09-25-95 NORMA Oficial Mexicana NOM-115-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de Staphylococcus aureus en alimentos.

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Salud.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-115-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. METODO PARA LA DETERMINACION DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN ALIMENTOS.

JOSE MELJEM MOCTEZUMA, Director General de Control Sanitario de Bienes y Servicios, por acuerdo del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en los artículos 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 38 fracción II, 47 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 194 fracción I de la Ley General de Salud; 2o. fracción III, 34, 37, 40 y los demás aplicables del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios; 8o. fracción IV y 13 fracción I del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud, y

CONSIDERANDO

Que con fecha 28 de abril de 1994, en cumplimiento de lo previsto en el artículo 46 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización la Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios presentó al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, el anteproyecto de la presente Norma Oficial Mexicana.

Que con fecha 15 de agosto de 1994, en cumplimiento del acuerdo del Comité y de lo previsto en el artículo 47 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, se publicó en el **Diario Oficial de la Federación** el proyecto de la presente Norma Oficial Mexicana a efecto que dentro de los siguientes noventa días naturales posteriores a dicha publicación, los interesados presentaran sus comentarios al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario.

Que en fecha previa, fueron publicadas en el **Diario Oficial de la Federación** las respuestas a los comentarios recibidos por el mencionado Comité, en términos del artículo 47 fracción III de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

Que en atención a las anteriores consideraciones, contando con la aprobación del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, se expide la siguiente:

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-115-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. METODO PARA LA DETERMINACION DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN ALIMENTOS.

PREFACIO

En la elaboración de la presente norma participaron los siguientes organismos e instituciones:

SECRETARIA DE SALUD

Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios

Laboratorio Nacional de Salud Pública

SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA Y DESARROLLO RURAL

Comisión Nacional del Agua

SECRETARIA DE MEDIO AMBIENTE, RECURSOS NATURALES Y PESCA

Instituto Nacional de la Pesca

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

JUGOS DEL VALLE, S.A. DE C.V.

LABORATORIO FERMI, S.A.

LABORATORIO ICCABI, S.A. DE C.V.

LECHE INDUSTRIALIZADA CONASUPO, S.A DE C.V. LICONSA

SOCIEDAD MEXICANA DE NORMALIZACION Y CERTIFICACION, S.C.

NORMEX

INDICE

0. INTRODUCCION

1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION

2. FUNDAMENTO

3. REFERENCIAS

4. DEFINICIONES

5. SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

6. REACTIVOS Y MATERIALES

7. APARATOS

8. PREPARACION DE LA MUESTRA

9. PROCEDIMIENTO

10. CALCULO Y EXPRESION DE RESULTADOS

11. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

12. BIBLIOGRAFIA

13. OBSERVANCIA DE LA NORMA

14. VIGENCIA

0. Introducción

El crecimiento de *Staphylococcus aureus* en alimentos tiene gran importancia por tratarse de un microorganismo capaz de producir una poderosa enterotoxina que al ingerirse causa intoxicaciones alimentarias.

Entre las razones para determinar el *Staphylococcus aureus* en alimentos están:

Confirmar la presencia de este microorganismo como agente causal de una enfermedad de origen alimentario.

Determinar si un alimento o ingrediente es fuente potencial de este microorganismo enterotoxigénico.

Demostrar la contaminación postproceso la cual es usualmente debida a contacto humano o con superficies inadecuadamente sanitizadas.

Los alimentos sujetos a contaminación postproceso con tipos enterotoxigénicos de *Staphylococcus aureus* representan un riesgo por la ausencia de flora competitiva que normalmente restringe el crecimiento del *Staphylococcus aureus* y la producción de enterotoxinas.

Este tipo de alimentos se vuelven más peligrosos, si además son sujetos a un inadecuado manejo o son mantenidos a temperaturas de conservación inapropiadas.

Los alimentos perecederos tales como: carnes crudas y procesadas, ensaladas, productos de pastelería y productos de leche, son los más comúnmente asociados con intoxicación estafilocóccica.

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta Norma Oficial Mexicana establece el método microbiológico para determinar la cuenta de *Staphylococcus aureus* presente en alimentos nacionales o de importación.

1.2 Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el territorio nacional para las personas físicas o morales que requieran efectuar este método en alimentos, para fines oficiales.

2. Fundamento

Este método permite hacer una estimación del contenido de *Staphylococcus aureus* en alimentos, se efectúa directamente en placas de medio de cultivo selectivo y diferencial, con la confirmación mediante las pruebas de coagulasa y termonucleasa.

Este método es adecuado para el análisis de alimentos en los cuales se esperen más de 100 células de *Staphylococcus aureus* por g.

3. Referencias

Esta norma se complementa con lo siguiente:

NOM-109-SSA1-1994	Procedimiento para la Toma, Manejo y Transporte de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.
NOM-110-SSA1-1994	Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

4. Definiciones

Para fines de esta norma se entiende por:

Staphylococcus aureus, microorganismo que se desarrolla en medios de cultivo selectivo y diferencial, que es capaz de dar positiva la prueba de coagulasa y termonucleasa.

5. Símbolos y abreviaturas

Cuando en esta norma se haga referencia a los siguientes símbolos y abreviaturas se entiende por:

kg	kilogramo
cm^2	centímetro cuadrado
g	gramo
l	litro
ml	mililitro
cm	centímetro
mm	milímetro
h	hora
min	minuto
seg	segundo
°C	grados Celsius
N	normal
M	molar
PM	peso molecular
pH	potencial de hidrógeno
±	más o menos
%	por ciento
/	por
µm	micrómetro
UFC	unidades formadoras de colonias

6. Reactivos y materiales

En caso de disponerse de fórmulas comerciales deshidratadas, para su preparación se deben seguir las instrucciones impresas en la etiqueta respectiva.

Cuando se mencione agua debe entenderse que se trata de "agua destilada".

Los reactivos a emplear en el método objeto de esta norma deben ser grado analítico.

6.1 Reactivos

6.1.1 Soluciones diluyentes

6.1.1.1 Solución reguladora de fosfatos (Solución concentrada)

FORMULA

Ingredientes	**Cantidad**
Fosfato monopotásico	34,0 g
Agua	1,0 l

Preparación

Disolver el fosfato en 500 ml de agua y ajustar el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio 1 N, aforar con agua a 1 l.

Esterilizar durante 15 min a 121ºC ±1, conservar en refrigeración (solución concentrada).

Tomar 1,25 ml de la solución concentrada y llevar a 1 l con agua (solución de trabajo).

Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml según se requiera.

Esterilizar a 121ºC ±1 durante 15 min.

Después de la esterilización, los volúmenes finales y el pH de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

6.1.1.2 Agua peptonada

FORMULA

Ingredientes	**Cantidad**
Peptona	1,0 g
Cloruro de sodio	8,5 g
Agua	1,0 l

Preparación

Disolver los componentes en un litro de agua.

Ajustar el pH a 7,0 con solución de hidróxido de sodio 1N.

Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml según se requiera.

Esterilizar a 121ºC ±1 durante 15 min.

Después de la esterilización los volúmenes finales y el pH de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

6.1.2 Medios de cultivo

6.1.2.1 Medio de Baird-Parker

FORMULA

Ingredientes	**Cantidad**
Medio base (6.1.2.1.1)	95,0 ml
Solución de telurito de potasio (6.1.2.1.2)	1,0 ml
Emulsión de yema de huevo (6.1.2.1.3)	5,0 ml

Preparación

Cuando el medio base esté a 45ºC, agregar los demás ingredientes y mezclar.

Colocar de 15 a 20 ml del medio completo, enfriar y dejar solidificar.

Las placas pueden almacenarse por 48 h a temperatura de 0 a 5ºC.

6.1.2.1.1 Medio base de Baird-Parker

FORMULA

Ingredientes	**Cantidad**
Triptona	10,0 g
Extracto de levadura	1,0 g
Extracto de carne	5,0 g
Glicina	12,0 g
Cloruro de litio	5,0 g
Piruvato de sodio	10,0 g
Agar	20,0 g
Agua	1,0 l

Preparación

Disolver los ingredientes o el agar base en agua y calentar con agitación constante y hervir durante 1 min. Esterilizar a 121ºC ±1 durante 15 min.

Enfriar y mantener el medio a 45ºC.

6.1.2.1.2 Solución de telurito

FORMULA

Ingredientes	**Cantidad**
Telurito de potasio	1,0 g
Agua	100,0 ml

Preparación

Disolver el telurito de potasio en agua y esterilizar.

La solución puede ser almacenada por varios meses a temperatura de 0 a 5ºC.

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.

6.1.2.1.4 Solución salina isotónica

FORMULA

Ingredientes	**Cantidad**
Cloruro de sodio	0,85 g
Agua	100,0 ml

Preparación

Disolver el ingrediente en agua y esterilizar a 121ºC ±1 durante 15 min.

6.1.2.2 Caldo de infusión cerebro-corazón (BHI)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Infusión de cerebro de ternera	200,0 ml
Infusión de corazón de res	250,0 ml
Peptona de gelatina	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Fosfato disódico dodecahidratado	2,5 g
Glucosa	2,0 g
Agua	1,0 l

Preparación

Disolver los ingredientes en agua y calentar ligeramente si es necesario.

Distribuir y esterilizar durante 15 min a 121ºC ±1.

6.1.2.3 Acido desoxirribonucleico helicoidal de timo de ternera.

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Acido desoxirribonucleico helicoidal de timo de ternera o equivalente	0,03 g
Agar	1,00 g
Cloruro de calcio anhidro (Solución 0,01 M) (6.1.2.3.1)	0,10 ml
Cloruro de sodio	1,00 g
Azul de toluidina (Solución 0,1 M) (6.1.2.3.2)	0,30 ml
Tris-(hidroximetil-aminometano) (Tris solución 0,05 M, pH 9) (6.1.2.3.3)	100,00 ml

Preparación

Disolver los ingredientes, excepto el azul de toluidina agitando hasta completar la disolución del ácido desoxirribonucleico y calentar a ebullición.

Agregar el azul de toluidina. Distribuir en frascos pequeños con tapón de hule. No es necesario esterilizar.

Este medio es estable a temperatura ambiente hasta 4 meses y funciona perfectamente aun después de fundirlo varias veces.

Tomar un porta objetos limpio y agregar 3 ml del medio fundido esparciéndolo por la superficie.

Cuando el agar solidifique, hacer orificios con la punta de una pipeta Pasteur.

Conservar en refrigeración para evitar la deshidratación.

6.1.2.3.1 Solución de cloruro de calcio anhidro 0,01 M

Cloruro de calcio PM = 110,99

Disolver 0,1199 g de cloruro de calcio en 100 ml de agua.

6.1.2.3.2 Solución de azul de toluidina 0,1 M

Disolver 3,05 g de azul de toluidina en 100 ml de agua.

6.1.2.3.3 Solución amortiguadora 0,05 M Tris-(hidroximetilaminometano)

(Tris pH 9) PM = 121,1

Disolver 6,055 g de Tris en 100 ml de agua.

6.1.3 Reactivo biológico:

Plasma de conejo

Emplear plasma de conejo deshidratado o rehidratado siguiendo las instrucciones del fabricante y agregar ácido etilendiaminotetracético (EDTA) en solución al 0,1% en plasma rehidratado. Si se utiliza plasma deshidratado diluir con agua estéril en proporción de 1:3.

Puede emplearse plasma de conejo liofilizado adicionado de EDTA. No debe emplearse sangre citratada.

6.2 Materiales

Todos los instrumentos que se utilicen para trabajar la muestra deben esterilizarse mediante horno, durante 2 h de 170-175ºC o como alternativa en autoclave durante 15 min como mínimo a 121ºC ±1.

Cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas y separador de huevo.

Tubos de cultivo de 16 mm x 150 mm o frascos de 125 a 250 ml de capacidad.

Tubos de cultivo de 10 mm x 75 mm.

Cajas Petri de 90 a 100 mm de diámetro.

Pipetas bacteriológicas de 1 ml y 10 ml de capacidad graduadas en 0,1 ml y 1 ml respectivamente y diámetro de 2 a 3 mm.

Pipetas Pasteur.

Probetas.

Varillas de vidrio de 3,5 mm de diámetro aproximadamente y 20 cm de largo dobladas en ángulo recto.

Matraz Erlenmeyer con perlas de vidrio

Cámara húmeda: consiste en una caja Petri en la cual se coloca una varilla de vidrio en forma de "V" rodeada de algodón humedecido con agua.

7. Aparatos

Horno para esterilizar que alcance 180°C.

Autoclave con termómetro.

Baño de agua con regulador de temperatura de 35 ± 0,5ºC.

Baño de agua con regulador de temperatura de 45 ± 0,5ºC.

Balanza con capacidad no mayor de 2,500 g y sensibilidad de 0,1 g.

Incubadora a 35 ± 1ºC.

8. Preparación de la muestra

La preparación de la muestra se debe realizar de acuerdo a lo establecido en la NOM-110-SSA1-1994 "Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico".

9. Procedimiento

9.1 Utilizando diferentes pipetas de 1 ml para cada dilución, depositar 0,1 ml sobre la superficie de las placas de agar Baird-Parker.

9.2 Distribuir el inóculo sobre la superficie del agar con varillas estériles de vidrio en ángulo recto, utilizando una para cada dilución.

9.3 Mantener las placas en su posición hasta que el inóculo sea absorbido por el agar.

9.4 Invertir las placas e incubar de 45 a 48 h a 35ºC.

9.5 Seleccionar las placas que tengan entre 15 y 150 colonias típicas de *Staphylococcus aureus*; si no es posible, seleccionar las placas de las diluciones más altas no obstante tengan más de 150 colonias.

9.6 Cuando las placas tengan menos de 15 colonias típicas también pueden ser utilizadas y al informe se debe agregar la nota de "valor estimado".

9.7 Las colonias típicas son negras, circulares, brillantes, convexas, lisas, de diámetro de 1 a 2 mm y muestran una zona opaca y un halo claro alrededor de la colonia.

9.8 Seleccionar las colonias de acuerdo con el siguiente cuadro para realizar las pruebas de coagulasa y termonucleasa:

CUADRO

NUMERO DE COLONIAS SOSPECHOSAS EN PLACA	**NUMERO DE COLONIAS POR PROBAR**
Menos de 50	3
51 a 100	5
101 a 150 o más	7

9.9 Seleccionar el número de colonias y sembrar cada una en tubos con 0,5 ml de caldo de infusión cerebro-corazón.

9.10 Incubar a 35ºC durante 24 h.

9.11 Inocular en la misma forma cepas conocidas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* como testigos positivo y negativo.

9.12 Después del periodo de incubación pasar con una pipeta de 1 ml, 0,3 ml de cada cultivo a otro tubo de 10 mm x 75 mm y conservarlo para la prueba de termonucleasa. El resto del cultivo se usa para la prueba de coagulasa.

9.13 Prueba de coagulasa

9.13.1 Agregar a los 0,2 ml del cultivo anterior, 0,2 ml de plasma de conejo diluido volumen a volumen con solución salina estéril.

9.13.2 Incubar en baño de agua de 35 a 37ºC y observar durante 6 h a intervalos de 1 h; si no hay formación de coágulo, observar a las 24 h. Considerar positiva la prueba si hay formación de coágulo.

Para comprobar la coagulabilidad del plasma de conejo se añade una gota de cloruro de calcio al 5% a 0,5 ml de plasma reconstituido empleado, formándose un coágulo en 10-15 seg.

9.14 Prueba de termonucleasa

9.14.1 Calentar durante 15 min, 0,3 ml de cultivo en caldo de infusión cerebro-corazón en baño de agua hirviendo.

9.14.2 Pasar una gota de cada cultivo por medio de una pipeta Pasteur a un orificio del medio, incluye testigo.

9.14.3 Incubar a 35ºC en cámara húmeda de 4 a 24 h.

9.14.4 La aparición de un halo color rosa extendido de por lo menos 1 mm alrededor de la perforación se califica como positiva.

10. Cálculo y expresión de resultados

10.1 Cálculo

Hacer el cálculo del contenido de microorganismos en el producto tomando en cuenta el número de colonias totales, el número de colonias confirmadas, la dilución y el volumen inoculado (0,1 ml).

Ejemplo 1:

Si la caja tiene 80 colonias en la dilución 1:1000

Se toman 5 colonias para la prueba, de éstas dan 4 positivas, el cálculo es:

$$\frac{80 \times 4}{5} = 64 \times 1000 \times 10 = 640\,000$$

Ejemplo 2:

Si la caja tiene 14 colonias en la dilución 1:10

Se toman 3 colonias para la prueba, de éstas dan 2 positivas, el cálculo es:

$$\frac{14 \times 2}{3} = 9{,}3 \times 10 \times 10 = 930$$

10.2 Expresión de los resultados:

Según ejemplo 1:

Informar como *Staphylococcus aureus* 640 000 UFC/g

Según ejemplo 2:

Informar como *Staphylococcus aureus* 930 UFC/g valor estimado

Si las pruebas confirmativas resultan negativas en todas las colonias probadas, informar como:

0 UFC/g en muestras directas

-10 UFC/g en muestras de dilución 1:10

-100 UFC/g en muestras de dilución 1:100

En la práctica los resultados pueden variar, esto dependerá del técnico que trabaje el método y el grado de confiabilidad del mismo, que en el 95% de los casos es de ± 16% a ± 52%.

11. Concordancia con normas internacionales

Esta norma no tiene concordancia con normas internacionales.

12. Bibliografía

12.1 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1992. Ley Federal sobre Metrología y Normalización. **Diario Oficial de la Federación**. México, D.F.

12.2 Secretaría de Salud. 1988. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. **Diario Oficial de la Federación**. México, D.F.

12.3 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1993. NOM-008-SCFI-1993 Sistema General de Unidades de Medida. **Diario Oficial de la Federación**. México, D.F.

12.4 Food and Drug Administration. 1978. Bacteriological Analytical Manual. 6th ed. Cap. XI p.p 4-5.

12.5 Koneman E./Stephen D. Diagnóstico Microbiológico. 3ra. ed. Editorial Médica Panamericana Uruguay. p.p. 295

12.6 Secretaría de Salud. Manual para la determinación de *Staphylococcus aureus*. Laboratorio Nacional de Salud Pública. México, D.F. p.p. 12-14 y 26-28.

12.7 NORMA ISO. 6888. 1983. General Guidance for the Enumeration of *Staphylococcus aureus*- Colony Count Technique. International Organization for Standarization

12.8 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1981

NORMA-Z-013/02. Guía para la Redacción, Estructuración y Presentación de las Normas Oficiales Mexicanas. México, D.F.

12.9 Poelman L.P./Silleker H.J. 1984. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. *Staphylococcus aureus*. 2nd ed. Ed. American Public Health Association. Washington, D.C.

13. Observancia de la Norma

La vigilancia del cumplimiento de la presente norma corresponde a la Secretaría de Salud.

14. Vigencia

La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor con su carácter de obligatoria a partir de los treinta días siguientes a su publicación en el **Diario Oficial de la Federación**.

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 10 de mayo de 1995.- El Director General, **José Meljem Moctezuma**.- Rúbrica.