60 ± 5 min a temperatura ambiente. Incubar sin ajustar el pH, durante 24 ± 2 h a 35°C. |
| Jugo de naranja (pasteurizado y no pasteurizado), sidra de manzana (pasteurizada y no pasteurizada) y jugo de manzana (pasteurizado). | <ul style="list-style-type: none"> ● Transferir 25 mL o g de muestra a 225 mL de caldo de preenriquecimiento universal (UP) ● Agite minuciosamente. Tape bien el frasco y déjelo reposar 60 ± 5 min a temperatura ambiente. ● No ajuste el pH. ● Incubar durante 24 ± 2 a 35°C. |

| | |
|---|---|
| <p>Orejas de cerdo y otros tipos de piezas para masticar para perros.</p> | <ul style="list-style-type: none"> ● Coloque 1 pieza o 2 a 3 piezas si son de tamaño más pequeño) de cada unidad de muestra en una bolsa de plástico estéril. Coloque la bolsa en un vaso de precipitados grande u otro recipiente adecuado. Agregue caldo lactosado estéril en una proporción de muestra a caldo (g / g) de 1: 9 para cubrir las piezas. ● Mezclar bien y dejar reposar 60 ± 5 minutos a temperatura ambiente. ● Mezcle bien determine el pH con papel de prueba. Ajuste el pH, si es necesario, a 6,8 ± 0,2. ● Agregue Tergitol Anionico 7 (esterilizado en vapor fluente por 15 min) o Triton X-100 (esterilizado en vapor fluente por 15 min) hasta una concentración del 1%. Por ejemplo, si se añaden 225 ml de caldo de lactosado, el volumen máximo de tensioactivo añadido es 2,25 ml. ● Limite el uso de estos tensioactivos a una cantidad mínima para iniciar la formación de espuma. ● Incubar 24 ± 2 h a 35 ° C. |
| <p>Melones.</p> | <p>Frutas trituradas o cortadas,</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Pesar 25 g ● Agregar 225 ml de caldo de preenriquecimiento universal (UP) ● Mezclar durante 2 min. ● Dejar reposar durante 60 ± 5 min a temperatura ambiente ● No ajustar el pH. <p>Melones enteros, no enjuagar incluso si hay suciedad visible. Examinar los melones "tal cual".</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Colocar el melón en una bolsa de plástico estéril. ● Agregar suficiente caldo UP para permitir que el melón flote. El volumen de caldo UP puede ser 1,5 veces el peso de los melones. Por ejemplo, los melones que pesan 1500 g probablemente necesitarán un volumen de aproximadamente 2250 ml de caldo UP para flotar. ● Agregar más caldo, si es necesario. ● Colocar la bolsa de plástico, con los melones y el caldo UP, en recipiente apropiado, para que sirva de apoyo durante la incubación. ● dejar que la solapa del extremo abierto de la bolsa de plástico se "doble" para formar un cierre seguro, pero no hermético, durante la incubación. ● Deje reposar durante 60 ± 5 min a temperatura ambiente. No ajustar el pH. ● Incubar la bolsa ligeramente abierta, que contiene melón, durante 24 ± 2 h a 35 ° C. |

| | |
|---------|---|
| Mangos. | <ul style="list-style-type: none"> ● Para frutas trituradas o cortadas, pesar 25 g de muestra ● Agregue 225 ml de agua de peptonada amortiguada estéril y mezcle 2 min. ● Déjelo reposar a 60 min. ● Mezcle bien girando ● Incubar 24 ± 2 h a 35°C. ● Para mangos enteros, no enjuague incluso si hay suciedad visible. Examine los mangos como están, coloque el mango en una bolsa de plástico estéril, agregue suficiente agua peptonada amortiguada para permitir que el mango flote. el volumen de agua peptonada amortiguada puede ser 1 vez el peso de los mangos. Por ejemplo, los mangos que pesan 500 g probablemente necesitarán un volumen de aproximadamente 500 mL de agua peptonada amortiguada para flotar. Agregue más agua peptonada tamponada, si es necesario. Coloque la bolsa de plástico con los mangos y agua peptonada amortiguada, en un vaso de precipitados, u otro recipiente apropiado, para su incubación. ● Deje reposar durante más de 60 minutos a temperatura ambiente. ● Incubar la bolsa ligeramente abierta durante 24 ± 2 h a 35°C. |
| Tomates | <ul style="list-style-type: none"> ● Para frutas trituradas o cortadas, pesar 25 g de muestra ● Agregar 225 ml de caldo de preenriquecimiento universal (UP) y mezcle 2 min. ● Déjelo reposar durante 60 ± 5 min a temperatura ambiente con el frasco bien tapado. ● No ajuste el pH. ● Incubar 24 ± 2 ha 35°C. ● Para tomates enteros, no enjuague incluso si hay suciedad visible. Examine los tomates "tal cual". ● Coloque el tomate en una bolsa de plástico esterilizada u otro recipiente adecuado (se puede usar un vaso de precipitados cubierto con papel de aluminio esterilizado). Agregue suficiente caldo UP para permitir que el tomate flote. El volumen de caldo UP puede ser 1.0 veces el peso del tomate. Por ejemplo, los tomates que pesan 300 g probablemente necesitarán un volumen de aproximadamente 300 ml de caldo UP para flotar. Agregue más, si es necesario. Coloque la bolsa de plástico (si se usa), con el tomate y el caldo UP, en un vaso de precipitados estéril (el tamaño del vaso de precipitados depende del tamaño del tomate) u otro recipiente apropiado, como soporte durante la incubación. Deje que la |

| | |
|------------------------------------|--|
| | <p>solapa del extremo abierto de la bolsa de plástico se "doble" para formar un cierre seguro, pero no hermético, durante la incubación.</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Deje reposar durante 60 ± 5 min a temperatura ambiente. No ajuste el pH. ● Incubar la bolsa ligeramente abierta durante 24 ± 2 ha 35°C. |
| Muestras ambientales. | <ul style="list-style-type: none"> ● Tome las muestras de las superficies ambientales con hisopos o esponjas estériles ● Coloque el hisopo / esponja en una bolsa estéril o equivalente, que contenga suficiente caldo Dey-Engley (DE) para cubrir el hisopo / esponja, en caso de que estas se encuentren deshidratadas. (Existen presentaciones comerciales que tiene medios de transporte que pueden ser usados en sustitución del DE) ● Transportar los hisopos / esponjas en una hielera separada con geles refrigerantes congelados, para mantener las muestras frías, pero no congeladas. Si las muestras no se pueden procesar inmediatamente, mantenerlas en temperatura de refrigeración. Las muestras deben ser analizadas antes de 50 h posteriores a la recolección. ● Coloque el hisopo / esponja en 225 ml de caldo lactosado ● Agite ● Déjelo reposar 60 ± 5 min a temperatura ambiente. ● Mezcle bien y determine el pH con papel de prueba. Ajuste el pH, si es necesario, a $6.8 \pm 0,2$. ● Incubar 24 ± 2 h a $35^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$. |
| Semillas de alfalfa y frijol mungo | <ul style="list-style-type: none"> ● Pesar 25 g de muestra y adicionar 225 mL de Caldo Lactosado. ● Homogeneizar por enjuague. ● Dejar reposar por 60 ± 5 minutos. ● Ajustar el pH, si es necesario a 6.8 ± 0.2. ● Incube por 24 h a $35^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$. |
| Pulpa de mamey | <ul style="list-style-type: none"> ● Pesar asépticamente 25 g ● Agregue 225 mL de caldo de pre enriquecimiento universal (UP) estéril. ● Mezcle girando y deje reposar 60 ± 5 min a temperatura ambiente ● No ajuste el pH. ● Incubar 24 ± 2 h a $35^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$. |

| | |
|--|---|
| | <ul style="list-style-type: none"> ● Cuando se realice o se solicite la búsqueda intencionada S. Typhi pesar 25 g de la muestra. Agregue 225 mL de Caldo de Preenriquecimiento universal (UP) sin citrato de amonio férrico. ● Mezclar y dejarlo reposar 60 ± 5 min a temperatura ambiente. ● No ajuste el pH. ● Incubar 24 ± 2 h a 35 ° C +/- 2°C. ● Trata como un alimento de baja carga microbiana. |
| <p>Verduras frescas de hoja verde, hierbas y brotes (espinacas tiernas, repollo, lechuga iceberg, lechuga romana, mezcla de primavera, albahaca, cilantro, eneldo, perejil rizado, cilantro cimarrón, perejil italiano, berros, alfalfa, frijol mungo, trébol, rábano y brotes de brócoli).</p> | <ul style="list-style-type: none"> ● Pesar asépticamente 25 g ● Agregue 225 ml de caldo de preenriquecimiento universal (UP) (para repollo, agregue 225 ml de agua de peptona tamponada modificada) y empape completamente el contenido sin homogeneizarlo. ● Incubar 24 ± 2 ha 35 ° C. |
| <p>Agua usada para riego de brotes de variedades de alfalfa, frijol mungo o verde, y brócoli.</p> | <ul style="list-style-type: none"> ● Añada asépticamente 375 mL de muestra a 1125 mL de caldo de preenriquecimiento universal (UP) en un recipiente estéril apropiado. ● Mezclar bien girando ● Incubar 24 ± 2 h a 35 ± 2 °C. (Trátelo como un alimento con alta carga microbiana). |
| <p>A.10 FORMULACIONES Y PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.</p> | <p>Eliminar el texto del A.10 "Alternativamente pueden utilizarse medios comerciales con excepción del medio RVS ya que en punto A.10.2.1.2 se indica que debe prepararse por ingredientes La caducidad de los medios de cultivo una vez preparado deberá ser demostrada en el laboratorio bajo las condiciones de almacenamiento particulares con excepción del medio RVS y que en el punto A.10.2.4.2 indica que debe ser usado el día de su preparación, el Caldo MKTTn para el que se indica en el punto A.10.3.4.2 que el medio deben usarse el mismo día de su preparación, el medio XLS para el que se indica que no debe usarse por más de 5 días."</p> <p>Este texto debe de eliminarse ya que contradice la propuesta de modificación en el numeral 7.1 y 7.2</p> <p>Según el BAM el medio RVS puede ser almacenado por 1 mes</p> |

BAM: "...Dispense 10 ml volumes of complete medium into 16 × 150 mm test tubes. Autoclave 15 min at 115°C. Final pH, 5.5 ± 0.2. Store in refrigerator and use within 1 month."

<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-media-m132-rappaport-vassiliadis-medium>

Según el ISO 6579 el medio RVS puede ser almacenado por : 3 meses

B.3.4.2 Preparation

Add to 1 000 ml of solution A, 100 ml of solution B, and 10 ml of solution C.

Adjust the pH, if necessary, so that after sterilization it is 5,2 ± 0,2 at 20 °C to 25 °C.

Dispense the medium into tubes or flasks (6.12) of suitable capacity to obtain the portions necessary

for the test, e.g. 10 ml quantities dispensed into tubes.

Sterilize for 15 min in the autoclave (6.1) set at 115 °C.

Store the complete medium in closed tubes or flasks at 5 °C (6.8) for up to three months.

Según el ISO 6579 el MKTTn puede ser almacenado a 5 °C hasta siempre que su pH no sea menor de 7.0

B.5.4.2 Preparation

Aseptically, add 5 ml of the novobiocin solution (B.5.3) to 1 000 ml of base medium (B.5.1). Mix, then add 20 ml of the iodine-iodide solution (B.5.2). Mix well. The final concentration of novobiocin in the complete medium is 40 mg/l.

Dispense the medium aseptically into containers (6.12) of suitable capacity to obtain the portions necessary for the test, e.g. 10 ml quantities dispensed into tubes. After preparation, the pH of complete MKTTn broth will be approximately 8,0. If the complete medium is not used immediately, store it in the dark at 5 °C (6.8). The pH may drop during storage due to chemical reactions. Do not use the complete medium if the pH drops below 7,0.

No existe ningún medio XLS.

Según el ISO 6579

El medio XLD puede ser almacenado por 4 semanas

B.6.3 Preparation of the agar plates

Cool the medium to 47 °C to 50 °C in a water bath (6.5), mix, and pour into sterile Petri dishes (6.14). Allow to solidify. Immediately before use, dry the agar plates carefully (preferably with the lids off and the agar surfacedownwards) in the oven (6.2) set between 25 °C and 50 °C until the surface of the agar is dry. Store the poured plates protected from drying, at 5 °C (6.8) for up to four weeks.

| | |
|---|--|
| <p>A.2.3 Incubadora capaz de operar a 36 °C ± 1 °C;</p> | <p>Se propone que se modifique a 35 °C ± 2 °C; como lo indica el BAM.</p> <p>La temperatura de incubación de los microorganismos debe validar siguiendo un protocolo y método científico, no se encuentran en la NOM-210 referencia a ninguna publicación o otro estándar de referencia que cite que existe una validación a 36°C +/- 1°C.</p> <p>A continuación se listan las referencias donde se menciona un paso de enriquecimiento en intervalos de +/- 2 °C</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bacteriological Analytical Manual Chap. 5. https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-5-salmonella |
| <p>A.10.2.4.2 Preparación: Agregar 1000mL de la solución A, 100mL de la solución B y 10mL de la solución C. Ajustar el pH, si es necesario, de tal manera que después de la esterilización sea de 5.2 ± 0.2. Antes de su uso, distribuir porciones de 10mL a cada tubo. Esterilizar a 115°C por 15 min. Almacenar el medio preparado a 3°C ± 2°C, utilizar el medio el mismo día de su preparación.</p> <p>Nota: La composición final del medio completo será de: Digerido enzimático de soya, 4.5g/L; NaCl, 7.2g/L; KH₂PO₄ + K₂HPO₄, 1.44g/L; MgCl₂, 13.4g/L o MgCl₂.6H₂O, 28.6g/L; oxalato de verde malaquita, 0.036g/L. Siempre que sea posible, este medio debe prepararse por sus componentes individuales. Cuando se usen medios formulados comercialmente, los usuarios deben observar que hay formulaciones y condiciones de incubación diferentes a las descritas en esta Norma. Se deberá considerar que el uso de medios de cultivo con formulaciones diferentes y/o condiciones de incubación diferentes a las descritas en esta Norma serán considerados como métodos alternativos a los establecidos en esta Norma, por lo tanto deberán cumplir con lo indicado en el inciso 5.3 de esta Norma.</p> | <p>Se sugiere cambiar a</p> <p>A.10.2.4.2 Preparación: Agregar 1000mL de la solución A, 100mL de la solución B y 10mL de la solución C. Ajustar el pH, si es necesario, de tal manera que después de la esterilización sea de 5.2 ± 0.2. Antes de su uso, distribuir porciones de 10mL a cada tubo. Esterilizar a 115°C por 15 min. Almacenar el medio preparado a 3°C ± 2°C, el medio preparado puede ser almacenado hasta por 1 mes si se almacena en refrigeración.</p> <p>Nota: La composición final del medio completo será de: Digerido enzimático de soya, 4.5g/L; NaCl, 7.2g/L; KH₂PO₄ + K₂HPO₄, 1.44g/L; MgCl₂, 13.4g/L o MgCl₂.6H₂O, 28.6g/L; oxalato de verde malaquita, 0.036g/L. Siempre que sea posible, este medio debe prepararse por sus componentes individuales. Cuando se usen medios formulados comercialmente, los usuarios deben observar que hay formulaciones y condiciones de incubación diferentes a las descritas en esta Norma. Se deberá considerar que el uso de medios de cultivo con formulaciones diferentes y/o condiciones de incubación diferentes a las descritas en esta Norma serán considerados como métodos alternativos a los establecidos en esta Norma, por lo tanto deberán cumplir con lo indicado en el inciso 5.3 de esta Norma.</p> <p>Justificación: Según el BAM el medio RVS puede ser almacenado por 1 mes BAM: "...Dispense 10 ml volumes of complete medium into 16 × 150 mm test tubes. Autoclave 15 min at 115°C. Final pH, 5.5 ± 0.2. Store in the refrigerator and use within 1 month."</p> |

<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-media-m132-rappaport-vassiliadis-medium>

Según el ISO 6579 el medio RVS puede ser almacenado por : 3 meses

B.3.4.2 Preparation

Add to 1 000 ml of solution A, 100 ml of solution B, and 10 ml of solution C.

Adjust the pH, if necessary, so that after sterilization it is $5,2 \pm 0,2$ at $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Dispense the medium into tubes or flasks (6.12) of suitable capacity to obtain the portions necessary

for the test, e.g. 10 ml quantities dispensed into tubes.

Sterilize for 15 min in the autoclave (6.1) set at $115\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Store the complete medium in closed tubes or flasks at $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (6.8) for up to three months.

A.10.6.1 Fórmulas.

Fórmula 1

| | |
|-------------------------|----------|
| Extracto de carne | 3.0g |
| Extracto de levadura | 3.0g |
| Peptona | 20.0g |
| NaCl | 5.0g |
| Lactosa | 10.0g |
| Sacarosa | 10.0g |
| Glucosa | 1.0g |
| Citrato de fierro (III) | 0.3g |
| Tiosulfato de sodio | 0.3g |
| Rojo de fenol | 0.024g |
| Agar | 9g a 18g |
| Agua | 1000mL |

pH final 7.4 ± 0.2

Fórmula 2

| | |
|----------------------|-------|
| Extracto de carne | 3.0g |
| Extracto de levadura | 3.0g |
| Peptona | 15.0g |
| Proteosa peptona | 5.0g |
| NaCl | 5.0g |
| Lactosa | 10.0g |
| Sacarosa | 10.0g |
| Glucosa | 1.0g |
| FeSO ₄ | 0.3g |
| Tiosulfato de sodio | 0.3g |

Sin comentarios

| | |
|---|---|
| <p>Rojo de fenol 0.024g Agar 12.0g Agua 1000mL pH final 7.3 ± 0.2 Fórmula 3</p> <p>Extracto de carne 3.0g Extracto de levadura 3.0g Peptona de caseína 15.0g Proteosa peptona 5.0g NaCl 5.0g Lactosa 10.0g Sacarosa 10.0g Glucosa 1.0g FeSO₄ 0.2g Tiosulfato de sodio 0.3g Rojo de fenol 0.024g Agar 12.0g Agua 1000mL pH final 7.4 ± 0.2</p> | |
| <p>A.10.6.2. De cualquiera de las 3 fórmulas disolver los ingredientes o seguir las instrucciones de preparación del fabricante.</p> | <p>Sin comentarios</p> |
| <p>Apéndice B Normativo.</p> | <p>TODO EL APÉNDICE B DEBE SER REVISADO A LA LUZ DE LA ISO 6888-1:2021 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) — Part 1: Method using Baird-Parker agar medium</p> <p>Es conveniente que la normatividad nacional se armonice con los estándares internacionales vigentes y no con referencias derogadas.</p> |
| <p>Apéndice B Normativo. Método de referencia para la estimación de la cuenta de S. aureus. B.2.6 Baño de agua capaz de operar a 36°C ± 1°C.</p> | <p>Se sugiere que la muestra se modifique. B.2.6 Baño de agua capaz de operar a 36°C ± 1°C a menos que el fabricante de la prueba de coagulasa indique algo diferente.</p> |
| <p>B.5.4 Productos de la pesca Dependiendo de la muestra seguir lo indicado en el inciso I.6 de esta Norma.</p> | |

| | |
|--|--|
| <p>B.6.4. Invertir las placas e incubar por 24 h \pm 2h a 36°C \pm 1°C, marcar en la base de la placa la posición de las colonias típicas y atípicas, re-incubar por 24 h \pm 2h 36°C \pm 1°C, marcar en la base de la placa la posición de las nuevas colonias típicas y atípicas.</p> | <p>Los tiempos de revisión propuestos están basados en una referencia ISO 6888 de 1999 , la cual no está actualizada al estándar actual. Esa misma norma indica condiciones de incubación de 37°C o 35 °C por lo que la NOM-210 tampoco sería equivalente a ese estándar ya que propone una temperatura de incubación diferente. Por otro lado el BAM si indica incubación a 36°C \pm 1°C con un tiempo de incubación de 45 a 48 h y por lo tanto se propone el siguiente texto:</p> <p>B.6.4 Invertir las placas e incubar de 45 h a 48 h a 36°C \pm 1°C.</p> |
| <p>B.6.4.1 Colonias Típicas: Son colonias negras o grises, circulares, brillantes, convexas, lisas, de diámetro de 1mm a 1.5 mm a las 24h de incubación y 1.5 mm a 2.5 mm después de 48h de incubación, rodeadas por una zona clara que puede ser parcialmente opaca. Después de 24h de incubación, en esa zona clara, se puede observar un halo opalescente en la periferia de las colonias.</p> | <p>En concordancia con la linea anterior se propone el siguiente texto. B.6.4.1 Colonias Típicas: Son colonias negras o grises, circulares, brillantes, convexas, lisas de 1.5 mm a 2.5 mm después de 48h de incubación, rodeadas por una zona clara que puede ser parcialmente opaca. A las 48h de incubación, en esa zona clara, se puede observar un halo opalescente en la periferia de las colonias.</p> |
| <p>B.6.4.2 Colonias Atípicas: Son colonias de las mismas dimensiones de las colonias típicas, pueden ser negras brillantes con o sin un pequeño borde blanco, la zona clara es muy pequeña o no visible, y el halo opalescente no está presente o es apenas visible. También son colonias atípicas las colonias grises sin zona clara, del mismo tamaño que las colonias típicas. Hay bacterias de géneros distintos al Staphylococcus, que pueden dar la morfología colonial típica o atípica, por lo que la observación microscópica usando una tinción de Gram puede ayudar en la distinción del género.</p> | <p>Sin comentarios</p> |
| <p>B.6.5 Seleccionar la dilución adecuada B.6.5.1 En la mayoría de los casos seleccionar las placas que tengan menos de 300 colonias en total y menos de 150 colonias sospechosas (típicas y atípicas) de S. aureus; si no es posible, seleccionar las placas de las diluciones más altas no obstante tengan más de las colonias indicadas. Seleccionar por placa un número de colonias para confirmar. (Si solo están presentes colonias típicas en general seleccionar 5 colonias típicas "ts". Si solo están presentes colonias atípicas en general seleccionar 5 colonias atípicas "as". Si hay de ambos tipos de colonias seleccionar colonias tanto típicas "ts" como atípicas "as", por lo general seleccionar solo 5 colonias en total). Realizar la tinción de Gram, en el caso de no observar cocos Gram positivos, la colonia se tomará como negativa para S. aureus, por lo contrario si se observan cocos se seguirá con su confirmación.</p> | <p>Sin comentarios</p> |

| | |
|---|------------------------|
| <p>B.6.5.2 Cuando en la primera dilución se cuenten menos de 15 colonias sospechosas por placa. Seleccionar por cada placa 5 colonias típicas, 5 colonias atípicas o todas las colonias típicas y todas las colonias atípicas, lo que sea menor. A las colonias seleccionadas realizar tinción de Gram, en el caso de observar una morfología diferente a cocos Gram positivos, la colonia se tomará como negativa para <i>S. aureus</i>, si se observan cocos Gram positivos se seguirá con su confirmación.</p> | <p>Sin comentarios</p> |
| <p>B.6.5.3. Si hay menos de 15 colonias típicas o atípicas en la dilución más baja seleccionar: 5 colonias típicas o todas las existentes en la placa, lo que sea menor y 5 colonias atípicas o todas las existentes en la placa, lo que sea menor. A las colonias seleccionadas realizar tinción de Gram, en el caso de observar una morfología diferente a cocos Gram positivos, la colonia se tomará como negativa para <i>S. aureus</i>, si se observan cocos Gram positivos se seguirá con su confirmación y seguir para el cálculo lo indicado en el inciso B.7.5 de esta Norma.</p> | <p>Sin comentarios</p> |
| <p>B.6.5.4 Cuando se siembre un 1mL dividido en 3 placas (0.3mL, 0.3mL y 0.4mL), considerar las tres placas como una sola placa. Si la cuenta es mayor que 15 UFC seleccionar 5 colonias sospechosas entre las 3 placas, es decir, cuando solo existan colonias típicas, seleccionar 5 colonias típicas, cuando solo existan colonias atípicas, seleccionar 5 colonias atípicas, cuando existan colonias típicas y atípicas seleccionar en total 5 colonias incluyendo típicas y atípicas. A las colonias seleccionadas realizar tinción de Gram, en el caso de observar una morfología diferente a cocos Gram positivos, la colonia se tomará como negativa para <i>S. aureus</i>, si se observan cocos Gram positivos se seguirá con su confirmación. Si la cuenta de las 3 placas es menor que 15 UFC considerar las tres placas como una sola y seguir lo indicado en el inciso B.6.5.2, de esta Norma.</p> | <p>Sin comentarios</p> |
| <p>B.6.6 Cuando las placas de la dilución más baja tengan menos de 15 colonias sospechosas (típicas y/o atípicas) se debe agregar la nota de "valor estimado" al reporte de los resultados.</p> | <p>Sin comentarios</p> |
| <p>B.6.8.1 Prueba de coagulasa. Seguir las instrucciones del proveedor del plasma. En general, sembrar cada colonia seleccionada (coco Gram positivo) en tubos con 0.5mL de BHI y en tubos con AST. Utilizar simultáneamente un control positivo de <i>S. aureus</i> y un control negativo de <i>S. epidermidis</i>. Incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 20h a 24h. Mantener los cultivos en AST a no más de 27°C para pruebas posteriores. Mezclar 0.1mL del cultivo en BHI con 0.3mL de plasma de conejo con EDTA. Incubar a 36°C</p> | <p>Sin comentarios</p> |

± 1°C y observar periódicamente a intervalos de 1h durante las primeras 4h a 6h; si no hay formación de coágulo, observar hasta las 24h. Considerar la prueba positiva cuando el coágulo se forma completamente y es firme al invertir el tubo. Cuando los resultados de la coagulasa o la termonucleasa no permitan concluir la confirmación de S. aureus, se deberán realizar las pruebas auxiliares, descritas en el inciso B.6.9, de esta Norma.

Apéndice C Normativo.
Método de referencia para el aislamiento de L. monocytogenes.

Todo el apéndice C debe ser actualizado para adecuarse a la Norma Internacional ISO 11290 Vigente.

La NORMA 210 en el numeral 9.4 declara que la norma es equivalente con la ISO 11290 (de 1996, sin embargo la versión vigente de la ISO es 2017 y por lo tanto el texto del apéndice C normativo debería ser actualizarse para seguir siendo equivalente.

El método actualmente descrito en la NOM-210 y cuyo objeto es la identificación de L. monocytogenes adolece de no contar con un medio de cultivo diferencial para L. monocytogenes respecto del resto de las listerias. Esta deficiencia técnica es un riesgo grave a la salud de los consumidores pues su falta de selectividad podría estar causando una sub-identificación del microorganismo objetable.

El apéndice actual solo se limita a los alimentos y excluye las superficies (que sí están incluidas en el apéndice A normativo), y que este tipo de muestras es de relevancia en la industria.

La norma de referencia también incluye en su alcance otro tipo de productos como los piensos.

Referencias:
Referencias:

- [1] ISO 16140 (all parts), Microbiology of the food chain — Method validation
- [2] ISO 18593, Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs

- [3] ISO/TS 17728, Microbiology of the food chain — Sampling techniques for microbiological analysis of food and feed samples
- [4] Barrow G.I., & Feltham R.K.A. eds. Cowan & Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. Cambridge University Press, Great Britain, Third Edition, 1993
- [5] Bertsch D., Rau J., Eugster M.R., Haug M.C., Lawson P.A., Lacroix C., Meile L. *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2013 Feb, 63 pp. 526–532
- [6] Beumer R.R., & Hazeleger W.C. Chromogenic media for the detection and/or enumeration of *Listeria monocytogenes* Results of trials performed by a working group of the International Organization for Standardization – ISO/TC 34/SC 9. Arch. Lebensmittelhyg. 2007, 58 pp. 47–50
- [7] Corry J.E.L., Curtis G.D.W., Baird R.M. eds. In: Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology. (Publishing R.S.C.) Third Edition, 2012
- [8] Garrity G.M. (editor in chief), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition, 2005
- [9] Greenwood M., Willis C., Doswell P., Allen G., Patack K. Evaluation of chromogenic media for the detection of *Listeria* species in food. J. Appl. Microbiol. 2005, 99 pp. 1340–1345
- [10] Graves L.M., Hesel L.O., Steigerwalt A.G., Morey R.E., Daneshvar M.I., Roof S.E. *Listeriamarthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010, 60 pp. 1280–1288
- [11] Johnson J., Jinneman K., Stelma G., Smith B.G., Lye D., Messer J., Ulaszek J., Evsen L., Gendel S., Bennett R.W., Swaminathan B., Pruckler J., Steigerwalt A., Kathariou S., Yildirim S., Volokhov D., Rasooly A., Chizhikov V., Wiedmann M., Fortes E., Duvall R.E., Hitchins A.D. Natural atypical *Listeria innocua* strains with *Listeria monocytogenes* pathogenicity island 1 genes. Appl. Environ. Microbiol. 2004, 70 pp. 4256–4266
- [12] Lang Halter E., Neuhaus K., Scherer S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* of a German fresh water pond. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2013 Feb, 63 pp. 641–647
- [13] Leclercq A. Colonial atypical morphology and low recoveries of *Listeria monocytogenes* strains on Oxford, PALCAM, Rapid'L.mono and ALOA solid media. J. Microbiol. Methods. 2004, 57 pp. 251–258

- [14] Leclercq A., Clermont D., Bizet C., Grimont P.A., Le Flèche-Matéos A., Roche S.M. *Listeria rocourtiae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010, 60 pp. 2210–2214
- [15] Liu D., Lawrence M.L., Wiedmann M., Gorski L., Mandrell R.E., Ainsworth A.J. et al. *Listeria monocytogenes* subgroups IIIA, IIIB, and IIIC delineate genetically distinct populations with varied pathogenic potential. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44 pp. 4229–4233
- [16] Ottaviani F. Ottaviani M., Agosti M., Differential agar medium for *Listeria monocytogenes*. Quimper Froid Symposium Proceedings, P6 ADRIA Quimper, France, 16-18 June, 1997
- [17] Ottaviani F. Ottaviani M., Agosti M. Esperienza su un agar selettivo e differenziale per *L. mono.* *Industrie Alimentari*, 1997
- [18] Roberts A., Nightingale K., Jeffers G., Fortes E., Kongo J.M., Wiedmann M. Genetic and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* lineage III. *Microbiology.* 2006, 152 pp. 685–693
- [19] Willis C., Baalham T., Greenwood M., Presland F. Evaluation of a new chromogenic agar for the detection of *Listeria* in food. *J. Appl. Microbiol.* 2006, 101 pp. 711–717
- [20] AFNOR validation studies, available at <http://nf-validation.afnor.org/en/?s=listeria>
- [21] Augustin J.-C., Kalmokoff M., Ells T., Favret S., Desreumaux J., Decourseulles Brasseur E. and Gnanou Besse N Modeling the behavior of *Listeria monocytogenes* during enrichment in half Fraser broth - Impact of pooling and the duration of enrichment on the detection of *L. monocytogenes* in food. *Food Microbiol.* 2016, 60 pp. 131–136
- [22] Jagadeesan B., Bastic Schmid V., Klijn A., Mc Mahon W. Validation of Test Portion Pooling for the Detection of *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* in Dairy Products. Poster presented at: IAFFP 2016, St. Louis, Jul 29 - Aug 3
- [23] Angelidis A.S., Kalamaki M.S., Georgiadou S.S. Identification of non-*Listeria* spp. bacterial isolates yielding a β -D-glucosidase-positive phenotype on Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti (ALOA). *Int. J. Food Microbiol.* 2015, 193 pp. 114–129
- [24] Carpentier B, & Barre L. Guidelines on Sampling the Food Processing Area and Equipment for the Detection of *Listeria monocytogenes*. *Listeria EURL*, 2012
- [25] Barre L., Angelidis A.S., Boussaid D., Decourseulles Brasseur E., Manso E. gnanou besse N. Applicability of the ISO 11290-1 Standard Method for *Listeria monocytogenes* detection in the

| | |
|---|---|
| | <p>presence of new <i>Listeria</i> species. <i>Int. J. Food Microbiol.</i> 2016, 238 pp. 281–287</p> <p>[26] Henk C., Warchocki S., Emily M., Adam F., Clyde M., Kephart D and Weidmann M Five new species of <i>Listeria</i> (<i>L. floridensis</i> sp. nov., <i>L. aquatic</i> sp. nov., <i>L. cornellensis</i> sp. nov., <i>L. riparia</i> sp. nov. and <i>L. grandensis</i> sp. nov.) from agricultural and natural environments in the United States. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> 2014, 64 pp. 1882–1889</p> <p>[27] Weller D., Andrus A., Wiedmann M., Bakker H. <i>Listeria booriae</i> sp. nov. and <i>Listeria newyorkensis</i> sp. nov., from food processing environments in the USA. <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> 2015, 65 pp. 286–292</p> <p>[28] ISO 17468, Microbiology of the food chain — Technical requirements and guidance on establishment or revision of a standardized reference method</p> <p>[29] Gnanou Besse N., Favret S., Desreumaux J., Decourseulles Brasseur E., Kalmokoff M. Evaluation of reduction of Fraser incubation by 24h in the EN ISO 11290-1 standard on detection and diversity of <i>Listeria</i> species. <i>Int. J. Food Microbiol.</i> 2016, 224 pp. 16–21</p> <p>[30] ISO 16140:2003,3) Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative methods</p> |
| | <p>Considerando lo anterior se recomienda se propone el siguiente texto:</p> |
| <p>Microbiología de la cadena alimentaria - Método horizontal para la detección y enumeración de <i>Listeria monocytogenes</i> y de <i>Listeria</i> spp.</p> <p>Método de detección</p> <p>ADVERTENCIA - Para salvaguardar la salud del personal de laboratorio, es fundamental que las pruebas de detección de <i>L. monocytogenes</i> y <i>Listeria</i> spp. sólo se lleven a cabo en laboratorios debidamente equipados, bajo el control de un microbiólogo capacitado y se debe tener cuidado en la eliminación de todos los materiales incubados. Las personas que utilicen este documento deben estar familiarizadas con las prácticas normales de laboratorio.</p> <p>Este documento no pretende abordar todos los aspectos de seguridad, si los hay, asociados con su uso. Es responsabilidad del usuario establecer prácticas adecuadas de seguridad y salud. En particular, se recomienda que las pruebas para detectar <i>L. monocytogenes</i> se realicen en laboratorios que ofrezcan condiciones de nivel 2 de bioseguridad. Se recomienda encarecidamente que el personal de laboratorio femenino sea consciente del riesgo particular que presenta la infección para el feto en desarrollo de la madre a través de la exposición a <i>L. monocytogenes</i> y <i>Listeria</i> spp, y que el personal gestante y las personas con afecciones o enfermedades subyacentes reconocidas que deterioran la inmunidad mediada por células no manipulan cultivos de <i>L. monocytogenes</i> y <i>Listeria</i> spp.</p> <p>Alcance</p> <p>Este documento especifica un método general para la detección de <i>L. monocytogenes</i> y la detección de <i>Listeria</i> spp. (incluida <i>L. monocytogenes</i>).</p> <p>Este documento es aplicable a: productos destinados al consumo humano y para la alimentación de animales y a muestras ambientales en el área de producción y manipulación de alimentos. Es posible que algunas especies de <i>Listeria</i> descritas adicionalmente no sean detectadas o confirmadas por este método. [5], [10], [12], [14],</p> | |

[25], [26], [27].

Detección de *Listeria monocytogenes*

Determinación de la detección / no detección de *Listeria monocytogenes* (3.1), en una masa o volumen de producto determinado o en una superficie determinada, cuando las pruebas se lleven a cabo de conformidad con este documento

Principio

General

Las especies de *Listeria* pueden estar presentes en pequeñas cantidades y a menudo van acompañadas de cantidades considerablemente mayores de otros microorganismos, por lo que es necesario un enriquecimiento selectivo. También es necesario detectar *Listeria* spp y el medio de enriquecimiento selectivo primario, con una concentración reducida de inhibidor, cumple al menos parte de esta función.

NOTA: La presencia de *L. monocytogenes* puede estar enmascarada por la presencia de otras especies de *Listeria*, en particular *L. innocua* o *L. ivanovii*.

Dentro de los límites de este documento, la detección de *L. monocytogenes* y de *Listeria* spp requiere cuatro etapas sucesivas, como se describe en el diagrama de flujo.

Enriquecimiento primario en un medio de enriquecimiento líquido selectivo con concentración reducida de agentes selectivos (caldo Demi Fraser) Inoculación de un medio de enriquecimiento primario selectivo que contiene la mitad de las concentraciones de acriflavina y ácido nalidíxico (medio caldo Fraser), que también se utiliza como líquido de dilución para la porción de ensayo. Incubación de la suspensión inicial a 30 ° C durante 24 a 26 h.

Enriquecimiento secundario es realizado en un medio de enriquecimiento líquido selectivo con concentración total de agentes selectivos (caldo Fraser). Inoculación de medio de enriquecimiento líquido secundario sin diluir (caldo Fraser) a partir del enriquecimiento primario.

Incubación del caldo Fraser a 37 ° C durante 24 h.

Placas e identificación

De los del enriquecimiento primario y secundario, sembrar en 2 medios sólidos selectivos:

- Agar *Listeria* según Ottaviani y Agosti (ALOA) (véanse las referencias [16] y [17]);
- Cualquier otro medio sólido selectivo a elección del laboratorio complementario a Agar *Listeria* según Ottaviani y Agosti, utilizando un sustrato y / o principio diferente al utilizado en agar *Listeria* según Ottaviani y Agosti

Incubación del Agar *Listeria* según Ottaviani y Agosti a 37 ° C durante un total de 48 h. Si las colonias son presuntivas *L. monocytogenes* o *Listeria* spp. son evidentes a las 24 h, la incubación puede detenerse en esta etapa. Incubación del segundo medio selectivo a la temperatura apropiada y examen después del tiempo apropiado.

Confirmación

Subcultivo de las colonias presuntivas *L. monocytogenes* o *Listeria* spp, En placa como se describe con anterioridad, y confirmación mediante pruebas morfológicas y / o bioquímicas apropiadas.

Medios de cultivo y reactivos

Para conocer las prácticas de laboratorio actuales, consulte la norma ISO 11133 vigente u otra referencia reconocida.

Equipo y consumibles

- Equipo común de laboratorio y en particular, lo siguiente:
- Aparato para esterilización en seco (horno) o esterilización en húmedo (autoclave).
- Incubadora, capaz de mantenerse entre 25 ° C y 50 ° C.

- Incubadoras, capaces de funcionar a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (opcional).
- Baño de agua, capaz de funcionar entre $47\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $50\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Asas estériles de aproximadamente 3 mm de diámetro o 10 μl y asa recta inoculación.
- Potenciómetro, capaz de leerse con una precisión de 0,01 unidades de pH a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, lo que permite realizar mediciones con una precisión de $\pm 0,1$ unidades de pH.
- Pipetas graduadas o pipetas automáticas, de capacidades nominales de 1 ml y 10 ml.
- Placas de Petri, por ejemplo de 90 mm de diámetro.
- Microscopio, preferiblemente con contraste de fases, y con portaobjetos y cubreobjetos.
- Refrigerador, capaz de funcionar a $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Muestreo

El muestreo no forma parte del método especificado en este documento. Si no existe una Norma específica que se ocupe del muestreo del producto en cuestión, se recomienda que las partes interesadas lleguen a un acuerdo sobre este tema.

Es importante que el laboratorio reciba una muestra que sea verdaderamente representativa y que no haya sido dañada o cambiada durante el transporte o almacenamiento.

Preparación de la muestra de prueba

Prepare la muestra de prueba de acuerdo con la NOM-110-SSA1-1994

Procedimiento

Porción de prueba y suspensión inicial

Para la preparación de la suspensión inicial, utilice como líquido de dilución el medio de enriquecimiento primario selectivo (medio caldo Fraser).

En general, para preparar la suspensión inicial, añadir una porción de ensayo de 25 g o 25 ml a 225 g o 225 ml del medio de enriquecimiento primario selectivo, para obtener una dilución diez veces mayor y homogeneizar. Precaliente el medio de enriquecimiento primario selectivo a temperatura ambiente antes de usarlo.

Este documento ha sido validado para porciones de prueba de 25 g o mL. Se puede utilizar una porción de prueba más pequeña, sin necesidad de validación / verificación adicional, siempre que se mantenga la misma proporción entre el caldo de enriquecimiento primario y la porción de prueba.

Enriquecimiento primario

Incubar el medio de enriquecimiento primario (caldo demi Fraser), a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante $25\text{ h} \pm 1\text{ h}$.

NOTA 1 Puede desarrollarse una coloración negra durante la incubación.

NOTA 2 Es posible almacenar a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ la muestra preenriquecida después de la incubación antes de transferirla al caldo Fraser por un máximo de 72 h.

Enriquecimiento secundario

Tras la incubación de la suspensión inicial (enriquecimiento primario) durante $25\text{ h} \pm 1\text{ h}$, transferir 0,1 ml del cultivo obtenido en (independientemente de su color) a un tubo o botella que contenga 10 ml de caldo Fraser.

Incubar el medio inoculado durante $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$

NOTA: En el caso de *Listeria* spp. además de la detección de *Listeria monocytogenes*, una incubación adicional de 24 h puede permitir la recuperación de más especies.

Selección e identificación

General.

A partir del cultivo de enriquecimiento primario incubado durante $25 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$ a 30°C , inocular, mediante un asa, la superficie del primer medio de siembra selectiva, Agar Listeria según Ottaviani y Agosti, para obtener colonias bien separadas.

Proceda de la misma manera con el segundo medio de aislamiento selectivo de su elección.

NOTA: El caldo demi fraser y el caldo Fraser se pueden refrigerar a 5°C antes del aislamiento en agar selectivo durante un máximo de 72 h. [20]

A partir del medio de enriquecimiento secundario incubado durante $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ a 37°C , repita el procedimiento descrito con los dos medios de selectivos.

Invierta las placas de Petri obtenidas y colóquelas en una incubadora a 37°C para Agar Listeria de acuerdo con Ottaviani y Agosti. Para el segundo medio selectivo, siga las instrucciones del fabricante.

Para agar Listeria de acuerdo con Ottaviani y Agosti incubar durante un total de $48 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$. Si a las 24 horas las colonias de *L. monocytogenes* y *Listeria* sp son evidentes, la incubación puede detenerse en esta etapa. Para el segundo agar selectivo incubar durante el tiempo apropiado. Examine las placas para detectar la presencia de presuntas colonias de *L. monocytogenes* o *Listeria* spp.

NOTA Después de la incubación, las placas se pueden refrigerar a 5°C durante un máximo de 48 h antes de la lectura.

Agar Listeria según Ottaviani y Agosti

Considere colonias presuntivas para *L. monocytogenes* las colonias azul verdosas rodeadas por un halo opaco (colonias típicas). Las colonias de *L. ivanovii* también son azul verdosas y están rodeadas por un halo opaco. Considere como presunta *Listeria* spp. las colonias azul verdosas con o sin halo opaco.

NOTA 1 Algunas cepas de *L. monocytogenes* expuestas a condiciones de estrés, particularmente estrés ácido, pueden mostrar un halo muy débil (o incluso ningún halo).

NOTA 2 Algunas cepas *L. monocytogenes* raras se caracterizan por una actividad lenta de PIPLC (fosfatidil inositol fosfolipasa C). Estas bacterias se detectan cuando la duración total de la incubación es superior, por ejemplo, a cuatro días. Algunas de estas cepas podrían ser patógenas. [13] No se han descrito cepas de *L. monocytogenes* como negativas para PIPLC.

NOTA 3 Algunos organismos distintos de *Listeria* spp. puede producir colonias azules en este medio. Véanse el anexo C y la referencia [23].

Segundo medio selectivo

Transcurrido el tiempo apropiado, examine las placas para detectar la presencia de colonias que se consideren presuntas de *Listeria* spp. o *L. monocytogenes*, según sus características para el tipo de medio utilizado.

Confirmación de *Listeria monocytogenes* o *Listeria* spp.

Selección de colonias para confirmación

Para confirmar la presunta *L. monocytogenes*, tome al menos una colonia que sea sospechosa para *L. monocytogenes*. Un aislado confirmado por muestra es suficiente. Si la primera colonia es negativa, tome otras colonias sospechosas para *L. monocytogenes* del medio selectivo (hasta un máximo de cinco colonias de cada placa de cada medio selectivo).

Separe las colonias seleccionadas sobre la superficie de placas presecadas de un agar no selectivo, por ejemplo, agar sangre, agar nutriente, agar con extracto de levadura de triptona soja (ASTEL), de una manera que permita que las colonias aisladas se dispersen. desarrollar.

El uso de agar sangre para cultivo puro permite interpretar la hemólisis, cuando es positiva, ya en esa etapa. Si el estriado en agar sangre no muestra hemólisis, la prueba de hemólisis se realizará mediante punción o en medio líquido.

Coloque las placas en la incubadora a 37°C durante 18 a 24 horas o hasta que el crecimiento sea satisfactorio.

Si las colonias no están aisladas, elija una colonia típica de *L. monocytogenes* en otra placa de agar no selectiva. Realizar las siguientes pruebas a partir de colonias de un cultivo puro en agar no selectivo.

Para la confirmación de colonias presuntivas de *Listeria spp.*, Tome al menos una colonia que se presume que es *Listeria spp*. Un aislado confirmado por muestra es suficiente. Si la primera colonia es negativa, tome otras colonias que se presume que son *Listeria spp.* de medio selectivo (hasta un máximo de cinco colonias de cada placa de cada medio selectivo).

Para la confirmación de *Listeria spp.* Utilice placas de ASTEL.

Separe las colonias seleccionadas en la superficie de las placas pre-secadas de ASTEL, de una manera que permita el desarrollo de colonias aisladas. Coloque las placas en la incubadora a 37 ° C durante 18 a 24 horas o hasta que el crecimiento sea satisfactorio.

Colonias típicas de *Listeria spp.* en ASTEL son de 1 mm a 2 mm de diámetro, convexas, incoloras y opacas con un borde completo. Cuando las placas se mantienen a la luz (artificial o natural) en un ángulo de aproximadamente 45 grados, las colonias exhiben un color gris azulado y una superficie granular.

Si las colonias no están aisladas, elija una típica *Listeria spp.* colonia en otra placa de agar no selectivo.

Realice las siguientes pruebas a partir de colonias típicas de un cultivo puro en ASTEL.

1. Confirmación de *L. monocytogenes*

1. General

Realice las pruebas de confirmación para *L. monocytogenes*. Se utilizarán cepas de control positivas y negativas adecuadas para cada una de las pruebas de confirmación. Realice como mínimo las pruebas obligatorias que se enumeran (en negrita) en la Tabla 1.

Tabla 1 — Pruebas de confirmación para *L. monocytogenes*

| Prueba | <i>L. monocytogenes</i> confirmation tests | Resultados |
|-------------|---|--|
| Obligatoria | Microscopic aspect Beta-haemolysis L-Rhamnose D-Xylose | Bacilos cortos delgados o cocobacilos + + - |
| Opcional | Catalase Motility at 25°C CAMP test | + + + |

a Microscopic aspect is optional for Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti and for the second medium if it allows distinction between pathogenic and non-pathogenic *Listeria spp.*

NOTA Se puede utilizar un procedimiento alternativo para confirmar el aislamiento como *Listeria monocytogenes*, siempre que se verifique la idoneidad del procedimiento.

Si se demuestra que son fiables, se pueden utilizar galerías miniaturizadas para la identificación bioquímica de *Listeria monocytogenes*.

Las cepas raras de *L. monocytogenes* no muestran beta-hemólisis ni una reacción positiva a la prueba CAMP en las condiciones descritas en este documento. Si las colonias típicas de Agar Listeria según Ottaviani y Agosti con actividad PIPLC, incluso si es baja, son negativas para la hemólisis, se recomienda realizar pruebas adicionales (por ejemplo, tinción de Gram, catalasa, movilidad, prueba CAMP, PCR), con el fin de determinar si este aislado es un *L. monocytogenes* no hemolítico.

Reacción de catalasa (opcional)

Tomar una colonia aislada obtenida en y suspenderla en una gota de solución de peróxido de hidrógeno en un portaobjetos. La formación inmediata de burbujas de gas indica una reacción positiva.

NOTA Una reacción de catalasa realizada a partir de una colonia que se origina en un agar sangre a veces puede dar lugar a resultados falsos positivos.

Prueba de movilidad (opcional)

Tomar una colonia aislada obtenida y suspenderla en un tubo que contenga un medio líquido nutritivo no selectivo.

Incubar en la incubadora a 25 ° C durante 8 a 24 h hasta que el medio se vuelva turbio.

Tome una gota del cultivo anterior usando un asa en un portaobjetos de microscopio de vidrio limpio. Coloque un cubreobjetos encima y examínelo con un microscopio.

Listeria spp (incluyendo *L. monocytogenes*) aparecen como bastoncillos delgados y cortos con movilidad giratoria.

Los cultivos que crecen a temperaturas superiores a 25 ° C pueden no mostrar este movimiento. Compárelos siempre con una cepa control de *Listeria*. Los cocos, bacilos grandes o los bacilos con movilidad de rotatorio rápida no son *Listeria* spp.

Como prueba alternativa de movilidad, utilizando una aguja de inoculación, diluir en agua estéril (u otro diluyente apropiado) un fragmento de colonia aislada obtenido en agar no selectivo. *Listeria* spp. (incluyendo *L. monocytogenes*) aparecen como bastoncillos delgados y cortos con movilidad giratoria.

Como otra prueba alternativa de movilidad, utilizando una asa recta, inocule el agar de movilidad (B.7) con un cultivo tomado de una colonia típica Incubar a 25 ° C durante 48 h ± 2 h.

Examine el crecimiento alrededor de la punción. *Listeria* spp son móviles, dando un patrón de crecimiento típico en forma de paraguas. Si el crecimiento no es suficiente, incube hasta cinco días más y observa el área de inoculación nuevamente.

NOTA Algunas especies nuevas de *Listeria* se han aislado recientemente. [5], [10], [12], [14], [25], [26], [27] La mayoría de ellas no son móviles en el agar de movilidad.

Aspecto microscópico (opcional en el caso de uso de agar específico para *Listeria* spp. Patógena)

Haga una preparación microscópica (por ejemplo, la tinción de Gram, microscopía húmeda) en una colonia bien aislada de *Listeria* spp. (incluyendo *L. monocytogenes*) aparecen como Gram positivos (si se realiza esta tinción), bastoncillos delgados, cortos o cocobacilos, con movilidad giratoria cuando se originan en un cultivo fresco.

Pruebas de hemólisis

General

Elija una de las pruebas de hemólisis descritas a continuación

NOTA Existen raras cepas de *L. monocytogenes* que no muestran b-hemólisis o una reacción positiva a la prueba CAMP en las condiciones descritas en este documento.

Hemólisis en agar sangre

Si las características morfológicas y fisiológicas son indicativas de *Listeria* spp, Inocular placas de agar sangre (B.8) para determinar la reacción hemolítica.

Seque bien la superficie del agar antes de usar. Tome una colonia aislada usando un asa, luego pinche una sección de agar. Repita para cada cultivo. En la misma placa, si es posible, inocule los cultivos de control positivos (*L. monocytogenes*) y negativos (*L. innocua*). Por ejemplo, se pueden utilizar *L. monocytogenes* 4b WDCM 00021 o *L. monocytogenes* 1 / 2a WDCM 00109 y *L. innocua* WDCM 00017.

Después de la incubación a 37 ° C durante 24 h ± 2 h, examinar las cepas de prueba y los controles. *L. monocytogenes* muestra zonas claras, estrechas y claras de hemólisis; *L. innocua* no muestra una zona clara alrededor de la estría. *L. seeligeri* muestra principalmente una zona débil de hemólisis. *L. ivanovii* suele mostrar zonas de hemólisis amplias y claramente delimitadas. Examine las placas con una luz brillante para comparar los cultivos de prueba con los controles.

NOTA 1 La reacción de hemólisis se ve más fácilmente eliminando cualquier crecimiento de colonia en la superficie del agar alrededor de la marca del inóculo.

NOTA 2 La prueba de hemólisis se puede realizar pinchando la placa de agar sangre utilizada para la prueba CAMP.

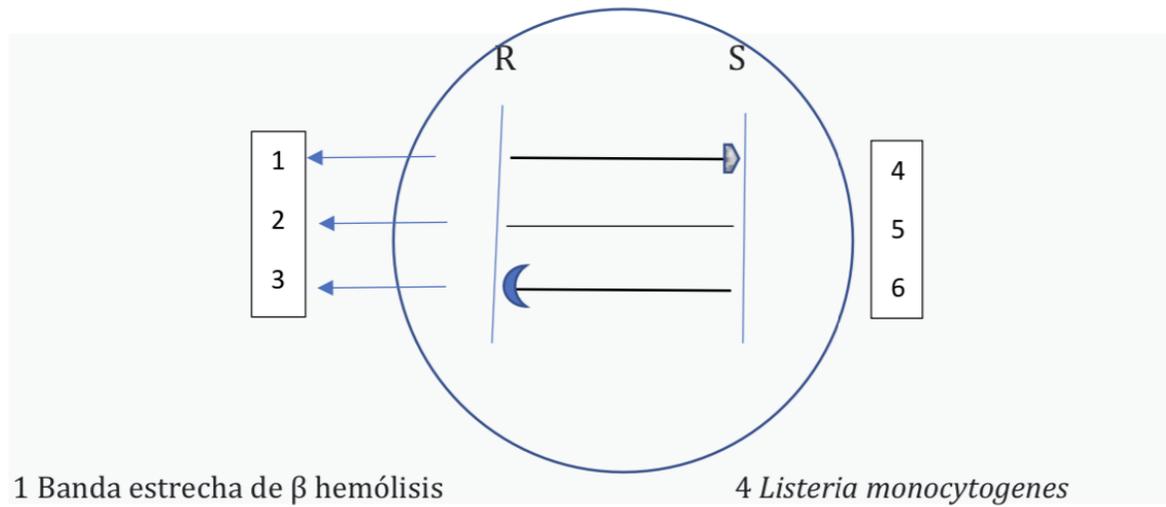
Reacción de hemólisis con glóbulos rojos

La reacción hemolítica también se puede llevar a cabo usando glóbulos rojos de la siguiente manera. Dispersar la colonia en 150 µl de un medio nutritivo líquido no selectivo, incubar a 37 ° C durante 2 h. Añadir 150 µl de suspensión de glóbulos rojos. Incubar a 37 ° C durante 15 min a 60 min, luego refrigerar a 5 ° C durante aproximadamente 2 h. Examine la actividad hemolítica. Si la reacción es dudosa, dejar a 5 ° C hasta 24 h ± 2 h. Una sedimentación de glóbulos rojos (formación de un punto rojo en la parte inferior de los tubos) indica una reacción negativa.

Incluya controles positivos y negativos.

Prueba CAMP (opcional)

Si el resultado de la prueba de hemólisis es difícil de interpretar, se recomienda la prueba CAMP para demostrar claramente que la hemólisis se debe a la actividad de la listeriolisina. Se requiere una cepa β-hemolítica de *Staphylococcus aureus* (p. Ej., WDCM 00034) y una cepa de *Rhodococcus equi* (p. Ej., WDCM 0028) para realizar la prueba CAMP. No todas las cepas de *S. aureus* son adecuadas para la prueba CAMP. Separe cada uno de los cultivos de *S. aureus* y *R. equi* en líneas simples a lo largo de la placa de agar sangre de modo que los dos cultivos sean paralelos y diametralmente opuestos (ver Figura). Se requiere un inóculo ligero y uniforme. Esto se puede obtener usando un asa de inoculación o un alambre sostenido en ángulo recto con el agar. Separe una colonia bien aislada de la cepa bajo prueba de una manera similar en ángulo recto con estos cultivos para que el cultivo de prueba y los cultivos de *S. aureus* y *R. equi* no se toquen, pero en su punto más cercano midan aproximadamente 1 mm. a 2 mm de distancia. Se pueden estriar varias cepas de prueba en la misma placa.



1 Banda estrecha de β hemólisis

4 *Listeria monocytogenes*

2 no hemólisis

5 *Listeria innocua*

3 Banda ancha de β hemólisis

6 *Listeria ivanovii*

Figura 1. Interpretación de la inoculación de la prueba de CAMP

Figura 1. Interpretación de la inoculación de la prueba de CAMP

Las líneas verticales en la Figura 1 representan rayas de *S aureus* (S) y *R equi* (R). Las líneas horizontales representan rayas de los cultivos de prueba. Las áreas sombreadas indican las ubicaciones de la hemólisis mejorada. El área punteada indica la zona de influencia del cultivo de *S aureus*. Simultáneamente, cultivos de control de estriás de *L monocytogenes*, *L innocua* y *L ivanovii*. Por ejemplo, se pueden utilizar *L monocytogenes* 4b WDCM 00021, *L monocytogenes* 1 / 2a WDCM 00109, *L innocua* WDCM 00017 y *L ivanovii* WDCM 00018. Mantener cultivos madre como se especifica en ISO 11133. Si se utiliza agar sangre, incuba las placas a 37 ° C durante 18 a 24 h. Si se utilizan placas de doble capa, incuba a 37 ° C durante 12 a 18 h. La reacción positiva con *R equi* se ve como una "punta de flecha" ancha (5 mm a 10 mm) de hemólisis. La reacción se considera negativa si una pequeña zona de hemólisis débil se extiende solo alrededor de 1 mm en la intersección de la cepa de prueba con la zona de difusión del cultivo de *R equi*.

Una reacción positiva con *S aureus* aparece como una pequeña zona de hemólisis potenciada que se extiende solo unos 2 mm desde la cepa de prueba y dentro de la zona débilmente hemolítica debido al crecimiento del cultivo de *S aureus*.

No se producen grandes zonas de hemólisis en el área de *S aureus* y *L monocytogenes*.

1. Utilización de carbohidratos

Utilizando un asa, inocular cada uno de los caldos de utilización de carbohidratos con los cultivos obtenidos del agar no selectivo. Incubar a 37 ° C. Las reacciones positivas (formación de ácido) están indicadas por un color amarillo y ocurren principalmente dentro de las 24 a 48 horas para los tubos de micro volúmenes y hasta 5 días para los tubos de macro volúmenes. La L-ramnosa y la D- xilosa se utilizan para la confirmación de *L monocytogenes*, que es L-ramnosa positiva y D-xilosa negativa.

NOTA Existen raras cepas de *L monocytogenes* que no fermentan la L-Ramnosa. [15], [18]

Para micro volúmenes, las reacciones son más rápidas. El nivel de inoculación en comparación con el volumen total es un factor importante. Para cada protocolo elegido, es importante verificar el tiempo necesario para obtener una coloración amarilla. Se aconseja utilizar controles. Por ejemplo, se pueden utilizar *L monocytogenes* 4b WDCM 00021, *L innocua* WDCM 00017 y *L ivanovii* WDCM 00018..

Confirmación de *Listeria* spp.

General

Realizar las pruebas de confirmación para *Listeria* spp. de una colonia típica. Se utilizarán cepas de control positivas y negativas adecuadas para cada una de las pruebas de confirmación.

Realice como mínimo las pruebas obligatorias que se enumeran (en negrita) en la Tabla 2.

Para más pruebas, si se requiere la identificación de especies de *Listeria*, consulte el Anexo D.

Tabla 2 - Pruebas de confirmación para *Listeria* spp.

| Prueba | <i>Listeria</i> spp | Resultados |
|--------|---------------------|------------|
|--------|---------------------|------------|

Obligatoria

Microscopic aspecta (9.5.2.4)

Catalasa (9.5.2.2)

Bacilos cortos delgados o cocobacilos

+

Opcional

Prueba VP (9.5.3.5)

Motility at 25°C (9.5.2.3)

+

+

NOTA 1 Se puede utilizar un procedimiento alternativo para confirmar el aislamiento como *Listeria* spp, Siempre que se verifique la idoneidad del procedimiento relevante.

NOTA 2 Es posible que algunas especies nuevas de *Listeria* aisladas recientemente no correspondan a este esquema, en particular para la movilidad, la prueba de VP y el crecimiento a 37 ° C (véanse, por ejemplo, las referencias [4], [10], [25], [26] y [27]).

Reacción de Voges - Proskauer (VP) (opcional)

Utilizando un asa, inocular un tubo que contenga 3 ml del medio VP.

Incubar a 37 ° C durante 24 h ± 2 h. Después de la incubación, añadir 0,6 ml de solución de α-naftol al 5% y 0,2 ml de solución de hidróxido de potasio al 40% (B.13.3). Agite bien, incline el tubo (para aumentar el área del aire interfaz líquida). Examinar después de 15 min y 1 h. Una reacción positiva está indicada por un color rojo intenso. *Listeria* spp son VP positivos.

NOTA Algunas especies nuevas de *Listeria* se han aislado recientemente. [5], [10], [12], [14], [25], [26], [27] La mayoría de ellas son VP negativas.

Interpretación de las propiedades morfológicas y fisiológicas y de las reacciones bioquímicas

Todas las especies de *Listeria*. son pequeños bacilos grampositivos o cocobacilos que dan una reacción positiva en la prueba de catalasa. *L. monocytogenes* se confirman de acuerdo con las pruebas enumeradas en la Tabla 1 y *Listeria* spp se confirman de acuerdo con las pruebas enumeradas en la Tabla 2.

Caracterización adicional de cepas aisladas (opcional)

Los aislados que se consideran *L. monocytogenes* pueden enviarse para su caracterización adicional a un Laboratorio de Referencia de *Listeria* nacional o regional reconocido. El envío irá acompañado de toda la información posible sobre la cepa o cepas.

Expresión de resultados

De acuerdo con la interpretación de los resultados, informar si se detecta o no *L. monocytogenes* y / o si se detecta *Listeria* spp se detecta o no en la muestra de ensayo especificando la masa en gramos, el volumen en mililitros de la muestra analizada, la superficie en centímetros cuadrados o por dispositivo de muestra.

Informe de prueba

El informe de la prueba deberá especificar el método utilizado y los resultados obtenidos y cumplir con lo indicado en la ISO 17025

Diagrama de procedimiento

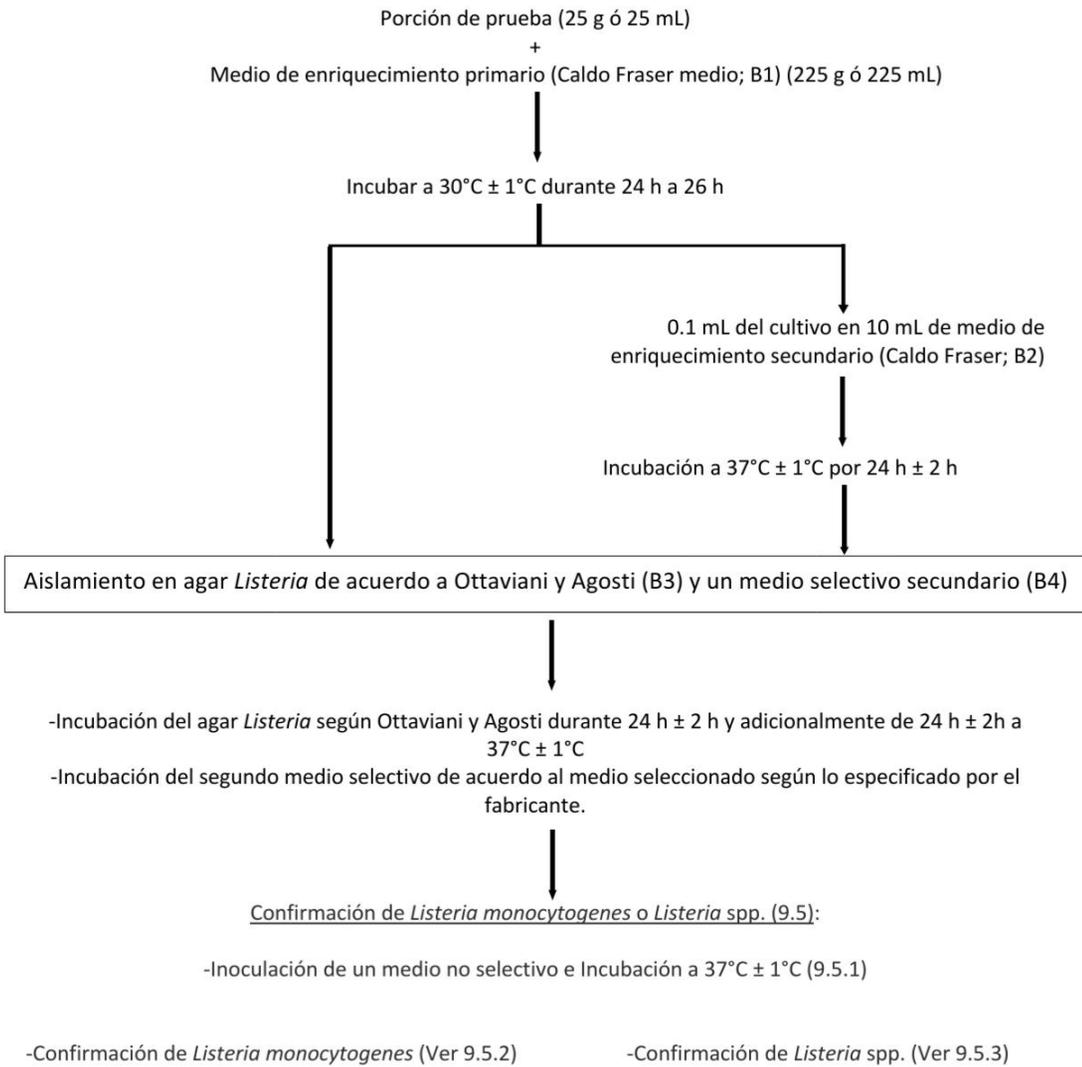


Figura A.1 — Diagrama de procedimiento

Composición y preparación de medios de cultivo y reactivos

Medio de enriquecimiento primario selectivo: medio caldo Fraser

Base

Composición

Digerido enzimático de tejidos animales ó proteosa peptona 5,0 g

Digerido enzimático de caseína ó cambiar a triptona 5,0 g

Extracto de carne 5,0 g

Extracto de levadura 5,0 g

Cloruro de sodio 20,0 g

Fosfato de hidrógeno disódico dihidrato 12,0 g

Dihidrógeno fosfato de potasio 1,35 g

Esculina 1,0 g

Agua 1000 ml

Preparación

Disuelva los componentes de la base o la base completa deshidratada en el agua calentando si es necesario.

Ajustar el pH, si es necesario, para que después de la esterilización sea de $7,2 \pm 0,2$ a 25°C .

Dispensar la base en frascos de capacidad adecuada para obtener porciones adecuadas para la prueba

Esterilizar durante 15 min en autoclave a 121°C .

La solución de cloruro de litio y la solución de ácido nalidíxico se pueden agregar a la base antes de esterilizar en autoclave.

Solución de cloruro de litio

Composición

Cloruro de litio 3 g

Agua 10 ml

Preparación

Agrega el cloruro de litio al agua.

Esterilizar por filtración a través de una membrana de $0,45 \mu\text{m}$.

ADVERTENCIA: tome todas las precauciones necesarias al disolver el cloruro de litio en el agua, ya que la reacción es muy exotérmica. Además, esta solución irrita las membranas mucosas.

Solución de sal sódica de ácido nalidíxico

Composición

Sal de sodio del ácido nalidíxico 0,1 g Hidróxido de sodio, solución $0,05 \text{ mol/l}$ 10 ml

Preparación

Disuelva la sal del ácido nalidíxico en el hidróxido de sodio.

Esterilizar por filtración a través de una membrana de $0,45 \mu\text{m}$.

Medio de enriquecimiento secundario selectivo: caldo Fraser

Base

Composición

| | |
|---|---------|
| Digerido enzimático de tejidos animales | 5,0 g |
| Digerido enzimático de caseína | 5,0 g |
| Extracto de carne | 5,0 g |
| Extracto de levadura | 5,0 g |
| Cloruro de sodio | 20,0 g |
| Fosfato de hidrógeno disódico dihidrato | 12,0 g |
| Dihidrógeno fosfato de potasio | 1,35 g |
| Esculina | 1,0 g |
| Cloruro de litio | 3,0 g |
| Sal de sodio del ácido nalidíxico | 0,02 g |
| Agua | 1000 ml |

Agar Listeria según Ottaviani y Agosti [16], [17]

Medio base

Composición

Digerido enzimático de tejidos animales o PROTEOSA PEPTONA 18 g

Digerido enzimático de caseína o TRIPTONA 6 g

Extracto de levadura 10 g

Piruvato de sodio 2 g

Glucosa 2 g
 Glicerofosfato de magnesio 1 g
 Sulfato de magnesio (anhidro) 0,5 g
 Cloruro de sodio 5 g
 Cloruro de litio 10 g
 Fosfato de hidrógeno disódico (anhidro) 2,5 g 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-d-glucopiranosido 0,05 g
 Agar 12 g a 18 g a
 Agua 930 mL b
 a Dependiendo de la fuerza de gel del agar.
 b 925 mL si se usa una solución de anfotericina B (ver B.3.5.2).

Preparación

Disuelva los componentes deshidratados o la base completa deshidratada en el agua hirviendo.
 Esterilizar durante 15 min en autoclave a 121 ° C.
 Ajustar el pH, si es necesario, para que después de la esterilización sea $7,2 \pm 0,2$.

Solución de Ceftazidima

| | |
|-------------|--------|
| Ceftazidima | 0,02 g |
| Agua | 5 ml |

Disolver la ceftazidima en 5 mL de agua y esterilizar por filtración a través de membranas de 0.45 micras

Solución de sulfato de Polimixina B

| | |
|-------------------------|-----------|
| Sulfato de polimixina B | 76 700 UI |
| Agua | 5 mL |

Disolver la polimixina B en 5 mL de agua. Esterilizar por filtración a través de membranas de 0.45 micras.

Suplementos de antibióticos

Solución de cicloheximida

| | |
|---------------|--------|
| Cicloheximida | 0,05 g |
| Etanol | 2,5 ml |
| Agua | 2,5 ml |

Disolver la cicloheximida en 2.5 mL de etanol y después adicionar 2.5 mL de agua. Esterilice por filtración a través de membranas de 0.45 micras.

Solución de Anfotericina B (como alternativa a la solución de cicloheximida)

| | |
|-----------------------|--------|
| Anfotericina B | 0,01 g |
| HCl (1 mol/l) | 2,5 ml |
| Dimetilformamida(DMF) | 7,5 ml |

Disolver la anfotericina en la solución de DMF. Esterilice por filtración a través de membranas de 0.45 micras. Otra técnica de disolución (por ejemplo en agua o en una base de medio caliente) puede hacerse de acuerdo a las instrucciones del fabricante

PELIGRO. La solución de HCl/DMF es tóxica, manejesse con cuidado

Suplementos

Disuelva 2g de 1-alfa-fosfatidilinositol en 50 mL de agua. 2g de lecitina de soya contienen al menos del 9 al 15% de fofatidilinositol, puede ser usado en lugar del 1-alfa-fosfatidilinositol. Agite por 30 minutos hasta obtener una suspensión homogénea. Esterilice a 121°C por 15 minutos y enfrie a 47-50°C.

Medio completo

Composición

| | |
|--------------------------------------|----------|
| Medio Base (B.3.1) | 930 ml a |
| Solución de ácido nalidixico (B.3.2) | 5 ml |
| Solución de ceftizimida (B.3.3) | 5 ml |
| Solución de polimixina B (B.3.4) | 5 ml |

| | | |
|--|-----------------------------------|---------------|
| So | Amphotericin B solution (B.3.5.2) | 5 ml 10 ml |
| Suplementos (B.3.6) | | 50 ml |
| a 925 ml si se usa una solución de anfotericina B. | | |

Preparación

.Adicionar las soluciones a la base fundida y atemperada a 47-50°C, mezclando bien entre cada adición.

.El pH del medio completo deber ser de 7.2 +/- 0.2 a 25°C. El medio debe ser homogéneo y ligeramente opalescente

Preparación de las placas con Agar. Dispensar en cada caja Petri de 18 a 20 mL del medio de cultivo completo recientemente preparado, permita que solidifiquen.

Segundo medio selectivo.

El segundo medio de cultivo, será a elección del laboratorio. Para la preparación del mismo se deberán seguir las instrucciones del fabricante así como las indicaciones de uso.

Evaluación del desempeño de los medios de cultivo.

La evaluación del desempeño de los medios de cultivo, debe hacerse de acuerdo con la bibliografía reconocida.

En el numeral

A.6.2.1 General.

La preparación de la suspensión inicial requiere 25g de la muestra en 225mL del medio de pre-enriquecimiento, para obtener una dilución 1:10.

En una situación atípica y justificada, si la porción de muestra utilizada en el ensayo es distinta a 25g, se deberá utilizar la cantidad necesaria de medio de pre-enriquecimiento para obtener una dilución 1:10.

En casos excepcionales, cuando es necesario analizar más de una porción de 25g de un lote específico de alimento y teniendo evidencia de que si hay mezcla de tales porciones no afecta el resultado, las muestras pueden ser compuestas; es decir, si 10 muestras de 25g serán examinadas, combinar las 10 porciones para obtener 250g y adicionar 2.25L del caldo de pre-enriquecimiento precalentado a 36 °C ± 1 °C.

Sin embargo, se debe tomar en cuenta que para inocular el caldo selectivo RVS y MKTTn aumentarán las porciones de 10mL a 100mL teniendo que inocular 1mL y 10mL respectivamente. Continuar como se indica en el punto A.7.2.

Eliminar el último párrafo pra quedar como dice a continuación:

A.6.2.1 General.

El texto que se propone eliminar carece de fundamento científico y no esta conforme a lo indicado en otros estandares normativos como el ISO 6887-1:2017 que presenta diferentes ejemplos para realizar la composición de muestras y porciones analíticas.

Según 9.3 de la ISO 6887-1:2017

Procedimientos de agrupación y composición para pruebas cualitativas

Hay cuatro opciones para combinar los pasos de examen para los exámenes cualitativos de productos o muestras ambientales del mismo tipo de la misma fuente u origen, para reducir la carga de trabajo cuando se va a examinar un gran número de muestras. Esto puede ser necesario para reflejar la calidad microbiológica de un gran lote de producto o muestras ambientales o, a veces, es requerido por la legislación nacional o regional.

La preparación de la suspensión inicial requiere 25g de la muestra en 225mL del medio de pre-enriquecimiento, para obtener una dilución 1:10.

En una situación atípica y justificada, si la porción de muestra utilizada en el ensayo es distinta a 25g, se deberá utilizar la cantidad necesaria de medio de pre-enriquecimiento para obtener una dilución 1:10.

En casos excepcionales, cuando es necesario analizar más de una porción de 25g de un lote específico de alimento y teniendo evidencia de que si hay mezcla de tales porciones no afecta el resultado, las muestras pueden ser compuestas; es decir, si 10 muestras de 25g serán examinadas, combinar las 10 porciones para obtener 250g y adicionar 2.25L del caldo de pre-enriquecimiento precalentado a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Una serie de elementos del mismo tipo se pueden componer o agrupar en la etapa de muestreo y el cliente deberá dejar esto en claro cuando se reciba la muestra de laboratorio para garantizar que el procedimiento de prueba posterior se lleve a cabo correctamente. La composición de muestras individuales también se puede realizar en el laboratorio si el cliente ha dejado claro que esto es necesario. Estos dos procedimientos se ilustran en las siguientes ilustraciones:

A.2 Compositing samples

A number of items are composited into one sample and mixed before the test portion is taken as shown in [Figure A.1](#).

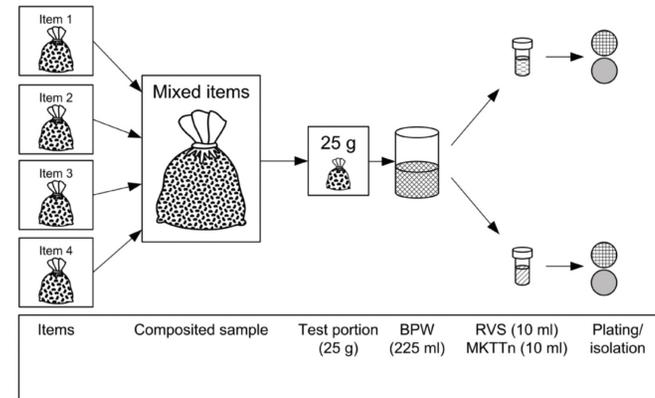


Figure A.1 — Compositing samples

A.3 Pooled samples

A number of items of the same type are pooled into one sample and the whole mixture is used as the test portion (see [Figure A.2](#)).

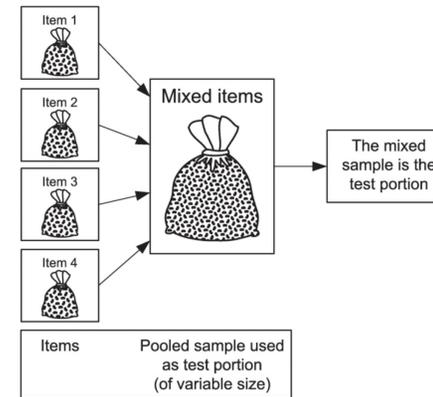


Figure A.2 — Pooling samples

La combinación de las porciones de ensayo también se puede llevar a cabo en el laboratorio y el examen puede continuar en grandes cantidades de medio precalentado como se ilustra en la siguiente figura

A.4 Pooled test portions

The test portions from a number of items of the same type are mixed and the whole mixture is used as the test portion for subsequent examination (see [Figure A.3](#)).

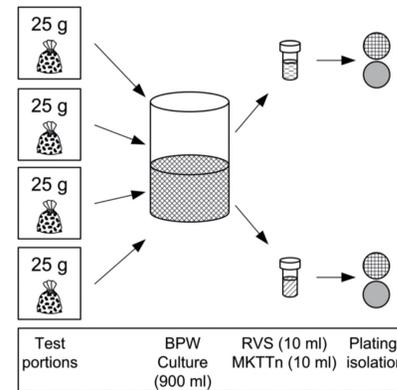


Figure A.3 — Pooling test portions

Se debe usar el monitoreo de la temperatura y los tiempos máximos de incubación del rango permitido para evitar resultados negativos falsos causados por el retraso de la temperatura en los volúmenes más grandes. Alternativamente, los cultivos de (pre) enriquecimiento de las porciones de prueba individuales pueden combinarse y llevarse a cabo como una sola prueba.

A.5 Pooled (pre-)enriched test portions

The test portions of a number of items of the same type are (pre-)enriched and then a specified volume from each culture is combined for subsequent examination (see [Figure A.4](#)).

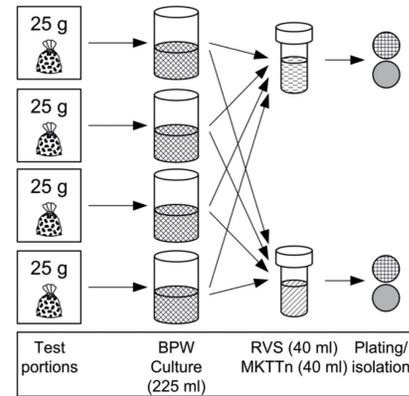


Figure A.4 — Pooling (pre-)enriched test portions

Todos estos procedimientos deberán verificarse antes de su uso para demostrar que no ha aumentado el riesgo de resultados falsos negativos;

Apéndice H Normativo.

Método aprobado para la estimación de la densidad de Coliformes totales, fecales y E. coli por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua.

El texto del apéndice H normativo la NOM-210-SSA1-2014 está referido según el 10.2 al capítulo 4 del Bacteriological Analytical Manual publicado en 2012, sin embargo después de esa fecha el BAM ha recibido varias modificaciones que deberían ser adoptadas en la regulación nacional ya que de no hacerlo los métodos nacionales quedarían desarmonizados con la referencia internacional y por lo tanto la equivalencia entre los sistemas de vigilancia y control se perdería.

Los cambios relevantes son:

- Octubre de 2020 - Se modificó la Sección I A.3 para reflejar que el enriquecimiento debe tener lugar a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ y no a $35 \pm 1^\circ\text{C}$.

- Julio de 2017 - Cap. 4 seg. IE Para la fase completa de la prueba de E. coli , la temperatura de incubación de los tubos EC se ha cambiado de $45,5 \pm 0,2$ ° C a $44,5 \pm 0,2$ ° C. El cambio se realizó en parte debido a la escasa capacidad de la cepa de control ATCC25922 para cultivar y fermentar lactosa para producir ácido y gas a $45,5 \pm 0,2$ ° C. El uso de $44,5 \pm 0,2$ ° C también lo haría compatible con el utilizado para el análisis de coliformes fecales en mariscos y carnes de mariscos (Sec. VI), así como con las condiciones utilizadas para las pruebas de E. coli por otras organizaciones internacionales.
- Febrero de 2013 - Se revisó el método de análisis de mariscos para que sea consistente con el Examen de agua de mar y mariscos de la APHA, 4ª ed.
- Febrero de 2013 - Se agregaron métodos de filtración de membrana al análisis del agua.

Con base en las siguientes referencias

1. Asociación Estadounidense de Salud Pública. 1970. Procedimientos recomendados para el examen de agua de mar y mariscos, 4ª ed. APHA, Washington, DC.
2. Asociación Estadounidense de Salud Pública. 1992. En: Marshall, RT (ed.). Métodos estándar para el examen de productos lácteos, 16ª ed. APHA. Washington DC.
3. Asociación Estadounidense de Salud Pública. 1998. Métodos estándar para el examen de agua y aguas residuales, 20ª ed. APHA, Washington, DC.
4. Asociación Estadounidense de Salud Pública. 1992. Compendio de métodos para el examen microbiológico de alimentos, 3ª ed. APHA, Washington, DC.
5. Brenner, KP, CC Rankin, M. Sivaganesan y PV Scarpino. 1996. Comparación de las recuperaciones de Escherichia coli y coliformes totales del agua potable mediante el método de agar MI y el método de filtro de membrana aprobado por la agencia de protección ambiental de EE. UU. Apl. Reinar. Microbiol. 62 : 203-208.
6. Caplenas, NR y MS Kanarek. 1984. Klebsiella pneumoniae de fuente no fecal termotolerantes : validez de la prueba de coliformes fecales en aguas recreativas. Soy. J. Salud pública. 74 : 1273-1275
7. Ciebin, BW, MH Brodsky, R. Eddington, G. Horsnell, A. Choney, G. Palmateer, A. Ley, R. Joshi y G. Shears. 1995. Evaluación comparativa de medios modificados m-FC y m-TEC para el recuento de filtros de membrana de Escherichia coli en agua. Apl. Reinar. Microbiol. 61 : 3940-3942.
8. Chang, GW, J. Brill y R. Lum. 1989. Proporción de Escherichia coli beta-glucuronidasa negativa en muestras fecales humanas. Apl. Reinar. Microbiol. 55 : 335-339.

9. Conway, PL 1995. Ecología microbiana del intestino grueso humano. En: GR Gibson y GT Macfarlane, eds. p.1-24. Bacterias del colon humano: papel en la nutrición, fisiología y patología. CRC Press, Boca Raton, FL.
10. Dege, Nueva Jersey 1998. Categorías de agua embotellada. Capítulo 3, en: DAG Senior y PR Ashurst (ed). Tecnología de Agua Embotellada. CRC Press, Boca Raton, Florida.
11. Doyle, MP y JL Schoeni. 1987. Aislamiento de *Escherichia coli* O157: H7 de carnes y aves al por menor. *Apl. Reinar. Microbiol.* 53 : 2394-2396.
12. Eijkman, C. 1904. Die garungsprobe bei 46 ° als hilfsmittel bei der trinkwasseruntersuchung. *Zentr. Bakteriol. Parasitenk. Abt. I. Orig.* 37 : 742.
13. Entis, P. 1989. Filtro de membrana de rejilla hidrofóbica / método MUG para el recuento de coliformes totales y *Escherichia coli* en alimentos: estudio colaborativo. *J. Assoc. Apagado. Anal. Chem.* 72 : 936-950.
14. Escherich, T. 1885. Die darmbakterien des neugeborenen und sauglings. *Fortshr. Medicina.* 3 : 5-15-522, 547-554.
15. Ewing, WH 1986. Identificación de Enterobacteriaceae de Edwards y Ewing , 4ª ed. Elsevier, Nueva York.
16. Feldsine, PT, MT Falbo-Nelson y DL Hustead. 1994. Método de disco de soporte de sustrato ColiComplete para la detección confirmada de coliformes totales y *Escherichia coli* en todos los alimentos: estudio comparativo. *J. Assoc. Apagado. Anal.Chem.* 77 : 58-63.
17. Feng, P. 1995. *Escherichia coli* serotipo O157: H7: Nuevos vehículos de infección y variantes fenotípicas de emergencia. *Enfermedad infecciosa emergente.* 1 : 16-21.
18. Feng, PCS y PA Hartman. 1982. Ensayos fluorogénicos para la confirmación inmediata de *Escherichia coli* . *Apl. Reinar. Microbiol.* 43 : 1320-1329.
19. Feng, P., R. Lum y G. Chang. 1991. Identificación de secuencias del gen uid A en beta-D-glucuronidasa (-) *Escherichia coli* . *Apl. Reinar. Microbiol.* 57 : 320-323.
20. FDA. 1998. Guía de control y peligros del pescado y los productos pesqueros. 2nd ed. Oficina de Productos del Mar, CFSSAN, FDA de EE. UU., Servicio de Salud Pública, Departamento de Salud y Servicios Humanos, Washington DC.
21. Frampton, EW y L. Restaino. 1993. Métodos para la identificación de *E. coli* en alimentos, agua y muestras clínicas basados en la detección de beta-glucuronidasa. *J. Appl. Bacteriol.* 74 : 223-233.
22. Geissler, K., M. Manafi, I. Amoros y JL Alonso. 2000. Determinación cuantitativa de coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas marinas con medios cromogénicos y fluorogénicos. *J. Appl. Microbiol.* 88 : 280-285.

23. Grant, MA 1997. Un nuevo medio de filtración por membrana para la detección y el recuento simultáneos de *Escherichia coli* y coliformes totales. *Apl. Reinar. Microbiol.* 63 : 3526-4530.
24. Gunzer, F., H. Bohm, H. Russmann, M. Bitzan, S. Aleksic y H. Karch. 1992. Detección molecular de *Escherichia coli* O157 fermentadora de sorbitol en pacientes con síndrome urémico hemolítico. *J. Clin. Microbiol.* 30 : 1807-10.
25. Hartman, PA 1989. La prueba MUG (glucuronidasa) para *Escherichia coli* en alimentos y agua, págs. 290-308. En: *Métodos Rápidos y Automatización en Microbiología e Inmunología*. A. Balows, RC Tilton y A. Turano (eds). Prensa Académica Brixia, Brescia, Italia.
26. Hayes, PS, K. Blom, P. Feng, J. Lewis, NA Strockbine y B. Swaminathan. 1995. Aislamiento y caracterización de una cepa productora de β -D-glucuronidasa de *Escherichia coli* O157: H7 en los Estados Unidos. *J. Clin. Microbiol.* 33 : 3347-3348.
27. Manafi, M. 1996. Sustratos de enzimas fluorogénicas y cromogénicas en medios de cultivo y pruebas de identificación. En t. *J. Food Microbiol.* 31 : 45-58.
28. Moberg, LJ, MK Wagner y LA Kellen. 1988. Ensayo fluorogénico para la detección rápida de *Escherichia coli* en alimentos refrigerados y congelados: estudio colaborativo. *J. Assoc. Apagado. Anal. Chem.* 71 : 589-602.
29. Neill, MA, PI Tarr, DN Taylor y AF Trofa. 1994. *Escherichia coli*. En el Manual de enfermedades transmitidas por los alimentos, YH Hui, JR Gorham, KD Murell y DO Cliver, eds. Marcel Decker, Inc. Nueva York. págs. 169-213.
30. Neufeld, N. 1984. Procedimientos para el examen bacteriológico de agua de mar y mariscos. En: Greenberg, AE y DA Hunt (eds). 1984. *Procedimientos de laboratorio para el examen de agua de mar y mariscos*, 5ª ed. Asociación Estadounidense de Salud Pública. Washington DC.
31. Rippey, SR, WN Adams y WD Watkins. 1987. Enumeración de coliformes fecales y *E. coli* en aguas marinas y destuarinas: una alternativa al enfoque APHA-NMP. *J. Water Pollut. Control Fed.* 59 : 795-798.
32. Rippey, SR, LA Chandler y WD Watkins. 1987. Método fluorométrico para el recuento de *Escherichia coli* en moluscos. *J. Food Prot.* 50 : 685-690, 710.
33. Warburton, DW 2000. Metodología para analizar el agua embotellada para detectar la presencia de bacterias indicadoras y patógenas. *Microbiología alimentaria.* 17 : 3-12.
34. Weagant, SD y P. Feng. 2001. Evaluación comparativa de un método rápido para detectar *Escherichia coli* en jugo de naranja contaminado artificialmente. *Boletín de información de laboratorio de la FDA # 4239*, 17: 1-6.

35. Weagant, SD y P. Feng. 2002. Análisis comparativo de una prueba rápida de presencia-ausencia modificada y el método estándar de NMP para detectar *Escherichia coli* en jugo de naranja. *Microbiología alimentaria*. 19 : 111-115.

Por lo anterior se propone que el siguiente texto reemplace en su totalidad el apéndice H normativo.

Nota: con la implementación del texto propuesto sería necesario derogar la NOM-113-SSA1-1994, NOM-247, NOM-242, NOM-243.

Método aprobado para la estimación de la densidad de Coliformes totales, fecales y *E. coli* por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua.

Escherichia coli, originalmente conocida como *Bacterium coli*, fue identificada en 1885 por el pediatra alemán Theodor Escherich ([14](#), [29](#)). *E. coli* se distribuye ampliamente en el intestino de humanos y animales de sangre caliente y es el anaerobio facultativo predominante en el intestino y parte de la flora intestinal esencial que mantiene la fisiología del huésped sano ([9](#), [29](#)). *E. coli* es un miembro de la familia Enterobacteriaceae ([15](#)), que incluye muchos géneros, incluidos patógenos conocidos como *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*. Aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* no se consideran patógenos, pueden ser patógenos oportunistas que causan infecciones en huéspedes inmunodeprimidos. También hay cepas patógenas de *E. coli* que, cuando se ingieren, causan enfermedades gastrointestinales en seres humanos sanos.

En 1892, Shardingier propuso el uso de *E. coli* como indicador de contaminación fecal. Esto se basó en la premisa de que *E. coli* es abundante en las heces humanas y animales y no se suele encontrar en otros nichos. Además, dado que *E. coli* podía detectarse fácilmente por su capacidad para fermentar glucosa (luego se cambió a lactosa), era más fácil de aislar que los patógenos gastrointestinales conocidos. Por lo tanto, la presencia de *E. coli* en los alimentos o el agua se aceptó como indicativo de contaminación fecal reciente y la posible presencia de patógenos francos. Aunque el concepto de utilizar *E. coli* como indicador indirecto de riesgo para la salud era sólido, en la práctica resultaba complicado debido a la presencia de otras bacterias entéricas como *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter* que también pueden fermentar lactosa y son similares a *E. coli* en características fenotípicas, por lo que no se distinguen fácilmente. Como resultado, se acuñó el término "coliforme" para describir este grupo de bacterias entéricas. Coliforme no es una clasificación taxonómica, sino más bien una definición de trabajo utilizada para describir un grupo de bacterias gramnegativas, anaerobias facultativas en forma de bastoncillos que fermentan lactosa para producir ácido y gas en 48 h a 35 ° C. En 1914, el Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos adoptó la enumeración de coliformes como un estándar más conveniente de importancia sanitaria.

Aunque los coliformes fueron fáciles de detectar, su asociación con la contaminación fecal era cuestionable porque algunos coliformes se encuentran naturalmente en muestras ambientales ([6](#)). Esto llevó a la introducción de coliformes fecales como indicador de contaminación. El coliforme fecal, definido por primera vez en base a los trabajos de Eijkman ([12](#)), es un subconjunto de coliformes totales que crece y fermenta lactosa a temperatura de incubación elevada, por lo que también se conoce como coliformes termotolerantes. Los análisis de coliformes fecales se realizan a 44,5 ° C para análisis de alimentos, incluyendo para análisis de agua, mariscos y agua de cosecha de mariscos.

El grupo de coliformes fecales se compone principalmente de *E. coli* pero algunos otros entéricos como *Klebsiella* también pueden fermentar lactosa a estas temperaturas y, por lo tanto, se consideran coliformes fecales. La inclusión de *Klebsiella* spp en la definición de trabajo de coliformes fecales disminuyó la correlación de este grupo con la contaminación fecal. Como resultado, *E. coli* ha resurgido como indicador, en parte facilitado por la introducción de métodos más nuevos que pueden identificar rápidamente a *E. coli*.

Actualmente, los 3 grupos se utilizan como indicadores, pero en diferentes aplicaciones. La detección de coliformes se utiliza como indicador de la calidad sanitaria del agua o como indicador general de las condiciones sanitarias en el entorno de procesamiento de alimentos. Los coliformes fecales siguen siendo el indicador estándar de elección para los mariscos y las aguas de cosecha de mariscos; y *E. coli* se usa para indicar contaminación fecal reciente o procesamiento insalubre. Casi todos los métodos utilizados para detectar *E. coli*, coliformes totales o coliformes fecales son métodos de enumeración que se basan en la fermentación de lactosa ([4](#)). El método del número más probable (NMP) es un ensayo estadístico de varios pasos que consta de fases presuntivas, confirmadas y completadas. En el ensayo, se inoculan diluciones seriadas de una muestra en medio

de caldo. Los analistas puntúan el número de tubos de gas positivo (fermentación de lactosa), a partir de los cuales se realizan las otras 2 fases del ensayo, y luego utilizan las combinaciones de resultados positivos para consultar una tabla estadística, para estimar el número de organismos. Por lo general, solo las 2 primeras fases se realizan en el análisis de coliformes y coliformes fecales, mientras que la tercera fase se realiza para E. coli. La prueba NMP de 3 tubos se utiliza para analizar la mayoría de los alimentos. El análisis del agua de mar utilizando una serie de diluciones múltiples no debe utilizar menos de 3 tubos por dilución (se recomiendan 5 tubos); en ciertos casos, también puede ser aceptable una sola serie de diluciones utilizando no menos de 12 tubos. (Para obtener detalles adicionales, consulte: Programa Mexicano de Sanidad de Moluscos Bivalvos. https://docs.google.com/document/d/1-H_wQQLJzuaNjkX4eIGvkyFfM4vEehiGuONSUjV1fJ8/edit#heading=h.wdgpvhuevuzb COFEPRIS). Análisis de jugo de cítricos para E. coli se realiza como un método de ausencia / presencia, consulte la sección V.

Además, existe un método de aislamiento en medio sólido para coliformes que usa Agar Rojo Violeta Bilis, que contiene un indicador de pH rojo neutro, de modo que la fermentación de lactosa da como resultado la formación de colonias rosadas. También hay pruebas de filtración por membrana para coliformes y coliformes fecales que miden la formación de aldehídos debido a la fermentación de lactosa. Este capítulo también incluye variaciones de las pruebas anteriores que utilizan sustratos fluorogénicos para detectar E. coli (18), pruebas especiales para el análisis de mariscos, una breve consideración de las pruebas de agua embotellada y un método para analizar grandes volúmenes de jugos de cítricos para detectar la presencia de E. coli. en conjunto con la regla Juice HACCP.

Método convencional para coliformes, coliformes fecales y E. coli

A. Equipos y materiales

1. Baño María, con sistema de circulación para mantener la temperatura de $44,5 \pm 0,2$ ° C. El nivel del agua debe estar por encima del medio al sumergir los tubos.
2. Incubadora a $35 \pm 0,5$ ° C provista con termómetro de inmersión, 1-55 ° C, con subdivisiones de 0.1 ° C o equivalente.
3. Balanza con capacidad > 2 kg y sensibilidad de 0,1 g
4. Licuadora y vaso de licuadora u homogenizador peristáltico
5. Pipetas graduadas estériles, 1.0 y 10.0 mL
6. Utensilios estériles para la manipulación de muestras
7. Frascos de dilución fabricados en vidrio borosilicato, con tapones de rosca de polietileno equipados con revestimientos de teflón.
8. Contador de colonias de Quebec, o equivalente, con lupa
9. Luz ultravioleta de onda larga [~ 365 nm], que no exceda los 6 W.
10. Potenciómetro

B. Medios y reactivos

1. Caldo de lactosa bilis verde brillante (BGLB), 2%
2. Caldo de lauril triptosa (LST)
3. Caldo de lactosa
4. Caldo EC
5. Agar eosina-azul de metileno (L-EMB) de Levine
6. Caldo de [triptona](#) (triptófano)
7. Caldo MR-VP
8. Caldo de citrato de Koser o Agar Citrato de Simmons
9. Agar para recuento en placa (PCA) (métodos estándar)
10. Agua tamponada con fosfato de Butterfield o diluyente equivalente

(Nota : Esta misma formulación se conoce como agua de dilución tamponada en la Asociación Estadounidense de Salud Pública. 1970. Procedimientos recomendados para el examen de agua de mar y mariscos, 4ª ed. APHA, Washington, DC., P14-15)

1. Reactivo de Kovacs
2. Reactivos de Voges-Proskauer (VP)
3. Reactivos de tinción de Gram

4. Indicador de rojo de metilo
5. Agar bilis rojo violeta (VRBA)
6. Agar VRBA-MUG
7. Medio EC-MUG
8. Caldo de lauril triptosa MUG (LST-MUG)
9. Diluyente de peptona, 0,5%
- 10.

B. NMP - Prueba presuntiva para coliformes, coliformes fecales y *E. coli*

Pese 50 g de alimentos en un vaso mezclador de alta velocidad estéril. Las muestras congeladas se pueden ablandar almacenándolas durante <18 h a 2-5 ° C, pero no descongelar. Agregue 450 ml de agua tamponada con fosfato de Butterfield y mezcle durante 2 min. Si dispone de una cantidad menor de 50 g de muestra, pese la porción que sea equivalente a la mitad de la muestra y agregue suficiente volumen de diluyente estéril para hacer una dilución 1:10. El volumen total en el vaso de la licuadora u homogenizador peristáltico debe cubrir completamente la muestra.

Prepare diluciones decimales con diluyente de fosfato de Butterfield estéril o equivalente. El número de diluciones a preparar depende de la densidad de coliformes anticipada. Agite todas las suspensiones 25 veces en un arco de 30 cm o mezcle en vértice durante 7 s. Utilizando al menos 3 diluciones consecutivas, inocule alícuotas de 1 ml de cada dilución en 3 tubos LST para un análisis de NMP de 3 tubos (otros análisis pueden requerir el uso de 5 tubos para cada dilución; ver IV). También se puede utilizar caldo lactosado. Para una mayor precisión, utilice una pipeta de 1 ml o 5 ml para la inoculación. No utilice pipetas para administrar <10% de su volumen total; p.ej. una pipeta de 10 ml para administrar 0,5 ml. Sostenga la pipeta en ángulo para que su borde inferior descanse contra el tubo. No deben transcurrir más de 15 minutos desde el momento en que se mezcla la muestra hasta que todas las diluciones se inoculan en un medio apropiado.

Incube los tubos LST a 35 ° C ± 0,5 ° C. Examine los tubos y registre las reacciones a las 24 ± 2 h en busca de gas, es decir, el desplazamiento del medio en la campana de fermentación o la efervescencia cuando los tubos se agitan suavemente. Vuelva a incubar los tubos negativos a la producción de gas durante 24 h más y vuelva a examinar y registrar las reacciones a las 48 ± 3 h. Realice una prueba confirmatoria en todos los tubos presuntamente positivos (gas).

A. NMP - Prueba confirmatoria para coliformes totales

De cada tubo de caldo de lactosa o LST con gas, transfiera una asada de la suspensión a un tubo de caldo BGLB, evitando la película si está presente. (También se puede utilizar un aplicador de madera estéril para estas transferencias). Incubar los tubos de BGLB a 35 ° C ± 0,5 ° C y examinar la producción de gas a las 48 ± 3 h. Calcular el número más probable (NMP) de coliformes totales en base a la proporción de tubos confirmados de LST con gas para 3 diluciones consecutivas.

A. NMP - Prueba confirmatoria para coliformes fecales y *E. coli*

De cada tubo de caldo de lactosa o LST con gas de la prueba presuntiva, transfiera una asada de cada suspensión a un tubo de caldo EC (también se puede usar un aplicador de madera estéril para estas transferencias). Incubar los tubos de caldo EC durante 24 ± 2 h a 44,5 ° C y examinar la producción de gas. Si es negativo, volver a incubar y examinar de nuevo a las 48 ± 2 h. Utilice los resultados de esta prueba para calcular el NMP de coliformes fecales. Para continuar con el análisis de *E. coli*, continúe con la Sección F. El método NMP en caldo EC se puede utilizar para agua de mar y mariscos, ya que se ajusta a los procedimientos recomendados (1).

A. NMP: prueba confirmatoria para *E. coli* .

Para realizar la prueba confirmatoria para *E. coli*, agite suavemente cada tubo de EC positivo, tome una asada del caldo y estríe para aislamiento en una placa de agar L-EMB e incube durante 18-24 h a 35 ° C ± 0,5 ° C. Examine las placas en busca de colonias de *E. coli* sospechosas, es decir, colonias con centro oscuro y planas, con o sin brillo metálico. Transfiera de 2 a 5 colonias sospechosas de cada placa L-EMB a agar inclinado de PCA, incube durante 18-24 h a 35 ° C ± 0,5 ° C y utilícelas para pruebas bioquímicas.

NOTA: La identificación de cualquiera de las colonias como *E. coli* es suficiente para considerar que el tubo de EC es positivo.

Realice la tinción de Gram. Todos los cultivos que aparezcan como bacilos cortos Gram negativos deben analizarse para las reacciones IMViC que se indican a continuación y también volver a inocularse en LST para confirmar la producción de gas.

Producción de indol. Inocular el tubo de caldo triptona e incubar 24 ± 2 h a 35 ° C ± 0,5 ° C. Realice la prueba agregando 0.2-0.3 mL de reactivo de Kovacs. La aparición de un color rojo distintivo en la capa superior es una prueba positiva.

Compuestos reactivos de Voges-Proskauer (VP). Inocular el tubo de caldo MR-VP e incubar 48 ± 2 h a $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Transfiera 1 mL a un tubo de 13×100 mm. Añadir 0,6 ml de solución de α -naftol y 0,2 ml de KOH al 40% y agitar. Agregar algunos cristales de creatina. Agitar y dejar reposar 2 h. La prueba es positiva si se desarrolla el color rosado de la eosina.

Compuestos reactivos con rojo de metilo. Después de la prueba VP, incube el tubo MR-VP durante 48 ± 2 h más a $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Agregue 5 gotas de solución de rojo de metilo a cada tubo. El color rojo distintivo es una prueba positiva. El amarillo es una reacción negativa.

Citrato. Inocular ligeramente el tubo de caldo de citrato de Koser; Evite la turbidez detectable. Incubar durante 96 h a $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$. El desarrollo de turbidez distintiva es una reacción positiva. O inocular por picadura en agar Citrato de Simons. Incubar durante 48 h a $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Una reacción positiva se observa mediante el crecimiento y coloración azul. La ausencia de cambio de coloración y crecimiento se considera una prueba negativa.

Gas de lactosa. Inocular un tubo de LST e incubar 48 ± 2 ha $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$. La producción de gas (desplazamiento del medio del vial interno) o efervescencia después de una agitación suave es una reacción positiva.

Interpretación: Todos los cultivos que (a) fermentan lactosa con producción de gas en 48 ha $35 \text{ }^\circ\text{C}$, (b) aparecen como bacilos gramnegativos no formadores de esporas y (c) dan patrones IMViC de ++ - (biotipo 1) o - + - (biotipo 2) se consideran E. coli . Calcule el NMP (consulte el Apéndice 2) de E. coli según la proporción de tubos de EC en 3 diluciones sucesivas que contengan E. coli .

NOTA: Alternativamente, en lugar de realizar la prueba IMViC, utilizando sistemas bioquímicos comerciales para identificar el organismo como E. coli. Utilice el crecimiento de los aislados en agar inclinado PCA y realice estos ensayos según lo descrito por el fabricante.

A. Método del medio sólido - Coliformes

Prepare agar bilis rojo violeta (VRBA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Enfriar a $48 \text{ }^\circ\text{C}$ antes de usar. Preparar, homogeneizar y diluir decimalmente la muestra cómo se describe en la sección anterior I. C para que se obtengan colonias aisladas. Transfiera dos alícuotas de 1 ml de cada dilución a placas Petri y utilice cualquiera de los dos métodos de vertido en placa siguientes, según se sospeche la presencia de células dañadas o estresadas (1).

Vierta 10 ml de VRBA atemperado a $48 \text{ }^\circ\text{C}$ en placas, agite las placas para mezclar y deje solidificar. Para evitar el crecimiento en la superficie y la propagación de colonias, cubra con 5 ml de VRBA y deje solidificar. Si es necesaria la reanimación, vertir una capa basal de 8-10 mL de agar de soya y tripticaseína atemperado a $48 \text{ }^\circ\text{C}$. Agitar las placas para mezclar e incubar a temperatura ambiente durante $2 \pm 0,5$ h. Luego, cubra con 8-10 mL de VRBA derretido y enfriado y deje solidificar.

Invertir las placas solidificadas e incube 18-24 h a $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Incubar los productos lácteos a $32 \text{ }^\circ\text{C}$ (2). Examine las placas con lupa y con iluminación. Cuente las colonias de color rojo púrpura que tengan 0,5 mm o más de diámetro y estén rodeadas por una zona de ácidos biliares precipitados. Las placas deben tener entre 25 y 250 colonias. Para confirmar que las colonias son coliformes, elija al menos 10 colonias representativas y transfíralas a un tubo de caldo BGLB. Incubar los tubos a $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Examinar a las 24 y 48 h para ver si hay producción de gas.

NOTA: Si el tubo BGLB con gas positivo muestra una película, realice la tinción de Gram para asegurarse de que la producción de gas no se deba a bacilos Gram positivos fermentadores de lactosa.

Determine el número de coliformes por gramo multiplicando el número de colonias sospechosas por el porcentaje confirmado en BGLB por el factor de dilución.

Alternativamente, las colonias de E. coli se pueden distinguir entre las colonias de coliformes en VRBA añadiendo 100 μg de 4-metil-umbeliferil- β -D-glucurónido (MUG) por ml en la superposición de VRBA. Después de la incubación, observe la fluorescencia azulada alrededor de las colonias bajo luz ultravioleta de onda larga. (consulte la sección II de LST-MUG para conocer la teoría y la aplicabilidad).

A. Método de filtración por membrana (FM) – coliformes

Consulte la Sección III. Agua embotellada.

Los homogeneizados de alimentos obstruyen fácilmente los filtros, por lo que la filtración de membrana es más adecuada para el análisis de muestras de agua; sin embargo, la FM puede usarse en el análisis de alimentos líquidos que no contienen altos niveles de material particulado, como el agua embotellada (ver la Sección III para la aplicación de FM).

II. Método LST-MUG para detectar E. coli en alimentos refrigerados o congelados, exclusivo de moluscos bivalvos

El ensayo LST-MUG se basa en la actividad enzimática de la β -glucuronidasa (GUD), que utiliza el sustrato 4-metilumbeliferil β -D-glucurónido (MUG) para liberar 4-metilumbeliferona (MU). Cuando se expone a luz ultravioleta de onda larga (365 nm), MU exhibe una fluorescencia azulada que se visualiza fácilmente en el medio o alrededor de las colonias. Más del 95% de E. coli produce GUD, incluidas las cepas anaerogénicas (que no producen gases). Una excepción es la E. coli enterohemorrágica (EHEC) del serotipo O157: H7, que es constantemente GUD negativo ([11](#) , [17](#)). La falta de fenotipo GUD en O157: H7 se usa a menudo para diferenciar este serotipo de otras E. coli ,

aunque existen variantes positivas para GUD de O157: H7 ([24](#) , [26](#)). La producción de GUD por otros miembros de la familia Enterobacteriaceae es rara, a excepción de algunas shigelas (44-58%) y salmonelas (20-29%) ([18](#) , [27](#)). Sin embargo, la detección inadvertida de estos patógenos mediante ensayos basados en GUD no se considera un inconveniente desde una perspectiva de salud pública. La expresión de la actividad de GUD se ve afectada por la represión de catabolitos ([8](#)) por lo que, en ocasiones, algunas E. coli son GUD negativas, aunque portan el gen uid A (gus A) que codifica la enzima ([19](#)). Sin embargo, en la mayoría de los análisis, alrededor del 96% de E. coli aislados analizados son positivos para GUD sin necesidad de inducción enzimática ([27](#)).

MUG se puede incorporar en casi cualquier medio para su uso en la detección de E. coli . Pero algunos medios como EMB, que contienen componentes fluorescentes, no son adecuados, ya que enmascararán la fluorescencia de MU. Cuando MUG se incorpora al medio LST, los coliformes se pueden enumerar sobre la base de la producción de gas a partir de lactosa y E. coli se identifica presuntamente por fluorescencia en el medio bajo luz ultravioleta de onda larga, por lo que es capaz de proporcionar una identificación presuntiva de E. coli dentro de las 24 h ([18](#) , [28](#)). El método LST-MUG que se describe a continuación ha sido adoptado como Acción Final Oficial por la AOAC para las pruebas de E. coli en alimentos refrigerados o congelados, excluidos los mariscos ([28](#)). Ver Sec. IV.4. D. para las precauciones en el uso de MUG en la prueba de mariscos. Para obtener información sobre el ensayo MUG, comuníquese con el Dr. Bill Burkhardt III (correo electrónico William.Burkhardt@fda.hhs.gov), FDA, CFSAN, Dauphin Island, AL, 36528; 251-406-8125

PRECAUCIÓN: Para observar la fluorescencia, examine los tubos LST-MUG inoculados bajo luz ultravioleta de onda larga (365 nm) en la oscuridad. Una lámpara UV portátil de 6 vatios es adecuada y segura. Cuando utilice una fuente de rayos ultravioleta más potente, como una lámpara fluorescente de 15 vatios, use anteojos protectores o gafas protectoras. Además, antes de usar en ensayos MUG, examine todos los tubos de vidrio para detectar auto fluorescencia. El óxido de cerio, que a veces se agrega al vidrio como medida de control de calidad, emitirá fluorescencia bajo la luz ultravioleta e interferirá con la prueba MUG ([25](#)). El uso de cepas de control positivo y negativo para la reacción MUG es esencial.

Equipo y material: consulte la sección IA anterior y , además ,

1. tubos de vidrio de borosilicato (100 × 16 mm)
2. Vales desechables de vidrio de borosilicato Durham (50 × 9 mm) para recolección de gas
3. Lámpara UV de onda larga, que no exceda los 6 vatios

Medios y reactivos: consulte la sección IB anterior

Prueba presunta LST-MUG para E. coli.

Prepare muestras de alimentos y realice la prueba presuntiva NMP como se describe en la sección IC anterior, excepto que utilice tubos LST-MUG en lugar de LST. Asegúrese de inocular un tubo de LST-MUG con un aislado de E. coli positivo para GUD conocido como control positivo (ATCC 25922). Además, inocular otro tubo con un cultivo de Enterobacter aerogenes (ATCC 13048) cultivo de Enterobacter aerogenes (ATCC 13048) o Klebsiella pneumoniae cepa como control negativo, para facilitar la diferenciación de los tubos de muestra que muestran solo crecimiento de aquellos que muestran tanto crecimiento como fluorescencia. Incubar los tubos durante 24 a 48 ± 2 ha 35 ° C. Examine cada tubo en busca de crecimiento (turbidez, gas) y luego examine los tubos en la oscuridad bajo una lámpara UV de onda larga (365 nm). Una fluorescencia azulada es una prueba presuntiva positiva para E. coli . Los estudios de Moberg et al. ([28](#)) muestran que una lectura de fluorescencia de 24 h es un predictor preciso de E. coli y puede identificar el 83-95% de los tubos positivos para E. coli . Después de 48 h de incubación, se puede identificar el 96-100% de los tubos positivos para E. coli ([28](#)). Realice una prueba confirmatorio a en todos los tubos presuntamente positivos inoculando un asa de suspensión de cada tubo fluorescente en agar L-EMB e incubar 24 ± 2 ha 35 ° C. Siga los protocolos descritos en I. F, para la prueba confirmatoria para E. coli . Calcule el NMP de E. coli basándose en la combinación de tubos fluorescentes confirmados en 3 diluciones sucesivas.

III. Examen de agua embotellada

El consumo de agua embotellada está aumentando rápidamente en todo el mundo. En los Estados Unidos solamente, se consumieron más de 3.6 mil millones de galones de agua embotellada en 1998 (Asociación Internacional de Agua Embotellada, Alexandria, VA). A diferencia del agua potable, que está regulada por la EPA de EE. UU., El agua embotellada está clasificada legalmente como alimento en los EE. UU. Y regulada por la FDA (Registro Federal. 1995. 21 CFR Parte 103 et al. Bebidas: agua embotellada; regla final. 60 (218) 57076-57130). La FDA define el agua embotellada como "agua destinada al consumo humano y que se sella en botellas u otros recipientes sin ingredientes

añadidos, excepto que puede contener agentes antimicrobianos seguros y adecuados" y, dentro de las limitaciones, algo de fluoruro añadido. El agua embotellada se puede utilizar como bebida por sí misma o como ingrediente en otras bebidas. Estas regulaciones no se aplican a refrescos o bebidas similares. Además de "agua embotellada" o "agua potable", en 21 CFR Parte 103, la FDA también define varios tipos de agua embotellada que cumplen con ciertos criterios. Estas identidades incluyen "agua de pozo artesano o ", "agua subterránea", agua mineral ", " agua purificada o desmineralizada ", " agua embotellada con gas ", " agua de manantial "y" agua de pozo ". Además, se define " agua estéril " como agua que cumple con los requisitos de la "Prueba de esterilidad" de la Farmacopea de los Estados Unidos.

Los organismos coliformes no son necesariamente patógenos y rara vez se encuentran en el agua embotellada, sin embargo, sirven como un indicador de insalubridad o posible contaminación. Las encuestas han demostrado que los coliformes son indicadores útiles de la calidad del agua embotellada, pero algunos países también monitorean poblaciones microbianas adicionales como indicadores de la calidad del agua embotellada ([10](#) , [33](#)). Según el estándar actual de calidad del agua embotellada, la FDA ha establecido un requisito de calidad microbiológica que se basa en los niveles de detección de coliformes. Estos niveles pueden obtenerse mediante filtración por membrana (MF) o mediante análisis NMP de 10 tubos de diez unidades analíticas de 10 ml.

A. Equipos y Materiales.

1. Incubadora a $35 \pm 0,5 \text{ } ^\circ \text{C}$.
2. Unidades de filtración de membrana (base de filtro y embudos): vidrio, plástico o acero inoxidable; envuelto en papel de aluminio o papel y esterilizado.
3. Cámara de esterilización ultravioleta para esterilizar la base del filtro y los embudos (opcional).
4. Colector de filtración o matraz de vacío para contener embudos de filtración.
5. Fuente de vacío (línea de vacío, bomba de vacío eléctrica o aspirador de agua).
6. Filtros de membrana; estéril, blanco, cuadrulado, 47 mm de diámetro, $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ de tamaño de poro (o equivalente, según lo especificado por el fabricante) para el recuento de bacterias.
7. Placas Petri, estériles, de plástico, $50 \times 12 \text{ mm}$, con tapas herméticas.
8. Pinzas diseñadas para transferir membranas sin dañarlas.

B. Medios de cultivo.

1. Caldo de lauril sulfato triptosa (LST)
2. Caldo de bilis lactosa verde brillante (BGLB)
3. Medio M-Endo
4. Agar LES-Endo (BD # 273620)

C. Prueba de coliformes totales NMP de diez tubos: procedimientos presuntivos y confirmados.

Para el examen de rutina del agua embotellada, tome 100 mL de muestra e inocule 10 tubos de 2X LST (10 mL de medio) con 10 mL de muestra sin diluir cada uno. Incubar los tubos a $35 \text{ } ^\circ \text{C}$. Examine los tubos a las $24 \pm 2 \text{ h}$ en busca de crecimiento y formación de gas, como lo demuestra el desplazamiento del medio en la campana de fermentación o la efervescencia cuando los tubos se agitan suavemente. Si es negativo a las 24 h, vuelva a incubar los tubos durante 24 h más y examínelos nuevamente en busca de gas. Realice una prueba confirmatoria en todos los tubos presuntamente positivos (formación de gas) de la siguiente manera: agite suavemente cada tubo LST positivo y, utilizando un asa estéril de 3,0 - 3,5 mm, transfiera una o más asas de suspensión a un tubo de caldo BGLB. También se pueden usar palitos aplicadores de madera esterilizados para la transferencia insertándolos al menos 2,5 cm en el cultivo del caldo. Incube los tubos de BGLB durante $48 \pm 2 \text{ h}$ a $35 \text{ } ^\circ \text{C}$. Examine la producción de gas y regístrelo. Calcule NMP usando la tabla NMP de 10 tubos (9221.III), p. 9-52, Métodos estándar para el examen de agua y aguas residuales ([3](#)).

NOTA : si se encuentra que una muestra contiene coliformes (en cualquier nivel), siga el procedimiento descrito anteriormente para determinar si es E. coli . No se permite que el agua embotellada contenga E. coli .

A. Método de filtración de membrana para coliformes.

Filtrar 100 mL de muestra y transferir el filtro al medio M-Endo o LES Endo Agar e incubar a $35 \text{ } ^\circ \text{C} \pm 0.5 \text{ } ^\circ \text{C}$ durante 22-24 h. Cuento las colonias que son de color rosa a rojo oscuro con un brillo superficial metálico verde. El brillo puede variar de un punto a una cobertura completa de la colonia. Se recomienda el uso de un microscopio de disección de baja potencia para examinar los filtros.

Confirmación- Si hay de 5 a 10 colonias brillantes en el filtro, confirme todas inoculando el crecimiento de cada colonia brillante en tubos de LST e incube a $35 \text{ } ^\circ \text{C} \pm 0,5 \text{ } ^\circ \text{C}$ durante 48 h. Si el número de colonias brillantes supera las 10, seleccione y confirme al azar 10 colonias que sean representativas de todas las colonias brillantes. Todos los

tubos LST positivos que hayan producido gas, deben confirmarse en BGLB e incubarse a $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 h. La producción de gas en BGLB en 48 h es una prueba de coliformes totales confirmada. Informar los resultados como número de colonias de coliformes por 100 ml.

NOTA: Estándar métodos, 1998, 20th ed, p. 9-60 (3), permite la inoculación simultánea de LST y BGLB durante la verificación. Sin embargo, BGLB es algo inhibitorio, por lo que el método descrito anteriormente, en el que las muestras se inoculan de LST a BGLB se considera un ensayo de verificación más sensible y, por lo tanto, es recomendable.

NOTA : si se encuentra que una muestra contiene coliformes totales (en cualquier nivel), seguir el procedimiento descrito en la Sec. SI para determinar si es E. coli . No se permite que el agua embotellada contenga E. coli.

IV. Examen de mariscos y carnes de mariscos

El procedimiento oficial de la COFEPERIS para el análisis de moluscos bivalvos se describe a detalle en el Programa Mexicano de Sanidad de Moluscos Bivalvos.

| | |
|--|--|
| <p>Apéndice B Normativo. Método de referencia para la estimación de la cuenta de S. aureus. B.2.6 Baño de agua capaz de operar a $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.</p> | <p>Con base en la ISO 6888-1 : 2021 modificar el rango de incubación para quedar como: Apéndice B Normativo. Método de referencia para la estimación de la cuenta de S. aureus. B.2.4 Incubadora capaz de operar a $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$; B.2.6 Baño de agua capaz de operar a $36^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.</p> |
| <p>B.5.4 Productos de la pesca Dependiendo de la muestra seguir lo indicado en el inciso I.6 de esta Norma.</p> | <p>Sin comentarios</p> |
| <p>B.6.4. Invertir las placas e incubar por $24\text{h} \pm 2\text{h}$ a $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, marcar en la base de la placa la posición de las colonias típicas y atípicas, re-incubar por $24\text{h} \pm 2\text{h}$ a $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, marcar en la base de la placa la posición de las nuevas colonias típicas y atípicas.</p> | <p>Con base en la ISO 6888-1 : 2021 modificar el rango de incubación para quedar como: B.6.4. Invertir las placas e incubar por $24\text{h} \pm 2\text{h}$ a $36^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, marcar en la base de la placa la posición de las colonias típicas y atípicas, re-incubar por un total de $48\text{h} \pm 4\text{h}$ a $36^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, marcar en la base de la placa la posición de las nuevas colonias típicas y atípicas.</p> |
| <p>B.6.4.1 Colonias Típicas: Son colonias negras o grises, circulares, brillantes, convexas, lisas, de diámetro de 1mm a 1.5 mm a las 24h de incubación y 1.5 mm a 2.5 mm después de 48h de incubación, rodeadas por una zona clara que puede ser parcialmente opaca. Después de 24h de incubación, en esa zona clara, se puede observar un halo opalescente en la periferia de las colonias. B.6.4.2 Colonias Atípicas: Son colonias de las mismas dimensiones de las colonias típicas, pueden ser negras brillantes con o sin un pequeño borde blanco, la zona clara es muy pequeña o no visible, y el halo opalescente no está presente o es apenas visible. También son colonias atípicas las colonias grises sin zona clara, del mismo tamaño que las colonias típicas. Hay bacterias de géneros distintos al Staphylococcus, que pueden dar la morfología colonial típica o atípica, por lo que la</p> | <p>Sin comentarios</p> |

observación microscópica usando una tinción de Gram puede ayudar en la distinción del género.

B.6.5 Seleccionar la dilución adecuada

B.6.5.1 En la mayoría de los casos seleccionar las placas que tengan menos de 300 colonias en total y menos de 150 colonias sospechosas (típicas y atípicas) de *S. aureus*; si no es posible, seleccionar las placas de las diluciones más altas no obstante tengan más de las colonias indicadas. Seleccionar por placa un número de colonias para confirmar. (Si solo están presentes colonias típicas en general seleccionar 5 colonias típicas "ts". Si solo están presentes colonias atípicas en general seleccionar 5 colonias atípicas "as". Si hay de ambos tipos de colonias seleccionar colonias tanto típicas "ts" como atípicas "as", por lo general seleccionar solo 5 colonias en total). Realizar la tinción de Gram, en el caso de no observar cocos Gram positivos, la colonia se tomará como negativa para *S. aureus*, por lo contrario si se observan cocos se seguirá con su confirmación.

B.6.5.2 Cuando en la primera dilución se cuenten menos de 15 colonias sospechosas por placa. Seleccionar por cada placa 5 colonias típicas, 5 colonias atípicas o todas las colonias típicas y todas las colonias atípicas, lo que sea menor. A las colonias seleccionadas realizar tinción de Gram, en el caso de observar una morfología diferente a cocos Gram positivos, la colonia se tomará como negativa para *S. aureus*, si se observan cocos Gram positivos se seguirá con su confirmación.

B.6.5.3. Si hay menos de 15 colonias típicas o atípicas en la dilución más baja seleccionar: 5 colonias típicas o todas las existentes en la placa, lo que sea menor y 5 colonias atípicas o todas las existentes en la placa, lo que sea menor. A las colonias seleccionadas realizar tinción de Gram, en el caso de observar una morfología diferente a cocos Gram positivos, la colonia se tomará como negativa para *S. aureus*, si se observan cocos Gram positivos se seguirá con su confirmación y seguir para el cálculo lo indicado en el inciso B.7.5 de esta Norma.

B.6.5.4 Cuando se siembre un 1mL dividido en 3 placas (0.3mL, 0.3mL y 0.4mL), considerar las tres placas como una sola placa. Si la cuenta es mayor que 15 UFC seleccionar 5 colonias sospechosas entre las 3 placas, es decir, cuando solo existan colonias típicas, seleccionar 5 colonias típicas, cuando solo existan colonias atípicas, seleccionar 5 colonias atípicas, cuando existan colonias típicas y atípicas seleccionar en total 5 colonias incluyendo típicas y atípicas. A las colonias seleccionadas realizar tinción de Gram, en el caso de observar una morfología diferente a cocos Gram positivos, la colonia se tomará como negativa para *S. aureus*, si se observan cocos Gram positivos se seguirá con su confirmación. Si la cuenta de las 3 placas es menor que 15 UFC considerar las tres placas como una sola y seguir lo indicado en el inciso B.6.5.2, de esta Norma.

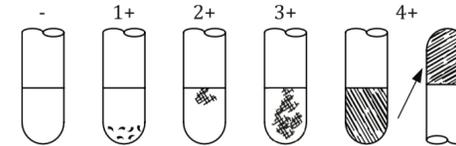
Sin comentarios

B.6.6 Cuando las placas de la dilución más baja tengan menos de 15 colonias sospechosas (típicas y/o atípicas) se debe agregar la nota de "valor estimado" al reporte de los resultados.

B.6.8.1 Prueba de coagulasa. Seguir las instrucciones del proveedor del plasma. En general, sembrar cada colonia seleccionada (coco Gram positivo) en tubos con 0.5mL de BHI y en tubos con AST. Utilizar simultáneamente un control positivo de *S. aureus* y un control negativo de *S. epidermidis*. Incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 20h a 24h. Mantener los cultivos en AST a no más de 27°C para pruebas posteriores. Mezclar 0.1mL del cultivo en BHI con 0.3mL de plasma de conejo con EDTA. Incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y observar periódicamente a intervalos de 1h durante las primeras 4h a 6h; si no hay formación de coágulo, observar hasta las 24h. Considerar la prueba positiva cuando el coágulo se forma completamente y es firme al invertir el tubo. Cuando los resultados de la coagulasa o la termonucleasa no permitan concluir la confirmación de *S. aureus*, se deberán realizar las pruebas auxiliares, descritas en el inciso B.6.9, de esta Norma.

Con base en la ISO 6888-1 : 2021 modificar el rango de incubación para quedar como:

B.6.8.1 Prueba de coagulasa. Seguir las instrucciones del proveedor del plasma. En general, sembrar cada colonia seleccionada (coco Gram positivo) en tubos con 0.5mL de BHI y en tubos con AST. Utilizar simultáneamente un control positivo de *S. aureus* y un control negativo de *S. epidermidis*. Incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 20h a 24h. Mantener los cultivos en AST a no más de 27°C para pruebas posteriores. Mezclar 0.1mL del cultivo en BHI con 0.3mL de plasma de conejo con EDTA. Incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y observar periódicamente a intervalos de 1h durante las primeras 4h a 6h; si no hay formación de coágulo, observar hasta las 24h. Considerar la prueba positiva si presenta un coágulo 3+ o 4+ según la siguiente imagen,



| Puntaje | | Interpretación de coagulasa a 24 h |
|---------|--|---|
| - | Sin coágulo | Negativo |
| 1 + | Pequeños coágulos desorganizados | intermedio debe ser confirmado por otro método (ver Introducción) |
| 2 + | Coágulo intermedio pequeño organizado | Intermedio debe ser confirmado por otro método (ver Introducción) |
| 3 + | Coágulo grande organizado | Positivo |
| 4 + | Todo el contenido del tubo se coagula y no se desplaza cuando se invierte el tubo. | Positivo |

| | |
|--|---|
| | <p>Cuando los resultados de la coagulasa no permitan concluir la confirmación de <i>S. aureus</i>, se deberán realizar las pruebas auxiliares, descritas en el inciso B.6.9, de esta Norma, iniciando por la prueba de termonucleasa.</p> <p>Alternativamente se pueden utilizar pruebas de aglutinación de látex (Aureus Test, Trisum corp.) como alternativa a la prueba de coagulasa.</p> |
| <p>B.6.8.3 Prueba de termonucleasa. Preparar portaobjetos con 3 mL de agar azul de toluidina-ADN. Con ayuda de una pipeta Pasteur hacer orificios equidistantes en el agar. En un baño de agua hirviendo calentar durante 15 min, 0.3mL de cultivo en BHI. Utilizando una pipeta Pasteur transferir una gota del cultivo a un orificio del medio, repetir para cada cepa incluyendo testigos positivos y negativos. Incubar a 35 °C ± 1 °C en cámara húmeda de 4h a 24h. La aparición de un halo color rosa extendido de por lo menos 1 mm alrededor de la perforación califica como positiva la prueba.</p> | <p>Mover todo el numeral como parte del B.6.9 para que se considere como prueba complementaria.</p> <p>Justificación la ISO 6888-1 no requiere la prueba de termonucleasa, mientras que el BAM Chapter 12 lo refiere sólo como un prueba auxiliar.</p> |
| | <p>6.1.2.1.3 Emulsión de yema de huevo Preparación Lavar con agua y jabón los huevos frescos que sean necesarios y limpiarlos con una solución de tintura de yodo (solución alcohólica al 2%) o sumergirlos en solución de cloruro mercúrico (1:1000). Enjuagar con agua estéril y secar con gasa estéril. En campana de flujo laminar o en condiciones asépticas, abrir los huevos y vaciarlos en un separador de claras estéril. Transferir las yemas a una probeta hasta un volumen de 60 ml y completar a 90 ml con solución salina isotónica. Verter la emulsión a un matraz Erlenmeyer con perlas de vidrio estéril y agitar fuertemente para formar la emulsión. Filtrar a través de gasa. Las placas deben utilizarse dentro de las 48 h siguientes a su preparación.</p> |
| <p>B.9.2.1 Preparación. (Sólo si una presentación comercial no está disponible). Utilizar huevos frescos, separar la yema de la clara. Mezclar las yemas con cuatro veces el volumen de agua, calentar la mezcla en un baño de agua, controlando la temperatura a 45 °C ± 0.5 °C por 2h y dejar reposar de 18h a 24h de 0 °C a + 5 °C, dejar precipitar. Decantar el sobrenadante líquido y esterilizar por filtración, a menos que se haya llevado la separación asépticamente. La emulsión puede ser almacenada de 2 °C a 8 °C por no más de 72h.</p> | <p>Se propone modificar el texto ya que su redacción es confusa y de forma práctica nos ha llevado a complicaciones en la preparación del medio. El texto actual de la norma refiere el uso filtración pero no aclara qué tipo de filtro utilizar.</p> <p>B.9.2.1 Preparación. (Sólo si una presentación comercial no está disponible). Lavar con agua y jabón los huevos frescos que sean necesarios y limpiarlos con una solución de tintura de yodo (solución alcohólica al 2%) o solución de etanol al 70 %. Enjuagar con agua estéril y secar con gasa estéril. En campana de flujo laminar o en condiciones asépticas, abrir los huevos y vaciarlos en un separador de claras estéril. Transferir las yemas a una probeta hasta un volumen de 60 ml y completar a 90 ml</p> |

| | |
|---|--|
| | <p>con solución salina isotónica. Verter la emulsión a un matraz Erlenmeyer esteril con perlas de vidrio estéril y agitar fuertemente para formar la emulsión. Filtrar a través de gasa.</p> |
| <p>Dice: I.8.1 En caso general inocular tres tubos por cada dilución. Para moluscos vivos, u otros productos especiales y/o cuando sea necesario obtener resultados más exactos es necesario inocular series de cinco tubos por dilución. Tomar tres tubos de medios de enriquecimiento selectivo. Con una pipeta estéril transferir 10mL de la muestra líquida o 10mL de la suspensión original en caso de otros productos a tubos con MMGA doble concentración. Tomar tres tubos de concentración simple de medios de enriquecimiento selectivo, usando otra pipeta estéril, transferir a cada uno de estos tubos 1mL de la muestra líquida o 1mL de la suspensión en caso de otros productos. Realizar diluciones decimales y repetir los incisos anteriores para cada dilución. Mezclar cuidadosamente el inóculo y el medio.</p> | <p>Debe decir: I.8.1 En caso general inocular tres tubos por cada dilución. Para moluscos vivos, u otros productos especiales y/o cuando sea necesario obtener resultados más exactos es necesario inocular series de cinco tubos por dilución. Tomar tres tubos de medios de enriquecimiento selectivo. Con una pipeta estéril transferir 10mL de la muestra líquida o 10mL de la suspensión original en caso de otros productos a tubos con MMGB doble concentración. Tomar tres tubos de concentración simple de medios de enriquecimiento selectivo, usando otra pipeta estéril, transferir a cada uno de estos tubos 1mL de la muestra líquida o 1mL de la suspensión en caso de otros productos. Realizar diluciones decimales y repetir los incisos anteriores para cada dilución. Mezclar cuidadosamente el inóculo y el medio. Justificación el MMGA no existe.</p> |
| <p>Dice: H.3.7 Termómetro de inmersión total de 379mm de longitud de 25 °C a 55 °C, una escala auxiliar a 0 °C con subdivisiones de 0.1 °C con una precisión y exactitud de ± 0.1 °C. Se deberá registrar la inspección anual de la columna de mercurio del termómetro con una lupa en búsqueda de rupturas de la misma, si se observa éste deberá salir de uso;</p> | <p>Se sugiere el siguiente texto. H.3.7 Instrumento de medición de temperatura capaz de registrar variaciones de 0.1°C, por ejemplo termómetro inmersión total de con escala de 25 °C a 55 °C, una escala auxiliar a 0 °C con subdivisiones de 0.1 °C o registrador electrónico de precisión adecuada. Justificación: El requisito de la norma limita el desarrollo o implementación de tecnologías equivalentes o superiores que permitan monitorear los procesos de incubación con misma o mayor precisión metrológica que la exigida en el requisito actual. El uso de mercurio en los laboratorios debe ser desalentado ya que este elemento representa un alto riesgo al ambiente y a la salud de los trabajadores. Y por tal motivo una norma no debería de forzar la exposición a este tipo de factores de riesgo. Lo anterior es una razón por la que los fabricantes han disminuido la comercialización de este tipo de insumos, y adicionalmente dadas las condiciones actuales por la pandemia de COVID 19, la importación de estos instrumentos está limitada y por lo tanto la exigencia de una sola forma de realizar la medición de la temperatura de incubación, puede limitar la posibilidad de tener infraestructura analítica suficiente para evaluar la conformidad de los productos que requieren ser analizados por el apéndice H normativo. Referencias:</p> |

| | |
|--|--|
| | <p>https://www.who.int/es/news/item/11-10-2013-who-calls-for-the-phase-out-of-mercury-f-every-thermometers-and-blood-pressure-measuring-devices-by-2020</p> |
| <p>I.3.6 Termómetro de inmersión total de 379mm de longitud de 25 °C a 55 °C, una escala auxiliar a 0 °C con subdivisiones de 0.1 °C con una precisión y exactitud de ± 0.1 °C.</p> <p>Se deberá registrar la inspección anual de la columna de mercurio del termómetro con una lupa en búsqueda de rupturas de la misma, si se observa alguna, éste deberá salir de uso.</p> | <p>Se sugiere el siguiente texto.</p> <p>H.3.6 Instrumento de medición de temperatura capaz de registrar variaciones de 0.1°C, por ejemplo termómetro inmersión total de con escala de 25 °C a 55 °C, una escala auxiliar a 0 °C con subdivisiones de 0.1 °C o registrador electrónico de precisión adecuada.</p> <p>Justificación: El requisito de la norma limita el desarrollo o implementación de tecnologías equivalentes o superiores que permitan monitorear los procesos de incubación con misma o mayor precisión metrológica que la exigida en el requisito actual. El uso de mercurio en los laboratorios debe ser desalentado ya que este elemento representa un alto riesgo al ambiente y a la salud de los trabajadores. Y por tal motivo una norma no debería de forzar la exposición a este tipo de factores de riesgo.</p> <p>Lo anterior es una razón por la que los fabricantes han disminuido la comercialización de este tipo de insumos, y adicionalmente dadas las condiciones actuales por la pandemia de COVID 19, la importación de estos instrumentos está limitada y por lo tanto la exigencia de una sola forma de realizar la medición de la temperatura de incubación, puede limitar la posibilidad de tener infraestructura analítica suficiente para evaluar la conformidad de los productos que requieren ser analizados por el apéndice H normativo.</p> <p>Referencias: https://www.who.int/es/news/item/11-10-2013-who-calls-for-the-phase-out-of-mercury-f-every-thermometers-and-blood-pressure-measuring-devices-by-2020</p> |
| <p>H.3.6 Termómetro de máximas para autoclave con división mínima de 0.5 °C calibrado. Se deberá registrar la inspección trimestral de la columna de mercurio del termómetro con una lupa en búsqueda de rupturas de la misma, si se observa éste deberá salir de uso;</p> <p>I.3.5 Termómetros de máximas cuya precisión/exactitud no sea mayor a 1 °C. Se deberá registrar la inspección trimestral de la columna de mercurio del termómetro con una lupa en búsqueda de rupturas de la misma, si se observa alguna, éste deberá salir de uso, y</p> | <p>Eliminar completamente los numerales</p> <p>Justificación: Los termómetros de máximas son termómetros de mercurio en vidrio que miden la temperatura máxima a la que llegan los proceso de esterilización pero no garantizan que el tiempo de exposición fue adecuado.</p> <p>El uso de este tipo de instrumentos sólo está referido en dos apéndices por lo que la misma norma se contradice en cuanto a la necesidad de contar con este instrumento en el método de análisis.</p> |

| | |
|---|---|
| | <p>El numeral 6.6. ya establece los requisitos que deben cumplir las autoclaves por lo que no sería prudente a menos que sea justificado científicamente, crear requisitos adicionales en los apéndices normativos.</p> |
| <p>H.11.4 Verificar el ciclo de esterilización de autoclaves con indicador biológico y termómetro de máximas calibrado o verificado. H.11.5 Verificar el ciclo de esterilización de hornos con indicador biológico.</p> | <p>Eliminar completamente los numerales. El numeral 6.6. ya establece los requisitos que deben cumplir las autoclaves por lo que no sería prudente a menos que sea justificado científicamente, crear requisitos adicionales en los apéndices normativos.</p> |
| <p>3.3 Coliformes fecales: a los bacilos cortos Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, que fermentan la lactosa con producción de ácido y de gas dentro de las 48h a $44.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ en agua y a $45.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ en alimentos usualmente en caldo E. coli.</p> | <p>Actualizar a: 3.3 Coliformes fecales: a los bacilos cortos Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, que fermentan la lactosa con producción de ácido y de gas dentro de las 48h a $44.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ usualmente en caldo E. coli.</p> <p>Justificación Actualizar la definición metodológica del BAM Ch. 4</p> <p>Bacteriological Analytical Manual (BAM) Main Page</p> <p>Authors: Peter Feng (ret.), Stephen D. Weagant (ret.), Michael A. Grant (dec.), William Burkhardt</p> <p>Revision History:</p> <ul style="list-style-type: none"> • October 2020 - Section I A.3 modified to reflect that enrichment should take place at $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ and not at $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$. • July 2017 - Chap. 4 Sec. I. E. For the completed phase of testing for <i>E. coli</i>, the incubation temperature of EC tubes has been changed from $45.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ to $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$. The change was made in part due to the poor ability of the control strain ATCC25922 to grown and ferment lactose to produce acid and gas at $45.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$. The use of $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ would also make it consistent with that used for fecal Coliform analysis in shellfish and shellfish meats (Sec. VI) as well as conditions used for <i>E. coli</i> testing by other International organizations. • February 2013 - Shellfish analysis method revised to be consistent with the APHA Examination of seawater and shellfish, 4th ed. • February 2013 - Membrane filter methods added to water analysis. |

H.2.1 Baño de agua con cubierta y recirculación constante que alcance una temperatura de 44.5 ° C, 45.5 ° C ± 0.2 ° C;

Actualizar a:
H.2.1 Baño de agua con cubierta y recirculación constante que alcance una temperatura de 44.5 ° C ± 0.2 ° C.

Justificación
Actualizar la definición metodológica del BAM Ch. 4

[Bacteriological Analytical Manual \(BAM\) Main Page](#)

Authors: Peter Feng (ret.), Stephen D. Weagant (ret.), Michael A. Grant (dec.), [William Burkhardt](#)

Revision History:

- October 2020 - Section I A.3 modified to reflect that enrichment should take place at 35 ± 0.5°C and not at 35 ± 1°C.
- July 2017 - Chap. 4 Sec. I. E. For the completed phase of testing for *E. coli*, the incubation temperature of EC tubes has been changed from 45.5 ± 0.2°C to 44.5 ± 0.2°C. The change was made in part due to the poor ability of the control strain ATCC25922 to grow and ferment lactose to produce acid and gas at 45.5 ± 0.2°C. The use of 44.5 ± 0.2°C would also make it consistent with that used for fecal Coliform analysis in shellfish and shellfish meats (Sec. VI) as well as conditions used for *E. coli* testing by other International organizations.
- February 2013 - Shellfish analysis method revised to be consistent with the APHA Examination of seawater and shellfish, 4th ed.
- February 2013 - Membrane filter methods added to water analysis.

H.7.1.3 Incubar los tubos para prueba de coliformes totales a 35 ° C ± 0.5 ° C por 48h ± 2h y para la prueba de coliformes fecales a 45.5 ° C ± 0.2 ° C en baño de agua con recirculación continua durante 24h, observar si hay formación de gas, registrar la lectura, en caso de no haber formación de gas, incubar 24h más. Utilizar estos resultados para calcular el NMP de Coliformes totales y coliformes fecales respetivamente. Consultar la sección de cálculos.

Nota: Para todos los alimentos que se les determine coliformes fecales, la incubación debe ser a 45.5 ° C ± 0.2 ° C por 24h a 48h, excepto para muestras de agua que deberán incubarse a 44.5 ° C ± 0.2 ° C durante 24h a 48h.

Actualizar a:
H.7.1.3 Incubar los tubos para prueba de coliformes totales a 35 ° C ± 0.5 ° C por 48h ± 2h y para la prueba de coliformes fecales a 44.5 ° C ± 0.2 ° C en baño de agua con recirculación continua durante 24h, observar si hay formación de gas, registrar la lectura, en caso de no haber formación de gas, incubar 24h más. Utilizar estos resultados para calcular el NMP de Coliformes totales y coliformes fecales respetivamente. Consultar la sección de cálculos.

Justificación
Actualizar la definición metodológica del BAM Ch. 4

[Bacteriological Analytical Manual \(BAM\) Main Page](#)

Authors: Peter Feng (ret.), Stephen D. Weagant (ret.), Michael A. Grant (dec.), [William Burkhardt](#)

Revision History:

- October 2020 - Section I A.3 modified to reflect that enrichment should take place at $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ and not at $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$.
 - July 2017 - Chap. 4 Sec. I. E. For the completed phase of testing for *E. coli*, the incubation temperature of EC tubes has been changed from $45.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ to $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$. The change was made in part due to the poor ability of the control strain ATCC25922 to grow and ferment lactose to produce acid and gas at $45.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$. The use of $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ would also make it consistent with that used for fecal Coliform analysis in shellfish and shellfish meats (Sec. VI) as well as conditions used for *E. coli* testing by other International organizations.
 - February 2013 - Shellfish analysis method revised to be consistent with the APHA Examination of seawater and shellfish, 4th ed.
 - February 2013 - Membrane filter methods added to water analysis.
-