



SECRETARIA DE COMERCIO

Y

FOMENTO INDUSTRIAL

NORMA MEXICANA

NMX-F-310-1978

**DETERMINACION DE CUENTA DE ESTAFILOCOCO AUREO,
COAGULASA POSITIVA, EN ALIMENTOS**

*(METHOD OF TEST FOR COUNT OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS IN
FOOD)*

DIRECCION GENERAL DE NORMAS

PREFACIO

En la elaboración de esta Norma participaron los siguiente organismos:

LABORATORIO NACIONAL DE LA SECRETARIA DE SALUBRIDAD Y ASISTENCIA.

COMPAÑIA NESTLE, S.A.

CAMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DE TRANSFORMACION

DEPTO. DE NORMAS.

KRAFT FOODS DE MEXICO, S.A. DE C.V.

ELIAS PANDO, S.A. DE C.V.

PEPSI-COLA MEXICANA, S.A.

LABORATORIO CENTRAL DE LA SECRETARIA DE HACIENDA Y CREDITO PUBLICO.

DIRECCION GENERAL DE CONTROL DE ALIMENTOS, BEBIDAS Y MEDICAMENTOS DE LA SECRETARIA DE SALUBRIDAD Y ASISTENCIA.

INDICE

0. INTRODUCCION
1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN
2. REFERENCIAS
3. REACTIVOS Y MATERIALES
4. APARATOS E INSTRUMENTOS
5. PREPARACION DE LA MUESTRA
6. PROCEDIMIENTO
7. EXPRESION DE LOS RESULTADOS
8. APENDICE
9. BIBLIOGRAFIA
10. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

DETERMINACION DE CUENTA DE ESTAFILOCOCO AUREO, COAGULASA POSITIVA, EN ALIMENTOS

(METHOD OF TEST FOR COUNT OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS IN FOOD)

0 INTRODUCCION

La presencia del estafilococo áureo en ciertos alimentos reviste importancia por tratarse de un microorganismo parásito del hombre y animales superiores y por su capacidad para producir en determinadas condiciones una poderosa enterotoxina. Cuando se pone de manifiesto en algún alimento, razonablemente se puede asociar este hecho con una exposición a la contaminación por humanos durante su manejo y eventualmente a una contaminación de origen si el animal de donde proviene el alimento sufría o sufre alguna infección piógena.

La situación adquiere mayor significado conforme el número encontrado se eleva por arriba de 100 y de 1000 gérmenes por gramo o ml. Esta última circunstancia da al microorganismo un riesgo especial, ya que se sabe que todas las cepas formadoras de enterotoxina coagulan el plasma. El método de Vogel Johnson permite hacer una estimación del contenido de estafilococo en el alimento aprovechando su carácter halotrófico; el resultado final expresa el número de estafilococo en múltiplos de 10. En la técnica de Baird-Parker el recuento se efectúa directamente en placas por siembra en superficie. En general, esta última técnica tiene mayor aceptación que la anterior por su especificidad y porque da cifras más reproducibles.

1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION

Esta Norma establece los métodos de Baird-Parker y de Vogel Johnson para determinar la cuenta de estafilococo áureo coagulasa positiva, en alimentos.

2 REFERENCIAS

Esta Norma se complementa con la Norma en vigor siguiente (ver 8.6):

NOM-F-285	Muestreo y transporte de Muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
NOM-BB-014	Clasificación y tamaños nominales para utensilios de vidrio usados en el laboratorio.

3. REACTIVOS Y MATERIALES

Los reactivos empleados en esta prueba deben ser grado analítico a menos que se indique otra cosa. Cuando se hable de agua debe entenderse por destilada.

3.1 Método de Baird-Parker

3.1.1 Disolución reguladora diluyente

Disolver 34 g de fosfato monopotásico en 500 ml de agua y ajustar el pH a 7.2 con hidróxido de sodio 1 N, esterilizar a 121°C durante 20 minutos. Conservar en refrigeración, tomar 1.25 ml y completar el volumen a 1000 ml con agua, distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml según se requiera; esterilizar a 121°C durante 20 minutos; El pH final debe ser de 7.2.

3.1.2 Agar de Baird Parker

3.1.2.1 Medio base

Peptona 10 g

Extracto de carne 5 g

Extracto de levadura 1 g

Cloruro de litio 5 g

Glicina 12 g

Piruvato de sodio 10 g

Agar 20 g

Preparación. Suspender los ingredientes del medio, previamente deshidratados, en 950 ml de agua, calentar agitando, hervir durante un minuto, enfriar, aforar a un litro y distribuir en frascos con tapón de rosca en cantidades de 95 ml. El pH final debe ser entre 6.8 y 7.2.

3.1.2.2 Emulsión de yema de huevo

Preparación. Se coloca la yema de huevo en probeta estéril y se le agrega la 3a. parte del volumen de la yema, de disolución estéril de cloruro de sodio al 0.85% y se agita con trozos de vidrio estéril.

3.1.2.3 Medio completo

Preparación. A cada 95 ml de medio base estéril a 45-50°C agregar un ml de una disolución al 1% de telurito de potasio estéril y 5 ml de la emulsión de yema de huevo. Homogenizar y distribuir en cajas de Petri.

Secar en la estufa o a temperatura ambiente la superficie de las placas manteniendo las cajas con las tapas ligeramente abiertas, a 37°C durante una hora. Emplear las placas dentro de las 24 horas posteriores a su preparación.

3.1.3 Caldo infusión cerebro corazón (BHI)

Infusión cerebro de ternera.	200.0 g
Dextrosa.	2.0 g
Infusión corazón de res.	250.0 g
Proteosa-peptona.	10.0 g
Cloruro de sodio.	5.0 g
Fosfato disódico.	2.5 g
Agua destilada.	1000 ml

Preparación: En 1000 ml de agua, disolver 37 g del medio deshidratado, hervir, esterilizar durante 15 minutos a 1.05 kg./cm² de presión.

3.1.4 Plasma humano o de conejo, diluido volumen a volumen con disolución salina, este plasma debe ser obtenido empleando reactivo EDTA como anticoagulante.

3.1.5 Disolución salina

Cloruro de sodio.	0.85 g
Agua destilada.	100 ml

Disolver y distribuir en volúmenes de 25 ml

Esterilizar a 121° durante 15 minutos.

3.2. Método de Vogel-Johnson

3.2.1 Disolución reguladora diluyente (ver 3.1.1).

3.2.2 Caldo Soya-Trypticasa, con 10% de cloruro de sodio.

Trypticasa.	17 g
Fitona.	3 g
Cloruro de sodio.	100 g
Fosfato de potasio dibásico.	2.5 g
Glucosa.	2.5 g

Agua 1000 ml

Disolver 30 g del medio deshidratado en 1000 ml de agua, hervir, distribuir en tubos de 16 x 150 mm en volúmenes de 4.5 ml
 Esterilizar a 121°C durante quince minutos. EL pH final debe ser 7.3.

3.2.3 Agar Vogel-Johnson

Triptona 10 g
 Extracto de levadura 5 g
 Manitol 10 g
 Fosfato dipotásico 5 g
 Cloruro de litio 5 g
 Glicina 10 g
 Agar. 16 g
 Rojo de fenol. 0.025 g
 Agua. 1000 ml

Disolver 61 g del medio deshidratado en un litro de agua, mezclar bien agitar frecuentemente y hervir durante un minuto.
 Esterilizar a 121°C durante quince minutos; Enfríar a 45° agregar 20 ml de disolución de telurito de potasio al 1%, distribuir en cajas de Petri.

El pH final debe ser de 7.2.

3.2.4 Caldo infusión cerebro corazón (BHI)
 (Ver 3.1.3).

3.2.5 Plasma humano o de conejo.
 (Ver 3.1.4).

3.2.6 Disolución salina.
 (Ver 3.1.5).

4 APARATOS E INSTRUMENTOS

Todo el material de vidrio que se emplea en esta prueba debe cumplir con la NOM-BB-014 y además debe ser estéril.

Horno para esterilizar a 180 ± 1°C

Autoclave con termómetro probado con termómetro de máximas.

Baño de agua con regulador de temperatura de $\pm 0.1^\circ$

Licuada de 1 ó 2 velocidades controladas por un reóstato con vasos metálicos.

Balanza de una capacidad no mayor de 2,500 g y de una sensibilidad de 0.1 g

Cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas.

Frascos de dilución de 200 a 250 ml de capacidad con tapón de rosca que contengan 99 ó 90 ml y tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca que contengan 9 ml de disolución reguladora diluyente en ambos casos + 1% del volumen señalado después de la esterilización.

Tubos de cultivo de 12 x 75 mm y de 16 x 150 mm.

Pipetas bacteriológicas de 10 ml y 1 ml graduadas en 0.1 y 0.01 ml respectivamente.

Cajas de Petri de 100 x 10 mm.

Varilla de vidrio de 3.5 mm de diámetro de 20 cm de longitud con un doblez terminal en ángulo recto de 2 cm.

Contador de colonias (ver 8.1).

Contador manual (ver 8.2).

Asa de platino o nicromel.

Incubadora con regulador de temperatura que evite variaciones mayores de $\pm 0.1^\circ\text{C}$.

5 PREPARACION DE LA MUESTRA

La preparación de la muestra debe hacerse según la NOM-F-285. Muestreo y transporte de muestra de alimentos para su análisis microbiológico.

6 PROCEDIMIENTO

6.1. Método de Baird Parker

6.1.1 Colocar 0.1 ml de cada dilución sobre una placa de agar Baird Parker y extenderla con la varilla de vidrio en toda la superficie (ver 8.3).

6.1.2 Incubar las placas invertidas a 35° - 37° durante 24 - 48 horas, después de 24 horas seleccionar las placas que muestren de 50 a 150 colonias aisladas, contar y marcar todas aquellas que aparezcan negras y brillantes con o sin ligero borde blanco y rodeadas por una zona clara en el fondo del medio opaco. Estas colonias son de estafilococo áureo. Incubar las placas 24 horas más e incluir en el cómputo las colonias nuevas que reúnan las características ya señaladas. Seleccionar la caja que contenga más de 150 colonias sospechosas y efectuar la prueba de coagulasa.

6.1.2.1 Prueba de coagulasa

Sembrar el número de colonias que corresponda según el cuadro en tubos con 3 ml de caldo infusión cerebro-corazón e incubar a 35-37°C durante 24 horas.

Número de colonias	Colonias por
Sospechosas en la placa	probar
Menos de 50	3
51 - 100	5
101 - 150	7

Agregar 0.3 ml de plasma.

Incubar en baño de agua a 35 - 37°C observar a intervalos de una hasta seis horas.

Si hay formación de coágulo, la prueba es positiva (ver 8.4).

6.2 Método de Vogel Johnson

6.2.1 Transferir 0.5 ml de cada dilución a tubos conteniendo 4.5 ml de caldo soya tripticasa. Incubar a 35°C durante 48 ± 3 horas. Inocular por estría una asada de los tubos con desarrollo a placas de agar Vogel Johnson de manera que puedan obtenerse colonias bien aisladas. Incubar a 35° durante 48 ± 3 horas.

Seleccionar las colonias negras (reductoras de telurito) convexas, brillantes o sospechosas y efectuar la prueba de la coagulasa (ver 6.1.2.1).

7 EXPRESION DE LOS RESULTADOS

7.1 Cálculos

7.1.1 Método de Baird Parker

Calcular el contenido de microorganismos en el producto tomando en cuenta el número de colonias, la dilución seleccionada para el recuento y el volumen inoculado (ver 8.5).

Informar: "Cuenta de estafilococo áureo colonias /g o ml de alimento".

Si la prueba de coagulasa resulta negativa en todas las colonias probadas, se informa como menos de una colonia/g.

7.1.2 Método de Vogel Johnson

Determinar el contenido de estafilococo áureo, coagulasa positiva en la muestra de acuerdo con los resultados obtenidos en la prueba de coagulasa: 10, 100, 1000 según la mayor dilución positiva en la prueba.

8 APENDICE

8.1 El contador de colonias empleado en esta prueba puede ser Quebec o equivalente.

8.2 El contador manual puede ser Tally o equivalente.

8.3 Para cada dilución emplear una varilla de vidrio.

8.4 El coagulo puede ser pequeño pero bien constituido o bien una coagulación total de la mezcla.

8.5 Si por ejemplo la dilución seleccionada para el cálculo final es 10^{-3} y se contaron 148 colonias, probar 7. Si de ellas cinco resultan positivas a la prueba de coagulasa, el cálculo final es:

Total de colonias coagulasa positiva en la placa:

7 colonias 5 positivas

148 colonias x

FIGURA No. 1 y 2

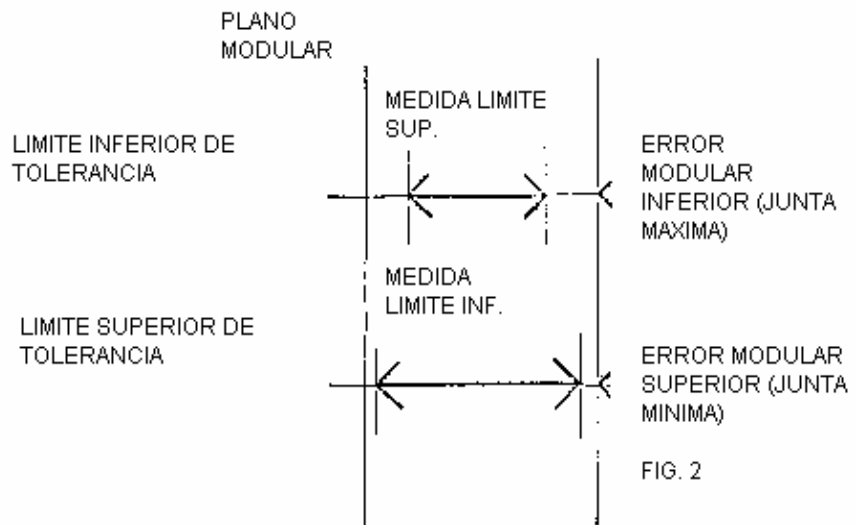
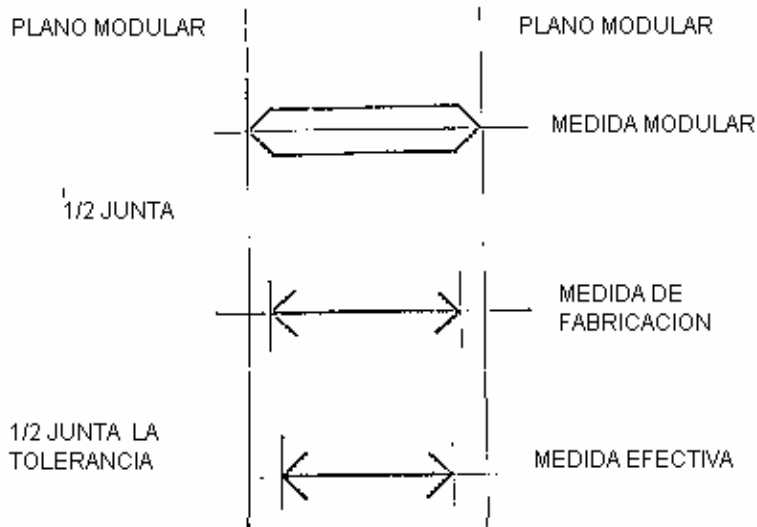


FIG. 2

$x = 10$ colonias positivas (en la dilución 10^3 de la placa inoculada con 0.1 ml).

Redondear la cifra a dos dígitos significativos

105 _____ 100

Como 0.1 ml de la dilución 10^{-3} corresponde a 1 ml de la dilución 10^{-4}

Multiplicar el número de colonias por la inversa de esta dilución:

$$100 \times \frac{1}{10^{-4}} = 1000000$$

9 BIBLIOGRAFIA

NOM-Z-013-1977 Norma Mexicana. Guía para la redacción, estructuración y presentación de las Normas Mexicanas. Secretaría de Patrimonio y Fomento Industrial.

Técnicas para el muestreo y análisis microbiológico de alimentos. Dirección General de Investigación en Salud Pública. Secretaría de Salubridad y Asistencia. 1975.

10 CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

Esta norma no coincide con norma alguna por no existir norma internacional sobre el tema.

México, D.F., Abril 19, 1978

P.A. DEL DIRECTOR GENERAL
EL SUBDIRECTOR DE OPERACION.



ING. JOSE HERNANDEZ SALGADO.

Fecha de aprobación y publicación: Abril 24, 1978