

03-06-95 NORMA Oficial Mexicana NOM-031-SSA1-1993, Bienes y servicios. Productos de la pesca. Moluscos bivalvos frescos-refrigerados y congelados. Especificaciones sanitarias.

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

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; 8o. fracción IV y 13 fracción I del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud, y

CONSIDERANDO

Que con fecha 18 de noviembre de 1993, 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 24 de marzo 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-031-SSA1-1993, BIENES Y SERVICIOS. PRODUCTOS DE LA PESCA. MOLUSCOS BIVALVOS FRESCOS-REFRIGERADOS Y CONGELADOS. ESPECIFICACIONES SANITARIAS.**

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

Dirección General de Salud Ambiental

Laboratorio Nacional de Salud Pública

SECRETARIA DE PESCA

Dirección General de Promoción Pesquera

INSTITUTO NACIONAL DE LA PESCA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Instituto de Ciencias del Mar y Limnología

CAMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA PESQUERA

INDICE

0. INTRODUCCION
1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION
2. REFERENCIAS
3. DEFINICIONES
4. SIMBOLOS Y ABREVIATURAS
5. CLASIFICACION
6. ESPECIFICACIONES SANITARIAS
7. MUESTREO
8. METODOS DE PRUEBA
9. ETIQUETADO
10. ENVASE, EMPAQUE Y EMBALAJE
11. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES
12. BIBLIOGRAFIA
13. OBSERVANCIA DE LA NORMA
14. VIGENCIA

15. APENDICE NORMATIVO

Apéndice A

0. Introducción

Las enfermedades transmitidas por alimentos, en su mayoría son de tipo infeccioso y de origen químico como las intoxicaciones. La incidencia de estas enfermedades sigue constituyendo uno de los problemas de salud pública más extendidos en el mundo contemporáneo y permanecen como una de las causas principales de morbilidad, que ocupan el segundo lugar entre las enfermedades transmisibles de notificación obligatoria.

Entre los alimentos involucrados resaltan los moluscos bivalvos, debido a que estos productos en su origen están sometidos a una contaminación microbiológica y química, entre otras, lo que aunado a la forma de consumo generan enfermedades para el consumidor.

Una Norma Oficial Mexicana, que regule a estos productos desde el punto de vista sanitario, permitirá promover el consumo de los mismos y a la vez proteger la salud del consumidor.

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta Norma Oficial Mexicana establece las especificaciones sanitarias de los moluscos bivalvos frescos-refrigerados y congelados.

1.2 Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el territorio nacional para las personas físicas o morales que se dedican a su proceso o importación.

2. Referencias

Esta Norma se complementa con lo siguiente:

NOM-051-SCFI-1994 Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados.

NOM-087-SSA1-1994 Aves frescas refrigeradas y congeladas, enteras y troceadas envasadas. Especificaciones sanitarias. *

NOM-092-SSA1-1994 Método para la cuenta de bacterias aeróbicas en placa.
*

NOM-110-SSA1-1994 Preparación y dilución de muestras para su análisis microbiológico. *

NOM-112-SSA1-1994 Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable. *

- NOM-114-SSA1-1994 Método para la determinación de Salmonella. *
- NOM-117-SSA1-1994 Método de prueba para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, fierro, zinc y mercurio en alimentos, agua potable y agua purificada por absorción atómica. *
- NOM-120-SSA1-1994 Buenas prácticas de higiene y sanidad en bienes y servicios. *
- NOM-128-SSA1-1994 Que establece la aplicación de un sistema de análisis de riesgos y control de puntos críticos en la planta industrial procesadora de productos de la pesca. *

* Proyecto en proceso de expedición como Norma Oficial Mexicana.

3. Definiciones

Para fines de esta Norma se entiende por:

- 3.1 Almeja, molusco bivalvo que vive libre, fijo o semifijo, sobre o dentro del fondo de las aguas marinas, estuarinas o dulces con nula, escasa o regular movilidad con o sin pie; con o sin músculo aductor anterior, casi siempre sifón y con concha generalmente rugosa, gruesa y dura.
- 3.2 Biotoxinas marinas, compuestos venenosos producidos por los dinoflagelados (*Ptychodiscus brevis*, *Gonyaulax* spp, *Gambierdiscus toxicus*, *Pyrodinium bahamensis*, *Dinophysis* spp), y las Diatomeas del género *Nitzschia*; que son acumuladas en los organismos que se alimentan de estos protozoarios.
- 3.3 Congelación, método de conservación físico que se efectúa por medio de equipo especial para lograr una reducción de la temperatura de los productos objeto de esta Norma en su centro térmico a máximo -18 °C (255 K), reduciendo los cambios enzimáticos y microbiológicos.
- 3.4 Enhielado, método de conservación físico con el cual se mantiene la temperatura interna del producto a máximo 4°C (277 K) con la utilización de hielo potable.
- 3.5 Etiqueta, todo rótulo, marbete, inscripción, imagen u otra forma descriptiva y gráfica, ya sea que esté impreso, marcado, grabado, en relieve, hueco, estarcido o adherido al empaque o envase del producto.
- 3.6 Fecha de caducidad, fecha límite en que se considera que un producto preenvasado almacenado en las condiciones sugeridas por el fabricante, reduce o elimina las características sanitarias que debe reunir para su consumo. Después de esta fecha no debe comercializarse ni consumirse.
- 3.7 Límite máximo, concentración permitida de aditivos, microorganismos, parásitos, materia extraña, plaguicidas, biotoxinas, residuos de medicamentos y metales pesados y metaloides de un alimento, bebida o materia prima.

3.8 Lote, cantidad de un producto elaborado en un solo proceso con el equipo y sustancias requeridas, en un mismo lapso para garantizar su homogeneidad. Por lo tanto, no puede ser mayor que la capacidad del equipo ni integrarse con partidas hechas en varios periodos.

3.9 Marea roja, un tipo de contaminación natural producida por protozoarios dinoflagelados de varias especies, que producen biotoxinas marinas.

3.10 Materia extraña, toda aquella sustancia, resto o desecho orgánico o no que se presenta en el producto sea por contaminación o por manejo poco higiénico del mismo durante su elaboración, considerándose entre otros: pelos, excretas de cualquier especie, fragmentos de hueso e insectos que resultan perjudiciales para la salud.

3.11 Mejillón, molusco bivalvo que vive fijo sobre el fondo de las aguas marinas o estuarinas, formando racimos adheridos por filamentos bisales a casi cualquier sustrato, con pie y músculo aductor anterior muy reducido; con concha lisa, delgada y frágil.

3.12 Metal pesado, aquel de peso atómico mayor que el del sodio (22,9) que forma jabones al reaccionar con ácidos grasos. Ejemplos: aluminio, plomo y cobalto.

3.13 Métodos de prueba, procedimientos analíticos utilizados en el laboratorio para comprobar que un producto satisface las especificaciones que establece la Norma.

3.14 Molusco bivalvo, organismo acuático comestible que proviene de agua dulce, salobre o salada; de cuerpo blando y cubierto por una concha compuesta invariablemente por dos valvas, el cual se alimenta por filtración.

3.15 Molusco bivalvo en su concha, organismo vivo que se define en 3.14 y que conserva su concha después de ser recolectado en las áreas de producción aprobadas, o bien de acuacultura, durante su desarrollo natural.

3.16 Molusco bivalvo desconchado comestible, el organismo a que se refiere en 3.14, que le ha sido retirada la concha, lavado y clasificado antes de su venta.

3.17 Molusco bivalvo fresco-refrigerado, organismo definido en 3.14, cuyo tratamiento de conservación es la refrigeración y el enhielado para mantener sus características sensoriales.

3.18 Molusco bivalvo congelado, el organismo definido en 3.14 y desconchado que se conserva a temperatura de congelación.

3.19 Muestra, número total de unidades de producto provenientes de un lote que representan las características y condiciones del mismo; de forma que los resultados obtenidos representen los del lote.

3.20 Ostión u ostra, molusco bivalvo que vive fijo sobre el fondo de las aguas marinas o estuarinas, adheridos algunos por filamentos bisales y otros por cementación de una de las valvas a casi cualquier sustrato presente, que están carentes de pie y músculo aductor anterior y que la concha posee en su parte externa una textura extremadamente rugosa con conformación de capas superpuestas, además de ser relativamente frágil.

3.21 Plaguicidas, sustancia o mezcla de sustancias utilizadas para prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier forma de vida que sea nociva para la salud, los bienes del hombre o el ambiente, excepto la que exista sobre o dentro del ser humano y los protozoarios, virus, bacterias, hongos u otros microorganismos similares sobre o dentro de los animales.

3.22 Proceso, conjunto de actividades relativas a la obtención, elaboración, fabricación, preparación, conservación, mezclado, acondicionamiento, envasado, manipulación, transporte, distribución, almacenamiento y expendio a suministro al público de productos.

3.23 Refrigeración, método de conservación físico con el cual se mantiene la temperatura interna de un producto a máximo 4 °C (277 K).

4. Símbolos y abreviaturas

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

°C grados Celsius

K grados Kelvin

kg kilogramo

ml mililitros

UR unidad ratón

µg microgramos

UFC unidades formadoras de colonias

g gramos

NMP número más probable

mg miligramo

/ por

Cuando en la presente Norma se mencione al:

Reglamento, debe entenderse que se trata del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.

5. Clasificación

Los productos objeto de esta Norma por su proceso se clasifican en:

5.1 Moluscos bivalvos frescos-refrigerados

5.2 Moluscos bivalvos congelados

6. Especificaciones sanitarias

Los productos objeto de este ordenamiento deben cumplir las siguientes especificaciones:

6.1 Físicas

6.1.1 Materia extraña

Los moluscos bivalvos frescos-refrigerados y congelados deben estar exentos de materia extraña.

6.2 Químicas

ESPECIFICACIONES	LIMITE MAXIMO
------------------	---------------

pH del líquido intervalvar	7,0-7,25
----------------------------	----------

pH de la carne	6,0-6,5
----------------	---------

Nitrógeno amoniacal en 100 g	30 mg
------------------------------	-------

6.3 Contaminación por biotoxinas marinas

ESPECIFICACIONES	LIMITE MAXIMO
------------------	---------------

Toxinas de <i>Ptychodiscus brevis</i>	20 UR/100g en carne
---------------------------------------	---------------------

Saxitoxina, veneno paralizante

de moluscos	80 µg/100g en carne
-------------	---------------------

Acido domoico 20 µg/g en carne

6.4 Microbiológicas

ESPECIFICACIONES LIMITE MAXIMO

Mesofílicos aerobios 500 000 UFC/g

Bacterias coliformes fecales (230 NMP/100 g en carne
más líquido intervalvar

Salmonella spp en 25 g Ausente

Vibrio cholerae 0 1 Ausente
toxigénico en 50 g

6.5 Contaminación por metales pesados

ESPECIFICACIONES LIMITE MAXIMO

(mg/kg)

Mercurio (Hg) 1,0

Mercurio como metil mercurio* 0,5

Plomo (Pb) 1,0

Cadmio (Cd) 0,5

* Es necesario únicamente en los casos en que el mercurio total supere el nivel de referencia establecido, con la finalidad de aceptar o rechazar el lote.

6.6 Contaminación por plaguicidas

Los moluscos bivalvos frescos-refrigerados y congelados objeto de esta Norma no deben contener residuos de plaguicidas como: Aldrin, Dieldrin, Endrin,

Heptacloro, Kapone u otros prohibidos en el Catálogo de Plaguicidas publicado en el Diario Oficial de la Federación.

6.7 Clasificación de Areas

Para efectos de esta Norma las áreas se clasifican en:

6.7.1 Area aprobada, aquella que cumple con las especificaciones siguientes:

MICROORGANISMOS LIMITE MAXIMO

Bacterias coliformes La mediana o el promedio geométrico del

totales NMP de bacterias coliformes en el agua, no debe exceder de 70 NMP/100 ml; no más del 10% de las muestras debe exceder a 230 NMP/100 ml de la prueba de dilución decimal en 5 tubos o 330 NMP/100 ml cuando se utiliza la prueba de dilución decimal de 3 tubos.

Bacterias coliformes La mediana o el promedio geométrico del

fecales NMP del agua no excederá de 14 NMP/100 ml y no más del 10% de las muestras excederá de 43 NMP/100 ml para la prueba de dilución decimal de 5 tubos con tres diluciones o 49 NMP/100 ml para la prueba de dilución decimal de 3 tubos.

6.7.2 Area aprobada condicionalmente, aquella que cumple con las especificaciones microbiológicas de acuerdo a los siguientes criterios:

Las áreas de producción que están sujetas a contaminación microbiológica intermitente, son las que se pueden clasificar como aprobadas condicionalmente; esta alternativa se puede utilizar cuando existe interés sobre un área que esté afectada por eventos de contaminación predecibles en tiempo y la cosecha de moluscos bivalvos sea destinada a venta directa en determinadas épocas del año. Así también la calidad sanitaria del área puede estar afectada por poblaciones estacionales, fuentes de contaminación no puntuales o por el uso esporádico de muelles o de puertos.

Por lo anterior el área debe estar sujeta a un programa de manejo que contenga los siguientes puntos:

6.7.2.1 Evaluación de fuentes potenciales de contaminación en términos de sus efectos en el agua y en el área.

Monitoreo rutinario.

6.7.2.2 Disponibilidad de instalaciones y condiciones de operación para el tratamiento de aguas residuales descargadas directa o indirectamente por el efluente en el área.

6.7.2.3 Condiciones para la apertura o clausura. Esta área está sujeta a reaperturas o clausuras, las cuales están determinadas por los resultados de los análisis bacteriológicos establecidos para un área aprobada y prohibida respectivamente.

6.7.3 Area restringida, la que cumple con las especificaciones microbiológicas siguientes:

MICROORGANISMOS MAXIMO

Bacterias coliformes La mediana de coliformes totales o del

totales promedio geométrico del NMP de las muestras de aguas, no debe exceder de 700 NMP/100 ml y no más del 10% de las muestras excederá de 2,300 NMP/100 ml para la prueba de dilución decimal de 5 tubos o 3,300 NMP/100 ml para la prueba de dilución decimal de 3 tubos.

Bacterias coliformes La mediana de coliformes fecales

fecales promedio geométrico del NMP del agua no debe exceder de 88 NMP/100 ml y no más del 10% excederá de 260 NMP/100 ml para la prueba de dilución decimal de 5 tubos o 300 NMP/100 ml para la prueba de dilución decimal de 3 tubos.

6.7.4 Area prohibida, aquella en la cual la calidad del agua rebase los límites máximos que representen un riesgo para la salud del consumidor en los siguientes casos:

6.7.4.1 Que estén contaminadas con aguas residuales, domésticas, municipales, industriales, agrícolas, de embarcaciones, plataformas u otras instalaciones lacustres o marítimas;

6.7.4.2 Que estén afectadas por derrames de materiales que contengan sustancias tóxicas como consecuencia de contingencias;

6.7.4.3 Que estén afectadas por residuos de material radiactivo;

6.7.4.4 Que estén afectadas por biotoxinas naturales, y

6.7.4.5 Que estén contaminadas por otras fuentes no contempladas en esta Norma.

7. Muestreo

El procedimiento de muestreo para los productos objeto de esta Norma debe sujetarse a lo que establece la Ley General de Salud.

8. Métodos de prueba

Para la verificación de las especificaciones químicas y microbiológicas que se establecen en esta Norma se deben aplicar los métodos de prueba señalados en el apartado de referencias. Para la determinación de:

Vibrio cholerae, se debe aplicar el método establecido en el apéndice normativo A de este ordenamiento.

pH y nitrógeno amoniacal, se deben efectuar con los métodos contemplados en el apéndice normativo de la NOM-087-SSA1-1994. Aves frescas refrigeradas y congeladas. Enteras y troceadas. Especificaciones sanitarias.

9. Etiquetado

La etiqueta de los productos objeto de esta Norma, además de cumplir con lo establecido en el Reglamento y la Norma Oficial Mexicana correspondiente, debe sujetarse a lo siguiente:

Si el producto está refrigerado, el texto: "Manténgase en refrigeración de 2°C a 4°C".

Si el producto está congelado, el texto: "Consérvese en congelación a -18°C o a una temperatura inferior". "Una vez descongelado no debe volverse a congelar".

Se debe indicar en los productos frescos refrigerados o congelados la fecha de extracción, el área de producción y el número del Certificado de Exportación e Importación del producto, el número de lote, día, mes y año de la elaboración y la fecha de caducidad, señalando día, mes y año.

10. Envase, empaque y embalaje

10.1 Envase

Los productos objeto de esta Norma se deben envasar en recipientes de tipo sanitario, elaborados con materiales inocuos y resistentes a distintas etapas del proceso, de tal manera que no reaccionen con el producto o alteren sus características físicas, químicas y organolépticas.

10.2 Empaque

Se deben usar envolturas de material resistente que ofrezcan la protección adecuada a los envases para impedir su deterioro exterior a la vez que

faciliten su manipulación, almacenamiento y distribución.

10.3 Embalaje

Se deben usar cajas o envolturas de material resistente que ofrezcan la protección adecuada a los envases para impedir su deterioro exterior, a la vez que faciliten su manipulación, almacenamiento y distribución.

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. 1984. Ley General de Salud. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.

12.3 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.

12.4 Programa Mexicano de Sanidad de Moluscos Bivalvos. 1989. "Manual de Operación I del Control Sanitario de Areas de Producción de Moluscos Bivalvos. México, D.F.

12.5 Programa Mexicano de Sanidad de Moluscos Bivalvos. 1989. "Manual de Operación II de los Aspectos Sanitarios de la Cosecha, Procesamiento y Distribución de los Moluscos Bivalvos. México, D.F.

12.6 Secretaría de Desarrollo Social. Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección del Ambiente.

12.7 Secretaría de Salud - Laboratorio Nacional de Salud Pública. 1992. Manual de Técnicas y Procedimientos para la Investigación de *Vibrio cholerae* en Agua y Alimentos. México, D.F.

12.8 Secretaría de Salud. 1992. Manual de Técnicas y Procedimientos para la Investigación del

Vibrio cholerae en Agua y Alimentos. Laboratorio Nacional de Salud Pública. México, D.F.

12.9 Association of Official Analytical Chemist. 1990. Official Methods of Analysis. "Fish and Other Marine Products". Ed Kenneth Helrich. Virginia, USA.

12.10 Code of Federal Regulations. 1991. "Regulations Governing Processed Fishery Products and U.S Standars for Grades of Fishery Products. Revised as of

october 1".

12.11 Comisión del Codex Alimentarius. 1978. "Código Internacional recomendado de Prácticas de Higiene para mariscos moluscos"; CAC/RCP 18. Roma, Italia.

12.12 World Health Organization. 1989. "International Consultive Group on Food Irradiation Consultation on Microbiological Criteria, for Food to be Further Processed Including by Irradiation; 29 may - 2 june. Geneve.

13. Observancia de la Norma

La vigilancia en el cumplimiento de la presente Norma corresponde a la Secretaría de Salud.

14. Vigencia

La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor con su carácter obligatorio a los trescientos sesenta y cinco días siguientes a partir de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 29 de noviembre de 1994.- El Director General de Control Sanitario de Bienes y Servicios, José Meljem Moctezuma.- Rúbrica.

Apéndice Normativo A

A DE LOS METODOS DE PRUEBA

1. Procedimiento de Bioensayo para Toxina Paralizante en Moluscos Bivalvos.

(Precaución: Use guantes de hule, cuando manipule materiales que puedan contener toxina paralizante de los moluscos).

1.1 Materiales

a) Solución estándar de saxitoxina (100 µg/ml)

b) Solución de referencia de saxitoxina (1 µg/ml)

Preparar la solución de referencia de veneno paralizante (1 µg de saxitoxina/ml) tomando 1,0 ml de solución estándar en matraz volumétrico de 100 ml, llevar al volumen con agua destilada acidificada con HCl (pH=3). Esta solución es estable por varias semanas si se guarda a 3 o 4 °C y el pH está entre 2,0 y 4,0.

c) Ratones, emplear ratones machos albinos, sanos, cepa Webster Suiza, con un peso de 19 a 21 gramos. Los animales que pesan de 17 a 19 y de 21 a 23 gramos también pueden ser utilizados en ausencia de animales con el rango de peso deseado. No reusar ratones sobrevivientes.

1.2 Estandarización de bioensayo

Diluir alícuotas de 10 ml de la solución de referencia con 10, 15, 20, 25 y 30 ml de agua, respectivamente. Posteriormente inyectar 1 ml de cada dilución por vía intraperitoneal a unos cuantos ratones de prueba. La mediana del tiempo de muerte debe estar entre 5 y 7 minutos, el pH de las diluciones debe estar entre 2 y 4, en ningún caso debe ser mayor a 4,5.

Probar diluciones adicionales con incrementos de 1 ml de agua destilada. Por ejemplo, si la alícuota de 10 ml diluidos con 25 ml de agua mata a los ratones en 5 a 7 minutos, preparar soluciones 10 + 24 y 10 + 26.

Inyectar a un grupo de 10 ratones con 2 diluciones (de preferencia 3) que estén dentro del tiempo entre 5 a 7 minutos. Aplicando dosis de 1 ml por vía intraperitoneal a cada ratón. Registrar el tiempo de inyección y de muerte lo más aproximado posible a intervalos de 5 segundos, si se registran 7 segundos, redondear a 5 segundos y si se registran 8 segundos redondear a 10 segundos. El tiempo de muerte es el tiempo transcurrido entre el término de la inyección y el último jadeo del ratón.

Pesar y anotar el peso de los 10 ratones, aproximando hasta 0,5 gramos e inyectar cada uno con un ml de 2 o 3 diluciones de preferencia que provoquen la muerte en una mediana de tiempo de 5 a 7 minutos. Anotar los tiempos de muerte. Si más ratones de un grupo de 10 sobrevive a la inyección de una dilución particular de la solución de referencia, repetir la inyección en un nuevo grupo de 10 ratones. Antes de proceder a realizar la prueba. Con el segundo grupo, investigar las variables de procedimiento que pudieron haber provocado los resultados iniciales tales como filtración, derrame de la mezcla inyectada en el ratón o el no haber inyectado el volumen completo de la solución estándar.

1.2.1 Cálculos

Determinar la mediana del tiempo de muerte para cada grupo de 10 ratones usados con cada dilución. Descartar los resultados para cada grupo de 10 ratones que den una mediana de muerte menor de 5 o mayor de 7 minutos, si cualquier grupo de 10 ratones da una mediana de tiempo de muerte en el intervalo de tiempo mencionado, incluir todos los grupos de 10 ratones usados para que los cálculos de la dilución subsecuente o algunas muertes caigan en el rango deseado.

Usar los tiempos de muerte por cada ratón para cada grupo, en el cual la mediana de tiempo de muerte quede entre 5 y 7 minutos, determinar las Unidades Ratón correspondientes a partir de la tabla de Sommer's. Con el peso de cada ratón se determinará el factor de corrección en la tabla de correcciones de pesos de ratones. Multiplicar las Unidades Ratón por el factor de conversión del peso para determinar los valores para las Unidades Ratón corregidas por ml de diluciones seleccionadas, dividir los μg de toxina/ml calculados en las diluciones seleccionadas por las URC asociadas, para obtener el factor de conversión (FC). Calcular el promedio de FC individuales, el valor resultante es útil para verificar los ensayos de rutina, este valor representa los

microgramos de veneno equivalentes a una UR.

Los valores individuales del FC obtenidos en el laboratorio, pueden variar significativamente si no existe un control absoluto de la técnica. Por lo regular el uso de estándares de referencia o estándares secundarios, depende del volumen de ejecución del trabajo de ensayo.

1.2.2 Uso de estándares en el ensayo de rutina de moluscos bivalvos

Verificar los valores del FC periódicamente como sigue: Si los moluscos son analizados menos de una vez a la semana, determinar el valor del FC cada día que el ensayo sea ejecutado, inocular 5 ratones con una dilución apropiada de la solución estándar. Si los ensayos se realizan durante varios días a la semana, verificar solamente una vez por semana la dilución cuya mediana de tiempo de muerte cae entre 5-7 minutos. El FC así determinando deberá quedar dentro de $\pm 20\%$ del FC estándar predeterminado.

Si los resultados no concuerdan, verificar el FC sobre una base de 10 ratones formado por la adición de 5 ratones inoculados con la misma dilución de solución estándar de saxitoxina e incluir los resultados a los 5 ratones originales. Inocular un segundo grupo de 10 ratones. El promedio de valores del FC obtenidos de los 6 grupos de 10 ratones representan un nuevo valor de FC.

Repetir la verificación de los valores de FC de manera que los resultados sean consistentes dentro del $\pm 20\%$. Si se encuentran grandes variaciones, investigar la posibilidad de controlar y reconocer otras variables que afectan al método antes de proceder con los análisis de rutina.

1.3 Preparación de la muestra

a) Almejas, ostiones y mejillones.- Lavar los moluscos bivalvos con agua potable retirando la arena y cualquier material extraño. Desconchar la carne con cuidado, sin lesionar el cuerpo del molusco. Colectar aproximadamente 150 gramos de carne sobre un tamiz del número 10 y dejar escurrir durante 5 minutos. Descartar las conchas, moler la carne en una mezcladora o licuadora hasta la homogenización.

b) Escalopas.- Separar la porción comestible (músculo aductor) y solamente aplicar la prueba para esta porción sola. Drenar y moler como en (a).

1.3.1 Extracción de PSP

Pesar 100 gramos de carne homogeneizada en un vaso de precipitado tarado.

Agregar 100 ml de solución de ácido clorhídrico (HCl) 0,18 N, agitar y verificar, el pH deberá estar entre 2 y 4, de preferencia 3.

Calentar la mezcla, hervir 5 minutos y dejar enfriar a la temperatura ambiente. Ajustar la mezcla enfriada a un pH 2,0-4,0 (nunca mayor a 4,5), verificar el pH con indicador universal BDH, azul de fenol, papel rojo congo o con un

potenciómetro. Para bajar el pH agregar HCl 5 N por goteo, agitando constantemente para evitar la alcalinización local y la consiguiente destrucción de la toxina.

Transferir la mezcla a una probeta graduada y diluir a 200 ml.

Regresar la mezcla a un vaso de precipitado, agitar para homogeneizar y dejar reposar hasta que una parte del sobrenadante sea translúcido y pueda encontrarse libre de partículas sólidas capaces de "tapar" una aguja hipodérmica del 26. Si es necesario centrifugar el sobrenadante 5 minutos a 3000 rpm o filtrar por papel. Filtrar sólo la cantidad de líquido necesario para el bioensayo.

1.4 Prueba de bioensayo en ratón

Pesar 3 ratones, anotando el peso para cada muestra que va a ser analizada. Inyectar por vía intraperitoneal cada ratón con 1 ml de extracto centrifugado. Este es el punto crítico del bioensayo. Si las inyecciones no se hacen directamente en la cavidad peritoneal el tiempo de muerte no es reproducible.

Descartar cualquier ratón en donde se pierda o se filtre más de una gota de extracto. Activar el cronómetro en el momento de la inyección y mantener la observación cuidadosamente hasta el tiempo de muerte, que se manifiesta por el último jadeo del animal. Registrar el momento de la muerte de cada ratón, si la mediana de tiempo de muerte es de 5 minutos, diluir el extracto con HCl 0,01 N, e inyectar otro lote de ratones hasta obtener los tiempos de muerte entre 5 y 7 minutos. Si la mediana del tiempo de muerte con el extracto no diluido es mayor de 7 minutos, el dato puede ser utilizado para determinar la toxicidad de la muestra.

1.4.1 Cálculo de la concentración de PSP

($\mu\text{g}/100\text{g}$ de carne de molusco)

Determinar la UR/ml de extracto que corresponde a los tiempos de muerte observados de la tabla de corrección de pesos de ratones.

Calcular las URC, multiplicando las UR correspondientes al tiempo de muerte de cada ratón por el factor de corrección del peso obtenido en la tabla de corrección de pesos de ratones.

Usar la mediana de los URC/ml de los tres bioensayos para determinar μg de veneno/100g de carne de molusco, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\mu\text{g PSP}/100\text{g carne de molusco} = \text{Mediana URC}/\text{ml} \times \text{FC} \times \text{FD} \times 200$$

En donde:

FC = Factor de conversión

FD = Factor de dilución

Ejemplo: $PSP = 1,60 \times 0,20 \times 1 \times 200$

$$PSP = 64 \mu\text{g}/100\text{g}$$

Cualquier valor más grande que $80 \mu\text{g}/100\text{g}$, es considerado valor de riesgo y el molusco debe ser prohibido para consumo humano.

Tabla de corrección de pesos de ratones.

Peso del ratón(g) Unidades ratón

10	0.50
10.5	0.53
11	0.56
11.5	0.59
12	0.62
12.5	0.65
13	0.675
13.5	0.70
14	0.73
14.5	0.76
15	0.785
15.5	0.81
16	0.84
16.5	0.86
17	0.88
17.5	0.905
18	0.93
18.5	0.95

19	0.97
19.5	0.985
20	1.000
20.5	1.015
21	1.03
21.5	1.04
22	1.05
22.5	1.06
23	1.07

TABLA DE SOMMER'S.

Tiempo de muerte: relación unidades ratón para toxina paralizante de moluscos.
(ácida)

	Tiempo de Muerte*	Unidades Ratón	Tiempo de Muerte	Unidades Ratón
1:00	100	5:00	1.92	
10	66.2	05	1.89	
15	38.3	10	1.86	
20	26.4	15	1.83	
25	20.7	20	1.80	
30	16.5	30	1.74	
35	13.9	40	1.69	
40	11.9	45	1.67	
45	10.4	50	1.64	
50	9.33	6:00	1.60	

55	8.42	15	1.54
2:00	7.67	30	1.48
05	7.04	45	1.43
10	6.52	7:00	1.39
15	6.06	15	1.35
20	5.66	30	1.31
25	5.32	45	1.28
30	5.00	8:00	1.25
35	4.73	15	1.22
40	4.48	30	1.20
45	4.26	45	1.18
50	4.06	9:00	1.16
55	4.88	30	1.13
3:00	3.70	10:00	1.11
05	3.57	30	1.09
10	3.43	11:00	1.075
15	3.31	30	1.06
20	3.19	12:00	1.05
25	3.08	13	1.03
30	2.98	14	1.015
35	2.88	15	1.000
40	2.79	16	0.99
45	2.71	17	0.98
50	2.63	18	0.972
55	2.56	19	0.965

4:00	2.50	20	0.96
05	2.44	21	0.954
10	2.38	22	0.948
15	2.32	23	0.942
20	2.26	24	0.937
25	2.21	25	0.934
30	2.16	30	0.917
35	2.12	40	0.898
40	2.08	60	0.875
45	2.04		
50	2.00		
55	1.96		

2.22

*Minutos: segundos

2. Técnicas y Procedimientos para la Investigación de *Vibrio cholerae*

2.1 Material y equipo

Licuada y vasos de licuadora estériles.

Frascos de vidrio de boca ancha tipo tarro de 500 ml de capacidad con tapa de rosca.

Varilla de vidrio de 3mm de diámetro y 20cm de largo, con un doblez terminal en ángulo recto de 4cm.

Balanza granataria de 2000 g de capacidad y 0,2 g de sensibilidad.

Balanza analítica de 120 g de capacidad y 5 mg de sensibilidad.

Incubadoras de 39-40°C.

Baño de agua de $42 \pm 0,2^\circ\text{C}$ y $35-37^\circ\text{C}$.

Cucharas estériles u otros instrumentos apropiados para transferir muestras de alimentos.

Cajas Petri estériles de 15 x 100 mm de plástico.

Pipetas estériles de 1 ml con graduación de 0,01 ml, de 5 y 10 ml con graduación de 0,1 ml.

Asas bacteriológicas de 3 mm de diámetro de nicromel o platino.

Tubos de cultivo o de ensayo de 16 x 150 mm y 20 x 150 mm.

Tubos para bioquímicas o ensayo de 10 x 75 mm o 13 x 100 mm.

Tijeras y pinzas estériles.

Lámpara (para observar reacciones serológicas).

Mecheros.

Papel pH (rango 1-14) con un máximo de graduación de 0,4 unidades de pH por cambio de color.

Potenciómetro.

Bolsas de polietileno de 28 x 37 cm con tapa resellable.

Aparato de filtración y membranas de 0,45 micras.

2.2 Medios de cultivo

Agua Peptonada Alcalina (APW)

FORMULA

Peptona 10 g

Cloruro de sodio 10 g

Agua destilada 1 000 ml

Disolver los ingredientes. Ajustar el pH de tal forma que después de esterilizar éste sea de $8,5 \pm 0,2$. Esterilizar en autoclave 10 minutos a 121°C .

Agar Tiosulfato, Citrato, Sales Biliares y Sacarosa (TCBS)

FORMULA

Extracto de levadura	5 g
Proteosa peptona	10 g
Sacarosa	20 g
Tiosulfato de sodio.5H ₂ O	10 g
Citrato de sodio.2H ₂ O	10 g
Sales biliares	3 g
Bilis de buey	5 g
Cloruro de sodio	10 g
Citrato férrico	1 g
Azul de bromotimol	40 mg
Azul de timol	40 mg
Agar	15 g
Agua destilada	1 000 ml

Preparar en un matraz por lo menos tres veces más grande que el volumen requerido de medio. Adicionar los ingredientes en agua destilada tibia y calentar con agitación constante hasta ebullición e inmediatamente retirar del calor. No esterilizar. Enfriar a 50°C y colocar en cajas de Petri. Dejar secar las placas de 37-45°C antes de usar.

Agar modificado con Celobiosa, Polimixina B y Colistina (mCPC)

SOLUCION 1:

FORMULA

Peptona	10 g
Extracto de carne	5 g
Cloruro de sodio	20 g
Solución Stock de colorante 1 000	1 ml

Agar 15 g

Agua destilada 900 ml

Ajustar el pH a 7,6. Hierva hasta que se disuelva el agar.

Esterilizar por autoclave 15 minutos a 121°C. Enfríe de 48-55°C.

SOLUCION STOCK DE COLORANTES 1 000 X:

FORMULA

Azul de bromotimol 4 g

Rojo de cresol 4 g

Etanol al 95% 100 ml

Para obtener un color firme del medio usar una solución colorante stock en lugar de estar pesando repetidamente los colores en polvo. Disuelva el colorante en etanol hasta obtener una solución al 4% (peso/volumen). Agregue 1 ml de esta solución a cada litro de agar mCPC, la cual tendrá al final 40 mg de azul de bromotimol y 40 mg de rojo cresol por litro.

SOLUCION 2:

FORMULA

Celobiosa 10 g

Colistina 400 000 UI

Polimixina B 100 000 UI

Agua destilada 100 ml

Disuelva la celobiosa por calentamiento en agua destilada. Enfríe y agregue los antibióticos. Esterilice por filtración, agregue la solución 2 a la solución 1 mezcle y distribuya en cajas Petri.

Agar T1N1 (Agar Triptona y Sal)

FORMULA

Triptona o tripticasa	10 g
Cloruro de sodio	10 g
Agar	20 g
Agua destilada	1 000 ml

Suspenda los ingredientes y hierva hasta disolución del agar, si lo desea inclinado, distribuya en tubos. Esterilice en autoclave 15 minutos a 121°C. Deje solidificar los tubos inclinados, para placas enfríe el medio de 45-50°C y distribuya en cajas Petri estériles.

Agar Gelatina (GA)

FORMULA

Peptona	4 g
Extracto de levadura	1 g
Gelatina	15 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 000 ml

Suspenda los ingredientes y hierva hasta disolución de la gelatina y el agar, ajuste el pH a $7,2 \pm 0,2$. Esterilice en autoclave 15 minutos a 121°C. Enfríe de 45-50°C y distribuya en cajas Petri estériles.

Agar Gelatina con Sal (GS)

FORMULA

Preparar agar gelatina (GA), pero adicionando 30 g de cloruro de sodio por cada litro. Suspenda los ingredientes y hierva hasta disolver la gelatina y el agar. Ajuste el pH de $7,2 \pm 0,2$. Esterilice en autoclave 15 minutos a 121°C. Enfríe

de 45-50°C, coloque en cajas Petri. Si es necesario para inhibir la diseminación de *Vibrio* spp tal como *V. alginolyticus*, use de 25-30 g de agar por litro.

Caldo Glucosa de Hugh-Leifson

FORMULA

Peptona	2 g
Extracto de levadura	0,5 g
Cloruro de sodio	20 g
Dextrosa	10 g
Púrpura de bromocresol	0,015 g
Agar	3 g
Agua destilada	1 000 ml

Suspenda los ingredientes y hierva hasta disolver el agar. Ajuste el pH a $7,4 \pm 0,2$. Coloque en tubos y esterilice en autoclave 15 minutos a 121°C.

Medio Base de Descarboxilasa (Arginina, Lisina y Ornitina)

FORMULA

BASE

Peptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
Dextrosa (D-glucosa)	1 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agua destilada	1 000 ml

Para caldo de arginina, lisina y ornitina, adicione 5 g de L-aminoácido a 1

litro de base. Como control, use base sin suplemento (aminoácido). Para *Vibrio* spp halofílicos, adicionar 15 g de cloruro de sodio por litro. Ajuste el pH de tal manera que después de la esterilización sea de $6,5 \pm 0,2$. Distribuya en tubos y esterilice en autoclave 10 minutos a 121°C .

Caldo Triptona y Caldos Triptona Sal T1N0,T1N1,T1N3, T1N6,T1N8 y T1N10

FORMULA

Triptona o tripticasa	10 g
Cloruro de sodio	0,10,30,60,80 o 100 g
Agua destilada	1 000 ml

Disuelva los ingredientes en agua destilada, para T1N0 no agregue cloruro de sodio, para T1N1 use 10 g de cloruro de sodio (1% w/v concentración de cloruro de sodio); así respectivamente. Para T1N3 usar 30 g de NaCl por litro (3% w/v concentración de cloruro de sodio). Distribuya en tubos de tapón de rosca de 16 x 150 mm, tape los tubos. Esterilice en autoclave durante 15 minutos a 121°C . Ajuste el pH a $7,2 \pm 0,2$.

Caldo Soya Tripticasa (TSB)

FORMULA

Peptona de tripticasa (Triptona)	17 g
Peptona de fitona (Soytona)	3 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato dipotásico	2,5 g
Dextrosa	2,5 g
Agua destilada	1 000 ml

Suspenda los ingredientes en agua destilada y caliente hasta disolución. Distribuya 225 ml en matraces de 500 ml o tubos. Esterilice en autoclave durante 15 minutos a 121°C . El pH final debe ser de $7,2 \pm 0,2$.

Agar Soya Trypticase (TSA)

FORMULA

Peptona tripticasa (Tryptona)	15 g
Peptona de fitona (Soytona)	5 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 000 ml

Suspenda los ingredientes en agua destilada y hierva durante un minuto hasta disolución del agar. Para *Vibrio* spp halofílicos, agregar 15 g de cloruro de sodio. Distribuya dentro de tubos o matraces. Esterilice en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Deje solidificar los tubos inclinados o deje enfriar de 45-50°C y distribuya en cajas Petri. El pH final debe ser de $7,3 \pm 0,2$.

Agar de Hierro Kligler (KIA)

FORMULA

Peptona polipeptona	20 g
Lactosa	20 g
Dextrosa	1 g
Cloruro de sodio	5 g
Citrato férrico amoniacal	0,5 g
Tiosulfato de sodio	0,5 g
Rojo de fenol	0,025 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1 000 ml

Suspender los ingredientes y hervir hasta disolución del agar. Distribuir en tubos de tapón de rosca. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Dejar solidificar los tubos inclinados. Ajustar el pH de $7,4 \pm 0,2$.

Agar Arginina Glucosa Inclinado (AGS)

FORMULA

Peptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
Triptona	10 g
Cloruro de sodio	20 g
Glucosa	1 g
L-Arginina(hidrocloruro)	5 g
Citrato férrico amónico	0,5 g
Tiosulfato de sodio	0,3 g
Púrpura de bromocresol	0,2 g
Agar	13,5 g
Agua destilada	1 000 ml

Suspender los ingredientes en agua destilada, hervir hasta disolución del agar, y distribuir en cantidades de 5 ml a tubos de 13 x 100 mm. Ajustar el pH de 6,8 a 7,0. Esterilizar en autoclave de 10 a 12 minutos a 121°C. Deje solidificar el medio inclinado.

Agar Triple Azúcar y Hierro (TSI)

FORMULA

Polipeptona	20 g
Cloruro de sodio	5 g
Lactosa	10 g
Sacarosa	10 g
Glucosa	1 g

Sulfato ferroso amónico 0,2 g
Tiosulfato de sodio 0,2 g
Rojo de fenol 0,025 g
Agar 13 g
Agua destilada 1 000 ml

Disolver los ingredientes en agua destilada. Mezclar bien y calentar a ebullición, agitando ocasionalmente hasta completa disolución. Enfriar a 60°C y ajustar el pH de $7,3 \pm 0,1$.

Agar de Hierro y Lisina (LIA)

FORMULA

Peptona o gelisato 5,0 g
Extracto de levadura 3,0 g
Glucosa 1,0 g
L-Lisina 10,0 g
Citrato férrico amónico 0,5 g
Tiosulfato de sodio 0,04 g
Púrpura de bromocresol 0,02 g
Agar 15,0 g
Agua destilada 1 000 g

Disolver los ingredientes en el agua destilada y mezclar bien; calentar hasta ebullición con agitación frecuente hasta conseguir la disolución completa. Esterilizar en autoclave 12 minutos a 121°C. Enfriar de 50-60°C y ajustar el pH de $6,7 \pm 0,1$. Distribuir en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm. Los tubos se enfrían en posición inclinada, de tal modo que se obtengan columnas de medio de 3 cm y una parte inclinada de 2 cm.

Caldo Rojo de Metilo y Vogues Proskauer(RM-VP)

FORMULA

Peptona	7 g
Glucosa	5 g
Fosfato dipotásico	5 g
Agua destilada	1 000 ml

Disolver los ingredientes en 800 ml de agua tibia. Para *Vibrio* spp halofílicos, agregar 15 g más de cloruro de sodio (para una concentración final del 2%). Filtrar, enfriar a 20°C y diluir a 1 litro. Distribuya en tubos. Esterilizar en autoclaves durante 12 - 15 minutos a 121°C. Ajustar el pH de 6,9 +/- 0,2.

Medio para prueba de movilidad (semisólida)

FORMULA

Peptona	10 g
Extracto de carne	3 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	4 g
Agua destilada	1 000 ml

Calentar con agitación y hervir de 1 a 2 minutos hasta disolución del agar. Para *Vibrio* spp halofílicos agregar 15 g más de cloruro de sodio (para una concentración final del 2%). Distribuir en tubos con tapón de rosca. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C. Ajustar el pH de 7,4 ± 0,2.

2.2.1 Soluciones y reactivos

Prueba de rojo de metilo.

REACTIVO

FORMULA

Rojo de metilo	0,1 g
----------------	-------

Alcohol etílico 300 ml
Agua destilada 200 ml

Disolver el rojo de metilo en el alcohol y diluir con el agua destilada, para llevar a cabo la prueba, añadir 5 gotas de la solución a 5 ml del cultivo problema.

Resultados: Un color rojo demuestra un pH menor a 4,5 y la prueba es Positiva. Un color amarillo se reporta como prueba Negativa.

Prueba de Vogues-Proskauer.

Esta prueba es para comprobar la presencia del diacetilo.

REACTIVO

FORMULA

Alfa naftol 5 g
Alcohol etílico absoluto 100 ml

Añadir 0,6 ml de la solución de alfa naftol y 0,2 ml de una solución acuosa al 40% de KOH a 1 ml de cultivo.

Resultados: El desarrollo de una coloración roja en 15 minutos constituye una reacción Positiva.

Prueba de oxidasa.

REACTIVO

FORMULA

N,N,N,N-Tetrametil-p-Fenilendiamino 0,5 g
Agua destilada 100 ml

Conservar en frasco oscuro a 5-10°C. El reactivo se conserva durante 14 días.

Sembrar en un tubo de base de gelosa para sangre. Incubar 18 horas a 35°C. Agregar 0,3 ml de reactivo.

Resultado: La reacción positiva se observa por la producción de un color azul en un minuto.

Reacción de indol.

REACTIVO DE KOVAC

FORMULA

P-dimetilaminobenzaldehído 5.0 g

Alcohol amílico.o alcohol isoamílico 750 ml

Acido clorhídrico concentrado 25 ml

Disolver el p-dimetilaminobenzaldehído en el alcohol amílico y agregar el ácido clorhídrico lentamente, gota a gota y agitando. Debe conservarse en frasco ámbar con tapón esmerilado; el color del reactivo va del amarillo al café claro. Se debe conservar a 4°C.

2.3 Procedimiento:

Sembrar un tubo con 5 ml de caldo tripton. Incubar 48 horas a 35°C. Agregar de 0,2 a 0,3 ml del reactivo. El desarrollo de un color intenso constituye una prueba Positiva para indol.

Toma de muestra

La toma de muestra para análisis microbiológicos se deberá hacer en condiciones asépticas y en recipientes estériles.

2.4 Preparación de la muestra

Las muestras de moluscos bivalvos deberán analizarse en su composición básica de líquido y carne.

Para moluscos bivalvos desconchar de 10 a 12 piezas grandes, incluir el líquido. Verter 50 g en 450 ml de agua peptonada alcalina (APW), licue para homogeneizar durante 2 minutos a alta velocidad. Esta es la dilución 1:10. Colocar 250 g de esta dilución en un segundo recipiente estéril. Preparar dos series de diluciones 1:100 y 1:1000. En este momento deberá tener dos series de tres diluciones. Incubar una serie a 35-37°C y la otra a 42°C.

2.4.1 Resembrar

Después de la incubación, y sin agitar, transferir el inóculo de la película (crecimiento superficial) con un asa de 3-5 mm de diámetro a una placa por lo menos, de cada uno de los medios de cultivo selectivos: Agar con tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa (TCBS) o al agar modificado con celobiosa, polimixina B y colistina (mCPC), la polimixina inhibe al biotipo Clásico de *V. cholerae*. Incubar el agar TCBS durante 18 a 24 horas de 35-37°C y el agar mCPC durante 18 a 24 horas de 39-40°C.

2.5 Morfología colonial.

Examinar las placas a fin de determinar si se presentan las características coloniales que a continuación se describen, seleccionar por lo menos 3 colonias sospechosas de cada placa y aplicarlas con estría cruzada para aislar en agar T1N1 o en agar soya tripticasa con sal (al 2% de concentración de NaCl) e incubar durante 12-18 horas a 35-37°C. Es necesario hacer un cultivo en un medio no selectivo a fin de garantizar la pureza de las colonias, antes de las pruebas bioquímicas, se puede inocular a los agares gelatina (GA) y gelatina sal (GS) en el segundo día. Los resultados serán confiables si las placas de aislamiento muestran colonias puras.

a.- Agar TCBS. Las colonias de *V. cholerae* (El Tor y Clásico) son grandes, lisas, amarillas (positivas para la fermentación de la sacarosa) y ligeramente achatadas, con el centro opaco y los bordes translúcidos.

Nota: Las especies de vibrio no producen colonias pequeñas de color crema en agar TCBS. Las colonias de *V. mimicus*, que están estrechamente relacionadas con la especie anterior, son verdes (sacarosa negativas). La mayoría de las demás especies de vibrio crecen en agar TCBS y producen colonias amarillas y verdes.

b.- Agar mCPC. Las colonias de *V. cholerae* El Tor son púrpuras (negativas para la fermentación de la celobiosa). El *V. vulnificus* produce colonias amarillas achatadas, con el centro opaco y los bordes translúcidos. La mayoría de las demás especies de vibrio no crecen fácilmente en agar mCPC.

2.6 Diferenciación.

Diferenciación de los vibrios sospechosos de los microorganismos que no son vibrios.

a.- TSI, KIA y agar inclinado de Arginina y Glucosa (AGS). Inocular las colonias individuales en medios de cultivo TSI (Agar de Triple Azúcar y Hierro), KIA (Agar de Hierro Kliger) y AGS, picar y estriar en el agar inclinado. Incubar los tubos inoculados, con el tapón no muy apretado, durante 18 a 24 horas de 35-37°C. Se recomiendan estos medios porque las reacciones permiten efectuar una diferenciación presuntiva entre la mayoría de las especies de vibrio, *Aeromonas*, *Plesiomonas shigella* y otras bacterias.

b.- Caldo triptona al 3% de NaCl (T1N3).

Inocular las colonias en los caldos T1N0 y T1N3 e incubar durante 18 a 24 horas de 35-37°C. El *V. cholerae* y el *V. mimicus* crecerán en T1N0 y T1N3. Algunas especies de bacterias que no son vibrios y que presentan reacciones similares a las de *V. cholerae* en medios de TSI y LIA no crecen en T1N3. La mayoría de las especies vibrio spp, incluyen algunos *V. cholerae* No. 01, crecerán en T1N3 únicamente de la familia vibrionaceae crece solamente en T1N3.

Una alternativa consiste en usar agar gelatina (GA) y agar gelatina con 3% de

NaCl (GS) para determinar la tolerancia de los cultivos puros a la sal. Dividir las placas en ocho sectores, inocular una línea recta en el centro de un sector de las placas, tanto de GA como de GS con cada cultivo puro. Incubar durante 18 a 24 horas de 35-37°C. El *V. cholerae* y el *V. mimicus* crecerán. El vibrio spp halofílico crecerá en ambas placas, porque ellos no requieren de sal. Sólo en la placa con GS. Para leer la reacción de la gelatinasa sostener la placa sobre una superficie negra, observará un halo opaco alrededor de la colonia de los microorganismos gelatinasa positivos.

c.- Caldo glucosa de Hugh-Leifson.

Inocular colonias individuales en tubos duplicados con caldo de glucosa de Hugh-Leifson. Recubrir un tubo con una capa de aceite mineral estéril o vapor líquido (50% de petrolato y 50% de parafina) unos dos centímetros de grueso. Incubar ambos tubos durante 18 a 24 horas de 35-37°C. Las especies de *Vibrio* spp utilizan la glucosa tanto para la oxidación como para la fermentación. Las especies de *pseudomonas*, que comúnmente se aíslan del pescado y los mariscos con métodos de enriquecimiento que se usan para las especies de vibrio, utilizan la glucosa sólo para la oxidación.

d.- Prueba de oxidasa.

Realizar la prueba de oxidasa con cultivos puros de agar soya tripticasa (2% de NaCl) u otro medio que no contenga carbohidratos fermentables. Un método fácil consiste en colocar un círculo de papel filtro en una caja de Petri y humedecerlo con algunas gotas de reactivo de oxidasa. Con un palito aplicador de madera, un mondadientes o una asa de platino estéril, sacar un poco de cultivo de la placa y tocar el papel humedecido, si hay microorganismos oxidasa positivos, el papel se tornará púrpura oscura o azul en pocos segundos. Las especies patógenas de vibrio son oxidasa positivas (excepto el *V. metschnikovii*).

3. Identificación y confirmación de *V. cholerae* 01, *V. cholerae* NO 01 y *V. mimicus*.

a.- Leer los resultados de las prueba bioquímicas de TSI, KIA, AGS, T1N0 y T1N3 o GA y GS, y caldo glucosa de Hugh-Leifson.

b.- Hacer una tinción de Gram a un cultivo de 18 a 24 horas en caldo o agar.

Nota: Los cultivos puros que se someterán a las demás pruebas serológicas y bioquímicas para el *V. cholerae* son sacarosa positivos (amarillo) en agar TCBS y sacarosa negativos (verdes) en el caso de *V. mimicus* o son celobiosa negativos (verde-púrpura) en agar mCPC, crecen en caldo T1N0 o en placas con GA; presentan reacciones características en TSI, KIA y AGS. Son gelatina y oxidasa positivos, son bacilos curvos gram negativos y producen ácido a partir de la glucosa, tanto en la oxidación como en la fermentación, en el caldo de cultivo de Hugh-Leifson.

c.- Pruebas bioquímicas.

Las reacciones bioquímicas para identificación de *V. cholerae* y otras especies bacterianas afines figuran en el cuadro anexo. La fórmula para todos los medios bioquímicos deberá contener por lo menos un 2% de NaCl. En vez de medios convencionales se pueden usar tiras AP120E, con 2% de NaCl como diluyente. Para el *V. cholerae* se puede usar solución salina fisiológica (0,85% de NaCl) como diluyente.

d.- Prueba serológica de aglutinación.

Usar antisuero de diagnóstico del grupo 01 y del subgrupo Inaba (factores AC) y Ogawa (Factores AB) para el antígeno del serotipo 01. Usar cultivos de 16 a 24 horas producidos en TSA. Incluir cultivos positivos y negativos, y los controles salinos para cada antisuero usado. Seguir las instrucciones del antisuero. Como es posible que los antígenos de los antisueros estén relacionados entre sí, hay que realizar pruebas bioquímicas para confirmar que el cultivo puro sea de *V. cholerae* 01 o No. 01.

Nota: Anticuerpos monoclonales están disponibles, pero el anti-B y anti-C reaccionan opuestamente con bacterias de otras especies. Uso de anticuerpos policlonales y/o monoclonales será para el antígeno del complejo 01

1.- Los cultivos que aglutinan con el antisuero del grupo 01, pero no en solución salina fisiológica simple, son de *V. cholerae* del grupo 01 si las reacciones bioquímicas confirman que el cultivo puro es de *V. cholerae*. Los cultivos que se aglutinan con este antisuero para grupos específicos pueden ser clasificados según el subtipo con anticuerpos Inaba y Ogawa.

- Los cultivos que aglutinan con el suero polivalente (grupo 01) y con los antisueros Inaba y Ogawa, tienen los 3 factores (A, B y C) y son del serotipo Hikojima.

- Los cultivos que aglutinan con el antisuero polivalente, pero no aglutinan con antisueros Inaba y Ogawa, no se pueden tipificar con estos antisueros.

2.- Los cultivos de *V. cholerae* cuya identidad se haya confirmado con métodos bioquímicos y que no aglutinen con el antisuero del grupo 01 son *V. cholerae* 0:1. El suero para la clasificación de *V. cholerae* No 0:1 según el tipo se puede obtener de R.J. Siebeling.

3.- Los cultivos que se aglutinan en el antisuero del grupo 01 y en solución salina, no se pueden clasificar según el tipo. Sin embargo, si se usa un medio más rico, como en TSA o agar infusión cerebro corazón (BHI), se puede eliminar esta autoaglutinación.

e. Características mínimas para la identificación de *V. cholerae*.

Las características que permiten suponer la presencia de *V. cholerae* como mínimo son las siguientes:

1.- Morfología.

Bacilo o bacilo encorvado, esporogénico y gram negativo.

2.- Aspecto en TSI.

Estría ácido, picadura ácido, gas negativo y H₂S negativo.

3.- Prueba de Hugh-Leifson.

Fermentación de la glucosa y oxidación positiva.

4.- Citocromo-oxidasa positivo.

5.- Prueba de la dihidrolasa arginina: negativo.

6.- Prueba de la lisinadescarboxilasa: positivo.

7.- Prueba de VP: Positivo El Tor, negativo Clásico y V. mimicus.

8.- Crecimiento a 42°C: positivo.

9.- Prueba de halofilia con NaCl.

0%: positivo, 3%: positivo, 6%: usualmente negativo. Algunas cepas de V. cholerae NO 01 se desarrollan a 0% de NaCl.

10.- Fermentación de la sacarosa: positivo para V. cholerae (negativo para V. mimicus).

11.- Prueba de ONPG: positivo.

12.- Fermentación de la arabinosa: negativo.

13.- O/129 sensitiva: sensible para 10 y 150 µg O/129

REACCIONES DE ALGUNOS Vibrio EN AGAR KIA, TSI Y AGS.

Micro

organismos	KIA		TSI		AGS	
	Estría	Picadura	Estría	Picadura	Estría	Picadura
V.cholerae	K	A	A(K)*	A	K	a

V.mimicus	K	A	K(A)*	A	K	A
V.parahe-molyticus		K	A	K	A	K A
V.algino lyticus		K	A	A	A	K A
V.vulnificus		K o A	A	K(A)*	A	K A
V.hidrophyla		K o A	A	K o A	A	K K
V.shigelloides		K o A	A	K o A	A	N N

* = Raramente

K = Alcalino

A = Acido

a = Ligeramente ácido

N = Neutro

Ninguna de las especies de vibrio enumeradas produce sulfuro de hidrógeno en medios KIA, TSI o AGS, ni una cantidad perceptible de gas a partir de glucosa en medios KIA, TSI o AGS. Algunas especies de Aeromonas pueden producir gas a partir de glucosa en estos medios.

3. Método de Determinación de Acido Domoico

3.1 Material y reactivos:

- Tubos de centrífuga
- Agua destilada
- Membranas
- Triptófano
- Metanol

3.2 Preparación de la muestra:

3.2.1 Pesar 5 g de la muestra dentro del tubo de la centrífuga.

3.2.2 Agregar 5 ml de agua destilada y mezclar.

3.2.3 Agregar 10 ml de metanol y mezclar. Ajustar el volumen a 20 ml con

metanol de ser necesario.

3.2.4 Centrifugar a 3,000 rpm aproximadamente por 5 minutos.

3.2.5 Diluir 1 ml del sedimento en 25 ml de agua destilada. Las alícuotas y diluciones pueden ser ajustadas por debajo de los niveles de ácido domoico. Se ha encontrado que esta dilución puede establecerse a una cantidad de 1 mg/kg de ácido domoico aproximadamente.

3.2.6 Filtrar en una membrana la muestra y analizarla por HPLC, de acuerdo a los requisitos del método del AOAC (suplemento 2,991.26)

3.2.7 De acuerdo al HPLC, se inyectará a la mezcla ácido domoico y triptófano (en proporción de 1:10 µg/ml respectivamente), observando la separación adecuada entre estos dos componentes.

La inadecuada separación entre estas sustancias significa resultados positivos falsos de ácido domoico.