

11-19-97 NORMA Oficial Mexicana NOM-143-SSA1-1995, Bienes y servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*.

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

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-143-SSA1-1995, BIENES Y SERVICIOS.
METODO DE PRUEBA MICROBIOLOGICO PARA ALIMENTOS. DETERMINACION
DE LISTERIA MONOCYTOGENES.

JOSE MELJEM MOCTEZUMA, Director General de Calidad Sanitaria de Bienes y Servicios, por acuerdo del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en el artículo 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 3o. fracción XXII, 13 apartado A fracción I, 194 fracción I, 197, 401 Bis, 401 Bis 1, 401 Bis 2 de la Ley General de Salud; 3o. fracción XI, 38 fracción II, 40 fracciones I, VIII, XI, XIII, 41, 43, 46, 47 y 53 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 40 y demás relativos del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios; y 21 fracción II del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud, y

CONSIDERANDO

Que con fecha 3 de junio de 1996, en cumplimiento de lo previsto en el artículo 46 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, la Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios presentó al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario el anteproyecto de la presente Norma Oficial Mexicana.

Que con fecha 19 de septiembre de 1996, en cumplimiento del acuerdo del Comité y lo previsto en el artículo 47 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, se publicó en el Diario Oficial de la Federación el proyecto de la presente Norma Oficial Mexicana, a efecto de que dentro de los siguientes noventa días naturales posteriores a dicha publicación, los interesados presentaran sus comentarios al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario.

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

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

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-143-SSA1-1995, BIENES Y SERVICIOS.
METODO DE PRUEBA MICROBIOLOGICO PARA ALIMENTOS. DETERMINACION
DE LISTERIA MONOCYTOGENES.

PREFACIO

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

SECRETARIA DE SALUD

Dirección General de Calidad Sanitaria de Bienes y Servicios

Laboratorio Nacional de Salud Pública

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

Unidad de Control Técnico de Insumos

INSTITUTO NACIONAL DE DIAGNOSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLOGICA

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

PROCURADURIA FEDERAL DEL CONSUMIDOR

Dirección General de Investigación Tecnológica

CENTRO DE CONTROL TOTAL DE CALIDADES, S.A. DE C.V.
SOCIEDAD MEXICANA DE NORMALIZACION Y CERTIFICACION, S.C.
NORMEX

INDICE

1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION
2. FUNDAMENTO
3. REFERENCIAS
4. DEFINICIONES
5. SIMBOLOS Y ABREVIATURAS
6. REACTIVOS, MEDIOS DE CULTIVO Y MATERIALES
7. APARATOS E INSTRUMENTOS
8. PREPARACION DE LA MUESTRA
9. PROCEDIMIENTO
10. EXPRESION DE RESULTADOS
11. INFORME DE LA PRUEBA
12. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES
13. BIBLIOGRAFIA
14. OBSERVANCIA DE LA NORMA
15. VIGENCIA

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta Norma Oficial Mexicana establece el método microbiológico para determinar la presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos.

1.2 Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el Territorio Nacional para las personas físicas o morales que requieran efectuar este método en productos nacionales y de importación, para fines oficiales.

2. Fundamento

El método para detectar la presencia de *L. monocytogenes* se basa en el aislamiento y la diferenciación de especies de *Listeria spp.*, principalmente por la fermentación de carbohidratos y la actividad hemolítica de los miembros de este género.

3. Referencias

Esta Norma se complementa con lo siguiente:

NOM-110-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

4. Definiciones

Para fines de esta norma se entiende por:

4.1 b-hemólisis, zona transparente alrededor de la colonia debida a la lisis total del eritrocito.

4.2 *Listeria monocytogenes*, bacilo corto, Grampositivo, no esporulado, móvil, aerobio, capaz de crecer en condiciones de microaerofilia, catalasa positivo y oxidasa negativo. En agar sangre da origen a colonias puntiformes, circulares, lisas y translúcidas de color azul grisáceo con una zona discreta de b-hemólisis.

5. Símbolos y abreviaturas

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

ATCC American Type Culture Collection

b beta

°C grado Celsius

CIP Culture International Production

g gramo

h hora

kg kilogramo

l	litro
M	molar
mg	miligramo
ml	mililitro
mm	milímetro
N	normal
NCTC	National Culture Type Collection
p	peso
pH	potencial de hidrógeno
spp	especies plurales
μm	micrómetro
v	volumen
x	signo de multiplicación
±	más menos
/	por
%	por ciento

6. Reactivos, medios de cultivo y materiales

6.1 Reactivos

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico.

Cuando se indica agua, debe entenderse que se trata de agua destilada.

Acido acético 5 N

Acido clorhídrico 1 M

Acido sulfanílico (cristales)

Alfa-naftilamina

Alfa-naftol 5% en etanol absoluto

Etanol absoluto

Granalla de zinc

Hidróxido de sodio 1 M

Lactamato de glicil-glicina (anhídrido de glicina)

Regulador de fosfatos glicerinado con pH $9,0 \pm 0,2$

Sangre de carnero desfibrinada

Solución al 3% de peróxido de hidrógeno

Solución salina fisiológica 0,85% estéril

Sueros comerciales para tipificación de *Listeria* spp

Sulfato de cadmio al 20%

Zinc pulverizado

6.1.1 Reactivos para Tinción de Gram

6.1.1.1 Alcohol-acetona

Ingredientes	Cantidad
--------------	----------

Etanol (95%)	700,0 ml
--------------	----------

Acetona	300,0 ml
---------	----------

Mezclar ambos líquidos.

6.1.1.2 Cristal violeta

Solución A

Ingredientes	Cantidad
--------------	----------

Cristal violeta	2,0 g
-----------------	-------

Etanol (95%)	20,0 ml
--------------	---------

Disolver el cristal violeta en el etanol.

Solución B

Ingredientes	Cantidad
--------------	----------

Oxalato de amonio 0,8 g

Agua 80,0 ml

Disolver el oxalato de amonio en el agua.

Después de preparar las soluciones A y B, verter una en la otra y agitar hasta que se mezclen perfectamente.

6.1.1.3 Solución de Yodo

Ingredientes	Cantidad
--------------	----------

Yodo	1,0 g
------	-------

Yoduro de potasio	2,0 g
-------------------	-------

Agua	300,0 ml
------	----------

Triturar finamente el yodo y el yoduro de potasio en un mortero, de ser posible en una campana de extracción. Añadir una pequeña cantidad de agua para lavar el material, agregar el resto del agua y agitar.

Nota: ¡Evitar el contacto de los reactivos con la piel!

6.1.1.4 Solución de Safranina

Ingredientes	Cantidad
--------------	----------

Safranina	0,25 g
-----------	--------

Etanol (95%)	10,00 ml
--------------	----------

Agua	100,00 ml
------	-----------

Disolver la safranina en el etanol, mezclar, agregar el agua y volver a agitar. Filtrar la solución con papel filtro.

6.1.2 Reactivos para la determinación de nitritos

6.1.2.1 Reactivo A

Ingredientes	Cantidad
--------------	----------

Alfa-naftilamina	0,5 g
------------------	-------

Acido acético 5N	100,0 ml
------------------	----------

6.1.2.2 Reactivo B

Ingredientes	Cantidad
--------------	----------

Acido sulfanílico	1,0 g
-------------------	-------

Acido acético 5N	125,0 ml
------------------	----------

6.1.2.3 Reactivo C

Ingredientes	Cantidad
--------------	----------

Alfa-naftol	1,0 g
-------------	-------

Acido acético 5N	200,0 ml
------------------	----------

6.1.2.4 Solución de sulfato de cadmio al 20%

Colocar granallas de zinc en solución de sulfato de cadmio al 20% de 4 a 6 h. Disolver el precipitado de cadmio, adicionando ácido clorhídrico 1N.

6.2 Medios de cultivo

A continuación se presentan las fórmulas y los procedimientos para preparar los medios empleados en este análisis microbiológico. En caso de disponer de fórmulas comerciales deshidratadas se deben seguir las instrucciones del fabricante para su preparación.

6.2.1 Caldo soya tripticaseína con 0,6 % de extracto de levadura (CSTEL)

Ingredientes	Cantidad
--------------	----------

Caldo soya tripticaseína	30,0 g
--------------------------	--------

Extracto de levadura	6,0 g
----------------------	-------

Agua	1000,0 ml
------	-----------

Agitar hasta disolver los ingredientes. Esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min. El pH final de la solución debe ser $7,3 \pm 0,2$.

6.2.2 Caldo de enriquecimiento (EB) pH 7,3

Un litro de caldo soya tripticaseína con extracto de levadura (CSTEL) debe contener los siguientes suplementos:

Suplementos	Cantidad
Clorhidrato de acriflavina	15,0 mg
Acido nalidíxico (sal sódica)	40,0 mg
Cicloheximida	50,0 mg
Acido pirúvico (sal sódica)	
solución al 10 % (p/v) *	11,1 ml

Preparar los suplementos de acriflavina y nalidíxico a partir de una solución al 0,5 % (p/v) con agua.

El suplemento de cicloheximida prepararlo como una solución al 1,0 % (p/v) en una solución al 40 % (v/v) de etanol en agua.

Esterilizar por filtración los suplementos.

Agregar en condiciones asépticas los suplementos al medio CSTEL previamente esterilizado, justo antes de su uso.

Para la preparación de un litro del medio CSTEL se debe partir de las soluciones anteriores, agregando las siguientes cantidades:

3,0 ml de acriflavina, 8,0 ml de ácido nalidíxico y 5,0 ml de solución de cicloheximida.

Precaución: ¡La cicloheximida es una sustancia química altamente tóxica, durante su manejo deben emplearse guantes, lentes de protección y lavarse las manos inmediatamente después de usarla!

6.2.3 Medio de cloruro de litio feniletanol-moxolactam (LMP)

Ingredientes	Cantidad
Agar fenil etanol	35,5 g
Glicina anhidra	10,0 g
Cloruro de litio	5,0 g
Solución de moxolactam al 1 % en amortiguador de fosfatos pH 6,0	2,0 ml
Agua	1000,0 ml

Esterilizar el medio (sin moxolactam) en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min. Enfriar de 48 a 50°C y agregar la solución de moxolactam previamente esterilizada por filtración.

Distribuir volúmenes de 12 a 15 ml del medio en cajas de Petri estériles. Las placas delgadas facilitan la observación de las colonias.

6.2.4 Medio Oxford

6.2.4.1 Medio base Oxford (OXA)

Ingredientes	Cantidad
Base de agar Columbia	39,0 g
Esculina	1,0 g
Citrato férrico amónico	0,5 g
Cloruro de litio	15,0 g
Agua	1000,0 ml

Agregar los ingredientes a un litro de agua y llevar a ebullición hasta disolución completa.

Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min.

Enfriar a 50°C el medio base y en condiciones asépticas agregar los suplementos.

Un litro de medio Oxford debe contener los siguientes suplementos:

Suplementos	Cantidad
Cicloheximida	400 mg
Sulfato de colistina	20 mg
Acriflavina	5 mg
Cefotetán	2 mg

Fosfomicina 10 mg

Disolver la cicloheximida, el sulfato de colestina, acriflavina, cefotetán y la fosfomicina en 10 ml de una mezcla 1:1 de etanol: agua. Esterilizar por filtración antes de agregar al medio base. Mezclar y vaciar en cajas Petri estériles.

Las placas del medio Oxford se pueden almacenar como máximo dos semanas.

6.2.5 Agar soya tripticaseína con 0,6% de extracto de levadura (ASTEL)

Ingredientes Cantidad

Agar soya tripticaseína 40,0 g

Extracto de levadura 6,0 g

Agua 1000,0 ml

Agitar y calentar a ebullición hasta disolver el agar. Esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min.

pH final $7,3 \pm 0,2$.

6.2.6 Agar sangre de carnero

Ingredientes Cantidad

Base de agar sangre 95,0 ml

Sangre de carnero desfibrinada 5,0 ml

Preparar el agar base de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Enfriar a $45 \pm 2^\circ\text{C}$ y agregar asépticamente la sangre de carnero, la cual previamente se debe encontrar a temperatura ambiente ($20 - 25^\circ\text{C}$). Homogeneizar el medio y verter en las cajas Petri estériles de 12 a 15 ml para la prueba de CAMP y de 15 a 20 ml para la prueba de hemólisis.

6.2.7 Caldo nitratos

Ingredientes Cantidad

Nitrato de potasio 1,0 g

Cloruro de sodio 0,5 g

Peptona 2,0 g

Agua 1000,0 ml

Agregar los ingredientes a un litro de agua, agitar hasta disolución completa. Verter en tubos de 13 x 100 mm con tapón de rosca. Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min.

6.2.8 Medios para la prueba de movilidad

6.2.8.1 Medio de SIM

Ingredientes Cantidad

Peptona de caseína 20,0 g

Peptona de carne 6,1 g

Sulfato de fierro y amonio 0,2 g

Tiosulfato de sodio 0,2 g

Agar 3,5 g

Agua 1000,0 ml

Agitar y calentar a ebullición hasta disolver el agar. Envasar en porciones de 4 ml en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min. pH final $7,3 \pm 0,2$.

6.2.8.2 Medio MTM

Ingredientes Cantidad

Extracto de carne 3,0 g

Peptona 10,0 g

Cloruro de sodio (NaCl) 5,0 g

Agar 4,0 g

Agua 1000,0 ml

Agitar y calentar a ebullición hasta disolver el agar. Envasar en porciones de 4 ml en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min. pH final $7,4 \pm 0,2$.

6.2.9 Caldo púrpura para fermentación de carbohidratos

Ingredientes Cantidad

Proteosa peptona No. 3 10,00 g
Cloruro de sodio 5,00 g
Extracto de carne 1,00 g
Púrpura de bromocresol 0,02 g
Agua 1000,00 ml

Calentar si es necesario para disolver los ingredientes. Esterilizar en autoclave durante 15 min. a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ pH final $6,8 \pm 0,2$.

Agregar la solución del carbohidrato, previamente esterilizada, por filtración en cantidad suficiente para obtener una concentración final de 0,5 %.

Nota: Los sistemas bioquímicos comerciales validados pueden usarse como alternativa para las pruebas bioquímicas convencionales.

6.3 Materiales

Aceite de inmersión

Asas bacteriológicas

Cajas Petri

Cubreobjetos

Matraces Erlenmeyer de 500 ml

Lámpara de luz blanca

Lápiz graso o marcador

Lupa de bajo aumento

Pipetas volumétricas de 25, 10 y 1,0 ml

Portaobjetos escabado

Portaasas

Tubos de 16 x 125 mm

Tubos de 13 x 100 mm u otros con tapón de rosca

Sistema de filtración con membranas con un tamaño de poro de $0,45 \mu\text{m}$

7. Aparatos e instrumentos

Se requiere además de lo mencionado en la NOM-110-SSA1-1994, Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico, lo siguiente:

Incubadoras con termostato que evite variaciones mayores de $\pm 1,0^\circ\text{C}$, provista con termómetro calibrado.

Microscopio de contraste de fases con objetivo de inmersión en aceite (100 X) o microscopio de campo oscuro.

8. Preparación de la muestra

Para la preparación de la muestra seguir la NOM-110-SSA1-1994, Preparación y Dilución de muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

9. Procedimiento

Este método debe realizarlo un microbiólogo experimentado, en un ambiente controlado, aislado de áreas de producción de alimentos.

Se debe tener especial cuidado en la disposición de aquellos materiales y equipo que hayan estado en contacto con alimentos sospechosos, antes de desecharlos o volver a utilizarlos.

Esta técnica por ningún motivo debe aplicarla personal inmunocomprometido ya sea por enfermedad o por el uso de medicamentos, mujeres embarazadas o personas de edad avanzada.

9.1 Procedimiento de enriquecimiento

Tomar una muestra representativa del alimento, tanto de la superficie externa como del interior

Colocar 25 ml o 25 g de la muestra en un recipiente conteniendo 225 ml de medio de enriquecimiento (EB), homogeneizar e incubar por 48 h a 30°C .

En el caso de muestras en donde se sospecha que tienen células de *Listeria* spp dañadas, se recomienda la incubación en un caldo de enriquecimiento que contenga piruvato de sodio al 0,1 % (p/v) incubado a 30°C por 6 h sin suplementos. Después de las 6 h de incubación los suplementos deben agregarse y continuar la incubación a 30°C hasta un total de 48 h.

9.1.1 Aislamiento

Después de 24 y 48 h de incubación en el medio EB, resembrar en los medios LMP y OXA. Incubar las placas del medio LMP a 30°C por 24 a 48 h y las de medio OXA a 35°C por el mismo periodo.

Observar el crecimiento en las placas del medio LMP con luz blanca en un ángulo de 45° (iluminación de Henry), a simple vista o con la ayuda de una lupa. En este medio generalmente aparecen las colonias de color blanco o azul iridiscentes. Ver la figura 1.

En el medio OXA las colonias de *Listeria* son negras, con halo negro. Algunas colonias pueden aparecer con un tono café oscuro que se define mejor a los siete días de incubación. Seleccionar cinco o más colonias típicas del medio de OXA o LMP y pasar a placas de medio ASTEL. Este paso es importante debido a que las colonias aparentemente aisladas en los medios OXA y LMP pueden estar contaminadas con flora competitiva parcialmente inhibida, invisible a simple vista.

Debido a que puede estar presente más de una especie de *Listeria* en la muestra, deben identificarse como mínimo cinco colonias.

Ver imagen (dar doble click con el ratón)

9.2 Identificación

Se deben utilizar cepas de referencia positivas y negativas para cada una de las pruebas. Seleccionar colonias típicas y sembrar en medio ASTEL. Incubar a 35°C por 24 h. Estos cultivos pueden mantenerse a 4°C y utilizarse como inóculo para realizar las pruebas de identificación.

9.2.1 Prueba de movilidad en fresco

Hacer preparaciones en fresco (en gota suspendida o entre porta y cubreobjetos) utilizando solución salina al 0,85%. La suspensión debe ser densa y emulsificarse completamente, y observar con objetivo de inmersión en un microscopio de contraste de fase o microscopio de campo oscuro.

Las células de *Listeria* spp son bacilos cortos con movilidad rotatoria o como si brincaran.

Los bacilos con movimientos rápidos no son *Listeria* spp.

9.2.2 Prueba de catalasa

Emulsificar un cultivo puro, con una gota de solución de peróxido al 3%.

La formación inmediata de burbujas indica que la prueba es positiva.

Las especies de *Listeria* son catalasa positivo.

¡Precauciones, la emulsión debe realizarse con una asa de plástico o palillo de madera estéril evitando el contacto del metal con el reactivo. Si las colonias provienen de agar base con sangre. Cualquier contaminación de eritrocitos puede dar pruebas falsas positivas!

9.2.3 Tinción de Gram

Hacer una tinción de Gram de cultivos de 16 a 24 h. Todas las especies de *Listeria* son bacilos cortos Grampositivo; sin embargo en cultivos viejos pueden presentarse como formas cocoides. En extensiones delgadas se observan de color pálido y pueden confundirse con *Bacteroides* spp.

9.2.4 Prueba de hemólisis

Dibujar una cuadrícula de 20 a 25 espacios en el fondo de la placa de agar sangre de carnero al 5%. Inocular por picadura un cuadro por cada cultivo. Incubar por 48 h a 35°C. Al inocular, observar la reacción hemolítica en las placas. *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* producen una

zona ligeramente clara alrededor del punto de picadura. Confirmar las reacciones dudosas con la prueba de CAMP.

9.2.5 Prueba de reducción de nitratos

Inocular los tubos conteniendo caldo nitratos, incubar a 35°C por 5 días. Para la lectura se debe agregar 0,2 ml del reactivo A y 0,2 ml del reactivo B, un color rojo indica una prueba positiva (presencia de nitritos). Si esta coloración no se observa, adicionar zinc en polvo. El desarrollo de color rojo después de una hora confirma una prueba negativa (presencia de nitratos).

En forma alternativa adicionar al cultivo en caldo nitratos 0,2 ml del reactivo B y 0,2 ml del reactivo C. Un color naranja indica una prueba positiva (presencia de nitritos). Si esta coloración no se observa, adicionar 0,2 ml del reactivo de cadmio, el desarrollo de un color naranja confirma una prueba negativa (presencia de nitratos). Este procedimiento alternativo elimina el uso del alfa - naftilamina, que es carcinogénica.

9.2.6 Prueba de movilidad en agar

Inocular el medio SIM o MTM, incubar por 7 días a temperatura ambiente (20-25°C), observar diariamente. Las especies de *Listeria* son móviles, dando un crecimiento típico en forma de paraguas.

9.2.7 Prueba de utilización de carbohidratos

Inocular tubos de caldo púrpura para fermentación de carbohidratos al 0,5 %: dextrosa, esculina, maltosa, ramnosa, manitol y xilosa. Incubar 7 días a 35°C. Una coloración amarilla indica una prueba positiva. Todas las especies de *Listeria* dan positivas las pruebas para dextrosa, esculina y maltosa. Consultar el cuadro 1 para reacciones con ramnosa, xilosa y manitol. Si la pigmentación prematura del aislamiento en el medio OXA no deja lugar a duda, el ensayo de esculina puede omitirse.

9.2.8 Prueba de Cristie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP)

Para la prueba de CAMP se emplean las siguientes cepas de colección de *S. aureus* y *R. equi*:

Staphylococcus aureus *Rhodococcus equi*

ATCC 49444 ATCC 6339

NCTC 7428 NCTC 1621

ATCC 25923

CIP 5710

Las cepas empleadas en la prueba de CAMP pueden obtenerse de diversas colecciones nacionales e internacionales.

En una placa de agar sangre de carnero sembrar una estría de la cepa de *S. aureus* y, paralelamente una de *R. equi*, separadas lo suficiente para que entre éstas se puedan estriar perpendicularmente las cepas sospechosas de *Listeria*, sin que lleguen a tocarse (aproximadamente 5 mm de separación). Después de 24 y 48 h de incubación a 35°C observar el sinergismo entre las hemolisinas de *S. aureus*, *R. equi* y *Listeria* que se manifiesta como una zona hemolítica más intensa.

La figura 2 muestra la disposición de las estrías de los cultivos en una placa para la prueba de CAMP. La hemólisis de *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* se incrementa cerca de la estría de *S. aureus*, y la hemólisis de *L. ivanovii* se aumenta cerca de la estría de *R. equi*. Las especies restantes no son hemolíticas en esta prueba.

Ver imagen (dar doble click con el ratón)

Prueba de CAMP para *Listeria monocytogenes*:

Diseño de la inoculación en placas de agar sangre de carnero. Las líneas horizontales representan las estrías de la inoculación de cinco cepas. Las líneas verticales representan las

estrías de inoculación de *S. aureus* (S) y *R. equi* (R). Las líneas sombreadas indican el incremento de hemólisis en esas regiones.

Cuadro 1. Diferenciación de las Especies de *Listeria*

Especies	Hemolítico		Reducción		Producción de CAMP			
	(beta)a nitratosácidos de							
M	R	X	S.a	R.e				
<i>L. monocytogenes</i>		+	-	-	+	-	+	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	-	-	+	-	+	
<i>L. innocua</i>	-	-	-	bV	-	-	-	
<i>L. welshimeri</i>	-	-	-	bV	+	-	-	
<i>L. seeligeri</i>	+	-	-	-	+	+1	-	
<i>L. grayi</i>	-	bV	+	bV	-	-	-	

a Sangre de carnero desfibrinada

bV Variable

L. grayi incluye ahora las cepas de la especie *L. murrayi* reductoras de nitratos y ramnosa variable

M Manitol

R Ramnosa

X Xilosa

S.a *Staphylococcus aureus*

R.e *Rhodococcus equi*

9.3 Serología

La determinación de los tipos serológicos de *Listeria* se aplica cuando las consideraciones epidemiológicas sean cruciales.

Inocular en caldo de triptosa por 24 h a 35°C. Transferir a dos tubos de agar inclinado de triptosa e incubar 24 h a 35°C. Para realizar la prueba se pueden utilizar sueros comerciales, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cuadro 2. Serología de las especies de *Listeria*

Especies	Serotipo
<i>L. monocytogenes</i>	1/2A, 1/2B, 1/2C 3A, 3B, 3C 4A, 4AB, 4B 4C, 4D, 4E, "7"

L. ivanovii 5

L. innocua 4AB, 6A, 6B, Un a

L. welshimeri 6A, 6B

L. seeligeri 1/2B, 4C, 4D, 6B, Un a

10. Expresión de resultados

Comparar los resultados obtenidos con el cuadro 1 y determinar el género y especie de las cepas aisladas. La correspondencia de resultados con el cuadro anterior indica la presencia del género *Listeria*.

El único miembro del género *Listeria* de importancia para esta norma es *Listeria monocytogenes*.

11. Informe de la prueba

Cuando los resultados sean positivos para *L. monocytogenes* informar la presencia en 25 g o 25 ml de muestra. Y si los resultados son negativos informar ausencia en 25 g o 25 ml de muestra.

12. Concordancia con normas internacionales

Esta norma no tiene concordancia con normas internacionales.

13. Bibliografía

- 13.1. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1992. Ley Federal sobre Metrología y Normalización. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.
- 13.2. Secretaría de Salud. 1984. Ley General de Salud. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.
- 13.3. Secretaría de Salud. 1988. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.
- 13.4. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. NOM-008-SCFI-1993. Norma Oficial Mexicana. Sistema General de Unidades de Medida. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.
- 13.5. American Public Health Association. 1992. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 5th ed. APHA, Washington. D.C.
- 13.6. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1995. Official Methods of Analysis 16th. Arlington, Virginia. USA. chaps. 17.10.01, 17.10.05. p. 94 a 100.
- 13.7. Bacteriological Analytical Manual. 1984. Food and Drugs Administration FDA. Bureau of Foods. Division of Microbiology. 6a. Ed. Washington D. C.
- 13.8. Bille, J., & M.P. Doyle. 1981 *Listeriae and Erysipelothrix*. Manual of Clinical Microbiology, 5th ed. A. Balows W. J. Hausler Jr., K.L. Herman, H.D. Isenberg, and J.J. Shadomy (Eds). American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp. 287 a 295.
- 13.9. Jones, D., & H.P.R. Seeliger. 1986. International Committee on Systematic Bacteriology. Subcommittee on the taxonomy on *Listeria* and related bacteria (Minutes of meeting, Nantes, France, Sept. 1985) In J. Syst. Bacteriol. 36: p 117 a 118.
- 13.10. Jones, D. & Seeliger PRR. 1992. Genus *Listeria*. Edit Ballows H., Truper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K. H. The Prokariotes, New York: Springer-Verlag. p. 1595 - 1615.
- 13.11. Miller, A. J., J. L. Smith & G.A. Somkuti. 1990. Foodborne Listeriosis. Elsevier Science Publishers. Amsterdam-New York-Oxford.
- 13.12. NORM-Z-013/02. 1981. Guía para la Redacción, Estructuración y Presentación de las Normas Oficiales Mexicanas. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial.
- 13.13. Rocourt, J., & P.A. Grimont. 1983. *Listeria welshimeri*, sp. nov., and *Listeria seeligeri*, sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 33: p 866 a 869.
- 13.14. Rocourt, J., & P.A. Grimont. 1983. *Listeria welshimeri*, sp. nov., and *Listeria seeligeri*, sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 33: p 866 a 869.
- 13.15. Seeliger, H.P.R., & D. Jones. 1986. *Listeria*. In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Vol. 2, 9th ed. P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt (eds). Williams & Wilkins, Baltimore. pp 1235-1245.
- 13.16. Seeliger, H.P.R., J. Rocourt, A. Schrettenbrunner, P.A.D. Grimond, & D. Jones. 1984. *Listeria ivanovii* sp. nov. int. J. Syst. Bacteriol. 34: p 336-337.
- 13.17. Stuart, S.E., & H. J. Welshimer. 1974. Taxonomic reexamination of *Listeria pirie* and transfer of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a new genus *Murraya*, Int. J. Syst. Bacteriol, 24: p 177-185.
- 13.18. Warburton, D. W., J. M. Farber. A. Armstrong, R. Cadeira, N. P. Tiwari, T. Babiuk, P. Lacasse & S. Read. 1991. A Canadian comparative study of modified versions of the "FDA" & "USDA" methods for the detection of *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 54: p 669-676.
14. Observancia de la Norma
La vigilancia en el cumplimiento de la presente norma corresponde a la Secretaría de Salud.
15. Vigencia
La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor con carácter de obligatorio el 1 de enero de 1998.
- Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 31 de octubre de 1997.- El Director General de Calidad Sanitaria de Bienes y Servicios, José Meljem Moctezuma.- Rúbrica.