

ORGANO EJECUTIVO

MINISTERIO DE ECONOMÍA RAMO DE ECONOMIA

ACUERDO No. 836.-

San Salvador, 29 de septiembre de 2000.

EL ORGANO EJECUTIVO EN EL RAMO DE ECONOMIA,

Vista la solicitud presentada por el Ingeniero **CARLOS ROBERTO OCHOA CORDOVA**, Director Ejecutivo del **CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA, CONACYT**, relativa a que se apruebe la Norma Salvadoreña Recomendada: **CODIGO DE PRACTICAS DE HIGIENE PARA PRODUCTOS DE HUEVO NSR 67.00.251:99**; y

CONSIDERANDO:

Que la Junta Directiva de la citada Institución, ha aprobado la Norma antes relacionada, mediante el Punto Número CUATRO, del Acta Número DOSCIENTOS SETENTA Y CUATRO, de la Sesión celebrada el quince de diciembre de mil novecientos noventa y nueve.

POR TANTO:

De conformidad al Artículo 36 Inciso tercero de la Ley del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología,

ACUERDA:

1°.- **APRUEBASE** la Norma Salvadoreña Recomendada: **CODIGO DE PRACTICAS DE HIGIENE PARA PRODUCTOS DE HUEVO NSR 67.00.251:99**. De acuerdo a los siguientes términos:

**NORMA
SALVADOREÑA
CONACYT**

CODEX CAC/RCP 15-1976

CODIGO DE PRACTICAS DE HIGIENE PARA PRODUCTOS DE HUEVO

CORRESPONDENCIA: Esta Norma es una adopción del CAC/RCP 15-1976, del Codex Alimentarius.

ICS 67.120.20

NSR 67.00.251:99

Editada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, Colonia Médica, Avenida Dr. Emilio Alvarez, Pasaje Dr. Guillermo Rodríguez Pacas, # 51, San Salvador, El Salvador, Centro América.

Tel: 226-2800, 225-6222; Fax.: 225-6255; e-mail: info@ns.conacyt.gob.sv.

Derechos Reservados.

CODIGO DE PRACTICAS DE HIGIENE PARA PRODUCTOS DE HUEVO**1. CAMPO DE APLICACION**

Este Código de Prácticas tiene por objeto:

1. Evitar el deterioro de la calidad de los huevos en cáscara destinados a su transformación en productos de huevo.
2. Proporcionar orientación sobre la producción, almacenamiento, envasado y transporte en condiciones higiénicas de huevos enteros, albúmina de huevo, yema de huevo y otros productos constituidos total o principalmente de uno o más de los constituyentes del huevo, destinados al consumo humano.
3. Proporcionar orientación sobre las prácticas higiénicas relativas a locales y equipo empleados y al personal que participa en la producción de estos productos de huevo.

A menos que se indique expresamente otra cosa, la palabra “huevo” en este código se refiere a huevos de gallinas domésticas, destinados a la elaboración como mencionado arriba. Sin embargo, los principios de este Código pueden aplicarse igualmente a huevos de otras aves domésticas.

2. DEFINICIONES

Aprobado significa aprobado por el organismo oficial que tenga jurisdicción en estas cuestiones.

Huevo significa huevos (con cáscara) de gallinas domésticas.

Productos de huevo el contenido de los huevos, como huevo entero o sólo la yema o sólo la albúmina de huevo o una mezcla de yema y albúmina en forma líquida, congelada o desecada, solos o mezclados con otros alimentos o bebidas en una proporción mínima del 50% de producto de huevo.

3. REQUISITOS DE LA MATERIA PRIMA**3.1 CONDICIONES HIGIENICAS AMBIENTALES EN LAS ZONAS DE PRODUCCION****3.1.1 Evacuación sanitaria de las aguas residuales de origen humano y animal**

Deberán tomarse las precauciones adecuadas para asegurarse de que las aguas residuales de origen humano y animal se eliminen de tal modo que no constituyan un peligro para la higiene ni la salud pública, y deberá ponerse especial cuidado en proteger los huevos contra la contaminación por estos desechos, especialmente aquellos huevos que puedan ser consumidos sin que se sometan a tratamiento térmico.

3.1.2 Control de enfermedades y plagas vegetales y animales

El tratamiento con agentes químicos, biológicos o físicos deberá hacerse únicamente de acuerdo con las recomendaciones del organismo oficial que tenga jurisdicción con o bajo la supervisión directa de personal que conozca perfectamente los peligros implicados, incluso los de la posibilidad de que el producto retenga residuos tóxicos.

3.2 PRODUCCION, ALMACENAMIENTO Y RECOGIDA DE HUEVOS EN LA GRANJA**3.2.1 Estado sanitario de las aves de la granja**

Deberán emplearse únicamente los huevos de aves sanas en la producción de productos de huevo para consumo humano.

3.2.2 Equipo y recipientes para el producto

El equipo y los recipientes que se empleen para envasar los huevos no deberán entrañar ningún peligro para la salud. Los envases que se utilicen de nuevo deberán ser de material y construcción tales que faciliten su limpieza completa, y deberán mantenerse en todo momento limpios y en condiciones que no constituyan una fuente de contaminación para el producto.

3.2.3 Técnicas sanitarias

Los huevos deberán recogerse con la frecuencia que exijan las condiciones climáticas. Se ha considerado satisfactoria la recogida dos veces al día. Los huevos deberán manipularse lo menos posible. Especialmente, deberá evitarse la manipulación brusca.

Durante toda la manipulación y almacenamiento, es esencial que se adopten medidas para evitar:

La contaminación de la cáscara con suciedad, materiales de cama o por animales, insectos, parásitos, pájaros, contaminantes químicos o microbiológicos u otras sustancias objetables.

La exposición a temperaturas desfavorables.

Limpieza

Los huevos no deben limpiarse en la granja. Si, excepcionalmente, se limpian en la granja, esto deberá hacerse únicamente con la aprobación del Organismo oficial que tenga jurisdicción, el cual deberá dar su visto bueno en cuanto al método de limpieza empleado, incluidas las condiciones de tiempo/temperatura de todas las operaciones de lavado y los detergentes/desinfectantes que se empleen.

3.2.4 Eliminación de materiales evidentemente inadecuados

Los huevos no aptos para el consumo deberán separarse, en la mayor proporción que sea practicable, durante la recolección, y eliminarse en lugar y manera tales que se evite la contaminación de otros huevos o suministros de agua.

3.2.5 Almacenamiento en la granja

Los huevos deberán guardarse en un recinto frío al que deben llevarse inmediatamente después de la recolección. No deben amontonarse o empaquetarse en cajas hasta que estén fríos, y el recinto debe mantenerse libre de sustancias de olor fuerte y de malos olores. Los huevos deben guardarse a temperatura y humedad relativa tales que minimicen el deterioro teniendo en cuenta las condiciones climáticas locales. Se ha encontrado que son satisfactorias temperaturas de 8°C- 15°C (46°F- 59°F) y humedades relativas del 70%-85%.

Los huevos con cáscara delgada o con grietas capilares deberán manipularse cuidadosamente y empaquetarse en un recipiente separado para evitar que se rompan antes de la entrega a la planta de rotura.

3.3. MANIPULACION DE HUEVOS AGRIETADOS CON CASCARA EN LA GRANJA

3.3.1 Los huevos con cáscara delgada o grietas capilares o huevos agrietados con las membranas de la cáscara intactas deberán manipularse cuidadosamente y envasarse en recipientes separados para evitar la rotura antes de la entrega a la planta encargada de romperlos.

3.3.2 Si existe el riesgo de que este tipo de huevos se rompa durante su transporte a las plantas de rotura, deberá aplicarse el procedimiento siguiente:

3.3.3 Sólo los huevos con grietas capilares, y limpios (no lavados), o huevos agrietados limpios (no lavados) con las membranas de la cáscara intactas, podrán romperse en la granja.

3.3.4 Este procedimiento deberá ajustarse a lo estipulado en la Sección 4, subsección 4.4.4.1.

3.3.5 Los productos de huevo recogidos en la granja no podrán ser colados ni sometidos a separación de la yema y de la albúmina.

3.3.6 Dicho producto de huevo deberá recogerse en recipientes limpios y, si es necesario, desinfectados, dotados de cierres apropiados, y deberá refrigerarse de conformidad con lo dispuesto en la subsección 4.4.4.4. de la Sección 4. Este procedimiento deberá efectuarse, de ser posible, en un local aparte. El local que se utilice para esta operación deberá ajustarse a los requisitos establecidos en la subsección 4.1.1.

3.3.7 Deberán adoptarse todas las medidas necesarias para proteger el producto de la contaminación.

3.3.8 Los productos de huevo deberán recogerse y transportarse lo antes posible de la granja donde se han producido sólo a la planta de productos de huevo, a una temperatura de transporte entre 0 y 5°C.

3.4 MANIPULACION DE HUEVOS AGRIETADOS CON CASCARA EN LA PLANTA DE ENVASADO

Deberán seguirse los mismos procedimientos prescritos en las subsecciones 3.3.2 a 3.3.8.

3.5 TRANSPORTE**3.5.1 Medios de transporte**

Los vehículos que se utilicen para el transporte de huevos deberán ser convenientes para la finalidad a que se destinan y de un material y construcción tales que permitan una limpieza completa, debiendo limpiarse y mantenerse de modo que no constituyan una fuente de contaminación para los huevos.

3.5.2 Procedimientos de manipulación

Todos los procedimientos de manipulación que se utilicen deberán ser de tal naturaleza que impidan la contaminación de los huevos. Los huevos deberán recogerse de los locales del productor y llevarse a la planta de temperatura tal que se minimice el deterioro teniendo en cuenta las condiciones locales.

4. REQUISITOS DE LA PLANTA, LAS INSTALACIONES Y LAS OPERACIONES**4.1 PLANO Y CONSTRUCCION DE LA PLANTA****4.1.1 Emplazamiento, dimensiones y condiciones sanitarias**

El edificio y la zona circundante deberán ser de tal naturaleza que puedan mantenerse razonablemente exentos de olores desagradables, humo, polvo u otros elementos contaminantes; deberán ser de dimensiones suficientes para los fines que se persiguen sin que haya aglomeración de personal ni de equipo;

deberán ser de construcción sólida y mantenerse en buen estado; deberán ser de un tipo de construcción que impida que entren o aniden insectos, pájaros o parásitos; y deberán estar proyectados de tal modo que puedan limpiarse convenientemente y con facilidad.

La construcción y plano de los locales de elaboración habrán de ser tales que aseguren un flujo regulado del proceso, desde la llegada de los huevos a los locales hasta el producto terminado, y habrán de procurar las condiciones correctas de temperatura en todas las fases del proceso.

4.1.2 Instalaciones y controles sanitarios**4.1.2.1 Separación de las operaciones**

Las partes donde hayan de recibirse o almacenarse los huevos y otras materias primas deberán estar separadas de las destinadas a la preparación o el empaquetado del producto final, de modo que se excluya la contaminación del producto acabado. Los recintos y compartimientos destinados al almacenamiento, fabricación o manipulación de productos comestibles deberán estar separados y ser diferentes de los destinados a materias no comestibles. La parte destinada a la manipulación de alimentos deberá estar completamente separada de toda parte habitada del edificio. Deberán procurarse salas separadas para el desempaquetado y lavado de los huevos y para el almacenamiento del producto terminado. El examen al trasluz, la rotura, la pasterización y llenado deberán estar separados de modo que haya protección contra la contaminación cruzada.

4.1.2.2 Suministros de agua

Deberá disponerse de un abundante suministro de agua fría y, cuando sea necesario, de un suministro adecuado de agua caliente. El agua habrá de ser de calidad potable. Las Normas de potabilidad no deberán ser inferiores a las estipuladas en la última edición de las "Normas Internacionales para el Agua Potable", de la Organización Mundial de la Salud.

4.1.2.3 Hielo

El hielo deberá hacerse con agua de calidad potable y habrá de fabricarse, manipularse, almacenarse y utilizarse de modo que esté protegido contra la contaminación.

4.1.2.4 Suministro auxiliar de agua

Quando se utilice agua que no sea potable- como por ejemplo, para combatir incendios- el agua deberá transportarse por tuberías completamente separadas, a ser posible identificadas con colores, y sin que haya ninguna conexión transversal ni sifonado de retorno con las tuberías que conducen al agua potable.

4.1.2.5 Instalación de cañerías y eliminación de aguas residuales

Toda la instalación de la cañerías y las tuberías de eliminación de las aguas residuales (incluidos los sistemas de alcantarillado) deberán ser suficientemente grandes para soportar cargas máximas. Todas las conexiones deberán ser estancas y disponer de trampas y respiraderos adecuados. La eliminación de aguas residuales se efectuará de tal modo que no pueda contaminarse el suministro de agua potable. La instalación de cañerías y la forma de eliminación de las aguas residuales deberán ser aprobadas por el organismo oficial competente.

Los sistemas de drenaje que incluyen trampas de materia sólida deberán estar diseñados de modo que permitan el vaciado. Cuando estén situados dentro o inmediatamente fuera de la planta, las trampas de materia sólida deberán vaciarse y limpiarse según sea necesario y de acuerdo con los requisitos del organismo oficial competente.

4.1.2.6 Iluminación

Los locales deberán estar bien iluminados. Las bombillas y lámparas colgadas sobre los alimentos, en cualquiera de las fases de fabricación, deberán ser del tipo de seguridad, o estar protegidas de cualquier otra forma, para impedir la contaminación de los alimentos en el caso de su rotura. La iluminación de cualquier parte de la sala de trabajo deberá tener no menos de 325 unidades lux (30 bujías pie) y los puntos donde sea necesario examinar de cerca el producto deberán estar iluminados con una intensidad no menor de 540 unidades lux (50 bujías pie). Los filamentos reflectores deberán estar diseñados de forma que puedan desmontarse, limpiarse y montarse nuevamente con facilidad.

4.1.2.7 Ventilación

Los locales deberán estar bien ventilados. Deberá prestarse especial atención a la ventilación de lugares y equipo donde se producen calor excesivo, vapor de agua, humos o vapores nocivos, o aerosoles contaminantes. Es importante disponer de buena ventilación para impedir tanto la condensación (con el posible goteo de agua sobre el producto) como el desarrollo de mohos en la estructuras altas, ya que estos mohos pueden caer sobre los alimentos. La ventilación debe estar planeada para permitir cambio suficientes de aire y para asegurar que la dirección de la corriente de aire nunca vaya de zona sucia a la limpia.

4.1.2.8 Retretes y servicios

Deberán instalarse retretes suficientes y adecuados y las zonas dedicadas a estos servicios deberán estar provistas de puertas que se cierren automáticamente. Los retretes deberán estar bien iluminados y ventilados, y no deberán dar directamente a la zona donde se manipulen los alimentos. Deberán mantenerse en perfectas condiciones higiénicas en todo momento. Dentro de la zona dedicada a retretes y sala de aseo, deberá haber servicios para lavarse las manos, y deberán ponerse rótulos en los que se requiera al personal que se lave las manos después de usar los servicios.

4.1.2.9 Instalaciones para lavarse las manos

Los empleados deberán disponer de instalaciones suficientes y adecuadas para lavarse y secarse las manos siempre que así lo exija la naturaleza de las operaciones en las que intervienen. Estas instalaciones deberán ser perfectamente visibles desde la planta de elaboración. Siempre que sea posible, se recomienda que se empleen toallas de uso personal, que se desechen después de usadas, pero, de todos modos, el método que se haya adoptado para secarse las manos deberá estar aprobado por el organismo oficial competente. Los servicios e instalaciones deberán mantenerse en todo momento en perfectas condiciones higiénicas.

4.2 EQUIPO Y UTENSILIOS**4.2.1 Materiales**

Todas las superficies que hayan de estar en contacto con los alimentos deberán ser lisas, exentas de picaduras, grietas y costras sueltas; no tóxicas, inatacables por los productos alimenticios, capaces de resistir lavados corrientes repetidos, y no absorbentes, a menos que la naturaleza de un proceso particular, y aceptable desde otros puntos de vista, exija emplear una superficie, por ejemplo, de madera.

4.2.2 Diseño, construcción e instalación higiénicos

El equipo y los utensilios deberán estar diseñados y contruidos de modo que eviten peligros higiénicos y permitan una limpieza fácil y completa. El equipo fijo deberá instalarse de tal modo que pueda limpiarse fácil y completamente.

No deberá emplearse equipo de madera en las salas de rotura, pasteurización o llenado.

Todas las bombas, tuberías, vajillas y superficies de contacto habrán de ser de acero inoxidable o de otro material aprobado.

Los huevos con cáscara que pasan a la sala de rotura deberán transportarse en recipientes contruídos de acero inoxidable, aluminio, material plástico aprobado o en bandejas de uso único. Las mesas de rotura deberán estar contruídas de acero inoxidable, aluminio o material plástico. En cuanto sea posible, los materiales plásticos utilizados para estos fines habrán de estar libres de grietas y arañazos y deberán ser capaces de resistir las operaciones corrientes de lavado y desinfección.

Las máquinas y recipientes para huevos líquidos deberán ser de acero inoxidable o de otro material adecuado y estar contruídos de tal manera que permitan eliminar fácilmente del suministro de huevo líquido todos los contenidos del huevo inadecuados para la posterior elaboración.

Todo dispositivo que haya de emplearse para la separación de la yema y la clara del huevo deberá haber sido aprobado en cuanto a las condiciones higiénicas de su diseño y construcción.

El equipo y los utensilios empleados para materias contaminadas o no comestibles deberán estar marcados de forma que se reconozca su finalidad, y no deberán emplearse para manipular productos comestibles.

4.3 REQUISITOS HIGIENICOS DE LAS OPERACIONES

4.3.1 Mantenimiento de la instalación, equipo y edificios en condiciones higiénicas

El edificio, el equipo y los utensilios y todos los demás accesorios de la instalación deberán mantenerse en buen estado de funcionamiento y limpios, en forma ordenada y en buenas condiciones sanitarias. En los lugares de trabajo y mientras esté funcionando la instalación deberán eliminarse frecuentemente los materiales de desecho y deberán proveerse recipientes adecuados para verter las basuras. Los detergentes y desinfectantes empleados deberán ser adecuados para los fines a que se destinan, y deberán utilizarse de tal forma que no constituyan ningún riesgo para la salud pública.

Todo el equipo debe limpiarse y desinfectarse en todas las pausas principales de los períodos de trabajo, siempre que sea necesario eliminar la contaminación, y al final de la jornada de trabajo.

También la desinfección debe realizarse ante de comenzar las tareas diarias. No debe dejarse que quede condensado de vapor en ninguna parte del equipo. Entre la desinfección y los períodos de trabajo, el equipo debe manejarse lo menos posible.

Cuando el proceso se pare durante unos 30 minutos o más, deben limpiarse y desinfectarse todo el equipo de rotura manual y las partes fácilmente desmontables de las máquinas de rotura. Al mismo tiempo, las superficies de las mesas de rotura deben limpiarse y regarse con abundante agua caliente y limpia.

Cuando se realiza la limpieza in situ y la inspección al final del día indica que esta limpieza ha sido defectuosa, debe desmontarse el equipo y limpiarse.

La operación final de limpieza y desinfección deberá ser un enjuagado a fondo con agua caliente limpia.

4.3.2 Evacuación de materiales de desecho

Los materiales de desecho, tales como cáscaras vacías y huevos rechazados, deben almacenarse de modo que no causen perjuicios por olores desagradables, insectos, pájaros o bichos. Deben retirarse periódica y frecuentemente y, por lo menos, al final del día, de las salas de elaboración, bien sea por medio de recipientes adecuados, correas transportadoras o artesas de agua. Además, deben retirarse diariamente de los locales. Inmediatamente después del vaciado, los recipientes y el equipo empleados para almacenamiento y recogida del material de desecho deberán limpiarse y desinfectarse, así como también deberá hacerse con las zonas pavimentadas para el almacenamiento de dichos recipientes.

4.3.3 Lucha contra los parásitos

Deberán adoptarse medidas eficaces para evitar que entren y aniden en los edificios insectos, roedores, pájaros y otros parásitos.

4.3.4 Prohibición de animales domésticos

Deberá prohibirse terminantemente la entrada de perros, gatos y otros animales domésticos en la zona donde se elaboran o almacenan los alimentos.

4.3.5 Salud del personal

La dirección de la fábrica deberá notificar al personal que todo empleado que padezca heridas infectadas, tenga llagas o cualquier enfermedad, especialmente diarrea, deberá comunicarlo inmediatamente a la dirección. Esta tomará las medidas necesarias para garantizar que no se permita trabajar a ninguna persona mientras se sepa que padece alguna enfermedad transmisible por los alimentos, o que se sepa que es un vector de dichos microorganismos patógenos, o mientras tenga heridas o llagas infectadas o cualquier enfermedad, en ningún departamento de una fábrica de alimentos, en que haya la probabilidad de que dicha persona pueda contaminar con organismos patógenos los alimentos o las superficies que entren en contacto con dichos alimentos.

4.3.6 Sustancias tóxicas

Todos los rodenticidas, fumigantes, insecticidas u otras sustancias tóxicas deberán almacenarse en cámaras o depósitos cerrados con llave, y solo podrán ser manipulados por personal convenientemente capacitado para ese trabajo. Deberá utilizarlos solamente el personal que posea un pleno conocimiento de los peligros implícitos, incluyendo la posibilidad de contaminación del producto, o bajo su supervisión directa.

4.3.7 Higiene del personal y prácticas de manipulación de los alimentos

Todas las personas que trabajan en una fábrica de productos alimenticios deberán mantener una esmerada limpieza personal mientras estén de servicio. Sus ropas, incluyendo el tocado adecuado de cabeza, habrán de ser apropiadas para las tareas que realicen y mantenerse siempre limpias.

Deberán lavarse las manos tantas veces como sea necesario para cumplir con las prácticas higiénicas prescritas para las operaciones.

En las zonas donde se manipulen los alimentos estará prohibido escupir, comer, mascar chicle y el uso del tabaco.

Deberán tomarse todas las precauciones necesarias para evitar la contaminación de los productos alimenticios o sus ingredientes con cualquier sustancia extraña.

Las rozaduras y cortaduras de pequeña importancia en las manos deberán curarse y cubrirse convenientemente con un vendaje impermeable adecuado. Deberá haber un botiquín de urgencia para atender los casos de esta índole, con el fin de evitar la contaminación de los alimentos.

Los guantes que se empleen para manipular los alimentos se mantendrán en perfectas condiciones de limpieza e higiene y en buen estado. Estarán hechos de material impermeable, excepto en los casos en que su empleo sea inapropiado o incompatible con los trabajos que hayan de realizarse.

4.4 PRACTICAS OPERATIVAS Y REQUISITOS DE LA PRODUCCION

4.4.1 Huevos y otras materias primas

Criterios de aceptación

La fábrica no deberá aceptar huevos ni otras materias primas si se sabe que contienen sustancias tóxicas. Tampoco deberán aceptarse huevos ni otras materias primas que contengan materias descompuestas o extrañas que no puedan ser eliminadas o reducidas en medida aceptable con los procedimientos normales de clasificación o preparación empleados por la fábrica.

4.4.2 Almacenamiento y manipulación de los huevos con cáscara

Al ser recibidos en la planta, los huevos deberán elaborarse lo antes posible. Hasta tanto se elaboren, los huevos deberán guardarse en sus cajas en un recinto limpio y frío. Serán adecuadas las temperaturas y humedades relativas que se indican en la Sección 3.2.5. Las cajas deberán guardarse de tal modo que puedan limpiarse fácilmente por debajo. Los huevos deben sacarse de las cajas en un recinto que esté completamente separado de las salas de elaboración. Las cajas exteriores de huevos no deben llevarse a la sala de rotura.

4.4.3 Inspección y clasificación

Los huevos deben examinarse al trasluz antes de la rotura, bien sea en la planta o, si se prefiere, en cualquier lugar, dentro de un tiempo especificado aprobado por el organismo oficial competente. Los huevos sucios deben limpiarse antes de la rotura, empleando métodos aprobados por la autoridad oficial competente, incluidas las condiciones de tiempo/temperatura y cualquier detergente/desinfectante que se empleen.

Los huevos agrietados con las membranas de la cáscara intactas deben separarse en recipientes someros contruidos de materiales adecuados y deberán examinarse cuidadosamente por personal experimentado en la operación de rotura, antes de la elaboración.

Los huevos agrietados con las membranas de la cáscara rotas deberán tratarse como material de desecho, pero si la rotura ha tenido lugar en la planta durante el examen al trasluz o la manipulación, deben separarse en un recipiente adecuado usado únicamente para este fin. Dichos huevos deben someterse a elaboración sin demora alguna.

Los huevos deben examinarse al trasluz antes de pasar al sector de rotura. Cuando se emplea la rotura por aplastamiento, debe ponerse especial cuidado durante el examen al trasluz para eliminar los huevos defectuosos.

Para evitar una contaminación cruzada, los huevos que no sean de gallina deben separarse y manipularse y elaborarse aparte cuando se termine la elaboración de huevos de gallina de la jornada.

Todo el equipo debe limpiarse y esterilizarse antes de reanudar la elaboración de los huevos de gallina.

4.4.4 Preparación y elaboración

4.4.4.1 Rotura individualmente

Los huevos deben romperse, bien sea a mano, o bien a máquina, en copa o bandejas, y cada huevo debe inspeccionarse en cuanto a su aspecto y si es posible el olor.

La sustancia de huevo que tenga un olor o aspecto anormales debe rechazarse y eliminarse juntamente con cualquier equipo de rotura contaminado. Dicho equipo debe limpiarse y desinfectarse antes de volver a emplearse. Después de tocar el huevo rechazado, el encargado de la rotura debe lavarse inmediatamente las manos con jabón/detergente inodoro y agua caliente.

La separación de la yema y la clara de huevo debe hacerse de modo higiénico.

Deben seguirse prácticas higiénicas para la eliminación de fragmentos de cáscara, así como para las manchas de sangre y las manchas de carne, cuando se eliminen corrientemente.

Después de la rotura, podrá utilizarse una centrifugadora para separar los residuos de albúmina de huevo de las cáscaras de huevo, pero solamente de huevos que hayan sido lavados de acuerdo con el método descrito en la subsección 4.4.4.2.

4.4.4.2 Rotura por aplastamiento

La rotura por aplastamiento, cuando está autorizada por el organismo oficial que tenga jurisdicción, debe cumplir los siguientes requisitos mínimos:

Las máquinas de aplastamiento en gran cantidad usadas para romper huevos para la preparación del producto de huevo entero deben ser de un tipo adecuado y construidas y operadas de tal modo que impidan la entrada de los huevos no aptos para el consumo en el producto líquido de huevo. No deberán utilizarse los huevos que hayan sido lavados antes de llegar a la planta de rotura. Los huevos deberán elaborarse dentro de las 24 horas de haber sido examinados al trasluz, con la salvedad de que, cuando los huevos se mantengan bajo condiciones de temperatura controlada de modo que se retarde la alteración y el crecimiento de microorganismos, podrán mantenerse durante un período que no exceda de 72 horas sin nuevo examen al trasluz.

Los huevos deben transportarse sobre rodillos de acero inoxidable o de otro material apropiado a través de un baño de agua caliente mantenido a una temperatura mínima de 60°C (140°F), enjuagarse bajo rociados de agua caliente a una temperatura mínima de 80°C (177°F) y secarse después con aire antes de ser lanzados sobre una correa transportadora, construida de material adecuado, a la sección de aplastado.

Los huevos deben aplastarse para separar su contenido, después de lo cual deben eliminarse todos los fragmentos de cáscara de la correa transportadora. A la terminación del trabajo de cada día deben limpiarse las máquinas, restregarse con un desinfectante adecuado y enjuagarse y aclararse con agua caliente limpia.

4.4.4.3 Filtración y recogida

El huevo líquido debe filtrarse, bien sea por filtros adecuados o bien centrifugas u otro equipo apropiado. Si se emplean filtros, debe disponerse de varios filtros de acero inoxidable o monel, desinfectados y limpios, o de filtros de otro tipo, para poder cambiarlos con frecuencia. Si es necesario, debe emplearse un recipiente de acero inoxidable desinfectado y limpio u otro recipiente adecuado para recoger el huevo líquido cuando se están cambiando los filtros. Este huevo líquido sin filtrar debe devolverse inmediatamente para filtrarlo.

4.4.4.4 Enfriamiento

Cuando la rotura no va seguida inmediatamente de la pasteurización, los productos de huevo líquido deben enfriarse rápidamente en un equipo capaz de reducir la temperatura del producto a 7°C(45°F).

Si el producto ha de guardarse antes de la pasteurización, el almacenamiento debe hacerse en tanques convenientemente aislados durante un período que preferiblemente no debe pasar de 24 horas y no debe exceder nunca de 48 horas. La yema de huevo líquida puede conservarse a una temperatura que no pase de 10°C (50°F) si el almacenamiento no ha de durar más de 8 horas.

Se han de guardar los productos de huevo líquidos más de 48 horas, se guardarán a temperaturas inferiores a 0°C (32°F).

4.4.4.5 Pasterización

Los productos de huevo líquidos deben preferiblemente pasteurizarse como parte de un proceso continuo.

Los productos de huevo que se reciban de las granjas o las plantas de envasado deberán someterse a pasteurización.

Todos los productos de huevo deben someterse a un tratamiento aprobado por el organismo oficial competente como tratamiento que destruirá las salmonellas.

El huevo entero líquido crudo se pasteurizará por un procedimiento aprobado de calentamiento a una temperatura suficientemente elevada y durante un tiempo suficientemente prolongado para asegurar la destrucción de salmonellas, por ejemplo, a una temperatura de 64°C (148°F) durante 2 minutos y medio por lo menos, o por otro tratamiento aprobado que dé los mismos resultados.

La pasteurización de albúmina líquida, y tal vez la de la yema líquida, requerirán combinaciones diferentes de tiempo/temperatura.

Una vez terminada la pasteurización, todos los productos líquidos deben enfriarse inmediatamente a una temperatura que no pase de 7°C (45°F).

El aparato pasteurizador de placa deberá incluir los dispositivos que sean necesarios para asegurar una velocidad constante de flujo de huevo líquido, el control termostático de calentamiento del huevo líquido y el apartamiento automático del flujo de todo huevo líquido que no se haya calentado suficientemente. El aparato pasteurizador por lotes debe comprender controles termostáticos y también un mecanismo de agitación para mezclar el huevo líquido que debe pasteurizarse a fin de asegurar la uniformidad de la temperatura.

Debe hacerse un registro continuo de cada serie de pasteurización, y deben fecharse y mantenerse a disposición de los inspectores, por lo menos durante un año, gráficos en los que se indiquen las temperaturas y los tiempos de pasteurización.

Los productos desecados de huevo, elaborados a partir de huevo líquido, que no se hayan pasteurizado de antemano, deben someterse a un proceso de tratamiento térmico aprobado, por ejemplo, el proceso de cámara caliente, en la forma seca y preferiblemente en el recipiente, para destruir las salmonellas.

Los diversos productos deben estar protegidos contra la contaminación en todas las fases después de la pasteurización.

4.4.4.6 Almacenamiento

El huevo líquido pasteurizado puede conservarse en tanques desinfectados, aislados y cubiertos, provistos de un agitador de baja velocidad y un termómetro, o en batidoras desinfectadas, a condición de que la temperatura del huevo no exceda de 5°C (41°F) durante el período de conservación.

Los productos que están suficientemente preservados para evitar el deterioro, por ejemplo, por salado o por azucarado, no necesitan ser enfriados.

4.4.4.7 Secado

La eliminación de la glucosa deberá realizarse, cuando sea aplicable, ante de la pasteurización por un método aprobado.

El secado debe realizarse por un procedimiento aprobado. La planta de secado utilizada para el producto deberá incluir, cuando sea aplicable, un sistema de separación de ciclón, mejor que la separación de tipo de saco.

El producto deberá retirarse continuamente de la cámara de secado, enfriarse y envasarse lo antes posible en recipientes apropiados. Si no se ha eliminado la glucosa, el producto debe guardarse a una temperatura que no pase de 10°C (50°F).

4.4.5 Empaquetado, enfriamiento y congelación

Los recipientes vacíos deben guardarse en lugar seco limpio y mantenerse libres de polvo, bichos, insectos y toda clase de materias extrañas. No deberán transmitir al producto sustancias desagradables más allá de los límites aceptables por el organismo oficial competente, y deberán proporcionar al producto una protección adecuada contra la contaminación. Deberán ser inspeccionados inmediatamente antes del uso para asegurar que están limpios y en condiciones satisfactorias. Antes del llenado, los recipientes deben desinfectarse, cuando sea necesario, por medio de vapor, aire caliente, agua caliente, un desinfectante, o cualquier combinación de estos agentes, pero hay que escurrir bien el recipiente antes del llenado.

En la sala de llenado únicamente deben guardarse recipientes listos para su uso inmediato.

El llenado de recipientes debe ser un proceso continuo. Los recipientes llenados deben cerrarse inmediatamente y llevarse a la sala de enfriamiento o a la cámara de congelación sin demora excesiva. Debe ponerse cuidado durante el llenado para evitar las salpicaduras, y debe eliminarse todo exceso de huevo.

Los recipientes deben amontonarse en dichos recintos de forma que permitan la libre circulación de aire alrededor de los recipientes.

La congelación deberá efectuarse a velocidad suficiente para evitar el deterioro del producto y estar terminada dentro de las 24 horas después del llenado. El producto enfriado debe guardarse a una temperatura que no pase de 5°C (41°F). Una vez congelado, el producto debe guardarse a una temperatura que de protección suficiente al producto.

4.4.6 Transporte de productos de huevo líquidos en envases o embalajes voluminosos

Los tanques o recipientes empleados para el transporte de productos de huevo líquidos deberán ser de acero inoxidable o de otro material adecuado, y estar diseñados de modo que faciliten la limpieza y el drenaje adecuados. Deberán estar refrigerados o suficientemente aislados para mantener el producto de huevo a una temperatura de no más de 5°C (41°F) y, de preferencia, no deberán usarse para ningún otro fin.

Las tuberías y conexiones empleadas para el llenado y la descarga de productos de huevo líquidos habrán de ser de diseño adecuado, lo mismo que los materiales, y habrán de desinfectarse antes de volver a usarlos.

Los productos de huevo líquidos no deberán descargarse de un camión cisterna o recipiente móvil en una vasija que contenga productos de huevo líquidos de un suministro anterior.

Los recipientes cisterna y los recipientes móviles deberán desinfectarse lo antes posible después de vaciados y antes de volverlos a llenar. La última operación de limpieza y desinfección debe ser un enjuagado a fondo con agua caliente. Del compartimiento de un vehículo cisterna deberán entregarse productos de huevo líquidos a un punto únicamente.

4.4.7 Descongelación de productos de huevo congelados

Cuando se descongelen productos de huevo congelados, deberá hacerse que el producto alcance su estado líquido cuanto antes sin causar deterioro, pero procurando que la temperatura del producto suba lo menos posible por encima de 0°C (32°F).

Los productos de huevo descongelados deben emplearse inmediatamente.

4.4.8 Marcado de los recipientes

Todos los recipientes deberán marcarse de modo que se pueda identificar el lugar y la fecha de fabricación del producto.

4.5 PROGRAMA DE CONTROL SANITARIO

Es conveniente que cada industria, por su propio interés, designe una persona, cuyas obligaciones preferiblemente estén separadas de las operaciones de la producción y que asuma la responsabilidad de la limpieza de la fábrica. El personal a sus ordenes estará constituido por empleados permanentes de la organización, que estarán bien adiestrados en el manejo de las herramientas especiales de limpieza, en el montaje y desmontaje del equipo para su limpieza y que, además, esté consciente de la importancia de la contaminación y de los riesgos que esta lleva consigo. Las zonas críticas, el equipo y los materiales, serán objeto de atención especial como parte de un programa permanente de saneamiento.

4.6 PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE LABORATORIO

Pueden utilizarse métodos apropiados de muestreo y examen microbiológico para asegurar la ausencia de salmonellas en el producto y para ensayar la eficacia de las combinaciones tiempo/temperatura u otros medios de pasteurización o comprobar la posibilidad de contaminación después de la pasteurización.

La prueba de la alfa-amilasa, que se ha comprobado que es valiosa como indicación inmediata de que se ha alcanzado la relación específica tiempo/temperatura, puede emplearse como índice de su consecución.

Además de todo control por parte del organismo oficial competente, conviene que cada fábrica, por su propio interés, controle en el laboratorio la calidad sanitaria del producto elaborado. Dicho control deberá rechazar todos los alimentos que no sean adecuados para el consumo humano.

5. ESPECIFICACIONES DEL PRODUCTO FINAL

Según la naturaleza del alimento, podrán necesitarse especificaciones microbiológicas, químicas, físicas o relativas a materias extrañas. Tales especificaciones deberán comprender los métodos apropiados para el muestreo, la metodología analítica, etc., según sea necesario respecto al producto de que se trate. (Véase el Anexo 2).

Cuando se emplee como indicación de relación específica tiempo/temperatura, la reacción de la alfa-amilasa debe ser negativa. El producto deberá satisfacer criterios microbiológicos que se establecerán más adelante.

ANEXO 1

PRUEBA DE LA ALFA-AMILASA

La reacción de la alfa-amilasa en relación con el tratamiento térmico de huevo entero es análoga a la reacción de la fosfatasa que se emplea para ensayar la eficacia de la pasteurización de la leche. Se basa en el hecho de que el calor destruye la actividad alfa-amilasa en el huevo entero en proporción al grado de tratamiento térmico aplicado.

La temperatura y el tiempo de retención para la pasteurización de huevo líquido a granel es no menor de 64°C (148°F) durante dos minutos y medio, combinación de tiempo y temperatura que es letal para salmonellas.

Cuando el huevo entero no tratado se mezcla con una solución de almidón, la alfa-amilasa presente degrada el almidón, de modo que la coloración violeta azulada normal que aparece cuando se mezcla yodo y almidón, no se produce. La intensidad de la coloración violeta azulada varía en razón inversa a la cantidad de alfa-amilasa presente. Por tanto, la reacción de la alfa-amilasa es una prueba del grado de tratamiento térmico aplicado a la mezcla de huevo entero cuando se pasteuriza, y proporciona una demostración de que se ha alcanzado o no una combinación satisfactoria de tiempo/temperatura.

Este Anexo trata de servir de ayuda a aquellos que hayan de realizar la prueba con huevo entero líquido.

Reacción de la Alfa-Amilasa

1. EXAMEN DE LA MUESTRA

La muestra de huevo líquido deberá examinarse lo antes posible después de su llegada en el laboratorio de análisis, pero deberá dejarse que se ponga a la temperatura ambiente, antes de hacer el ensayo.

Si la muestra de huevo líquido ha de guardarse antes de hacer el ensayo, deberá mantenerse por debajo de 40°F (aproximadamente 4,50°C) y ponerse después a la temperatura ambiente antes de hacer la reacción.

Todas aquellas muestras que acusen señales de alteración o pruebas de que están deterioradas, no deberán analizarse.

Una muestra que contenga cualquier azúcar, ácido cítrico, o un citrato, o cualquier sustancia que contenga azúcar, ácido cítrico o cualquiera de sus sales, no deberá enviarse para realizar el análisis, puesto que estas sustancias interfieren con la reacción.

2. PRECAUCIONES

Deberán adoptarse las siguientes precauciones:

1. deberá emplearse agua destilada o desionizada en la preparación de los reactivos o en la dilución de los mismos;
2. deberá evitarse la contaminación del huevo líquido o de los reactivos con saliva;
3. todo el material de vidrio deberá estar limpio y seco antes del uso;
4. para cada muestra de huevo líquido deberá emplearse una pipeta recién preparada;
5. no deberán contaminarse con saliva las pipetas;
6. en el caso de que una muestra no pase la prueba, todo el material de vidrio que haya estado en contacto con el huevo líquido deberá esterilizarse y limpiarse como se indica en la Sección 5.

3. REACTIVOS

Solución de almidón

Almidones diferentes dan una ligera variación en el resultado, que puede influir en el tono y en la intensidad del color producido. Esta variación no influye en modo alguno en el fundamento de la reacción. La solución de almidón deberá prepararse del modo siguiente:

Pesar una cantidad de almidón soluble de calidad reactivo para análisis equivalente a 0,70 g de almidón seco. El contenido de humedad del almidón deberá determinarse secando una muestra a 100°C ó 212°F durante 16 horas (o a 160°C ó 320°F durante una hora).

Mezclar esta cantidad de almidón con agua fría hasta obtener una consistencia cremosa fina. Pasar toda la cantidad de esta crema a unos 50 ml de agua hirviendo, hervir durante un minuto y enfriar por inmersión en agua fría. Agregar tres gotas de tolueno y diluir con agua hasta 100 ml en un matraz aforado.

Esta solución no debe emplearse si tiene más de quince días.

Solución de yodo

1. Para uso inmediato
2. Aproximadamente mili-normal, como se especifica en la "British Pharmacopoeia" 1973, Anexo II-A. ¹Esta solución debe prepararse poco antes del uso pero puede hacerse diluyendo una concentración de yoduro potásico.
3. Soluciones de reserva más concentradas.

¹ Yodo 0,001 "Yodo y yoduro potásico disueltos en agua de modo que contengan en 1000 ml las siguientes cantidades de I y KI: 0,1269 g de I y 3,6 g de KI.

4. La Solución de yodo puede prepararse a partir de 1,27 g de yodo disuelto en una solución de 25 g de yoduro potásico en 30 ml de agua destilada para dar una solución aproximadamente N/10. La solución de yoduro potásico puede prepararse a partir de 335 g de yoduro potásico disuelto y completados hasta hacer 1 litro, con agua destilada. Inmediatamente antes de hacer la reacción, se mezcla 1 ml de cada solución (yodo y yoduro potásico) y se completa hasta 100 ml con agua destilada, que da una solución aproximadamente mili-normal para uso.

5. Solución de ácido tricloroacético

6. Solución acuosa 15 por ciento peso en volumen de ácido tricloroacético de calidad reactivo para análisis.

4. APARATOS

Pueden emplearse los siguientes:

1. Pipetas graduadas Grado B bulbo 2 ml, 5 ml. y 10 ml, o Grado B bulbo 2 ml y Grado A 10 ml lado recto.
2. Matraces aforados Grado B de 100 ml y 1000 ml de capacidad.
3. Una probeta graduada de 50 ml
4. Embudos de filtración de 3-4 pulgadas de diámetro.
5. Papeles de filtro Whatman No. 12 de pliegues, de 12, 5 cm de diámetro o equivalente.
6. Matraces cónicos de cuello ancho de 100 ml de capacidad y/o recipientes universales.
7. Tubos de ensayo de aproximadamente 7" x 1".
8. Buretas y jeringas automáticas, pueden usarse para medir yodo, ácido tricloroacético y agua destilada.
9. Un baño de agua capaz de mantener una temperatura de $44^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ($111,2^{\circ}\text{F} \pm 0,9^{\circ}\text{F}$).

5. LIMPIEZA Y CUIDADO DE LOS APARATOS

La limpieza y el cuidado del aparato son especialmente importantes.

1. Después del uso, todo el material de vidrio deberá aclararse con agua y eliminarse por lavado todo el huevo que pueda quedar adherido, si es necesario, con hidróxido sódico N/10. El material de vidrio deberá lavarse después con ácido crómico o ácido clorhídrico diluido, seguido de un enjuagado a fondo con agua y agua destilada.
2. El aparato empleado para muestras que no han superado la prueba debe esterilizarse en una solución bactericida de ácido carbólico o de hipoclorito antes de la limpieza.
3. El material de vidrio nuevo deberá limpiarse por imbibición en solución de ácido crómico o ácido clorhídrico diluido y enjuagarse luego con agua caliente, enjuagarse en agua destilada y finalmente secarse.
4. El material de vidrio empleado para la reacción no deberá emplearse para ningún otro fin y debe mantenerse separado del resto de los aparatos de laboratorio.
5. Los indicios de huevo, proteínas o detergentes pueden dar resultados falsos.

6. METODO

Pesar 15,0 g de muestra de huevo líquido en un matraz cónico de 100 ml o recipiente universal o bien puede usarse un tubo de ebullición de 7" x 1" si tiene tapón.

Agregar 2,0 ml de la solución de almidón y mezclar íntimamente.

Si el huevo es muy viscoso, puede ser difícil asegurar que se mezclen bien el huevo y el almidón. Como esto es esencial, debe mezclarse lo mejor posible el huevo y el almidón antes, durante y después de la incubación.

Poner la mezcla en el baño de agua durante 30 minutos a $44^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Retirar del baño de agua, agitar y, con la mínima demora, añadir 5 ml de esta mezcla sobre 5 ml de solución de ácido tricloroacético contenida en un matraz cónico, tubo de ensayo ancho o recipiente universal. Agitar y mezcla íntimamente otra vez. Añadir 15 ml de agua y agitar y mezclar de nuevo.

Separar por filtración o por centrifugación la materia suspendida. Agregar 10 ml de filtrado claro (después de tirar los primeros filtrados), o el líquido que sobrenada, según el caso, sobre 2 ml de la solución de yodo.

7. INTERPRETACION

Para la determinación del color, puede usarse un Disco 4/26 Comparador Lovibond Standard que contenga siete patrones de color de referencia, y diseñado para uso con un Special Purposes Comparator y cubetas de 25 mm.

Hay muchos tonos intermedios entre el azul y el violeta, y los del disco estándar indican los límites probables.

Se considerará que la muestra ha pasado la prueba de la alfa-amilasa, si el filtrado o el líquido en la solución de yodo toma inmediatamente un color violeta azulado. Para este fin, deben considerarse satisfactorios los colores que son más violeta-azulados que el No. 3 sobre el Disco 4/26 Comparador Lovibond Standard, o de un patrón espectrofotométrico comparable.

Con cubetas de 1 cm empleando una longitud de onda de 585 mm, el patrón espectrofotométrico comparable, comparado contra agua, tiene una densidad óptica de 0,15.

Para el ensayo de comparación, deberá emplearse luz nórdica o fluorescente.

Cuando las muestras fallan, deberán examinarse de nuevo inmediatamente junto con controles calentados. Cuando se confirman los fallos, deberán examinarse salmonellas en las muestras.

ANEXO 2

ESPECIFICACIONES DEL PRODUCTO FINAL

ESPECIFICACIONES MICROBIOLÓGICAS PARA PRODUCTOS DE HUEVO PASTERIZADOS

Las presentes especificaciones microbiológicas para productos de huevo contienen:

1. Número de muestras de un lote tomadas in situ.¹
2. Métodos de muestreo.
3. Métodos de referencia para la detención de Salmonella y para la enumeración de bacterias aerobias mesofílicas y bacterias coliformes.

Planes y límites de muestreo microbiológico.

1. NUMERO DE MUESTRAS DE UN LOTE TOMADAS IN SITU

1.1 HUEVOS ENTEROS DESECADOS

Tomar 10 muestras in situ, todas las cuales se utilizan para la detección de Salmonella, y seleccionar al azar cinco de estas muestras a fin de examinarlas también para la detección de bacterias aerobias mesofílicas y bacterias coliformes.

1.2 HUEVOS ENTEROS CONGELADOS

Tomar 10 muestras in situ, todas las cuales se utilizan para la detección de Salmonella, y seleccionar al azar cinco de estas muestras a fin de examinar también para la detección de bacterias aerobias mesofílicas y bacterias coliformes.

1.3 OTROS PRODUCTOS DE HUEVO

Tomar 10 muestras in situ, todas las cuales se utilizan para la detección de Salmonella.

¹ Se entiende por lote una cantidad de alimentos producida en condiciones idénticas cuyos envases deben llevar todos ellos un número de lote que identifique la producción durante un determinado período de tiempo, y que procede normalmente en una determinada "línea" o de otra unidad crítica de elaboración.

2. METODOS DE MUESTREO

Para todos los productos de huevo, tomar muestras in situ de 200 gramos por lo menos.¹

2.1 HUEVOS ENTEROS DESECADOS²

Equipo. Sonda esterilizada suficientemente larga para llegar al fondo de los envases de los que han de tomarse muestras. Envases de muestreo esterilizados, con tapas bien ajustadas, cuchara esterilizada, mechero de alcohol o de otro tipo, alcohol, algodón, paño o toalla limpios y pila de agua.

Métodos. Para envases pequeños, tomar al azar un envase sin abrir por cada número de muestras que han de tomarse. Para envases mayores, como cajas, sacos, etc., quitar la capa superior con una cuchara esterilizada u otro instrumento esterilizado y, con una sonda esterilizada, tomar por lo menos tres porciones, una del centro, y la otra de la periferia y otra de un punto intermedio entre ambos. Pasar asépticamente los núcleos a un recipiente de muestras esterilizado. Las muestras deberán conservarse en un lugar refrigerado o frío hasta que se efectúen los análisis.

2.2 HUEVOS ENTEROS CONGELADOS³

Equipo

1. Taladro eléctrico o manual esterilizado de 40 x 2,5 cm, martillo y banda de acero de 30 x 5 x 0,5 cm u otro instrumento adecuado para abrir latas, cuchara esterilizada, recipientes esterilizados preenfriados (jarras con tapa de rosca o latas con tapas de presión), mechero de alcohol o de otro tipo, alcohol, algodón, paño o toalla limpios y pila de agua

2. Se recomienda que, cuando se emplee un taladro eléctrico en la toma de muestras, se ajuste una pantalla en el taladro para evitar la contaminación aérea del producto.

Método

1. Taladrar tres porciones internas entre la superficie y el fondo del envase: primera porción en el centro, segunda en un punto medio entre el centro y la periferia y tercera cerca del borde del envase. Con una cuchara esterilizada pasar las porciones del envase a un recipiente de muestras preenfriado.

2. Mantener las muestras refrigeradas con CO₂ sólido y otro refrigerante adecuado, en caso de que deba retrasarse el análisis o de que el punto de muestreo se halle a cierta distancia del laboratorio.

2.3 OTROS PRODUCTOS DE HUEVO

Proceder como en el caso de los productos de huevo desecados o congelados, según convenga.

3. METODOS DE REFERENCIA

3.1 PRODUCTOS DE HUEVO - DETECCION DE SALMONELLA (METODO DE REFERENCIA)

1. CAMPO DE APLICACION

Método de referencia para la detección de Salmonella (incluida la Arizona, pero excluida la Salmonella typhi) en productos de huevo.

2. CAMPO DE APLICACION

El método puede aplicarse a los productos de huevo regulados por el Código de Prácticas de Higiene para Productos de Huevo.

3. REFERENCIA

Modificación de ISO/DIS 3565.¹

¹ Para más información véase International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1974) Microorganisms in Food II. Sampling for Microbiological analysis; principles and specific applications.

Toronto, University of Toronto Press.

² Para más información véase "Official Methods of the Association of Official Analytical Chemists" (12th Ed., 1975, secciones 46,003 y 46,004)

³ Se entiende por lote una cantidad de alimentos producida en condiciones idénticas cuyos envases deben llevar todos ellos un número de lote que identifique la producción durante un determinado periodo de tiempo y que procede normalmente en una determinada "línea" o de otra unidad crítica de elaboración.

¹ ISO 3565: Carne y productos cárnicos. Detección de Salmonella (Método de referencia)

4. DEFINICIONES

- 4.1 Salmonella: microorganismos que forman colonias típicas en determinados medios sólidos y poseen las características bioquímicas y serológicas descritas cuando se efectúa el ensayo de conformidad con este método.
- 4.2 Detección de Salmonella: Determinación de la presencia o ausencia de estos microorganismos en una masa determinada. Cuando el ensayo se efectúa de conformidad con el método descrito.

5. PRINCIPIOS

La detección de Salmonella necesita cuatro etapas sucesivas, porque normalmente están presentes en un número reducido y a menudo en presencia de números considerablemente mayores de otros miembros de enterobacteriáceas.

Preenriquesimiento:	incubación de las muestras en un medio líquido no selectivo a 37°C.
Enriquesimiento:	los medios incubados de preenriquesimiento de muestras de un único lote se incuban en grupos de diez en matraces cada uno de los cuales contiene uno de dos medios líquidos selectivos.
Preparación de placas:	inoculación de dos medios de enriquesimiento en medios sólidos selectivos de diagnóstico que después de incubarlos a 37°C se examinan para descubrir la presencia de colonias que por sus características se consideren presuntas Salmonellas.
Confirmación:	subcultivo de colonias de presuntas Salmonella y determinación de sus correspondientes características bioquímicas y serológicas.

6. MEDIOS DE CULTIVOS, DILUYENTES Y REACTIVOS

6.1 MATERIALES BASICOS

Para que los resultados sean uniformes, se recomienda que se empleen, o bien, componentes deshidratados de medio de cultivo de calidad uniforme y productos químicos de calidad analítica, o bien, un medio completo deshidratado. El agua empleada deberá ser agua destilada o agua de pureza por lo menos equivalente.

Cuando se empleen medios completos deshidratados deberán seguirse rigurosamente las instrucciones del fabricante.

NOTA: En cuanto al verde brillante, véase la especificación indicada en el anexo, (sección 12).

6.2 MEDIOS DE CULTIVO

6.2.1 Agua Peptónica Amortiguada

Composición	
Peptona	10,0 g
cloruro de sodio	5,0 g
hidrogen fosfato disódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	9,0 g
dihidrogen fosfato potásico (KH_2PO_4)	1,5 g
Agua	1,5 g

Preparación

Disolver hirviendo en agua los componentes. Ajustar el pH para que, después de la esterilización, sea de $7,0 \pm 0,1$ a 20°C. Pasar el medio en porciones de 225 ml a botellas de 500 ml de capacidad. Esterilizar el medio durante 20 minutos a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

6.2.2 Medio de Tetrionato (Muller Kauffmann)**6.2.2.1 Base**

Composición	
extracto de carne	5,0 g
Peptona	10,0 g
cloruro de sodio	3,0 g
carbonato cálcico	45 g
Agua	1000 ml

Preparación

Añadir el agua los componentes básicos deshidratados o la base completa deshidratada y hervir hasta la disolución completa de los componentes solubles. Ajustar el pH para que, después de la esterilización, sea de $7,0 \pm 0,1$ a 20°C . Esterilizar la base durante 20 minutos a $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

6.2.2.2 Solución de tiosulfato sódico

Composición	
tiosulfato sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	50,0 g
agua hasta un volumen de	100 ml

Preparación

Disolver el tiosulfato sódico en una parte del agua. Diluir hasta el volumen final. Esterilizar la solución durante 20 minutos a $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

6.2.2.3 Solución de yodo

Composición	
Yodo	20,0 g
yoduro de potasio	25,0 g
agua hasta un volumen final de	100 ml

Preparación

Disolver el yoduro potásico en un volumen mínimo de agua y añadir yodo. Agitar hasta la solución completa y diluir hasta el volumen final. Conservar la solución en un envase opaco fuertemente cerrado.

6.2.2.4 Solución de verde brillante

Composición	
verde brillante	0,5 g
agua	100 ml

Preparación

Añadir el verde brillante al agua. Conservar la solución en la oscuridad, por lo menos durante un día, para dejar que se produzca la autoesterilización.

6.2.2.5 Solución de bilis de buey

Composición	
bilis de buey, desecada	10,0 g
agua	100 ml

Preparación

Disolver hirviendo en agua la bilis de buey desecada. Esterilizar la solución durante 20 minutos a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

6.2.2.6 Medio completo

Composición	
base	900 ml
solución de tiosulfato de sodio (6.2.2.2)	100 ml
solución de yodo (6.2.2.3)	20 ml
Solución de verde brillante (6.2.2.4)	2 ml
Solución de bilis de buey (6.2.2.5)	50 ml

Preparación

Añadir a la base, en condiciones asépticas, los demás ingredientes en el orden citado. Mezclar bien los líquidos después de cada adición. Pasar asépticamente el medio completo en porciones de 1000 ml a botellas esterilizadas. Conservarlos a 4°C en la oscuridad hasta que sea necesario, pero utilizarlo en el plazo de una semana después de la preparación.

6.2.3 Caldo de Selenito y Cistina

6.2.3.1 Base

Composición	
Triptona	5,0 g
lactosa	4,0 g
hidrogen fosfato disódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	10,0 g
selenito ácido de sodio	4,0 g
agua	1000 ml

Preparación

Disolver los ingredientes hirviéndolos en agua durante 5 minutos, con excepción del selenito ácido de sodio. Después de enfriarlo, añadir el selenito ácido de sodio. Ajustar el pH a $7,0 \pm 0,1$ a 20°C y almacenarlo a 4°C .

6.2.3.2 Solución de L-cistina

Composición	
L-cistina	0,1 g
hidróxido de N sodio (NaOH)	15 ml

Preparación

Diluir con agua destilada hasta 100 ml, no autoclrear.

6.2.3.3 Medio completo

Añadir solución de L-cistina a la base, a razón de 0,1 por 10 ml de base. Ajustar el pH a $7,0 \pm 0,1$ a 20°C . Pasar asépticamente el medio completo en porciones de 1000 ml a botellas esterilizadas. Utilizar el medio el mismo día de la preparación.

6.2.4 Agregar el Verde Brillante/Rojo Fenol (Edel y Kampelmacher)

6.2.4.1 Base

Composición	
extracto de carne	4,0 g
peptona	10,0 g
cloruro de sodio	3,0 g
hidrogen fosfato disódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	0,8 g
dihidrogen fosfato sódico (NaH_2PO_4)	0,6 g
agar, fácilmente soluble ¹	12,0 g
agua	900ml

¹ Empleese oxid. No. 1 Agar o un producto análogo.

Preparación

Disolver hirviendo en agua los componentes básicos deshidratados o la base completa deshidratada. Ajustar el pH para que, después de la esterilización, sea de $7,0 \pm 0,1$ a 20°C .

Pasar la base a tubos o botellas de 500 ml de capacidad como máximo. Esterilizar la base durante 15 minutos a $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

6.2.4.2 Solución de azúcar/rojo fenol

Composición	
Lactosa	10,0 g
Sacarosa	10,0 g
rojo fenol	0,09 g
agua hasta un volumen final de	100 ml

Preparación

Disolver los ingredientes en el agua. Calentar en un baño de agua durante 20 minutos a 70°C .

Enfriar a 55°C y utilizarlo inmediatamente.

6.2.4.3 Solución de verde brillante.

Para la composición y preparación de esta solución, véase 6.2.2.4.

6.2.4.4 Medio completo

Composición	
base (6.2.4.1)	900 ml
solución de azúcar/rojo fenol (6.2.4.2)	100 ml
solución de verde brillante (6.2.4.3)	1 ml

Preparación

En condiciones asépticas, añadir la solución de verde brillante a la solución de azúcar/rojo fenol enfriada a aproximadamente 55°C . Añadir a la base a una temperatura entre 50 y 55°C y mezclar.

6.2.4.5 Preparación de Placas de Agar

Añadir a cápsulas Petri de gran tamaño esterilizadas (7.2.5.1) unos 40 ml de medio completo recién preparado (6.2.4.4) manteniendo una temperatura de unos 45°C , y dejar que se solidifique. (Si no se dispone de grandes cápsulas de Petri, pasar unos 15 ml de medio disuelto (6.2.4.4) a pequeñas cápsulas de Petri esterilizadas (7.2.5.2) y dejar que se solidifique).

Inmediatamente antes de la utilización, secar con cuidado las placas, preferentemente sin tapa y con la superficie de Agar hacia abajo, en un horno o incubador a $50 \pm 5^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. Si han sido preparadas previamente, las placas sin secar no deberán mantenerse durante más de cuatro horas a temperatura ambiente, ni más de un día en un refrigerador.

6.2.5 Agar al Sulfito de Bismuto (Wilson y Blair, Modificado)

Composición	
extracto de buey	5,0 g
peptona o polipeptona	10,0 g
Glucosa	5,0 g
hidrogen fosfato disódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	4,0 g
sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,3 g
sulfito de bismuto	8,0 g
verde brillante 0,025 g	0,025 g
Agar	20,0 g
agua	1000 ml

Preparación

Dispersar los componentes o el medio deshidratado completo en agua y hervir agitando frecuentemente para disolver los materiales solubles. Enfriar a 40-45°C, no autoclavar. El pH final deberá ser aproximadamente de 7,7.

6.2.5.1 Preparación de Placas de Agar

Añadir a las cápsulas esterilizadas de Petri de gran tamaño (7.2.5.1) unos 40 ml de medio completo recién preparado (6.2.5) y dejar que se solidifique. (Si no se dispone de grandes cápsulas de Petri, pasar unos 15 ml del medio disuelto (6.2.5) a pequeñas cápsulas de Petri esterilizadas (7.2.5.2) y dejar que se solidifique). Conservar el medio en un refrigerador y no utilizarlo antes de las 24 horas de almacenamiento, ni después de cinco días.

6.2.6 Agar Nutriente

Composición	
extracto de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
agar	12,0 g
Agua	1 000 ml

Preparación

Disolver hirviendo en agua los componentes deshidratados del medio o el medio completo deshidratado. Ajustar el pH para que, después de hervir, sea de 7,0 $\pm$ 0,1 a 20°C. Pasar el medio de cultivo a tubos o botellas de una capacidad de 500 ml como máximo. Esterilizar el medio durante 20 minutos a 121 $\pm$ 1°C.

6.2.6.1 Preparación de placas de agar

Pasar unos 15 ml del medio disuelto (6.2.6) a pequeñas cápsulas de Petri esterilizadas (7.2.5.2) y proceder como en 6.2.4.5.

6.2.7 Agar con tres Azúcares/Hierro (TAH)

Composición	
extracto de carne	3,0 g
extracto de levadura	3,0 g
Peptona	20,0 g
cloruro de sodio	5,0 g
Lactosa	10,0 g
Sacarosa	10,0 g
Glucosa	1,0 g
nitrito de hierro (III)	0,3 g
tiosulfato sódico	0,3 g
rojo fenol	0,024 g
agar	12,0 g
Agua	1 000 ml

Preparación

Disolver hirviendo en agua los componentes deshidratados del medio o el medio completo deshidratado. Ajustar el pH para que, después de la esterilización, sea de $7,4 \pm 0,1$ a $20^{\circ}C$.

Pasar el medio en porciones de 10 ml a tubos de 17 a 18 mm de diámetro. Esterilizar el medio durante 10 minutos a $121 \pm 1^{\circ}C$. Dejar en reposo en posición inclinada de forma que la profundidad máxima sea de 2,5 cm.

6.2.8 Agar - Urea (Cristensen)

6.2.8.1 Base

Composición	
Peptona	1,0 g
Glucosa	1,0 g
cloruro de sodio	5,0 g
dihidrogen fosfato potásico (KH_2PO_4)	2,0 g
rojo fenol	0,012 g
agar	15,0 g
agua	1 000 ml

Preparación

Disolver hirviendo en agua los componentes básicos deshidratados o la base completa deshidratada. Esterilizar la base durante 20 minutos a $121 \pm 1^{\circ}C$.

6.2.8.2 Solución de urea

Composición	
urea	400 g
agua hasta un volumen final de	1 000 ml

Preparación

Disolver la urea en agua. Esterilizar por filtración y comprobar la esterilización. (Para detalles de la técnica de esterilización por filtración, puede consultarse cualquier manual apropiado de microbiología).

6.2.8.3 Medio completo

Composición	
Base (6.2.8.1)	950 ml
solución de urea (6.2.8.2)	50 ml

Preparación

En condiciones asépticas, añadir la solución de urea a la base. Ajustar el pH para que sea de $6,8 \pm 0,1$ a $20^{\circ}C$. Pasar el medio completo en porciones de 10 ml a tubos esterilizados. Dejar reposar en posición inclinada.

6.2.9 Agar Nutriente Semisólido

Composición	
extracto de carne	3,0 g
peptona	5,0 g
agar	4,0-8,0 g (según la "concentración de gel" obtenida)
agua	1 000 ml

Preparación

Disolver hirviendo en agua los componentes básicos deshidratados. Ajustar el pH para que, después de la esterilización, sea de $7,0 \pm 0,1$ a 20°C . Pasar el medio a botellas de 500 ml de capacidad como máximo. Esterilizar el medio durante 20 minutos a $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Preparación de placas de agar

Añadir a pequeñas cápsulas de Petri esterilizadas (7.2.5.2) unos 15 ml de medio completo recién preparado (6.2.9). No deben secarse las placas.

6.2.10 Solución Salina

Composición	
cloruro de sodio	8,5 g
agua	1 000 ml

Preparación

Disolver hirviendo en agua el cloruro de sodio. Ajustar el pH para que, después de la esterilización, sea de $7,0 \pm 0,1$ a 20°C . Pasar a botellas o tubos porciones de la solución que sean de 90 a 100 ml después de la esterilización. Esterilizar la solución durante 20 minutos a $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

6.2.11 Medio de Decarboxilación con Lisina

Composición	
monohidrocloruro de L-lisina	5,0 g
extracto de levadura	3,0 g
Glucosa	1,0 g
púrpura de bromocresol	0,015 g
Agua	1 000 ml

Preparación

Disolver los componentes hirviéndolos en agua. Ajustar el pH para que, después de la esterilización, sea de $6,8 \pm 0,1$ a 20°C . Pasar el medio en porciones de 5 ml a tubos estrechos de cultivo de unos 8 mm de diámetro y 160 mm de longitud, para obtener condiciones anaerobias. Esterilizar el medio durante diez minutos a $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

6.2.12 Reactivo de β -Galactosidasa (Ensayo de ONFG)

6.2.12.1 Solución amortiguada

Composición	
dihidrogen fosfato de sodio (NaH_2PO_4)	6,9 g
solución de hidróxido de sodio de 0,1 N (4 g/l) aprox.	3 ml
agua hasta un volumen final de	50 ml

Preparación

Disolver el dihidrogen fosfato de sodio en unos 45 ml de agua. Ajustar el pH a $7,0 \pm 0,1$ con unos 3 ml de solución de hidróxido de sodio. Añadir agua hasta un volumen final de 50 ml.

Conservar en frío.

6.2.12.2 Solución de ONFG

Composición	
o-nitrofenil β -D-galactopiranosida (ONFG)	80 mg
Agua	15 ml

Preparación

Disolver el ONFG en agua a 50°C. Enfriar la solución.

6.2.12.3 Reactivo completo

Composición	
solución amortiguada (6.2.12.1)	5 ml
solución de ONFG (6.2.12.2)	15 ml

Preparación

Añadir la solución amortiguada a la solución de ONFG, Conservar el reactivo completo a 4°C por un período máximo de un mes.

6.2.13 Reacción de Voges-Proskauer (Método Rápido de Barry y Feeney)

6.2.13.1 Medio de VP

Composición	
Peptona	7,0 g
Glucosa	5,0 g
hidrogenfosfato dipotásico (K_2HPO_4)	5,0 g
agua	1 000 ml

Preparación

Disolver los componentes en agua. Ajustar el pH a 6,9 y filtrar. Esterilizar el medio durante 20 minutos a 115°C.

6.2.13.2 Solución de creatina

Composición	
creatina monohidrato	0,5 g
Agua	100 ml

Preparación

Disolver la creatina monohidrato en agua.

6.2.13.3 Reactivo de α -Naftol

Composición	
α -naftol	6 g
etanol, 96% (v/v)	100 ml

Preparación

Disolver el α -naftol en el etanol

6.2.13.4 Reactivo KOH

Composición	
hidróxido de potasio	40 g
agua	100 ml

Preparación

Disolver el hidróxido de potasio en el agua

6.2.14 Reacción de Indol

6.2.14.1 Medio de triptona

Composición	
Triptona	10 g
cloruro de sodio	5 g
agua	1 000 ml

Preparación

Disolver los componentes en el agua. Esterilizar durante 20 minutos a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

6.2.14.2 Reactivo (Kovacs)

Composición	
p-dimetilaminobenzaldehído	5 g
ácido clorhídrico, p ,1,19 g/ml	25 ml
alcohol amílico terciario	75 ml

Preparación

Mezclar los componentes

6.3 SUEROS

Existen en el comercio varios sueros anti-Salmonella, es decir, antisueros que contienen uno o más grupos "O" (llamados mono- o polivalentes antisueros O) y antisueros que contienen uno o más grupos "H" (llamados mono o polivalentes antisueros H). La descripción detallada puede variar y se recomienda leer atentamente las etiquetas. Los sueros deben llevar un certificado, expedido por la autoridad competente de inspección, que indique su potencia y especificidad.

7. APARATOS Y RECIPIENTES DE VIDRIO

7.1 APARATOS

Mezclador mecánico, que funcione como mínimo a 8 000 y a 45 000 rev/min como máximo con jarras de mezcla de vidrio o metal de capacidad apropiada dotadas de tapas ajustadas y resistentes a las condiciones de esterilización.

Aparato de esterilización de vidrio, jarras para mezclar, medios de cultivo, etc., y equipos para esterilización de filtro, por ejemplo, almohadillado de asbesto, filtro de membrana o filtro de bujía de porosidad adecuada.

Armario secador, horno o incubador para secar la superficie de las placas de agar preferentemente a $50 \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Incubador para mantener los medios líquidos Inoculados, las placas y los tubos a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$

Incubador o baño de agua para mantener los medios líquidos inoculados a $42-43^{\circ}\text{C}$.

Baños de agua para calentar y enfriar soluciones y medios de cultivo a las temperaturas apropiadas.

7.2 RECIPIENTES DE VIDRIO

Los recipientes de vidrio deberán resistir repetidas esterilizaciones.

Tubos y botellas de cultivo para esterilización y almacenamiento de medios de cultivo y tubos de cultivo de 8 mm de diámetro y 160 mm de longitud para el medio de decarboxilación con lisina (6.2.11).

Cilindro de medir de 100 ml de capacidad, subdividido en partes de 10 ml, para preparar los medios completos.

Pipetas graduadas con una capacidad nominal de 10 ml y 1 ml, subdivididas respectivamente en partes de 1,0 y 0,1 ml.

7.2.1 Cápsulas de Petri

Cápsula grande

Cápsula	
diámetro exterior	$140 \pm 2 \text{ mm}$
altura exterior	$30 \pm 2 \text{ mm}$
espesor del vidrio	$1,5 \pm 0,5 \text{ mm}$

El borde deberá seguir un plano paralelo a la base. El fondo de la cápsula deberá ser plano y paralelo a la base.

Tapa	
diámetro exterior	$150 \pm 2 \text{ mm}$
altura exterior	$15 \pm 2 \text{ mm}$
espesor del vidrio	$1,5 \pm 0,5 \text{ mm}$

7.2.1.2 Cápsula pequeña

Cápsula	
diámetro interior	$90 \pm 2 \text{ mm}$
altura exterior, mínima	18 mm

El borde deberá seguir un plano paralelo a la base. El fondo de la cápsula deberá ser plano y paralelo a la base.

Tapa	
Diámetro exterior máximo	102 mm

Pueden utilizarse también cápsulas de Petri de plástico, incluso de dimensiones ligeramente diferentes de las de las cápsulas de vidrio descritas en 7.2.5.1 y 7.2.5.2.

7.3 ESTERILIZACION DE LOS RECIPIENTES DE VIDRIO, ETC.

Esterilizar los recipientes de vidrio, etc., mediante uno de los métodos siguientes:

- esterilización en húmedo a 121°C como mínimo y durante 20 minutos por lo menos;
- esterilización en seco a 170°C como mínimo y durante una hora por lo menos.

8. MUESTREO

Proceder a partir de muestras tomadas in situ de 200 g (véanse párrafos 1 y 2 al comienzo del Anexo 2).

Las muestras congeladas se mantendrán congeladas hasta el análisis.

9. PROCEDIMIENTO**9.1 TRATAMIENTO PREVIO DE LA MUESTRA**

Las muestras de huevo desecadas deberán mezclarse bien agitándolas antes de la extracción de las unidades de muestra. Las muestras de huevos congelados deberán descongelarse colocándolas en agua fría corriente solamente durante el tiempo suficiente para que se descongelen completamente. Deberá mezclarse bien la muestra descongelada antes de tomar las unidades de muestra.

9.2 UNIDAD DE MUESTRA

Pesar 25 g de la muestra tomada in situ mezclada (9.1) en una jarra mezcladora esterilizada (7.1.1).

9.3 MEZCLA

Añadir en la jarra 225 ml. de agua de peptona amortiguada (6.2.1).

Accionar el mezclador según su velocidad, durante el tiempo suficiente para obtener un total de 15 000 a 20 000 revoluciones. Aún tratándose del mezclador más lento, este tiempo no deberá exceder de 2,5 minutos.

9.4 PRE-ENRIQUECIMIENTO

Pasar asépticamente el contenido de la jarra mezcladora a una botella esterilizada de 500 ml. Incubar la botella a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 16 horas, como mínimo y 20 horas, como máximo.

9.5 ENRIQUECIMIENTO

Tras el período de incubación, pasar 10 ml. de cada una de las diez botellas (9.4.2) a 1000 ml de medio de tetrationato (6.2.2) y 10 ml de cada una de las mismas diez botellas a 1,000 ml de medio de selenito (6.2.3). Ambos caldos enriquecidos deberán calentarse a 42-43°C ante de la inoculación.

Incubar los medios de tetrationato y selenito inoculados a 42-43°C hasta dos días. La temperatura no deberá exceder de 43°C.

9.6 PREPARACION DE PLACAS

Tras un período de incubación de 18 a 24 horas (9.5.2), con un alambre anular de inoculación de 2,5 a 3 mm diámetro, raspar de cada matraz y pasar una porción a la superficie de las placas de agar al verde brillante/rojo fenol (6.2.4) y de agar al sulfito de bismuto, para obtener colonias bien aisladas. (Cuando no se disponga de grandes cápsulas de Petri, podrán rasparse dos cápsulas de Petri pequeñas una después de otra, utilizando el mismo alambre).

Incubar las placas con el fondo de las cápsulas de Petri hacia arriba en un incubador a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Tras un período de incubación de dos días (véase 9.5.2) repetir la preparación de placas de dos medios de enriquecimiento y colocar las placas en un incubador a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Tras un período de incubación de 20 a 24 horas, examinar las placas para detectar la presencia de colonias típicas de Salmonella.

Si el crecimiento es leve y no hay colonias típicas de Salmonella, reincubar a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante otras 20 a 24 horas.

Reexaminar las placas descubrir la presencia de colonias típicas de Salmonella.

NOTA: Toda colonia típica o sospechosa queda sujeta a confirmación (9.7) porque el reconocimiento de colonias de Salmonella es en gran medida cuestión de experiencia y su aparición puede variar algo, no sólo de especie a especie de Salmonella, sino también de una porción a otra de medio. A este propósito, puede ayudar a reconocer colonias sospechosas la aglutinación de colonias con un antisuero de Salmonella omnivalente.

9.7 CONFIRMACION DE PRESUNTAS COLONIAS DE SALMONELLA

9.7.1 Selección de Colonias para Confirmación

De cada placa de cada uno de los medios selectivos (véanse 9.6.1) elegir cinco colonias típicas o sospechosas para confirmación.

Si en una de las placas hay menos de 5 colonias típicas o sospechosas, tomar para confirmación todas las colonias típicas o sospechosas.

Inocular las colonias seleccionadas en franjas sobre la superficie de placas de agar nutriente (6.2.6) de forma que puedan desarrollarse colonias bien aisladas.

Incubar las placas inoculadas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 20 a 24 horas.

Seleccionar colonias aisladas para confirmación bioquímica y serológica.

9.7.2 CONFIRMACION BIOLOGICA

9.7.2.1 Inoculación e incubación de medios

Inocular los siguientes medios con las colonias seleccionadas (9.7.1.5) mediante un alambre de inoculación:

9.7.2.1.1 Agar con tres azúcares/hierro (TAH) (6.2.7).

Inocular en franjas la superficie inclinada de agar y perforar el extremo. Incubar durante uno o dos días a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Interpretar los cambios en el medio de la forma siguiente:

Extremo	
Amarillo	conversión de glucosa
Rojo o inalterado	ninguna conversión de glucosa
Negro	formación de hidrogensulfuro
burbujas o grietas	formación de gas a partir de la glucosa

Superficie inclinada	
Amarilla	conversión de lactosa y/o sacarosa
Roja o inalterada	ninguna conversión de lactosa ni sacarosa

9.7.2.1.2 Agar a la urea (6.2.8)

Inocular rascando la superficie inclinada de agar. Incubar durante uno o dos días a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. El resquebrajamiento de la urea libera amonio, que cambia el color del rojo fenol en rosa y, más tarde, en cereza.

9.7.2.1.3 Medio de decarboxilación con lisina (6.2.11)

Inocular inmediatamente debajo de la superficie del medio líquido. Incubar durante un día a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. El color púrpura después de producirse el crecimiento indica una reacción positiva. El color amarillo indica una reacción negativa.

9.7.2.1.4 Reactivo de β -galactosidasa (6.2.12).

Tomar con el alambre una porción de la colonia sospechosa y suspenderla en 0,25 ml de solución salina (6.2.10) en un tubo. Añadir una gota de tolueno. Poner el tubo en un baño de agua a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante varios minutos. Añadir después 0,25 ml del reagente de β -galactosidasa y mezclar. Volver a colocar el tubo en el baño de agua a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas (véase la nota). El color amarillo indica una reacción positiva.

NOTA: La reacción aparece frecuentemente a los 20 minutos.

9.7.2.1.5 Reacción de Voges-Proskauer (6.2.13)

Inocular dos tubos suspendiendo una porción tomada con el alambre de inoculación de la colonia sospechosa en 0,2 ml del medio (6.2.13.1) en cada tubo. Incubar un tubo a la temperatura ambiente y el otro a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 horas. Después de la suspensión, añadir a cada tubo dos gotas de solución de creatina (6.2.13.2), 3 gotas de solución de naftol etanólico (6.2.13.3) y después dos gotas de reactivo KOH (6.2.13.4); agitar después de la adición de cada reactivo. La aparición de un color rojo de rosa a brillante en el plazo de 15 minutos indica una reacción positiva.

9.7.2.1.6 Reacción de indol (6.2.14)

Inocular un tubo que contiene 2 ml de medio (6.2.14.1) con la colonia sospechosa. Incubar durante 24 horas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Después de la incubación, añadir 1 ml de reactivo de indol (6.2.14.2). La formación de un anillo rojo indica una reacción positiva. Un anillo amarillo oscuro indica una reacción positiva. Un anillo oscuro indica una reacción negativa.

9.7.2.2 Interpretación de los resultados.

Las Salmonellas muestran las siguientes reacciones¹:

Confirmación de serotipos de Salmonella²

Glucosa en TAH (formación de ácido) (9.7.2.1.1)	+ 100%
Glucosa en TAH (formación de gas) (9.7.2.1.1)	+ 91,9%
Lactosa en TAH (9.7.2.1.1)	- 99,2% ³
Sacarosa en TAH (9.7.2.1.1)	- 99,5%
Hidrogen sulfuro en TAH (9.7.2.1.1)	+ 91,6%
Resquebrajamiento de urea (9.7.2.1.2)	- 100%
Decarboxilación de lisina (9.7.2.1.3)	+ 94,6% ⁴
Reacción de b-galactosidasa (9.7.2.1.4)	- 98,5%
Reacción de Voges-Proskauer (9.7.2.1.5)	- 100%
Reacción del indol (9.7.2.1.6)	- 98,9%

9.7.3 Confirmación Serológica

Examinar colonias puras (9.7.1.5) no autoaglutinables (9.7.3.1) para descubrir la presencia de antígenos de Salmonella O o H por aglutinamiento con sueros en plano inclinado de acuerdo con el procedimiento siguiente.

9.7.3.1 Eliminación de cepas autoaglutinables.

Poner en un plano inclinado bien limpio una gota de solución salina (6.2.10). Dispersar en esta gota una cantidad del cultivo que se ensaya para obtener una suspensión homogénea y turbia. Balancear suavemente el plano inclinado durante 30 ó 60 segundos. Observar las reacciones sobre fondo oscuro, preferentemente con la ayuda de un cristal de aumento. Las cepas se consideran autoaglutinables si las bacterias forman grumos en unidades más o menos distintas. Es imposible la confirmación serológica de estas cepas autoaglutinables por los procedimientos 9.7.3.2 y 9.7.3.3.

9.7.3.2 Examen de los antígenos-O

Utilizar colonias puras (9.7.1.5) no autoaglutinables (9.7.3.1). Proceder según 9.7.3.1 utilizando suero anti-O (6.3) en lugar de solución salina. Los sueros mono- o polivalentes deberán utilizarse uno después del otro.

9.7.3.3 Examen de los antígenos-H

Inocular el agar nutriente semisólido (6.2.9) con una colonia pura no autoaglutinable (9.7.3.1). Incubar el medio durante 18 a 24 horas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Utilizar este cultivo para el examen de antígenos H según el procedimiento (9.7.3.1), pero utilizando una gota de suero anti-H (6.3) en lugar de solución salina

9.7.4 Interpretación

las cepas que muestran reacciones bioquímicas típicas (9.7.2) y dan reacciones serológicas positivas según 9.7.3.2 ó 9.7.3.3 se consideran Salmonella.

¹ Edwards and Ewing 1972

² Estos porcentajes que son todavía objeto de estudio, indican solamente que no todas las clases de Salmonella muestran las reacciones indicadas por los signos + o -. Estos porcentajes pueden variar de un país a otro y de un alimento a otro.

³ La Salmonella subgénero III (Arizona) pueden dar una reacción positiva de lactosa y galactosidasa; la Salmonella subgénero II puede dar una reacción negativa de lactosa, pero positiva de galactosidasa.

⁴ Para más información, véase "Official Methods of the Association of Official Analytical Chemists" (12 th Ed., 1975, secciones 46.003 y 46.004).

Las cepas que muestran reacciones bioquímicas típicas (9.7.2), pero no dan reacciones serológicas positivas según 9.7.3.2 ó 9.7.3.3, las que no muestran reacciones bioquímicas típicas (9.7.2), pero dan reacciones serológicas positivas según 9.7.3.2 ó 9.7.3.3 y las autoaglutinables (9.7.3.1) que muestran reacciones bioquímicas típicas (9.7.2) podrían ser Salmonella.

Las cepas que no muestran reacciones bioquímicas típicas (9.7.2) ni dan reacciones serológicas positivas según 9.7.3.2. ó 9.7.3.3 no se consideran Salmonella.

9.7.5 Confirmación Definitiva

Las cepas que se consideren Salmonella (9.7.4.1) o que puedan ser Salmonella según 9.7.4.2, deberán enviarse a un centro reconocido de referencia de Salmonella para su tipificación definitiva. Este envío deberá ir acompañado de toda la información posible sobre dichas cepas.

10. EXPRESION DE LOS RESULTADOS

Si después del cultivo en placas (9.6) no se han encontrado Salmonella en ningún medio de enriquecimiento, indicar: “no se ha aislado ninguna Salmonella de las 10 (ó 30) unidades de muestra del producto examinado”.

Si después del cultivo en placas (9.6) se ha encontrado Salmonella en uno o en los dos medios de enriquecimiento, indicar: “Se han aislado Salmonella de las 10 (ó 30) unidades de muestra del producto examinado”, y señalar si se ha utilizado la serotipificación. “Las Salmonella identificadas pertenecen a los tipos siguientes:...”

11. INFORMACION DEL ENSAYO

Indicar el método de ensayo citando el presente método de referencia.

Indicar el nombre exacto del Centro que ayudó a identificar las cepas.

12. ANEXO: ESPECIFICACION PARA EL VERDE BRILLANTE

12.1 RESULTADO BACTERIOLOGICO

Supresión de la difusión de proteus sobre el agar con verde brillante/rojo fenol (6.2.4), sin impedir el crecimiento de Salmonella.

12.2 METODO EN ENSAYO

12.2.1 Medio

Preparar agar con verde brillante/rojo fenol, según 6.2.4, con varias concentraciones de verde brillante, por ejemplo, de 4,5 mg/1 a 6 mg/1.

12.2.2 Procedimiento

Inocular una serie de placas con distintas concentraciones de verde brillante con un cultivo puro de proteus en crecimiento, y otra serie con un cultivo de Salmonella, e incubar estas placas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas como máximo. Una concentración satisfactoria de la mancha debería permitir el crecimiento de Salmonella con típicas colonias rosas de 1 a 2 mm de diámetro, y el crecimiento limitado de proteus, es decir, sin difusión. La concentración de verde brillante que muestre estas características deberá emplearse para la preparación de la solución de verde brillante (6.2.2.4).

3.2 PRODUCTO DE HUEVO - ENUMERACION DE BACTERIAS AEROBIAS MESOFILICAS (METODO DE REFERENCIA)

1. CAMPO DE APLICACION

Método de referencia para la enumeración de bacterias aerobias mesofílicas en productos de huevo.

2. CAMPO DE APLICACION

El método puede aplicarse a los productos de huevo entero desecados o congelados, regulados por el Código Internacional Recomendado de Prácticas de Higiene para Productos de Huevo.

3. REFERENCIA

Modificación del método ISO/TC 34/SC 9 para la enumeración de bacterias aerobias mesofílicas.

4. DEFINICION

Por “bacterias aerobias mesofílicas”, se entiende microorganismos que crecen aerobiamente a 30°C en las condiciones descritas en el presente método.

5. PRINCIPIO

Inoculación en cápsulas de Petri de un medio definido de cultivo fundido con el homogenado nutritivo (1 en 10) y diluciones decimales.

Incubación de este medio aerobiamente a 30°C durante 72 horas.

Cálculo del número de bacterias aerobias mesofílicas por gramo de las unidades de muestra tomadas del número de colonias obtenidas en determinadas cápsulas de Petri a niveles de dilución que den un resultado significativo.

6. MEDIOS DE CULTIVO, DILUYENTES Y REACTIVOS**6.1 MATERIALES BASICOS**

Para que los resultados sean uniformes, se recomienda el empleo, o bien, de componentes deshidratados de medios de cultivo de calidad uniforme y productos químicos de calidad analítica, o bien, un medio completo deshidratado. El agua usada deberá ser agua destilada o agua de pureza por lo menos equivalente.

Cuando se empleen medios completos deshidratados, deberán seguirse rigurosamente las instrucciones del fabricante.

Si los medios no se utilizan el día de la preparación, pueden conservarse en la oscuridad a máximo, a más de 5°C durante un mes, como máximo, tomando precauciones para evitar la evaporación.

6.2 MEDIOS DE CULTIVO**6.2.1 Agua de Peptona Amortiguada**

Composición	
Peptona	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Hidrogen fosfato disódico ($\text{Na}_2 \text{HPO}_4 12\text{H}_2\text{O}$)	9,0 g
Dihidrogen fosfato potásico (K_2HPO_4)	1,5 g
Agua	1 000 ml.

Preparación

Disolver en agua hirviendo los componentes. Ajustar el pH para que, después del autoclave, sea de $7,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ a 20°C . Pasar a tubos o botellas de dilución en porciones de 9 ml. Esterilizar durante 20 minutos a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

6.2.2 Agar para el Recuento de Placas

Composición	
Extracto de levadura deshidratado	2,5 g
Digestión pancreática de caseína	5,0 g
Glucosa	1,0 g
Agar-agar en polvo o en escamas	12 a 18 g según las propiedades de gelatinización del producto
Agua	1 000 ml

Preparación.

Disolver en agua hirviendo los componentes o el medio completo deshidratado. Si es necesario, ajustar el pH para que, después de la esterilización, sea de $7,0 \pm 0,2$ a 20°C (medición realizada a 45°C con corrección de temperatura). Distribuir el medio en tubos (por ejemplo, de 18 mm x 180 mm), poniendo 15 ml en cada tubo, o en botellas que no excedan de 500 ml, llenando solamente alrededor de la mitad del volumen de la botella. Esterilizar en un autoclave a $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ durante 20 minutos.

Antes de empezar el análisis, para evitar que se retrase el momento de verter el agar, fundir completamente el medio en un baño de agua hirviendo y enfriarlo a $45\text{--}48^\circ\text{C}$, preferentemente en un baño de agua.

6.2.3 Agar no Nutritivo, Llamado “Agar Blanco”

Composición	
Agar-agar en polvo o en escamas	12 a 18 g según las propiedades de gelatinización del producto
Agua	1000 ml

Preparación

Disolver el agar-agar en agua hirviendo. Si es necesario, ajustar el pH para que, después de la esterilización, sea de $7,0 \pm 0,2$ a 20°C (Medición realizada a 45°C con corrección de temperatura).

Distribuir el agar en tubos (por ejemplo, de 18 mm x 180 mm), 4 ml en cada tubo, o en botellas de 150 ml, poniendo 100 ml en cada botella.

Esterilizar en un autoclave a $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ durante 20 minutos.

Antes de empezar el análisis, para evitar que se retrase el momento de verter el agar, fundir completamente el medio en un baño de agua hirviendo y enfriarlo a 45-48°C, preferentemente en un baño de agua.

7. APARATOS Y RECIPIENTES DE VIDRIO

Equipos normalizados de laboratorio y especialmente:

Aparatos para la esterilización de los recipientes de vidrio, medios de cultivo, etc.

Incubador regulado a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Cápsulas de Petri de vidrio o cápsulas de plástico de 90 a 100 mm de diámetro.

Tubos o botellas de cultivo para la esterilización y el almacenamiento de los medios de cultivo.

Pipetas de flujo total, con una capacidad nominal de 1 ml y graduadas en partes de 0,1 ml.

Esterilización de los recipientes de vidrio.

Esterilizar los recipientes de vidrio mediante uno de los métodos siguientes:

esterilización en seco a 170°C como mínimo, y durante una hora por lo menos.

esterilización en húmedo a 120°C como mínimo y durante 20 minutos por lo menos.

8. MUESTREO

Proceder a partir de muestras tomadas in situ a 200 g (véanse párrafos 1 y 2 al comienzo del Anexo2).

Las muestras congeladas deberán mantenerse congeladas hasta el análisis.

9. PROCEDIMIENTO

9.1 PREPARACION DE LA UNIDAD DE MUESTRA, DEL HOMOGENADO NUTRITIVO (1 EN 10) Y DE LAS DILUCIONES DECIMALES.

Para el tratamiento previo de la muestra tomada in situ, la unidad de muestra y la mezcla para obtener el homogenado alimentario (1 en 10), véase el método de referencia para la Salmonella, 9.1, 9.2 y 9.3 de la sección 3.1.

9.1.1 Dilución

Mezclar el contenido de la jarra agitándolo y pasar con una pipeta (7.5) 1 ml a un tubo que contiene 9 ml de fluido de dilución (6.2.1).

Mezclar los líquidos con cuidado aspirando 10 veces con una pipeta.

Con la misma pipeta pasar 1, 0 ml a otro tubo de dilución que contiene 9 ml de fluido de dilución y mezclar con una pipeta nueva.

Repetir las operaciones 9.1.2.2 y 9.1.2.3 hasta que se haga el número necesario de diluciones. Cada dilución sucesiva hará que la concentración sea diez veces menor.

9.2 PREPARACION DE PLACAS POR DERRAME

Tomar dos cápsulas de Petri esterilizadas (7.3). Con una Petri esterilizada (7.5), pasar a cada una de estas cápsulas 1 ml de homogenado nutritivo (1 en 10).

Tomar otras dos cápsulas de Petri esterilizadas. Con una nueva pipeta esterilizada, pasar a cada una de estas cápsulas 1 ml del contenido del primer tubo de dilución.

Efectuar la misma operación con el último tubo de dilución. Verter en cada cápsula de Petri 15 ml del medio (6.2.2). El tiempo que transcurra entre el comienzo de la preparación de las diluciones y el momento de verter el agar en las cápsulas no deberá exceder de 15 minutos. Mezclar con cuidado el inóculo con el medio y dejar que este último se solidifique colocando

Las capsulas de Petri en una superficie horizontal fría. Cuando se sospecha que el producto que va a analizarse contiene bacterias cuyas colonias se dispersarán probablemente en la superficie del medio, verter en la superficie del agar inoculado, después que este último se ha solidificado, unos 4 ml del medio (6.2.3) para formar una capa de unos 2 mm de espesor.

Dejar que el medio se solidifique.

9.3 INCUBACION DE LAS CAPSULAS

Invertir las cápsulas preparadas y colocarlas en el incubador a $30^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (7.2).

9.4 RECuento DE COLONIAS

Examinar las cápsulas después del período prescrito de incubación. Si ésto no es posible, pueden mantenerse a 4°C durante un máximo de 24 horas. Contar las colonias en cada cápsula utilizable para el cálculo del número de bacterias por gramo de producto; en principio, las que contienen entre 30 y 300 colonias. (Si no se aplica la excepción, véase la Sección 9).

10. EXPRESION DE LOS RESULTADOS

10.1 METODO PARA CALCULAR¹

Expresar el resultado como el número de bacterias aerobias mesofílicas por gramo de producto de huevo entero desecado o congelado. Expresarlo por un número comprendido entre 1,0 y 9,9 multiplicado por 10^x , siendo “x” la potencia apropiada de 10.

Al hacer el recuento, pueden encontrarse distintos casos:

Productos que contienen relativamente pocos microorganismos (Cuadro I).

Las cápsulas examinadas no contienen colonias:

Expresar el resultado con la fórmula siguiente:

Menos de 1×10^1 bacterias por gramo de producto, donde 10^1 es la inversa de la disolución del homogenado nutritivo (ejemplo 1).

Las cápsulas correspondientes al homogenado nutritivo (1 en 10) contienen menos de 30 colonias:

Expresar el resultado con la fórmula siguiente:

menos de 3×10^2 bacterias por gramo de producto (ejemplo 2).

10.2 Otros productos (Cuadro II)

Caso general: Hay por lo menos una cápsula que contiene entre 10 y 300 colonias (ejemplos 3,4 y 5).

Retener todas las cápsulas correspondientes a la dilución o a las dos diluciones sucesivas en que ésta o estas cápsulas están situadas.

Para cada dilución, calcular el promedio de colonias. Mantener sólo dos cifras significativas. Así, para un número de tres cifras, redondearlo al cero más próximo. Si la tercera cifra es cinco, redondearlo al cero inferior.

Multiplicar el valor obtenido por la inversa de la dilución correspondiente para obtener el número de bacterias por gramo de producto.

En caso de que haya dos valores para el número de bacterias por gramo de producto (como cuando se han retenido dos diluciones), sacar la media de estos valores si la proporción del valor superior con respecto al inferior es de menos de 1. De lo contrario, retener el valor inferior.

Casos especiales: No hay cápsulas que contengan entre 30 y 300 colonias.¹

Si los números de colonias difieren algo de estos límites en el nivel de dos diluciones sucesivas (ejemplo 6), proceder como en 10.1.2.1 (caso de retención de dos diluciones)

Si las cápsulas correspondientes a una dilución contienen colonias en difusión y si el número de colonias de la dilución siguiente es inferior a 30 (ejemplo 7), proceder con esta dilución como en 10.1.2.1.

¹ Nuevo Texto del documento ISO cuando se halle disponible

¹ Es posible que el texto de esta sección sea objeto de modificación futura por la Comisión del Codex Alimentarius.

11. INFORME DEL ENSAYO

Indicar el método de ensayo citando el presente método de referencia.

El informe del ensayo debe facilitar la información necesaria para la identificación completa de la muestra.

CUADRO I ¹			
Ejemplos	Número de colonias de un gramo de homogenado nutritivo (1 en 10)	Resultados (en número de bacterias por gramo de producto)	Explicación de los cálculos
Nº1	0	menos de 1×10 bacterias	$1 \times 10^1 = 1 \times 10$
Nº2	18	menos de 3×10^2 bacterias	$30 \times 10^1 = 3 \times 10^2$
	17		

CUADRO II ¹					
Ejemplos	Número de colonias		Proporciones	Resultados (en número de bacterias por gramo de producto)	Explicación de los cálculos
	dilución a 1/100	dilución a 1/1000			
Nº 3	175	16		1.9×10^4	$175 + 208 = 383:2 = 191$ $\rightarrow 190 \times 10^2 = 1.9 \times 10^4$
	208	17			
Nº 4	322	23		3×10^4	$322 + 278 = 600:2 = 300 \rightarrow$ $\times 10^2 = 3 \times 10^4$
	278	29			
Nº 5	296	40		3.3×10^4	$296 + 373 = 674:2 = 337 \rightarrow 340 \times 10^2 = 3.4 \times 10^4$
	378	24	< 2		$40 + 24 = 64:2 = 32 \rightarrow 32 \times 10^3 = 3.2 \times 10^4$
Nº 6	327	18		2.7×10^4	$3.4 \times 10^4 / 3.2 \times 10^4 < 2 \rightarrow 10^4 \times (3.4 + 3.2) / 2 = 3.3 \times 10^4$ $327 + 330 = 657:2 = 328 \rightarrow 330 \times 10^2 = 3.3 \times 10^4$
	330	25	< 2		$18 + 25 = 43:2 = 21.5 \rightarrow 21 \times 10^3 = 2.1 \times 10^4$ $3.3 \times 10^4 / 2.1 \times 10^4 \rightarrow 10^4 \times (3.3 + 2.1) / 2 = 2.7 \times 10^4$
Nº 7	en difusión	18			$18 + 24 = 42:2 = 21 \rightarrow 21 \times 10^3 = 2.1 \times 10^4$
	en difusión	24			

¹ Este cuadro es todavía objeto de estudio por la Comisión del Codex Alimentarius.

3.3 PRODUCTOS DE HUEVO - ENUMERACION DE BACTERIAS COLIFORMES; DETERMINACION DEL NUMERO MAS PROBABLE (NMP) (METODO DE REFERENCIA)**1. AMBITO DE APLICACION**

Método de referencia para la detección de bacterias coliformes en productos de huevo.

2. CAMPO DE APLICACION

El método puede aplicarse a productos de huevo entero desecados o congelados regulados por el Código de Prácticas de Higiene para productos de huevo.

3. REFERENCIA

Thatcher, F.S. y Clark, D. S., ed (1968): Microorganisms in Foods. Their Significance and Methods of Enumeration, Toronto, University of Toronto Press.

4. DEFINICION

Se entiende por bacterias coliformes los microorganismos que forman gas en los dos medios descritos a continuación, cuando se efectúa el ensayo de conformidad con el método.

5. PRINCIPIO**5.1 ENRIQUECIMIENTO**

Inoculación en tubos de un medio de enriquecimiento con el homogenado nutritivo (1 en 10) y diluciones decimales.

Incubación de este medio a 37°C durante 48 horas.

5.2 CONFIRMACION

De tubos con formación de gas, inocular en un medio de confirmación en tubos.

Incubar estos tubos de confirmación a 37°C durante 48 horas y calcular basándose en un cuadro el número más probable de bacterias coliformes por gramo del producto de huevo.

6. MEDIOS DE CULTIVO, DILUYENTES Y REACTIVOS**6.1 MATERIALES BASICOS**

Para obtener resultados uniformes, se recomienda utilizar, o bien, componentes deshidratados del medio de cultivo de calidad uniforme y productos químicos de calidad analítica o bien, un medio completo deshidratado. El agua empleada deberá ser agua destilada o agua de pureza por lo menos equivalente.

Cuando se empleen medios completos deshidratados, deberán seguirse rigurosamente las instrucciones del fabricante.

Si los medios no se utilizan el día de la preparación, mantenerlos en la oscuridad a +5°C durante un mes como máximo, tomando precauciones para evitar la evaporación.

6.2 MEDIOS DE CULTIVO**6.2.1 Agua de Peptona Amortiguada**

Composición	
peptona	10,0g
Cloruro de sodio	5,0 g
hidrogen fosfato disódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$)	9,0 G
dihidrogen fosfato potásico (KH_2HPO_4)	1,5 g
agua	1000 ml

Preparación

Disolver los componentes hirviéndolos en agua. Ajustar el pH para que, después del autoclave, sea de $7,0 \pm 0,1$ a 20°C . Pasar a tubos o botellas de dilución en porciones de 9 ml.

Esterilizar durante 20 minutos a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

6.2.2 Caldo de Triptosa y Sulfato de Laurilo

Composición	
triptosa, triptona o tripticasa	20,0 g
lactosa	5,0 g
monohidrogen fosfato de potasio (K_2HPO_4)	2,75 g
dihidrogen fosfato de potasio (KH_2PO_4)	2,75 g
cloruro de sodio	5,0 g
sulfato de laurilo y sodio	0,1 g
agua	1000 ml

Preparación

Disolver los ingredientes en agua y pasar en porciones de 10 ml a tubos (por ejemplo de 18 mm x 180 mm) (7.3) que contienen ampollas de fermentación Durham invertidas (10 mm x 75 mm) (7.4). Esterilizar en autoclave a 121°C durante 10 minutos. El pH final deberá ser de 6,8 aproximadamente.

6.2.3 Caldo de Verde Brillante, Lactosa y Bilis al 2%

Nota: Para la preparación de solución de bilis de buey y solución verde brillante, véase el Método de Referencia para Salmonella.

Composición	
peptona	10,0 g
lactosa	10,0 g
bilis de buey	20,0 g
verde brillante	0,0133 g
agua	1000 ml

Preparación

Disolver la peptona y lactosa en 500 ml de agua y añadir bilis de buey disuelta en 200 ml de agua. Aumentar el volumen con agua hasta unos 975 ml y ajustar el pH a 7,4

Añadir 13,3 ml de solución acuosa al 1% de verde brillante, elevar el volumen total a un litro, agitar y filtrar a través de algodón si es necesario.

Dispersar porciones de 10 ml en tubos (por ejemplo de 18 mm x 180 mm) (7.3) que contienen ampollas de fermentación Durham invertidas (10 mm x 75 mm) (7.4). Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 10 minutos.

7. APARATOS Y RECIPIENTES DE VIDRIO

Equipos normalizado de laboratorio y especialmente:

Aparatos para esterilizar los recipientes de vidrio, medios de cultivo, etc.

Incubador regulado a 37° ±1°C.

Tubos para esterilizar y almacenar medios de cultivo.

Ampollas Durham (para insertar en 7.3)

Pipetas de flujo total, con capacidad nominal de 1 ml y graduadas en partes de 0,1 ml.

Esterilización de los recipientes de vidrio

Esterilizar los recipientes de vidrio mediante uno de los métodos siguientes:

1. esterilización en seco a 170°C como mínimo, durante una hora por lo menos;
2. esterilización en húmedo a 121°C como mínimo, durante 20 minutos por lo menos.

8. MUESTREO

Proceder a partir de muestras tomadas in situ a 200 g (véanse párrafos 1 y 2 al comienzo del Anexo 2).

Las muestras congeladas deberán mantenerse congeladas hasta el análisis.

9. PROCEDIMIENTO

9.1 PREPARACION DE LA UNIDAD DE MUESTRA, DEL HOMOGENADO NUTRITIVO (1 EN 10) Y DE LAS DILUCIONES DECIMALES

Para el tratamiento previo de la muestra, la unidad de muestra y la mezcla para obtener el homogenado nutritivo (1 en 10), véase el método para Salmonella, Secciones 9.1, 9.2 y 9.3 del párrafo 3.1.

9.1.1 Dilución

Mezclar el contenido de la jarra agitándolo y pasar con una pipeta (7.5) 1 ml a un tubo que contiene 9 ml de fluido de dilución (6.2.1).

Mezclar los líquidos con cuidado aspirando 10 veces con una pipeta.

Con la misma pipeta, pasar 1,0 ml a otro tubo de dilución que contiene 9 ml de fluido de dilución y mezclar con una piedra nueva.

Repetir las operaciones 9.1.2.2 y 9.1.2.3 hasta que se haga el número necesario de diluciones. Cada dilución sucesiva hará que la concentración sea diez veces menor.

9.2 INOCULACION DEL MEDIO DE ENRIQUECIMIENTO

Tomar tres tubos de caldo de triptosa y sulfato de laurilo (6.2.2). Con una pipeta esterilizada (7.5) pasar a cada uno de estos Tubos 1 ml del homogenado nutritivo (1 en 10).

Tomar otros tres tubos de caldo de triptosa y sulfato de laurilo (6.2.2). Con una nueva pipeta esterilizada, pasar a cada uno de estos tubos 1 ml del contenido del primer tubo de dilución.

Realizar la misma operación con el último tubo de dilución.

9.3 INCUBACION DE LOS TUBOS

Incubar los tubos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 a 48 horas.

9.4 LECTURA DE LOS TUBOS DE ENRIQUECIMIENTO

Después de 24 horas, registrar los tubos indicando la producción de gas y proceder con los tubos de operación 9.5 Volver a incubar los tubos negativos y leerlos después de 48 horas. Tomar nota de los tubos indicando la producción de gas y proceder a la operación 9.5.

9.5 CONFIRMACION DE COLIFORMES

Confirmar que los tubos de caldo de triptosa y sulfato de laurilo elegidos en la operación 9.4 son positivos en cuanto a bacterias coliformes, pasando con un alambre anular de inoculación una porción de cada uno de ellos a tubos separados de caldo de bilis, lactosa y verde brillante al 2% (6.2.3).

9.6 INCUBACION DE LOS TUBOS DE CONFIRMACION

Incubar los tubos de confirmación durante 48 horas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ y tomar nota de la producción de gas.

9.7 LECTURA DE LOS TUBOS DE CONFIRMACION

La formación de gas confirma la presencia de bacterias coliformes.

9.8 REGISTRO DEL NUMERO DE TUBOS DE CONFIRMACION POSITIVOS

Registrar el número de tubos de enriquecimiento (9.4) de cada dilución que se han confirmando como positivos en cuanto a bacterias coliformes.

Si, por ejemplo, el número de tubos positivos en las tres diluciones es 3,1, y 0, respectivamente, los resultados se registran como dilución 1:10 = 3, dilución 1:100=1, y dilución 1:1000 = 0

10. EXPRESION DE LOS RESULTADOS**10.1 METODO DE CALCULO**

Para obtener el número más probable (NMP) de bacterias coliformes, proceder como sigue:

Remitirse al cuadro NMP (Cuadro 1) y señalar el NMP apropiado para el número de tubos positivos. Por ejemplo en el caso indicado en 9.8 supra, los valores para cada dilución son 3, 1 y 0 respectivamente. El cuadro muestra que estos resultados indican un NMP de 40 por gramo del producto de huevo.

11. INFORME DEL ENSAYO

Indicar el método de ensayo citando el presente Método de Referencia.

El informe de ensayo debe facilitar la información necesaria para la identificación completa de la muestra.

Cuadro 1 Número más probable (NMP) de bacterias Coliformes de Productos de Huevo por gramo ¹					
Resultado	NMP	Límites de confianza			
		99%		95%	
010	3	< 1	23	< 1	17
100	4	< 1	28	1	21
101	7	1	35	2	27
110	7	1	36	2	28
120	11	2	44	4	35
200	9	1	50	2	38
201	14	3	62	5	48
210	15	3	65	5	50
211	20	5	77	8	61
220	21	5	80	8	63
300	23	4	177	7	129
301	40	10	230	10	180
310	40	10	290	20	210
311	70	20	370	20	280
320	90	20	520	30	390
321	150	30	660	50	510
322	210	50	820	80	640
330	200	<100	1900	100	1400
331	500	100	3200	200	2400
332	1100	200	6400	300	4800

El cuadro contiene solamente los resultados más probables que se obtendrían en el 95% de los casos con series de cinco ensayos. Si uno de los resultados no figura en el cuadro, es sumamente improbable que sea aceptable y deberán repetirse las series de cinco ensayos.

¹ El cuadro de NMP que se reproduce aquí está calculado según: J.C. de Man (1975). The Probability o Most Probable Numbers. European J. Appl. Microbiol 1,67-68.

² ⁿ = Número de Unidades de muestra que se va a examinar . m= Este valor u otros inferiores no son motivos de preocupación. M = De Excederse esta valor se rechaza el lote . c = Número máximo de unidades de muestra con valores entre m y M para que el lote sea aceptable. Estos criterios se emplean para describir planes de tres clases. En un plan de dos clases M no es aplicable.

³ Se entiende por lote una cantidad de alimentos producida en condiciones idénticas cuyos envases deben llevar todos ellos un número de lote que identifique la producción durante un determinado período de tiempo, y que procede normalmente en una determinada "línea" o de otra unidad crítica de elaboración.

4. PLANES DE MUESTREO Y LIMITES MICROBIOLOGICOS**4.1 HUEVOS ENTEROS DESECADOS Y CONGELADOS**

Salmonella:

1. No deberán detectarse microorganismos Salmonella de ninguna de las diez unidades de muestra examinadas cuando el ensayo se efectúe de conformidad con el método descrito ($n = 10$, $c = 0$, $m = 0$).²
2. En los productos destinados a fines alimentarios especiales, no deberán detectarse microorganismos Salmonella de ninguna de las 30 unidades de muestra examinadas ($n = 30$, $c = 0$, $m = 0$).³

Bacterias aerobias mesofílicas:

No deberán detectarse bacterias aerobias mesofílicas de ninguna de las cinco unidades de muestra examinadas, cuando el ensayo se efectúe de conformidad con el método descrito y el número exceda de un millón por gramo, ni cuando el número exceda de 50 000 por gramo y proceda de tres o más de las cinco unidades de muestra examinadas: ($n = 5$, $c = 2$, $m = 5 \times 10^4$, $M = 10^6$).¹

Bacterias coliformes:

No deberán detectarse bacterias coliformes de ninguna de las cinco unidades de muestra examinadas, cuando el ensayo se efectúe de conformidad con el método descrito y el número exceda de 1 000 por gramo, ni cuando el número exceda de 10 por gramo y proceda de tres o más de las cinco unidades de muestra examinadas. ($n = 5$, $c = 2$, $m = 10$, $M = 10^3$).¹

4.2 OTROS PRODUCTOS DE HUEVO

Salmonella:

No deberán detectarse microorganismos Salmonella de ninguna de las unidades de muestra examinadas, cuando el ensayo se efectúe de conformidad con el método descrito ($n = 10$, $c = 0$, $m = 0$).¹

En productos destinados a fines alimentarios especiales, no deberán detectarse microorganismos Salmonella de ninguna de las 30 unidades de muestra examinadas ($n = 30$, $c = 0$, $m = 0$).¹

- FIN DE LA NORMA -

2°.- El presente Acuerdo entrará en vigencia a partir del día de su publicación en el Diario Oficial.- COMUNIQUESE.- (Rubricado por el Señor Presidente de la República).- MIGUEL E. LACAYO, MINISTRO DE ECONOMIA.

¹ Se entiende por lote una cantidad de alimentos producida en condiciones idénticas cuyos envases deben llevar todos número de lote que identifique la producción durante un determinado período de tiempo, y que procede normalmente en una determinada "línea" o de otra unidad crítica de elaboración.