

# **NORMA Oficial Mexicana NOM-129-SSA1-1995, Bienes y servicios. Productos de la pesca: secos-salados, ahumados, moluscos cefalópodos y gasterópodos frescos-refrigerados y congelados. Disposiciones y especificaciones sanitarias.**

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

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-129-SSA1-1995, BIENES Y SERVICIOS. PRODUCTOS DE LA PESCA: SECOS-SALADOS, AHUMADOS, MOLUSCOS CEFALOPODOS Y GASTEROPODOS FRESCOS-REFRIGERADOS Y CONGELADOS. DISPOSICIONES Y ESPECIFICACIONES SANITARIAS.

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 los artículos 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 3 fracción XXII, 33, 13, 194 fracción Y, 197, 401 Bis, 401 Bis 1, 401 Bis 2 de la Ley General de Salud, 3 fracción XI, 33 fracción II, 40 fracciones I, V, VIII, XI, XIII, 41, 43, 47 fracción IV, 50 y 53 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 20 fracción III inciso d, 511, 513, 526, 527 y demás relativos del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios; 21 fracción II del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud; y

## **CONSIDERANDO**

Que con fecha 21 de agosto de 1995 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 29 de enero de 1996, en cumplimiento del acuerdo del Comité y de lo previsto en el artículo 47 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización se publicó en el **Diario Oficial de la Federación**, el proyecto de la presente Norma Oficial Mexicana a efecto que dentro de los siguientes noventa días naturales posteriores a dicha publicación, los interesados presentaran sus comentarios al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario.

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

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

**NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-129-SSA1-1995. BIENES Y SERVICIOS. PRODUCTOS DE LA PESCA: SECOS-SALADOS, AHUMADOS, MOLUSCOS CEFALOPODOS Y GASTEROPODOS FRESCOS-REFRIGERADOS Y CONGELADOS. DISPOSICIONES Y ESPECIFICACIONES SANITARIAS.**

## **PREFACIO**

En la elaboración de la presente Norma participaron los siguientes Organismos e Instituciones:

SECRETARIA DE SALUD

Dirección General de Salud Ambiental

Dirección General de Calidad Sanitaria de Bienes y Servicios

Dirección General de Servicios de Salud Pública en el Distrito Federal

Laboratorio Nacional de Salud Pública

SECRETARIA DE COMERCIO Y FOMENTO INDUSTRIAL

Dirección General de Política de Comercio Interior

SECRETARIA DE MEDIO AMBIENTE, RECURSOS NATURALES Y PESCA

Dirección General de Acuicultura

Dirección General de Promoción Pesquera

INSTITUTO NACIONAL DE PESCA

PROCURADURIA FEDERAL DEL CONSUMIDOR

Dirección General de Investigación Tecnológica

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Instituto de Ciencias del Mar y Limnología

FEDERACION REGIONAL DE SOCIEDADES COOPERATIVAS DE LA INDUSTRIA PESQUERA, BAJA CALIFORNIA, F.C.L.

CONFEDERACION DE CAMARAS NACIONALES DE COMERCIO

AHUMADOS NORUEGOS, S.A. DE C.V.

## INDICE

PREFACIO

1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION

2. REFERENCIAS

3. DEFINICIONES

4. SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

5. MOLUSCOS CEFALOPODOS Y GASTEROPODOS

6. PRODUCTOS DE LA PESCA SECOS-SALADOS

7. PRODUCTOS DE LA PESCA AHUMADOS

8. MUESTREO

9. METODOS DE PRUEBA

10. ETIQUETADO

11. ENVASE, EMPAQUE Y EMBALAJE

12. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

13. BIBLIOGRAFIA

14. OBSERVANCIA DE LA NORMA

15. VIGENCIA

16. APENDICE NORMATIVO

Apéndice A

17. APENDICE INFORMATIVO

Apéndice A

### 1. Objetivo y campo de aplicación

**1.1** Esta Norma Oficial Mexicana establece las especificaciones sanitarias de los moluscos cefalópodos y gasterópodos frescos-refrigerados y congelados, productos de la pesca secos-salados y ahumados.

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

### 2. Referencias

Esta Norma se complementa con lo siguiente:

NOM-028-SSA1-1993 Bienes y servicios.  
Productos de la pesca. Pescados en conserva.  
Especificaciones sanitarias.

NOM-030-SSA1-1993 Bienes y servicios.  
Productos de la pesca. Crustáceos en conserva.  
Especificaciones sanitarias.

NOM-031-SSA1-1993 Bienes y servicios.  
Productos de la pesca. Moluscos bivalvos frescos-  
refrigerados y congelados. Especificaciones  
sanitarias.

NOM-051-SCFI-1993 Especificaciones generales  
de etiquetado para alimentos y bebidas no  
alcohólicas preenvasados.

NOM-092-SSA1-1994 Bienes y servicios. Método  
para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

NOM-110-SSA1-1994 Bienes y servicios.  
Preparación y dilución de muestras de alimentos  
para su análisis microbiológico.

NOM-112-SSA1-1994 Bienes y servicios.  
Determinación de bacterias coliformes. Técnica del  
número más probable.

NOM-113-SSA1-1994 Bienes y servicios. Método  
para la cuenta de microorganismos coliformes  
totales en placa.

NOM-114-SSA1-1994 Bienes y servicios. Método  
para la determinación de *Salmonella* en alimentos.

NOM-115-SSA1-1994 Bienes y servicios. Método  
para la determinación de *Staphylococcus  
aureus* en alimentos.

NOM-116-SSA1-1994 Bienes y servicios.  
Determinación de humedad en alimentos por  
tratamiento térmico. Método por arena o gasa.

NOM-117-SSA1-1994 Bienes y servicios. Método  
de prueba para la determinación de cadmio,  
arsénico, plomo, estaño, cobre, fierro, zinc y  
mercurio, en alimentos, agua potable y agua  
purificada por espectrometría de absorción  
atómica.

NOM-120-SSA1-1994 Bienes y servicios. Prácticas  
de higiene y sanidad para el proceso de alimentos,  
bebidas no alcohólicas y alcohólicas.

NOM-122-SSA1-1994 Bienes y servicios.  
Productos de la carne. Productos cárnicos curados  
y cocidos, y curados emulsionados y cocidos.  
Especificaciones sanitarias.

NOM-128-SSA1-1994 Bienes y servicios. Que  
establece la aplicación de un Sistema de Análisis  
de Riesgos y Control de Puntos Críticos en la  
Planta Industrial Procesadora de Productos de la  
Pesca.

NOM-143-SSA1-1994 Bienes y servicios. Método  
de prueba microbiológico para alimentos.  
Determinación de *Listeria monocytogenes*.

### 3. Definiciones

Para fines de esta Norma se entiende por:

- 3.1** Aditivos para alimentos, aquellas sustancias que se adicionan directamente a los alimentos y bebidas, durante su elaboración para proporcionar o intensificar aroma, color o sabor; para mejorar su estabilidad o su conservación.
- 3.2** Ahumado, procedimiento que consiste en someter el alimento al efecto del humo originado en la combustión de madera u otros procedimientos autorizados.
- 3.3** Ahumado en caliente, someter los productos de la pesca a temperaturas y periodos suficientes para lograr la coagulación térmica de la proteína.
- 3.4** Ahumado en frío, someter los productos de la pesca a temperaturas a las que no muestre señales de coagulación térmica de la proteína.
- 3.5** Biotoxinas marinas, compuestos venenosos producidos por los dinoflagelados y las diatomeas; que son acumuladas en los organismos que se alimentan de estos protozoarios.
- 3.6** Congelación, método de conservación físico que se efectúa por medio de equipo especial para lograr una reducción de la temperatura de los productos objeto de esta Norma en su centro térmico a  $-18^{\circ}\text{C}$  (255 K), como mínimo, reduciendo los cambios enzimáticos y microbiológicos.
- 3.7** Envasado en atmósferas modificadas, técnica de envasar productos en la cual el aire en el envase o contenedor es reemplazado por uno o más gases, en varias concentraciones antes del sellado.
- 3.8** Envasado al vacío, técnica para envasar productos en la que el aire es extraído del envase antes del sellado.
- 3.9** Enhielado, método de conservación físico con el cual se mantiene la temperatura interna del producto a un máximo de  $4^{\circ}\text{C}$  (277 K), con la utilización de hielo potable.
- 3.10** Envase, todo recipiente destinado a contener un producto y que entra en contacto con el mismo, conservando su integridad física, química y sanitaria.
- 3.11** Etiqueta, todo rótulo, marbete, inscripción, imagen u otra forma descriptiva o gráfica ya sea que esté impreso, marcado, grabado en relieve, hueco grabado, estarcido adherido o anexo al empaque o envase del producto.
- 3.12** Eviscerado, acción de retirar las vísceras.
- 3.13** Humo líquido, solución acuosa de humo de madera que cuando es diluido adecuadamente puede ser usado para impartir el sabor a humo a los productos de la pesca.
- 3.14** Límite máximo, cantidad establecida de aditivos, microorganismos, parásitos, materia extraña, plaguicidas, radionúclidos, biotoxinas, residuos de medicamentos, metales pesados y metaloides que no se deben exceder en un alimento, bebida o materia prima.
- 3.15** Lote, cantidad de producto elaborado en un mismo lapso para garantizar su homogeneidad.
- 3.16** Materia extraña, aquella sustancia, resto o desecho orgánico o no, que se presenta en el producto sea por contaminación o por manejo poco higiénico del mismo durante su elaboración, considerándose entre otros: excretas y pelos de cualquier especie, fragmentos de hueso e insectos que resulten perjudiciales para la salud.
- 3.17** Métodos de prueba, procedimientos analíticos utilizados en el laboratorio para comprobar que un producto satisface las especificaciones que establece la norma.
- 3.18** Metal pesado o metaloide, aquellos elementos químicos que causan efectos indeseables en el metabolismo aun en concentraciones bajas. Su toxicidad depende de la dosis en que se ingieran, así como de su acumulación en el organismo.
- 3.19** Molusco cefalópodo, el organismo invertebrado acuático comestible que proviene de agua salobre, cuerpo alargado y cilíndrico con uno o dos pares de branquias, boca con maxilas córneas y rádula, rodeada por ocho a diez brazos tentaculares contráctiles o retráctiles, ventosas con anillos córneos, ganglios nerviosos y agrupados en la cabeza dentro de una cubierta cartilaginosa, órganos sensoriales desarrollados.
- 3.20** Molusco cefalópodo congelado, organismo definido en el punto 3.19 que se conserva a temperatura de congelación.
- 3.21** Molusco cefalópodo fresco-refrigerado, organismo definido en el punto 3.19, cuyo tratamiento de conservación es la refrigeración o el enhielado para mantener sus características organolépticas.

**3.22** Molusco gasterópodo, organismo acuático comestible que proviene de agua dulce, salobre o salada; de cuerpo blando y asimétrico, cabeza destacada, pie desarrollado, masa viscosa desnuda cubierta en una concha univalva en espiral, pudiendo ser desconchada.

**3.23** Molusco gasterópodo congelado, organismo definido en el punto 3.22 y desconchado que se conserva a temperatura de congelación.

**3.24** Molusco gasterópodo fresco-refrigerado, organismo definido en el punto 3.22, cuyo tratamiento de conservación es la refrigeración o el enhielado para mantener sus características organolépticas originales.

**3.25** Muestra, número total de unidades de producto provenientes de un lote y que representan las características y condiciones del mismo.

**3.26** Plaguicida, cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se destina a controlar cualquier plaga, incluidos los vectores que transmiten las enfermedades humanas y de animales, las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal, así como las sustancias defoliantes y las desecantes.

**3.27** Producto de la pesca con sabor a humo, pescado preparado por tratamiento con sal al que se le imparte el sabor de humo con la inmersión de éste en solución de "humo líquido".

**3.28** Producto de la pesca ahumado, el que se somete previamente limpio, libre de vísceras y salado a la acción directa o indirecta del humo generado por la combustión no resinosa, con el fin de deshidratarlo parcialmente dándole sabor a humo.

**3.29** Productos de la pesca secos-salados, los procedentes de cuerpos de agua salobre, dulce acuícola, sanos, limpios que han sido desgrasados, eviscerados, descamados o no, descabezados o no, fileteados o no, sometidos a un proceso de salazón ya sea en seco o en húmedo.

**3.30** Refrigeración, método de conservación físico con el cual se mantiene el producto a una temperatura interna máxima de 7°C (280 K).

**3.31** Salazón en húmedo, procedimiento en que el pescado se mezcla con sal grado alimentario y se conserva en la salmuera que se forma al disolver la sal en el agua extraída del tejido muscular del pescado.

**3.32** Salazón en seco, procedimiento que consiste en mezclar el pescado con sal seca grado alimentario, de manera que la salmuera resultante se drene.

**3.33** Salmuerado, es la inmersión del producto en salmuera.

**3.34** Tiempo de conservación, periodo en que un producto se mantiene apto para consumo humano.

#### **4. Símbolos y abreviaturas**

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

°C grados Celsius

g gramo

GR grado reactivo

h hora

K grados Kelvin

l litro

mg miligramos

min minutos

ml mililitros

NMP Número Más Probable

pH potencial de Hidrógeno

QP Químicamente puro

UFC Unidades Formadoras de Colonias

UR Unidades Ratón

µg microgramos

% por ciento

< menor que

≤ menor o igual que

≥ mayor o igual que

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

## 5. Moluscos cefalópodos y gasterópodos

### 5.1 Clasificación

Los moluscos cefalópodos y gasterópodos por su proceso se clasifican en:

#### 5.1.1 Moluscos cefalópodos frescos-refrigerados

#### 5.1.2 Moluscos cefalópodos congelados

#### 5.1.3 Moluscos gasterópodos frescos-refrigerados

#### 5.1.4 Moluscos gasterópodos congelados

### 5.2 Disposiciones sanitarias

Los moluscos cefalópodos y gasterópodos, además de cumplir con lo establecido en el Reglamento deben ajustarse a las siguientes disposiciones:

**5.2.1** El hielo que se emplea para conservar la materia prima debe ser elaborado con agua potable que cumpla con los requisitos sanitarios establecidos en el Reglamento y en la Norma Oficial Mexicana correspondiente.

**5.2.2** Cuando el glaseado sea necesario, la temperatura del agua empleada debe ser inferior a 5°C.

**5.2.3** La temperatura de almacenamiento para los productos refrigerados no debe ser superior a 7°C y para los productos congelados no será superior a -18°C.

### 5.3 Especificaciones sanitarias.

Los moluscos cefalópodos y gasterópodos frescos-refrigerados y congelados deben cumplir con las siguientes especificaciones:

#### 5.3.1 Químicas

ESPECIFICACIONES	LIMITE MAXIMO
pH de la carne	6,0 - 6,5
Nitrógeno amoniacal en 100 g	30 mg

#### 5.3.2 Contaminación por biotoxinas marinas\*

(Sólo en casos de emergencia sanitaria)

ESPECIFICACIONES	LIMITE MAXIMO
Toxinas de <i>Ptychodiscus brevis</i>	20 UR/100 g en carne
Saxitoxina, veneno paralizante de	80 µg/100g en carne

moluscos	
Acido domóico	20 µg/g en carne

\*La Secretaría de Salud sin perjuicio de las atribuciones de otras Dependencias del Ejecutivo, determinará los casos para identificar la presencia de estas biotoxinas.

### 5.3.3 Microbiológicas

ESPECIFICACIONES	LIMITE MAXIMO
Mesofílicos aerobios	500,000 UFC/g
Bacterias coliformes fecales	<230 NMP/100g
<i>Salmonella spp</i> en 25g	Ausente
** <i>Vibrio cholerae</i> O:1 toxigénico en 50g	Negativo

\*\*Bajo situaciones de emergencia sanitaria la Secretaría de Salud, sin perjuicio de las atribuciones de otras Dependencias del Ejecutivo, determinará los casos para identificar la presencia de este agente biológico.

### 5.3.4 Contaminación por metales pesados o metaloides

ESPECIFICACIONES	LIMITE MAXIMO (mg/kg)
Cadmio (Cd)	0,5
Mercurio (como Hg)	1,0
***Mercurio como metil mercurio	0,5
Plomo (Pb)	1,0

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

### 5.3.5 Materia extraña

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

## 6. Productos de la pesca secos-salados

### 6.1 Disposiciones sanitarias

Los productos de la pesca secos-salados, además de cumplir con lo establecido en el Reglamento, deben ajustarse a las siguientes disposiciones:

**6.1.1** La salazón se debe efectuar a temperatura menor de 7°C (280 K).

**6.1.2** Deben almacenarse en un lugar seco, protegido contra la contaminación y bien ventilado.

**6.1.3** No deben presentar las siguientes características: manchas rojizas o rosas, tejido muscular blando, disgregación de su fibra y olor putrefacto.

### 6.2 Especificaciones sanitarias

Los productos de la pesca secos-salados deben cumplir con las siguientes especificaciones:

#### 6.2.1 Físicoquímicas

ESPECIFICACIONES	LIMITE MAXIMO
NaCl	20%
Humedad	40%

### 6.2.2 Microbiológicas\*

ESPECIFICACIONES	LIMITE MAXIMO
<i>Staphylococcus aureus</i>	500 UFC/g
<i>Salmonella spp</i> en 25g	Ausente

\*Se efectuarán únicamente si el contenido de sal es  $\leq$  al 15% y la humedad es  $\leq$  del 40% en el producto final.

**6.2.3** Los productos de la pesca secos-salados deben cumplir con las especificaciones de metales pesados y materia extraña establecidas para los moluscos cefalópodos y gasterópodos.

## 7. Productos de la pesca ahumados

### 7.1 Disposiciones sanitarias

Los productos de la pesca ahumados, además de cumplir con lo establecido en el Reglamento, deben ajustarse a las siguientes disposiciones:

**7.1.1** Todos los pescados crudos que van a ser ahumados deben mantenerse congelados y, en su caso refrigerados hasta necesitarse para el proceso.

**7.1.2** El pescado en el que se sospeche la presencia de parásitos y que esté destinado a ser ahumado en frío, debe ser sujeto a un tratamiento previo de congelación. En el apéndice informativo A se presentan tiempos y temperaturas para dicho tratamiento.

**7.1.3** Cuando sea necesario descongelarlos debe hacerse cuidando que la temperatura interna no exceda los 4°C y con un buen sistema de evacuación de agua (en refrigeración o con agua potable corriente, nunca utilizar agua estancada).

**7.1.4** Todos los pescados deben ser eviscerados antes del proceso.

#### 7.1.5 Del Salado:

**7.1.5.1** Las salmueras utilizadas en los productos de la pesca deben estar preparadas con agua potable y sal de grado alimentario.

**7.1.5.2** En el salado en seco, el pescado debe regresarse al área de refrigeración o pasarse a la cámara de ahumado inmediatamente después de la aplicación de la sal.

**7.1.6** Para producir humo durante el ahumado directo, la madera no resinosa debe estar exenta de polvo y sustancias perjudiciales.

**7.1.7** Los productos de la pesca ahumados no deben presentar manchas rojizas o verdosas, ni zonas micóticas.

**7.1.8** El secado después del ahumado debe llevarse a cabo a temperaturas de refrigeración.

**7.1.9** El producto ahumado no debe mantenerse fuera de refrigeración.

**7.1.10** El pescado sometido al proceso de ahumado en caliente y aquel con sabor a ahumado, para ser empacado, necesita calentarse continuamente a una temperatura interna de cuando menos 63°C (336 K) en todo el pescado, por un mínimo de 30 minutos y salarse en salmuera, para contener no menos del 3,0 por ciento de sal en el producto terminado. En el caso de ser empacado al vacío en atmósfera modificada y controlada necesita ser salado en salmuera, para contener no menos del 3,5 por ciento de sal en el producto terminado. El contenido de sal puede disminuirse al 3,0 por ciento, siempre y cuando la temperatura a que se someta no sea menor de 82°C.



**7.1.11** El pescado sometido al proceso de ahumado en frío o aquel con sabor ahumado, para ser empacado no al vacío, deberá ser salado en salmuera o salado en seco, para contener cuando menos 3,5 por ciento de sal en el producto terminado. Sin embargo, cuando dicho pescado contiene no menos de 100 mg/kg de nitrito de sodio deberá contener no menos de 3,0 por ciento de sal en el producto terminado. Cuando este tipo de producto se congela inmediatamente después del ahumado y el enfriamiento, y permanece en ese estado a lo largo de todo el almacenamiento y distribución subsecuentes, deberá contener no menos del 2,5 por ciento de sal en el producto terminado.

**7.1.12** El pescado sometido a proceso de ahumado en frío y aquel con sabor a ahumado para ser empacado al vacío, con atmósfera modificada o controlada, deberá ser salado en salmuera o salado en seco, para contener cuando menos 3,0 por ciento de sal en el producto terminado y no menos de 100 mg/kg de nitrito de sodio. Si no se utiliza el nitrito de sodio, el contenido de sal en el producto terminado deberá ser cuando menos del 3,5 por ciento.

## 7.2 Especificaciones sanitarias

Los productos de la pesca ahumados deben cumplir las siguientes especificaciones:

### 7.2.1 Microbiológicas

ESPECIFICACIONES	LIMITE MAXIMO
Mesofílicos aerobios	500 000 UFC/g
<i>Salmonella spp</i> en 25g	Ausente
Coliformes fecales	< 230 NMP/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	500 UFC/g
* <i>Listeria monocytogenes</i>	Negativo
* <i>Clostridium botulinum</i>	Negativo
* <i>Vibrio cholerae</i> O:1 toxigénico en 50g	Negativo

\*Bajo situaciones de emergencia sanitaria la Secretaría de Salud, sin perjuicio de las atribuciones de otras Dependencias del Ejecutivo, determinará los casos para identificar la presencia de este agente biológico.

#### 7.2.1.1 No debe existir toxina del *C. botulinum*.

**7.2.2** Los productos de la pesca ahumados deben cumplir con las especificaciones de metales pesados y materia extraña establecidas para moluscos cefalópodos y gasterópodos.

### 7.2.3 Aditivos para alimentos

En los productos de la pesca ahumados se permite el uso de los siguientes conservadores, dentro de los límites señalados a continuación:

#### 7.2.3.1 Conservadores:

	LIMITE MAXIMO
Nitrito y nitrato de sodio (expresados como nitrito de sodio)	156 mg/kg
Sorbato de potasio	0,1 %

## 8. Muestreo

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

## **9. Métodos de prueba**

Para la verificación de las especificaciones, que se establecen en esta Norma, se deben aplicar los métodos de prueba señalados en el Apartado de Referencias y en el apéndice normativo A.

Para la determinación de *Vibrio cholerae*, preparar la muestra como se indica en el apéndice normativo A y aplicar el método establecido en el apéndice normativo A de la NOM-031-SSA1-1993. Productos de la pesca. Moluscos bivalvos frescos- refrigerados y congelados. Especificaciones sanitarias.

Para la determinación de nitritos aplicar el método establecido en el apéndice normativo B de la NOM-122-SSA1-1994. Productos de la Carne. Productos cárnicos curados y cocidos, y curados emulsionados y cocidos. Especificaciones sanitarias.

## **10. Etiquetado**

La etiqueta de los productos objeto de esta Norma, además de cumplir con lo establecido en el Reglamento y la NOM-051-SCFI-1994. Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas, debe sujetarse a lo siguiente:

### **10.1 Refrigerados y ahumados:**

**10.1.1** La fecha de caducidad, conforme al siguiente formato: día /mes/año.

**10.1.2** Identificación del lote. Cuando se emplee una fecha como código de lote, debe anteponerse la palabra "Lote".

**10.1.2.1** Si la identificación del lote es la misma que la fecha de caducidad, se deben anteponer las leyendas "Lote" y "Fecha de caducidad", o las abreviaturas correspondientes.

**10.1.3** El texto: "Manténgase en refrigeración" o "Consérvese en refrigeración".

**10.2** Si el producto está congelado, el texto: "Consérvese en congelación a -18°C" y "Una vez descongelado no debe volverse a congelar".

### **10.3 Secos-salados:**

**10.3.1** La leyenda "Consérvese en un lugar fresco y seco".

## **11. Envase, empaque y embalaje**

### **11.1 Envase**

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

### **11.2 Empaque**

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

### **11.3 Embalaje**

Se debe usar material resistente que ofrezca la protección adecuada a los envases para impedir su deterioro exterior, a la vez que facilite su manipulación, almacenamiento y distribución.

## **12. Concordancia con normas internacionales**

Esta Norma es parcialmente equivalente a la siguiente norma y códigos.

**12.1** FAO/OMS. Norma Codex para Pescado seco-salado (Klippfish) de la familia de los Gadidae. Codex Stan 167-1989.

**12.2** FAO/OMS. Código Internacional recomendado de prácticas para el Pescado seco-salado. CAC/RCP 26-1979.

**12.3** FAO/OMS. Código Internacional recomendado de prácticas para el Pescado ahumado. CAC/RCP 25-1979.

12.4 FAO/OMS. Código Internacional recomendado de prácticas para Cefalópodos. CAC/RCP 37-1989.

### 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. Ley General de Salud. 1991. **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 Salud. 1992. Laboratorio Nacional de Salud Pública; Manual de Técnicas y Procedimientos para la Investigación de *Vibrio cholerae* en Agua y Alimentos. México, D.F.

13.5 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. NORMA-Z-013/02.1981. Guía para la Redacción, Estructuración, y Presentación de las Normas Oficiales Mexicanas. **Diario Oficial de la Federación**. México, D.F.

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

13.7 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1992. "Directrices para emitir aseguramiento de calidad de productos de la pesca". México, D.F.

13.8 Department of Environmental Conservation. 1990. Alaska Fish Inspection Regulations. 18 AAC 34. p 32-35.

13.9 Code of Federal Regulations. 1991. "Regulations Governing Processed Fishery Products and U.S. Standards for grades of fishery products revised as of October 1. Washington D.C.

13.10 Code of Federal Regulations. 1994. Proposal to establish procedures for the safe processing and importing of fish and fishing products. Vol 59:10. Washington D.C. p 4142-4214.

13.11 Comisión del Codex Alimentarius. 1994. Comité del Codex sobre Pescado y Productos Pesqueros. 21a. Reunión. FAO/OMS. CX/FFP94/9. Anteproyecto de Código de Prácticas de Higiene para el Pescado y los Productos Pesqueros Envasados en Atmósfera Controlada y Modificada. Roma, Italia. p 4.

13.12 Comisión del Codex Alimentarius. 1992. "Texto Abreviado". Roma, Italia.

13.13 Comisión del Codex Alimentarius. 1992. Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. Aditivos. Roma, Italia. p 3-82 y 7-26.

13.14 Comisión del Codex Alimentarius. 1979. Código Internacional Recomendado de Prácticas para el Pescado Salado CAC/RCP. Roma, Italia. p 1-2 y 25-30.

13.15 Comisión de las Comunidades Europeas. 1992. Decisión de la Comisión Relativa a los Criterios Microbiológicos Aplicables a la Producción de Crustáceos y Moluscos Cocidos. Diario Oficial de las Comunidades Europeas.

13.16 Department of Health and Human Services. 1991. Seafood Training Program. Seafood Microbiology.

13.17 FAO/OMS. 1979. Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. Código Internacional Recomendado de Prácticas para el Pescado Ahumado. CAC/RCP 25. Volumen B. 1 Ed.

13.18 Food and Drug Administration. 1994. Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guide. Get Hooked on Seafood Safety. USA. p 82 y 87.

13.19 Huidobro, A., Montero, P. y Careche, M. 1988. El Salmón Ahumado. Instituto del Frío, Ciudad Universitaria. Madrid, España. p 53 y 56.

13.20 Manuals of Food Quality Control 7. 1986. Food analysis and Agriculture Organization of the United Nations. Roma. p 233 y 234.

13.21 Microbiological Criterio for Raw Molluscan Shellfish. 1991. Recommendation by the National Advisory Committee on Microbiological Criteria For Foods. USA.

13.22 Ministerio de Sanidad y Consumo. 1991. Disposiciones Generales. Boletín Oficial del Estado: 195. Madrid, España. p 27153 y 27154.

**13.23** Official Methods of Analysis. 1990. "Fish and Other Marine Products; 15 Edition. Arlington, Virginia 22201 USA. p 864.

**13.24** Official Methods of Analysis. 1990. Association of Official Analytical Chemists. 15 Edition, Vol. II Method 937.09 USA.

**13.25** Arafiles M. L. 1986. Handbook on some toxic marine organisms and low risk Fishery products. Safis extensión Manual series No. 25. The Secretariat Southeast Asian Fisheries Development Center. USA.

**13.26** Banwart G. 1989. Basic food Microbiology. Van Nostrand Reinhold, 3 Ed. New York. USA.

**13.27** Cubas G. A. 1982. Moluscos de un Sistema Lagunar Tropical en el Sur del Golfo de México (Laguna de Términos, Campeche). Instituto de Ciencias del Mar y Limnología Universidad Nacional Autónoma de México. p 9-13 y 148-149.

**13.28** Hobbs B. Roberts D. 1987. Food Poisoning and Food hygiene. Edward Arnold, 5 Ed. New York. USA.

**13.29** Joy J. 1986. Basic Food Microbiology. Van Nostrand Reinhold, 3 Ed. New York. USA.

**13.30** Rehbronn, E. y Rutkowski, F. 1985. Ahumado de pescados. Ed. Acribia. Zaragoza, España. p 101-103.

**13.31** Skinner. Carr. 1976. Microbiology in Agriculture, Fisheries and Food. Academic Press. New York. USA.

**13.32** W. Kraemer Donald. 1991. Microorganisms of Concern in Seafood Processing. U.S. Food and Drug Administration.

#### **14. Observancia de la Norma**

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

#### **15. Vigencia**

La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor con su carácter obligatorio el 2 de mayo de 1998.

Atentamente

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 23 de octubre de 1997.- El Director General de Calidad Sanitaria de Bienes y Servicios, **José Meljem Moctezuma**.- Rúbrica.

### **APENDICE NORMATIVO A**

#### **A. De los métodos de prueba**

##### **1. Determinación de pH**

###### **1.1 Fundamento**

Es la medida de la diferencia de potenciales entre un electrodo de vidrio y otro de referencia que se genera en una muestra, medido con un potenciómetro. La fuerza electromotriz producida por el sistema de electrodos es proporcional al pH de la muestra problema.

###### **1.2 Materiales y equipo**

Balanza analítica con sensibilidad de 0,1 mg.

Molino mecánico para carnes con placa perforada con agujeros de un diámetro no mayor de 4mm.

Potenciómetro graduado en unidades de pH de 0,1 o menos y que permita efectuar lecturas con una exactitud entre 0,05 unidades y provista de un sistema de corrección de temperaturas (en caso de no tenerlo, las lecturas deben tomarse en un rango de temperaturas de  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

Electrodos de referencia.

Electrodo de vidrio o sistema de electrodo combinado.

Material común de laboratorio.

Algodón.

### 1.3 Reactivos

Todos los reactivos deben ser de grado analítico y cuando se mencione agua debe ser destilada.

Etanol al 95% (v/v) C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O

Eter etílico saturado con agua C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O

Soluciones patrón

Para calibrar el potenciómetro se pueden usar las siguientes soluciones de referencia:

Soluciones patrón con pH 4,0 a 20°C.

Pesar con exactitud 10,211g de potasio hidrógeno ftalato (KHC<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (COO) 2) previamente secado a 125°C hasta peso constante, disolver en agua y llevar al volumen de 1000 ml.

El pH de esta solución a 10°C es de 4,01.

Solución patrón con pH 5,45 a 20°C.

Mezclar 500 ml de solución 0,2N de ácido cítrico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>) en agua con 375 ml de solución de hidróxido de sodio (NaOH) en agua. El pH de esta solución a 10°C es de 5,42 y a 30°C es de 5,48.

Solución patrón con pH 6,88 a 20°C.

Pesar con exactitud 3,402g de potasio dihidrógeno ortofostato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) y 3,549g de disodio hidrógeno ortofostato (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), disolver en agua y llevar al volumen a 1 l.

El pH de esta solución es 6,92 a 10°C y 6,85 a 30°C.

En el caso de disponer de producto comercial seguir las indicaciones del fabricante.

### 1.4 Procedimiento:

Se describen dos procedimientos:

**1.4.1** Para productos que pueden ser homogeneizados.

**1.4.2** Para productos que no pueden ser homogeneizados.

**1.4.1.1** Preparación de la muestra.

Homogeneizar la muestra y pasarla dos veces a través de un molino y después mezclarla perfectamente.

En el caso de muestras muy secas para poder homogeneizarlas adicionar una cantidad de agua igual a la masa de muestra tomada para la determinación y mezclarlas perfectamente.

Tomar una cantidad de muestra suficiente para que los electrodos puedan sumergirse.

**1.4.1.2** Calibración del potenciómetro

Calibrar el potenciómetro y usar solución patrón de un pH conocido exactamente y lo más cerca posible del pH que se va a determinar.

Si el procedimiento no tiene un sistema de corrección de temperatura, la temperatura de la solución patrón debe estar dentro del rango de 20±2°C.

**1.4.1.3** Medición

Introducir los electrodos en la muestra y fijar el sistema de corrección de temperatura a la temperatura de la muestra, en caso de que no lo tenga, la temperatura de la muestra debe estar dentro del rango de 20±2°C.

Efectuar la medición usando el procedimiento descrito en el manual del aparato.

Leer el pH directamente en la escala del instrumento, hasta alcanzar un valor estable.

Llevar a cabo 3 lecturas de la misma muestra.

**1.4.1.4** Limpieza de los electrodos

Limpian los electrodos con trozos de algod3n mojados con 3ter etilico y etanol sucesivamente, finalmente lavarlos con agua y guardarlos de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### **1.4.1.5 Expresi3n de los resultados**

Tomar como resultado la media aritm3tica de los valores de las tres lecturas, siempre y cuando la diferencia entre los valores extremos resultantes no sea mayor de 0,15 unidades de pH.

#### **1.4.2 Procedimiento para productos que no puedan homogeneizarse.**

**1.4.2.1** Tomar una porci3n de muestra suficiente que permita tomar medidas de pH en varios puntos de la misma.

#### **1.4.2.2 Medici3n**

Si la muestra tiene consistencia firme, hacer un agujero para cada determinaci3n, de manera que el electrodo pueda ser introducido cuidadosamente para no quebrarlo.

Efectuar las lecturas como se describi3 anteriormente.

Si se considera importante conocer las diferencias entre los valores del pH tomados en diferentes puntos de la muestra, el n3mero de determinaciones estar3 en funci3n de la naturaleza y el tama1o de la muestra.

El lavado de los electrodos debe hacerse como se describi3 en el punto 1.4.1.4.

#### **1.4.2.3 Expresi3n de resultados**

Tomar como resultado la media aritm3tica de los valores obtenidos en el mismo punto de la muestra, siempre y cuando la variaci3n no sea mayor a 0,15 unidades de pH.

Reportar que el promedio de pH para cada punto al m3s cercano a 0,1 unidades de pH.

#### **1.5 Precauciones**

Determinar el pH de la muestra inmediatamente cuando sea posible o almacenarla, de tal manera que el cambio de pH se restrinja al m3nimo.

Durante las mediciones el aparato debe estar protegido de cambios de corriente el3ctrica externa.

### **2. Nitr3geno amoniacal (NVT)**

#### **2.1 Fundamento**

La muestra se destila bajo condiciones establecidas en presencia de 3xido de magnesio recibiendo las bases vol3tiles en un 3cido d3bil de donde son tituladas.

#### **2.2 Material y equipo**

Bureta de 10 ml graduada en 0,01

Matraz de Kjeldahl de 800ml

Matraz Erlenmeyer de 500ml

Probeta

Cuerpos de ebullici3n

Equipo de destilaci3n macro Kjeldahl

Balanza anal3tica con sensibilidad de 0,1mg

Agua destilada

#### **2.3 Reactivos**

Acido b3rico H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> al 2% grado reactivo, pesar 20 g y diluir con agua destilada a 1 litro.

Acido sulf3rico o clorh3drico 0,1N valorado

Rojo de metilo

Azul de metileno

Etanol

Oxido de magnesio grado reactivo

Antiespumante preparación de silicones o alcohol octílico.

### 2.3.1 Preparación del reactivo de Wesslow

En una mezcla 60:40 de etanol-agua, agregar rojo de metilo hasta llegar al 0,2%.

Preparar una dilución de azul de metileno al 0,2% en agua destilada.

Mezclar dos partes de la solución de rojo de metilo con una parte de azul de metileno.

### 2.4 Preparación de la muestra

Para prevenir la pérdida de agua durante la preparación y subsecuente manejo no se deben usar muestras pequeñas (la cantidad mínima aceptable es de 500g).

Guardar el material molido en recipientes de vidrio o similares con tapas herméticas que lo protejan del aire y del agua.

Pasar la muestra rápidamente tres veces a través de un molino de alimentos con placas de aproximadamente 3mm de abertura.

Mezclar perfectamente después de cada molienda y comenzar todas las determinaciones lo más rápido posible, si ocurriera cualquier demora, congelar la muestra para inhibir la descomposición (-2 a -4°C).

### 2.5 Procedimiento

Pesar 10g de muestra preparada como se indica en el punto 2.4 transferirla cuantitativamente a un matraz de Kjeldahl 800ml.

Agregar 2g de óxido de magnesio, 300 ml de agua destilada y los cuerpos de ebullición (en caso necesario, agregar algún agente antiespumante).

Disgregar perfectamente la muestra, por medio de movimientos circulares. Recibir el destilado en un matraz Erlenmeyer de 500ml conteniendo 50ml de ácido bórico y unas gotas del indicador de Wesslow (la parte terminal del tubo debe estar dentro del ácido).

Conectar el matraz de Kjeldahl al equipo de destilación y calentar de manera que hierva exactamente durante un periodo de 10 min, mantener la temperatura exactamente durante 25 min.

Lavar el refrigerante con agua destilada y titular con ácido sulfúrico o clorhídrico.

Titular la solución destilada utilizando el ácido clorhídrico o sulfúrico.

Simultáneamente, determinar un blanco.

Nota: Antes de realizar la determinación definir los tiempos y temperaturas con una prueba.

### 2.6 Cálculos

El resultado se expresa en mgN/100g

En donde:

v1 = ml de ácido sulfúrico 0,1N requeridos en la titulación de la muestra.

v2 = ml de ácido sulfúrico 0,1N requeridos en la titulación del blanco.

N = Normalidad del ácido sulfúrico o clorhídrico.

PM = Peso de la muestra.

14 = Miliequivalente de Nitrógeno.

### 3. Determinación de cloruro de sodio (método volumétrico)

#### 3.1 Fundamento

El método incluye la digestión de la muestra con ácido nítrico concentrado. Los cloruros disueltos en la solución son precipitados con nitrato de plata, como cloruro de plata y el exceso de los iones plata se retitulan con tiocianato de amonio, usando sulfato ferroso amónico como indicador, hasta formar un complejo rojizo café permanente como punto final.

#### 3.2 Reactivos y materiales

##### 3.2.1 Reactivos

Todos los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico y por agua debe entenderse agua destilada libre de halógenos.

##### 3.2.1.1 Acido Nítrico Concentrado HNO<sub>3</sub>

##### 3.2.1.2 Acido Nítrico 1:1 v/v

Mezclar un volumen de ácido nítrico concentrado, con un volumen de agua.

##### 3.2.1.3 Indicador. Sulfato ferroso amónico FeNH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·12H<sub>2</sub>O. Solución acuosa saturada.

##### 3.2.1.4 Solución de nitrato de plata 0,1N estandarizada.

Pesar una pequeña cantidad mayor de 16,987 g de nitrato de plata y disolverla lentamente en agua libre de halógenos y diluir a 1l en un matraz volumétrico, perfectamente limpio, evitar el contacto con el polvo y guardar la solución en frasco ámbar al abrigo de la luz. (Puede obtenerse preparada comercialmente)

##### 3.2.1.4.1 Estandarización de la solución 0,1N de nitrato de plata

**3.2.1.4.2** Cloruro de potasio KCl-Secado a 110°C y calentado a aproximadamente 500°C a peso constante. Peso equivalente = 74,555 o puede emplearse un estándar de calidad certificada.

##### 3.2.1.4.3 Cromato de potasio K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> - Solución al 5% en agua.

##### 3.2.1.4.4 Procedimiento

Pesar con exactitud alrededor de 0,3 g de cloruro de potasio o la cantidad necesaria para obtener en la titulación un gasto de aproximadamente 40 ml de la solución de nitrato de plata.

Transferirlo a un matraz Erlenmeyer de 250 ml con tapón de vidrio. Adicionar 1 ml de la solución de cromato de potasio y titular con la solución de nitrato de plata hasta que aparezca el primer precipitado café rojizo pálido.

Ejecutar un blanco con 75 ml de agua y 1 ml de la solución de cromato de potasio y titular como se indicó anteriormente.

En donde:

V<sub>1</sub> = Volumen en ml gastados en la titulación del KCl

V<sub>2</sub> = Volumen en ml gastados en la titulación del blanco

74.555 = peso equivalente del KCl

##### 3.2.1.4.5 Solución de Tiocianato de amonio o potasio 0,1N estandarizada NH<sub>4</sub>SCN o KSCN

Pesar 7,612 g de NH<sub>4</sub>SCN o 9,718 g de KSCN seco, y diluir a 1l con agua (puede obtenerse preparada comercialmente).

Estandarización de la solución de Tiocianato.

Medir 40-50 ml de la solución estandarizada 0,1N de nitrato de plata, adicionar 5 ml de ácido nítrico 1:1 v/v y 2 ml de la solución de sulfato férrico amónico, titular con la solución de tiocianato de amonio o potasio con agitación vigorosa hasta la aparición de un color rosa pálido.



V1 = Volumen de la solución 0,1N de AgNO<sub>3</sub>

N2 = Normalidad de la solución 0,1N de AgNO<sub>3</sub>

V = Volumen de la solución de NH<sub>4</sub> SCN gastados en la titulación

### 3.2.2 Materiales

Bureta de 50 ml graduada en 0,1

Matraces Erlenmeyer de 250 ml

Matraces volumétricos de diferentes capacidades

Pipetas graduadas de diferentes capacidades

Pipetas volumétricas de diferentes capacidades

### 3.2.3 Aparatos

Balanza analítica con sensibilidad de 0,1 mg

Placa de calentamiento

### 3.3. Procedimiento

#### 3.3.1 Pescados con concha.

Pesar 10 g de carne, líquido o mezcla de carne y líquido, en un vaso o en un matraz Erlenmeyer de 250 ml.

#### 3.3.2 Otros productos de la pesca.

Pesar una cantidad apropiada de muestra, dependiendo de su contenido de sal.

**3.3.3** Adicionar un volumen conocido de solución 0,1N de nitrato de plata (no menos de 5 ml) suficiente para precipitar todos los cloruros como cloruro de plata, adicionar 20 ml de HNO<sub>3</sub> concentrado.

Hervir suavemente sobre una placa caliente o un baño de arena hasta que todos los sólidos con excepción del cloruro de plata se disuelvan (aproximadamente 15 min) enfriar, adicionar 50 o 100 ml de agua, 5 ml del indicador sulfato ferroso amónico y titular con la solución 0,1N de tiocianato de amonio hasta que adquiera un color ligeramente rojizo-café permanente.

### 3.4 Cálculos

En donde:

V1 = Volumen en ml de AgNO<sub>3</sub> 0,1N

N1 = Normalidad de AgNO<sub>3</sub>

V2 = Volumen en ml de NH<sub>4</sub> SCN 0,1N

N2 = Normalidad de NH<sub>4</sub>SCN

PM = Peso de la muestra

0,0585 = miliequivalente del NaCl

### 3.5 Repetibilidad y reproducibilidad del método

La diferencia entre dos resultados sucesivos obtenidos en las mismas condiciones no debe exceder del 5% del promedio de los mismos. En caso contrario, repetir las determinaciones.

### 3.6 Precauciones

El ácido nítrico puede causar quemaduras, por lo que debe evitarse el contacto con la piel, ojos o ropa. Evitar inhalar sus vapores y trabajar en campanas de humos o lugares bien ventilados.

#### **4. Determinación de *Clostridium botulinum* y sus toxinas en alimentos y muestras clínicas**

##### **4.1 Fundamento**

Demostrar la presencia de toxina botulínica por inyección a ratones con extractos de alimentos o muestras clínicas y observar el efecto letal. Comprobar con el antisuero específico la neutralización de la toxina. La determinación de *C botulinum* se basa en el cultivo de muestras de alimentos y clínicas en condiciones de anaerobiosis en medios específicos y la subsecuente demostración de la toxina.

##### **4.2 Toma y manejo de muestras**

###### **4.2.1 Alimentos**

Las muestras pueden tomarse de sobrantes de los alimentos sospechosos o de recipientes cerrados. Cuando están involucrados alimentos comerciales, es importante observar la etiqueta, número de lote del fabricante, o cualquier dato relevante que pueda identificar el origen de la muestra.

###### **4.2.2 Clínicas**

Las muestras clínicas para el análisis incluyen: materia fecal, aproximadamente 10 g, contenido gástrico (ajustar aproximadamente a pH 6 con hidróxido de sodio 0,1) y suero (colectado de 20 ml de sangre ANTES DE ADMINISTRAR LA ANTITOXINA). Cuando se sospecha de botulismo infantil es importante analizar las heces. Si fuera necesario, las manchas o partes sólidas de los pañales.

##### **4.3 Envío de muestras**

**4.3.1** Para un envío seguro, el interior de los empaques deben contener:

- (i) Un primer recipiente impermeable al agua.
- (ii) Un segundo recipiente impermeable al agua.
- (iii) Material absorbente (por ejemplo unigel) entre los dos contenedores, suficiente para absorber el contenido entero del primer recipiente.

**4.3.2** De preferencia enviar el material en refrigeración en paquetes que contengan recipientes con gel congelado. Para una máxima preservación de la toxina el recipiente secundario debe empacarse en una caja de unigel con recipientes de gel congelado. Sin embargo, si se sospecha retraso en el envío, el material debe congelarse y empacarse con hielo seco.

##### **4.4 Material y equipo**

0,1 N NaOH o NaHCO<sub>3</sub> saturado para limpiar posibles derrames.

Flujo laminar

Propipeta o bulbo

Lentes de seguridad

Guantes de cirujano

Tubos de centrífuga de 40 ml de capacidad

Centrífuga refrigerada con capacidad de 15 000 x g

Jeringas desechables de 19 x 15.

Filtros desechables de 0,45µ m.

Vortex

Licuada

Solución de tetraciclina al 0,2%

Potenciómetro

Incubadora 30°, 35°C

Balanza

Equipo para tinción de Gram

Tubos de ensayo de 13 x 100 mm

Antisuero monovalente A,B,E y F

Antisuero trivalente ABE

Jeringas para tuberculina

Ratones de preferencia hembras de 20 a 30 g cepa CFI o NIH

Solución reguladora de fosfatos con gelatina

Tripsina al 1% p/v

Tripsina al 1,4%

Medio carne cocida (CMM)

Caldo tripticasa peptona glucosa extracto de levadura (TPGY).

Caldo tripticasa peptona glucosa extracto de levadura (TPGYT) con tripsina

Agar aislamiento *Clostridium botulinum* (CBI)

Agar hígado de ternera yema de huevo

Agar esporulación de Eklund

Baño de agua (75-100°C)

Etanol al 50% o absoluto

Jarras y sistema de anaerobiosis

#### **4.5 Preparacion de medios de cultivo**

##### **4.5.1 Medio de la carne cocida (CMM).**

#### **FORMULA**

Corazón de res 454 g

Proteosa peptona 20 g

Bactodextrosa 2 g

Cloruro de sodio 5 g

Extracto de corazón de res 1000 ml

Picar el corazón de res, sumergir en agua y calentar hasta ebullición durante 1 h. Enfriar, ajustar el pH a 7,0, y hervir 10 minutos. Filtrar a través de muselina y presionar para drenar el exceso de líquido de la carne. Guardar la carne cocida. Agregar los ingredientes al filtrado y ajustar a pH 7,0, agregar agua hasta hacer 1000 ml. Filtrar a través de papel filtro poroso. Se puede conservar el caldo y la carne en congelación por separado. Agregar el corazón cocido y picado a tubos de ensayo de 18 x 150 mm o 20 x 150 mm a una altura de 1,2 a 2,5 cm del tubo y adicionar de 10 a 12 ml del caldo. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C. Si este medio se almacena por más de 12 h después de su preparación, debe calentarse a ebullición por 10 minutos y enfriar antes de su uso.

##### **4.5.2 Caldo tripticasa peptona glucosa extracto de levadura (TPGY).**

#### **FORMULA**

Tripticasa 50 g

Peptona 5 g

Glucosa 4 g

Extracto de levadura 20 g

Tioglicolato de sodio 1 g

Agua destilada 1000 ml

Disolver los ingredientes en agua caliente, enfriar y ajustar a pH 7,2. Distribuir en volúmenes de 21 ml en tubos de 20 x 150 mm con tapón de rosca. Esterilizar por vapor fluyente, enfriar a la temperatura y almacenar a 4°C hasta 6 semanas. Si se almacena más de 12 h, tratarlos con calor como se indica en 4.9.1.

**4.5.3** Caldo tripticasa peptona glucosa extracto de levadura adicionado con tripsina (TPGYT).

#### FORMULA

Tripticasa 50 g

Peptona 5 g

Glucosa 4 g

Extracto de levadura 20 g

Tioglicolato de sodio 1 g

Agua destilada 1000 ml

Disolver los ingredientes en agua caliente, enfriar y ajustar a pH 7,2. Distribuir en volúmenes de 2 ml en tubos de 20 x 150 mm con tapón de rosca. Esterilizar por vapor fluyente, enfriar a la temperatura y almacenar a 4°C hasta 6 semanas. Si se almacena más de 12 h tratarlos con calor como se indica en 4.5.1. Agregar 1,5 ml de solución de tripsina al 1,4% por cada tubo con 21 ml del medio TPGY. Mezclar muy suavemente. Este medio no se puede almacenar.

**4.5.4** Agar hígado de ternera yema de huevo.

**a)** Agar hígado de ternera.

#### FORMULA

Infusión de hígado 50 g

Infusión de ternera 500 g

Proteosa peptona 20 g

Neopeptona 1,3 g

Triptona 1,3 g

Dextrosa 5,0 g

Almidón soluble 10,0 g

Caseína isoelectrica 2,0 g

Cloruro de sodio 5,0 g

Nitrato de sodio 2,0 g

Gelatina 20,0 g

Agar 15,0 g

Agua destilada 1000 ml

Calentar con agitación constante hasta dilución completa. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C, pH final  $7,3 \pm 0,2$ . Agregar por cada 500 ml del medio base fundido 40 ml de la suspensión salina de yema de huevo. Mezclar y vaciar a cajas de Petri estériles de 15 x 100 mm (aproximadamente 15 - 20 ml). Secar las placas a temperatura del laboratorio por 2 días o a 35°C por 24 horas. Verificar esterilidad de las placas. Almacenar en refrigeración.

**b) Emulsión al 50% de yema de huevo.**

Lavar los huevos con un cepillo suave y dejar escurrir. Sumergirlos por 1 hora en solución de cloruro mercúrico al 0,1%, escurrir. Sumergir en una solución de etanol al 70% y dejar durante 30 minutos, escurrir. Abrir los huevos en condiciones asépticas y descartar las claras. Colocar las yemas en un recipiente estéril y mezclar con igual volumen de solución salina fisiológica (0,85%) estéril. Guardar en refrigeración hasta su uso.

**4.5.5 Agar para asilamiento de *C. botulinum* (CBI).**

El agar CBI es una modificación del medio agar McClung Toabe para el aislamiento selectivo y diferencial de *C. botulinum*, el cual puede aislarse de los cultivos toxigénicos de CMM, provenientes de muestras de heces, líquido gástrico o alimentos. El medio de agar CBI contiene: Cicloserina 250 µg/ml, sulfametoxazol 76 µg/ml y trimetoprim 4 µg/ml en la base del medio agar McClung Toabe yema de huevo.

Agar McClung Toabe

**FORMULA**

Proteosa peptona 40 g

Bacto dextrosa 2 g

Fosfato de sodio dibásico 1 g

Fosfato de potasio monobásico 1 g

Cloruro de sodio 2 g

Sulfato de magnesio 0,1 g

Agar 25 g

Agua destilada 1000 ml

pH final  $7,6 \pm 0,2$  a 25°C

Extracto de levadura 5 g

Suspensión de yema de huevo 100 ml

**SOLUCION DE ANTIBIOTICOS**

Cicloserina 250 mg o 25 ml de una solución al 0,1%

Sulfametoxazol 76 mg o 4 ml de una solución al 1,9%

Disolver el sulfametoxazol en solución 2 N de NaOH.

Lactato de Trimetoprim 4 mg o 4 ml de una solución al 0,1% por cada 100 ml de medio base

Esterilizar por filtración.

Preparación:

Agregar el extracto de levadura y los ingredientes del agar McClung Toabe a un matraz de 2 L con 900 ml de agua destilada, mezclar y calentar hasta disolución. Ajustar a pH 7,5. Esterilizar 15 minutos a 121°C en autoclave. Enfriar a 55°C en baño de agua y en condiciones asépticas agregar 100 ml de la suspensión al 50% de yema de huevo. Agregar los volúmenes necesarios para conservar la concentración de antibióticos por litro de medio base. Mezclar y distribuir en cajas de Petri estériles de 15 x 100 mm aproximadamente 15-20 ml por placa. Dejar solidificar y colocar en bolsas de plástico. Guardar en refrigeración hasta su uso. Estas placas pueden almacenarse hasta 1 mes aproximadamente.

**4.5.6 Agar para esporulación de Eklund.**

**FORMULA**

Tripticasa 4 g

Peptona 1 g

Glucosa 0,1 g

Extracto de levadura 1 g

Agar 4 g

Agua destilada 200 ml

Disolver los ingredientes en agua caliente, excepto el agar, ajustar a pH 7,8, agregar el agar. Esterilizar por vapor y enfriar a 50°C. Agregar 2 ml de solución al 10% de clorhidrato de cisteína, esterilizada por filtración; 12 ml de emulsión de yema de huevo y 2 ml de sangre citratada de bovino o borrego. Preparar las placas. Este medio es particularmente adecuado para la esporulación de *C. botulinum* del grupo II.

#### 4.6 Diluyentes y reactivos

##### 4.6.1 Solución amortiguadora de fosfatos con gelatina

#### FORMULA

Gelatina 2 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4 g

Agua destilada 1000 ml

Ajustar a pH 6,2 con solución de ácido clorhídrico 4N. Distribuir en frascos con tapón de rosca, esterilizar por vapor, enfriar a la temperatura ambiente y almacenar a 4°C.

##### 4.6.2 Solución de tetraciclina al 0,2%.

Disolver 50 mg en 25 ml del diluyente fosfato de gelatina, mantener a 4°C hasta 4 días. Si se requiere almacenar por más tiempo, congelar en pequeñas porciones. Evitar la recongelación.

##### 4.6.3 Solución de tripsina (1:250).

###### a) Solución al 1%

Disolver 200 mg en 20 ml de agua destilada. No almacenar.

###### b) Solución al 1,4%.

Disolver 280 mg en 20 ml del diluyente fosfato de gelatina, filtrar a través de membrana de 0,45 μ m. Usar vacío para obtener efecto parcial de deareación del filtrado.

##### 4.6.4 Antisueros

A, B, E; A, B; A, B, E, C\*, D\*, F.

Investigación de sospecha de botulismo en animales.

#### 4.7 Procedimiento

##### 4.7.1 Examen microscópico de los alimentos sospechosos

Este examen no es esencial para la detección de *C. botulinum*, pero facilita la selección de los alimentos sospechosos para el análisis. Preparar frotis directos y hacer tinción de Gram. Si el alimento contiene exceso de grasa, sumergir los portaobjetos fijados al calor por 1-2 minutos en xilol antes de teñir.

##### 4.7.2 Preparación del material para el análisis de las toxinas.

###### 4.7.2.1 Alimentos líquidos

Centrifugar aproximadamente 20 ml a 15000 x g durante 20 minutos. Decantar cuidadosamente el sobrenadante o extraer con una jeringa desechable de 19 x 25 mm. Cubrir el tubo y conservar a 4°C para hacer el cultivo del sedimento posteriormente. Repetir la centrifugación, si el sobrenadante aún no está claro. Esterilizar el sobrenadante por filtración a través de la membrana de 0,45 μ m adaptada a una jeringa desechable. Ocasionalmente puede requerirse una prefiltración durante el proceso de filtración. El propósito de la esterilización es prevenir una infección y a su vez una muerte inespecífica de los ratones inoculados.

#### **4.7.2.2 Alimentos semilíquidos**

Colocar 10-15 g en tubos de centrífuga de 40 ml, agregar igual volumen de solución reguladora de fosfatos con gelatina y homogenizar en vortex.

Centrifugar y proceder como en 4.7.2.1.

#### **4.7.2.3 Alimentos sólidos**

Colocar 10-20 g en un vaso de licuadora o mortero. Agregar suficiente solución reguladora de fosfatos con gelatina para obtener cuando menos 10 ml de sobrenadante después de la centrifugación. La dilución del alimento deberá estar entre 1:1 a 1:3. Licuar a velocidad alta por 1-2 minutos. Los vasos de licuadora deberán cerrarse herméticamente para prevenir la formación de aerosoles. Centrifugar y proceder como en 4.7.2.1, 4.7.2.2 y 4.7.2.3.

#### **4.7.2.4 Alimentos enlatados**

Lavar y secar la superficie de la lata. Cubrir la tapa con etanol al 96%, dejar por 2 minutos; decantar y flamear el alcohol residual. Colocar la lata en una bolsa de plástico para prevenir la dispersión de aerosoles y abrir con un abrelatas estéril. Proceder como en 4.7.2.1, 4.7.2.2 y 4.7.2.3.

#### **4.7.2.5 Suero**

Idealmente debe obtenerse 10 ml de suero. El suero usado sirve sólo antes del tratamiento con el antisuero. Si está turbio, centrifugar a 15,000 x g durante 20 minutos, decantar el sobrenadante.

#### **4.7.2.6 Heces**

Colocar 10 g en un tubo de centrífuga de 40 ml de capacidad, agregar suficiente cantidad de solución reguladora de fosfatos con gelatina para obtener al menos 10 ml de sobrenadante después de la centrifugación. Mezclar en vortex durante 2-3 minutos. Conservar la mezcla a 4°C por 2 h. Homogeneizar en vortex. Centrifugar y proceder como en 4.7.2.1.

Las muestras líquidas, enemas y el contenido intestinal se pueden centrifugar directamente con poco o sin la adición de la solución reguladora de fosfatos con gelatina.

Ocasionalmente, los sobrenadantes de muestras clínicas no se pueden filtrar, en estos casos, agregar 1 ml de una solución al 0,2% de tetraciclina por cada 9 ml del sobrenadante.

#### **4.7.2.7 Contenido gástrico**

Medir el pH y ajustar, si es necesario, a 5,5-6,5 con una solución 1N de NaOH. Evitar que el valor de pH sea mayor a 7,0. Centrifugar y proceder como en 4.7.2.1.

#### **4.7.2.8 Otras muestras clínicas.**

Tratar las muestras semilíquidas y sólidas como en 4.7.2.2 y 4.7.2.3

### **4.8 Análisis de las toxinas**

**4.8.1 Procedimiento general** (se aplica cuando no se sospecha de alguna toxina en particular).

**4.8.1.1** Si se dispone de suficiente material, distribuir el filtrado en volúmenes de 1,2 ml dentro de 6 tubos de ensayo de 13 x 100 mm, marcados del 1-6. A los tubos marcados 2-5, agregar 0,12 ml de los siguientes antisueros: monovalente A, B o E y trivalente ABE. Mezclar en vortex y dejar reposar a temperatura ambiente por 45 minutos.

**4.8.1.2** Al tubo 6, agregar 0,12 ml de una solución de tripsina al 1%. Incubar a 35°C por 60 minutos. El tubo 1 no se adiciona. Ver tabla No. 2.

**4.8.1.3** Si el volumen de material es insuficiente para completar la prueba, se puede omitir el tubo No. 6.

**4.8.1.4** Inyectar dos ratones (20-30 g) intraperitonealmente por tubo, con los volúmenes siguientes: 0,5 ml del tubo 1,0 y 0,55 ml de los tubos 2-6. Observar a los ratones por 72 h. Los síntomas típicos de botulismo son: pelo erizado, estrechamiento de cintura, dificultad para respirar, parálisis de los miembros posteriores y parálisis general antes de la muerte. Si estos síntomas se presentan después de 72 h, observar a los animales por otras 24 h hasta completar un total de 4 días.

**4.8.1.5** Si mueren 1 o 2 ratones repetir la inyección. Una muestra se considera positiva para la toxina si  $2/2$  o  $> 2/4$  ratones mueren, si se presenta la muerte de los animales dentro de las 2 primeras horas se pueden considerar que son debidas a otras causas diferentes a toxina botulínica.

**4.8.1.6** Si solamente mueren los ratones inoculados con las muestras tratadas con tripsina, indica la presencia de toxina de grupo II y continuar como se indica en el punto 4.8.3.

**4.8.1.7** Si no se neutralizara la toxina con los antisueros A, B y E, indica

**a)** la presencia de toxinas no relacionadas en especial cuando se presentan síntomas atípicos;

**b)** Cantidad insuficiente de antisuero en presencia de altos niveles de toxina (difícil en caso de muestras clínicas y en la mayoría de los alimentos tóxicos; o

**c)** incluido un serotipo no común. Si la muestra probada produce síntomas típicos de botulismo y sin embargo no es neutralizada con los antisueros, proceder de la forma siguiente:

**i)** En casos de muy alta toxicidad, diluir la muestra 1:10 con solución amortiguadora de fosfatos gelatina y repetir la prueba de neutralización.

**ii)** Incluir el antisuero F en la prueba de neutralización.

**4.8.2** Muestras sospechosas de contener toxina grupo V (A o B).

Proceder como se indica en 4.8.1 omitiendo el tubo No. 6.

**4.8.3** Muestras sospechosas de contener toxina grupo II (B o E).

Distribuir en cada uno de los tubos marcados del 1 al 4, 1,2 ml del filtrado. A cada tubo agregar 0,12 ml de una solución de tripsina al 1%, incubar a 35°C por 60 minutos. A los tubos marcados del 2 al 4 agregar 0,12 ml de uno de los siguientes antisueros monovalente B o E y trivalente A, B y E. Mezclar y continuar como se indica en 4.8.1 Inyectar 0,5 ml del tubo No. 1 y 0,6 ml de los tubos 2 al 4.

Si no hubiese material disponible suficiente, omitir los tubos con los antisueros monovalentes B y E.

**4.8.4** Determinación de la dosis letal en ratón (DLR)

Si se quiere titular la toxina, hacer diluciones decimales de los sobrenadantes tratados, y no tratados con tripsina, generalmente se hacen hasta 1:1000 dependiendo del nivel de toxina esperado, pero nunca excediendo 1:10000. Inyectar 2 ratones por dilución. La recíproca de la dilución más alta que causa la muerte multiplicada por 2, es la DLR. Ejemplo: si la muerte ocurre a una dilución de 1:100 pero no de 1:1000, el nivel de toxina es de 200 a 2000 DLR por ml.

**4.9** Identificación de *Clostridium botulinum*.

**4.9.1** Quitar el exceso de aire disuelto en los tubos preparados con medio caldo carne cocida (CMM) y caldo glucosa peptona tripticasa extracto de levadura (TPGY), mediante calentamiento en baño de agua a ebullición por 10 minutos y enfriar antes de usarlos. Asegurarse de que las tapas de los tubos estén flojas al hacer este proceso.

**4.9.2** Agregar a los tubos de TPGY 1,5 ml de una solución de tripsina al 1,4% y mezclar suavemente y marcar con una T (TPGYT). A los tubos de CMM marcarlos con 1 y 2; y 3 y 4 a los tubos con TPGYT. Ver tabla No. 3.

**4.9.3** Cualquier tipo de muestra incluyendo los sedimentos, pueden servir como inóculo; éstos además tienen la ventaja de que no contienen inhibidores potenciales, los cuales se han eliminado junto con el sobrenadante, de aquí que los sedimentos pueden contener grandes cantidades de microorganismos por unidad de volumen.

**4.9.4** Colocar aproximadamente 1 g de inóculo a cada uno de los tubos 1 a 3, calentar el tubo No. 2 en baño de agua a 75°C por 20 minutos para seleccionar esporas resistentes al calor.

**4.9.5** Para seleccionar esporas sensibles o resistentes al calor, suspender aproximadamente 1 g del inóculo en un volumen de 10 a 20 ml de solución de etanol al 50%, o mezclar el inóculo, cuando la muestra es líquida 1:1 con etanol absoluto o de 96%. Mantener las suspensiones o mezclas a temperatura ambiente por 60 minutos, centrifugar a 14000 x g durante 15 minutos, y pasar el sedimento al tubo No. 4.

**4.9.6** Incubar los tubos a 35°C por 24 horas y a 30°C por 4 días. Centrifugar aproximadamente 10 ml de cultivo a 15000 x g durante 20 minutos. Esterilizar el sobrenadante por filtración a través de membranas de 0,45 µ m, con ayuda de una jeringa desechable. Diluir el filtrado 1:5 con solución amortiguadora de fosfatos con gelatina. Continuar como se indica en 4.6.1 para el ensayo de toxina pero omitiendo el tubo No. 6.

**4.9.7** Si fuera necesario neutralizar con antisuero tipo F, el cual es relativamente débil, determinar la toxicidad y diluir con solución amortiguadora de fosfatos de gelatina el sobrenadante a aproximadamente 10



DLR/ml. Mezclar volúmenes de 1,25 ml con 0,25 ml de antisuero F. Inyectar 0,5 ml sin antisuero y 0,6 ml con antisuero.

**4.10** Aislamiento de *Clostridium botulinum* a partir de cultivos toxigénicos.

**4.10.1** El aislamiento de cepas productoras de botulismo, se facilita si se dan todas las condiciones para la producción de toxina. Si los cultivos de los tubos Nos. 2 o 4 son toxigénicos, uno de éstos debe seleccionarse. Sembrar directamente en agar hígado de ternera yema de huevo o en agar para el aislamiento de *Clostridium botulinum* (CBI), en estos medios no se ha observado un enmascaramiento por microflora atípica. En el caso de que predominara flora atípica combinada con la presencia de algunas esporas de *C. botulinum*, el inóculo debe hacerse previo tratamiento con etanol. En el caso de ausencia de esporas, reincubar los tubos de enriquecimiento o pasar al medio de esporulación (Eklund).

**4.10.2** Aislamiento de *C. botulinum* de cultivos con presencia moderada de microorganismos atípicos.

**4.10.2.1** Hacer una tinción de Gram de los cultivos tóxicos. Si los cultivos 2 y 4 son tóxicos, pueden excluirse los tubos 1 y 3. Seleccionar los cultivos sobre las siguientes bases:

i) Bacilos gram positivos atípicos.

ii) Número de bacilos gram positivos con esporas. Si en la tinción se observa un mínimo de 10% de bacilos gram positivos, inocular una asada en agar hígado de ternera-yema de huevo y en agar CBI. Incubar en anaerobiosis a 30°C por 48 horas.

**NOTA:** Es importante tomar en cuenta que cultivos viejos de *C. botulinum* pueden aparecer como Gram negativos.

**4.10.2.2** Seleccionar 5 colonias bien aisladas sobre el agar hígado de ternera yema de huevo que presenten un halo opaco indicativo de lipólisis y pasarlas a caldo TPGY. Seleccionar otras 5 colonias del medio agar para el aislamiento de *C. botulinum* rodeadas de un halo opaco con brillo aperlado y pasar a caldo TPGY. Incubar a 30°C durante 5 días. Hacer pruebas para determinar las toxinas como se indica en 4.6, inocular por duplicado los cultivos toxigénicos en agar hígado de ternera yema de huevo, incubar una placa en anaerobiosis y otra en aerobiosis para asegurar pureza. Nota: Es necesario inocular un gran número de colonias, debido a que *C. botulinum* puede enmascarse por otros clostridia que presentan características coloniales similares.

**4.10.3** Aislamiento de *C. botulinum* de cultivos con grandes cantidades de microorganismos atípicos.

**4.10.3.1** Si en la tinción de Gram se observan bacilos gram positivos con esporas, mezclar 2 ml del cultivo, con 2 ml de etanol al 96%, y dejar a temperatura ambiente por 60 minutos. Inocular una asada en agar hígado de ternera yema de huevo y en agar aislamiento de *C. botulinum*, y continuar como se indica en 4.10.1.

**4.10.3.2** Si no se presenta esporulación en el medio de enriquecimiento, reincubar por otra semana a 30°C o extender 0,1 ml del cultivo en agar de esporulación de Eklund, e incubar las placas en anaerobiosis a 30°C hasta que las esporas estén presentes en cantidades significativas (generalmente se requieren de 5 a 10 días. Suspende una asada del cultivo en aproximadamente 2 ml de etanol al 50%, dejar a temperatura ambiente por 60 minutos, e inocular en agar hígado de ternera yema de huevo y en agar CBI. Continuar como se indica en 4.10.1.

**TABLA No. 1 ALGUNAS CARACTERISTICAS DE *C. BOTULINUM* GRUPOS I Y II**

GRUPO CRECIMIENTO POR ABAJO DE 10°C	TEMPERATURA PARA CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE TOXINA				
I	A,B, Fb	±	+	-	30 - 37°C
II	Bc,E,F b	+	-	+	26 - 30°C

\* Algunas cepas de los tipos A y B pueden presentar subtipos A-B, A-F, B-A, B-F, cada una produce una toxina en mayor cantidad (representada por la primera letra del subtipo).

b No común

c No común en Norteamérica

**TABLA No. 2 PRUEBA DE NEUTRALIZACION Y TOXICIDAD EN RATON**

TUBO No.	Volumen de muestra (ml)	Antisuero	Volumen del Antisuero (ml)	Volumen inocularado (ml)
1	1,2	-	-	0,5
2	1,2	AntiA	0,12	0,55
3	1,2	AntiB	0,12	0,55
4	1,2	AntiE	0,12	0,55
5	1,2	Anti A,B,E	0,12	0,55
6	1,2	Tripsina	0,12	0,55

**TABLA No 3 ENRIQUECIMIENTO**

TUBO No.	MEDIO	TRATAMIENTO
1	CMM	NINGUNO
2	CMM	CALOR
3	TPGYT	NINGUNO
4	TPGYT	ALCOHOL

### 5. Preparación de la muestra para la determinación de *Vibrio cholerae*

Las submuestras de pescado ahumado en filete deben analizarse individualmente.

#### 5.1 Incubación de las muestras a 35-37°C

De cada submuestra tomar 25 g, cortar en piezas pequeñas e introducirlas en un vaso de licuadora de 500 ml de capacidad que contenga 225 ml de agua peptonada alcalina (APW) y homogeneizar por 2 min a la máxima velocidad. Esta es la dilución 1:10. De esta dilución preparar la dilución 1:100 y 1:1000, en 9 o 90 ml de agua peptonada alcalina.

Incubar las tres diluciones de 35 a 37°C. Proseguir con el paso de resiembra marcado en la NOM-031-SSA1-1993. Productos de la pesca. Moluscos bivalvos frescos-refrigerados y congelados. Especificaciones sanitarias.

#### 5.2 Incubación de las muestras de 35-37°C y 42°C

Si se van a incubar los enriquecimientos a dos temperaturas para una muestra, homogeneizar una porción de 50 g de cada submuestra en 450 ml de agua peptonada alcalina (APW). Esto hace la dilución 1:10. Verter 250 ml (g) de la dilución 1:10 a un segundo recipiente estéril. Prepare dos series de diluciones de 1:100 y 1:1000. Por lo tanto tenemos dos series de 3 diluciones. Incubar una serie de 35 a 37°C y la otra a 42°C. Proseguir con el paso de resiembra marcado en la NOM-031-SSA1-1993. Productos de la pesca. Moluscos bivalvos frescos-refrigerados y congelados. Especificaciones sanitarias.

## APENDICE INFORMATIVO A

### A. DE LAS RECOMENDACIONES PARA EL TRATAMIENTO DE CONGELACION

Para los productos de la pesca con sospecha de contener parásitos y que se destine para ahumar en frío debe ser sometido a un tratamiento previo, conforme a los tiempos y temperaturas que se recomiendan a continuación:

**Temperatura**

**Tiempo**

-20°C

7 días

-35°C

15 h

**Fecha de publicación: 10 de diciembre de 1997**