

Procedimiento de Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica



78.

Ensayos microbiológicos en alimentos
en brotes de transmisión alimentaria

Editores

Emilia Cercenado Mansilla
Rafael Cantón Moreno

Coordinadora

Alicia Jiménez Manso

Autoras

Alicia Jiménez Manso
Jessica Babich
María Paz Sánchez Moreno
María Lucía Fernández Valenti



ISBN: 978-84-09-46569-9

EDITORES:

Emilia Cercenado Mansilla. Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.
Rafael Cantón Moreno, Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). Madrid.

SUGERENCIA DE CITACIÓN:

Jiménez Manso A, Babich J, Sánchez Moreno MP, Fernández Valenti ML. Ensayos microbiológicos en alimentos en brotes de transmisión alimentaria. 2022. 78. Jiménez Manso A (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2022.

AVISO:

Reservados todos los derechos. Los documentos SEIMC o cualquiera de sus partes no podrán ser reproducidos, almacenados, transmitidos, distribuidos, comunicados públicamente o transformados mediante ningún medio o sistema sin la previa autorización de sus responsables, salvo excepción prevista por la ley. Cualquier publicación secundaria debe referenciarse incluyendo “Este documento ha sido elaborado por la SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) y su contenido puede encontrarse en la página web www.seimc.org”

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores:

Emilia Cercenado Mansilla

Rafael Cantón Moreno

78. Ensayos microbiológicos en alimentos en brotes de transmisión alimentaria. 2022

Coordinadora:

Alicia Jiménez Manso¹

Autoras:

Alicia Jiménez Manso¹

Jessica Babich²

María Paz Sánchez Moreno³

Maria Lucía Fernández Valenti⁴



¹Unidad de Calidad, Laboratorio Regional de Salud Pública, Dirección General de Salud Pública de la Comunidad de Madrid; ²Departamento de Microbiología, SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria), CIALOA (Coordinación de Inocuidad de los Alimentos), Buenos Aires (Argentina); ³Laboratorio de Salud Pública del Ayuntamiento de Madrid; ⁴Subdirección General de Seguridad Alimentaria y Sanidad Ambiental, Comunidad de Madrid.

ÍNDICE

1.	Introducción.....	5
2.	Normativa.....	5
3.	Objeto.....	6
4.	Actuaciones ante la sospecha de un brote alimentario.....	7
5.	Principales agentes causantes de brotes alimentarios.....	8
	5.1. <i>Salmonella</i> spp.....	8
	5.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	11
	5.3. <i>Campylobacter</i> spp.....	14
	5.4. <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	15
	5.5. Toxinas estafilocócicas.....	17
	5.6. <i>Clostridium perfringens</i> y <i>Clostridium botulinum</i>	19
	5.7. <i>Bacillus cereus</i>	21
	5.8. Parasitosis: <i>Anisakis</i> spp.....	22
	5.9. Parasitosis: <i>Trichinella spiralis</i>	24
	5.10. <i>Norovirus</i>	25
	5.11. <i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga (STEC).....	27
6.	Toma de muestras, conservación, transporte y preparación de alimentos para análisis microbiológico...28	
7.	Procedimientos normalizados de trabajo para la detección/recuento de los distintos microorganismos en el laboratorio.....	28
8.	Bibliografía.....	29

DOCUMENTOS TÉCNICOS

- PNT-MA-01a.** Toma de muestras de alimentos, conservación y transporte
PNT-MA-01b. Preparación de muestras para análisis microbiológico de alimentos
PNT-MA-02. Investigación de *Salmonella* spp. en muestras de alimentos
PNT-MA-03. Investigación de *Listeria monocytogenes* en muestras de alimentos
PNT-MA-04. Recuento de *Listeria monocytogenes* en alimentos
PNT-MA-05. Investigación de *Campylobacter* spp. en alimentos
PNT-MA-06. Investigación de *Escherichia coli* O157 en alimentos
PNT-MA-07. Detección de toxinas estafilocócicas en alimentos
PNT-MA-08. Recuento de *Clostridium perfringens* en alimentos
PNT-MA-09. Investigación de clostridios productores de neurotoxina botulínica A, B, E y
PNT-MA-10. Recuento de *Bacillus cereus* presuntivo en alimentos
PNT-MA-11. Investigación de larvas de *Anisakis* spp. en productos de la pesca
PNT-MA-12. Investigación de larvas de *Trichinella spiralis* en carne de cerdo
PNT-MA-13. Investigación de *Norovirus* en alimentos
PNT-MA-14. Investigación de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC)

1. INTRODUCCIÓN

Se define un **brote de enfermedad transmitida por los alimentos** como la incidencia observada, en determinadas circunstancias, de dos o más casos de la misma enfermedad o infección en seres humanos, o una situación en la que el número de casos observados supera el número esperado y en la que los casos tienen su origen probable en la misma fuente alimentaria.

Actualmente se considera que los alimentos son la mayor fuente de exposición a riesgos por la presencia de agentes patógenos, tanto químicos como biológicos, que afectan sin distinción del nivel de desarrollo de los países.

De los aproximadamente 1.500 millones de casos de diarrea que ocurren anualmente en el mundo, se estima que el 70% son el resultado directo de la contaminación química o biológica que presentan algunos de los alimentos que se comercializan (1).

La incidencia de enfermedades infecciosas como la salmonelosis, la campilobacteriosis y las infecciones causadas por *Escherichia coli* 0157:H7 asociadas a la contaminación de los alimentos está aumentando en los países industrializados. Los estudios de la OMS indican que, en esos países, entre el 5% y el 10% de la población se ve afectada anualmente por las mencionadas patologías (2).

Los agentes causales de enfermedad asociados al consumo de alimentos pueden ser de tipo biológico (agentes zoonóticos, toxinas, priones, virus, parásitos...), químico (pesticidas, micotoxinas, aditivos...) o físico (cuerpos extraños, materiales extraños ajenos).

Los agentes biológicos a través del consumo de alimentos pueden producir bien una **infección**, cuando se ingieren alimentos contaminados por agentes zoonóticos que se desarrollan en el intestino humano, o bien una **intoxicación** cuando se ingieren alimentos en los que el agente patógeno produjo una toxina en el alimento de forma previa a su ingestión. Las infecciones se diferencian de las intoxicaciones normalmente por el periodo de incubación que es algo más largo en aquellas y por la sintomatología inicial atendiendo al tracto digestivo afectado.

La información sobre los brotes de toxiinfecciones alimentarias investigados en los estados miembros de la Unión Europea está recogida en la Directiva 2003/99/CE y traspuesta a nuestro ordenamiento jurídico a través del Real Decreto 1940/2004 de 27 de septiembre, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos.

De este modo, las autoridades competentes están obligadas a realizar la investigación de los agentes causales de las toxiinfecciones alimentarias, a su análisis, para así realizar las actuaciones oportunas sobre la posible retirada del alimento en cuestión, además de tener que realizar la recopilación de esta información mediante datos que sean comparables para que sean posteriormente remitidos a nuestra administración central y formen parte del Informe Sumario Nacional y Comunitario (3).

Los últimos informes Sumarios Comunitarios publicados relativos a las zoonosis, los agentes zoonóticos y los brotes alimentarios son relevantes, ya que se declaran por encima de 5.000 brotes cada año. Los agentes mayormente detectados causantes de los brotes declarados son *Salmonella* spp., las bacterias productoras de toxinas, los virus y *Campylobacter* spp. (4, 5).

2. NORMATIVA

Normativa de aplicación

- Directiva 2003/99 (CE), del Parlamento Europeo y del Consejo, de 17 de noviembre de 2003 sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos y por la que se modifica la Decisión 90/424/CEE del Consejo y se deroga la Directiva 92/117/CEE del Consejo.

- Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de marzo de 2017, relativo a los controles y otras actividades oficiales realizadas para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios, y por el que se modifican varios Reglamentos.
- Reglamento (CE) n° 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005 y sus modificaciones relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.
- Real Decreto 1940/2004, 2004 de 27 de septiembre, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos.
- Reglamento (CE) n° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal

Normas ISO y normativa relativa a métodos analíticos

- ISO 7218. Microbiología de alimentos y productos para la alimentación animal. Requisitos generales y directrices para los análisis microbiológicos.
- ISO 6887-1. Microbiología de la cadena alimentaria. Preparación de muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para análisis microbiológicos. Parte1: Normas generales para la preparación de la suspensión inicial y las diluciones decimales.
- ISO 6887-2. Microbiología de la cadena alimentaria. Normas específicas para la preparación de carne y productos cárnicos.
- ISO 6887-3. Microbiología de la cadena alimentaria. Normas específicas para la preparación de pescado y productos de la pesca.
- ISO 6887-4. Microbiología de la cadena alimentaria. Normas específicas para la preparación de productos diversos.
- ISO 6887-5. Microbiología de la cadena alimentaria. Normas específicas para la preparación de leche y productos lácteos.
- ISO 11290-2. Método horizontal para la detección y recuento de *Listeria monocytogenes* y *Listeria* spp. Parte-2: Método de recuento.
- ISO 19020. Método horizontal para la detección inmunoenzimática de enterotoxina estafilocócica en los productos alimenticios.
- ISO 7937. Microbiología de alimentos y productos para la alimentación animal. Método horizontal para el recuento de *Clostridium perfringens*. Técnica de recuento de colonias.
- ISO 7932. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de *Bacillus cereus* presuntivos. Técnica de recuento de colonias a 30°C.
- ISO 11290-1. Método horizontal para la detección y recuento de *Listeria monocytogenes* y *Listeria* spp. Parte-1: Método de detección.
- ISO 10272. Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección y recuento de *Campylobacter* spp. Parte 1: Método de detección.
- ISO 13136. Método horizontal para la detección de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) y la determinación de los serogrupos O157, O111, O26, O103 y O145.
- ISO 18593. Microbiología de la cadena alimentaria. Métodos horizontales para el muestreo de superficies.
- ISO/TS 17728. Microbiology of the food chain-sampling techniques for microbiological analysis of food and feed samples.
- ISO DIS- 18743. Microbiology of food and animal feed- Detection of *Trichinella Larvae* in meat- Physical method by digestion.
- Artificial digestion fish fillets for the isolation of *Anisakidae* and *Opisthorchidae* larval stages. Documento Estándar (SOP) Laboratorio Comunitario de Referencia.

3. OBJETIVO

El objetivo de este documento es realizar una recopilación, no exhaustiva, referida a los principales agentes biológicos implicados en los brotes de origen alimentario y un desarrollo a través de procedimientos técnicos sobre los métodos analíticos de referencia establecidos en los Reglamentos Comunitarios que lo regulan. Es necesario, sin embargo, recordar que desde el punto de vista normativo se pueden usar otros

sistemas de pruebas alternativas a condición de que proporcionen garantías equivalentes de seguridad alimentaria. Estos métodos analíticos alternativos en caso de utilizarse deben estar validados con respecto al método de referencia establecido en los procedimientos normalizados de trabajo (PNTs) del documento. Si se utilizara un método registrado debería estar certificado por terceros conforme al protocolo de la norma EN/ISO 16140 u otros protocolos similares internacionalmente aceptados.

4. ACTUACIONES ANTE LA SOSPECHA DE UN BROTE ALIMENTARIO

La Directiva 2003/99 (CE) relativa a la *Vigilancia de las Zoonosis* y de los *Agentes Zoonóticos* establece que los estados miembros han de realizar de forma obligatoria la debida investigación epidemiológica de los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos, de forma que pueda recogerse en la Comunidad Europea la información necesaria para evaluar las tendencias y las fuentes pertinentes.

Las autoridades competentes de los países miembros están obligados a asegurar la recogida, análisis y publicación sin demora de datos sobre la presencia de zoonosis y agentes zoonóticos y sobre la resistencia a los antimicrobianos ligada a los brotes alimentarios.

Asimismo, el Reglamento (UE) 625/2017 *relativo a los Controles Oficiales y otras actividades Oficiales, realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios*, establece la obligatoriedad de contribuir activamente al diagnóstico de los brotes de enfermedades de origen alimentario, zoonosis o enfermedades de los animales en los estados miembros, mediante la realización de estudios de diagnóstico de confirmación, de caracterización y epizooticos o taxonómicos con cepas de patógenos aislados en los brotes.

Las diferentes circunstancias que originan la aparición de brotes alimentarios, dan lugar a diversas clasificaciones de los brotes de origen alimentario, como:

Brote colectivo: cuando el alimento ha sido elaborado y consumido por los afectados en establecimientos del sector alimentario (restauración comercial o social).

Brote mixto: cuando el alimento ha sido elaborado en un establecimiento alimentario, pero se ha consumido en un domicilio particular, excursión o circunstancias similares.

Brote familiar: cuando el alimento ha sido elaborado en el domicilio particular y consumido en el mismo u otro domicilio particular, excursión o circunstancias similares.

Actuaciones principales:

Los principales objetivos y actuaciones de los médicos epidemiólogos y de los responsables del Control Oficial de Alimentos ante la aparición de un brote de naturaleza alimentaria son los siguientes:

- Establecer la historia natural de la enfermedad
- Identificar el alimento implicado y/o el origen (las fuentes de infección en caso de enfermedades transmisibles), el agente causal, el modo o mecanismo de transmisión, el período de incubación o latencia y el espectro clínico,
- Caracterizar la población de riesgo, establecer los posibles factores contribuyentes, identificar factores de riesgo, establecer medidas de control y prevención, y evaluar su impacto.

Para ello es necesario:

- Confirmar la existencia del brote
- Recoger toda la información posible entrevistando a todos los afectados que en ese momento se conozcan
- Realizar las encuestas epidemiológicas

- Realizar la toma de muestras clínicas
- Analizar una descripción inicial de la situación: tiempo, lugar, formular hipótesis
- Confeccionar un estudio de los manipuladores de alimentos posiblemente implicados
- Formalizar un informe de confirmación de hipótesis

En España, a través de lo establecido en el Real Decreto 2210/1995, por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) se debe realizar la declaración del brote epidémico a la autoridad sanitaria competente de la Comunidad Autónoma de forma obligatoria y urgente, así como realizar un informe final del brote y las encuestas epidemiológicas de los casos implicados en dicho brote al Centro Nacional de Epidemiología. (6)

5. PRINCIPALES AGENTES CAUSANTES DE BROTES ALIMENTARIOS

5.1. *Salmonella* spp

5.1.1. Introducción

La salmonelosis es una de las enfermedades de transmisión alimentaria más común y ampliamente extendida, producida por bacterias del género *Salmonella*. Es la segunda zoonosis de transmisión alimentaria más notificada en humanos después de la campilobacteriosis y la primera causa de brotes alimentarios en la Unión Europea (UE) y en países no pertenecientes a la UE. En 2020 se notificaron 52.702 casos confirmados de salmonelosis en humanos en la UE, registrándose el número más bajo desde 2007, debido a los impactos de la retirada del Reino Unido de la UE, por un lado, y la pandemia de COVID-19, por otro. A pesar de ello, la tendencia general de la salmonelosis en humanos se ha estabilizado en los últimos 5 años (2016-2020). En total, en la UE se notificaron 694 brotes de *Salmonella* spp. asociados al consumo de alimentos y agua, siendo en su mayoría causados por *S. enteritidis*. En España, donde es una enfermedad de declaración obligatoria, en 2020 se notificaron 3.526 casos de salmonelosis (la pandemia por COVID-19 tuvo impacto en el nivel de notificación en España durante 2020, por lo que el número de casos podría estar infraestimado (7).

Los microorganismos del género *Salmonella* son bacilos Gram-negativos, aerobios o anaerobios facultativos, móviles por flagelos peritricos. Poseen antígeno somático (O), antígeno flagelar (H) y pueden tener antígeno de virulencia (Vi), este último es un polisacárido termolábil localizado en la cápsula. El sistema de clasificación más comúnmente utilizado agrupa a *Salmonella* spp. por especies (*S. enterica* y *S. bongori*), subespecies (*S. enterica* a su vez se divide en 6 sub-especies) y serotipos. *Salmonella enterica* tiene más de 2.300 serotipos diferentes. En el esquema de Kaufmann-White, varios serotipos de *Salmonella* spp. se clasifican dentro de diferentes serogrupos. Los serogrupos están basados en un antígeno mayor y uno o más antígenos somáticos menores. Los serotipos causantes de enteritis varían según la localización geográfica, siendo los más frecuentes en nuestra área Enteritidis y Typhimurium. La nomenclatura recomendada para *Salmonella* spp. comporta escribir el nombre de la especie en cursiva seguido del serotipo en redonda y con su primera inicial en mayúscula (por ejemplo: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (8,9).

5.1.2. Fuentes de infección

Salmonella spp. se encuentra comúnmente en el intestino de aves (incluidas las domésticas) y mamíferos sanos (fundamentalmente ganado porcino y bovino) aunque algunas cepas pueden tener como reservorios a animales de sangre fría (reptiles y tortugas) y especies de pescado y moluscos. Los animales reservorios eliminan este microorganismo en las heces, contaminando suelo, pastos y agua, en los que puede sobrevivir durante meses. El hombre es el único reservorio de *S. Typhi*, agente causal de las fiebres tifoideas, enfermedad transmitida por agua o alimentos contaminados por heces humanas, y que no se considera (10).

En los alimentos procedentes de animales infectados, los principales factores intrínsecos y extrínsecos que afectan al crecimiento y supervivencia de la bacteria son el pH, la actividad de agua (aw) y la temperatura, así como la microbiota competitiva. *Salmonella* spp. es capaz de sobrevivir en ambientes aeróbicos y anaeróbicos, con unos rangos amplios de temperatura, pH y actividad de agua como se indica en la tabla 1.

Tabla 1.- Supervivencia de *Salmonella* spp. en diferentes ambientes

	Sobrevive (valores extremos)	Crecimiento óptimo	Crecimiento extremo
Temperatura	-23°C (mantequilla)	35-37°C	5-50°C
pH		7-7,5	3,8-9,5
Actividad de agua	0,3-0,5 (chocolate)	0,99	0,94->0,99

La infección suele ocurrir por el consumo de alimentos crudos o poco cocinados. En 2020, el 59% de los brotes de salmonelosis fueron causados por el consumo de huevos y derivados (donde predomina *S. Enteritidis*, presente tanto en la cáscara como en la yema, debido a su capacidad de transmisión transovárica), el 15% por carne y productos derivados del cerdo (siendo predominante *S. Typhimurium*). Los principales alimentos afectados fueron: (7)

- Productos crudos o insuficientemente cocinados, derivados de: carne de aves, huevos, carne de cerdo o vacuno.
- Leche cruda y productos lácteos con leche cruda.
- Vegetales, zumos, cereales y semillas germinadas.
- Productos de bollería y repostería. Chocolate (brote ligado a chocolate en 2022) (11).
- Alimentos desecados o en polvo (cacao, leche en polvo, especias)

5.1.3. Factores de riesgo

Las malas prácticas en la producción primaria (falta de limpieza, hacinamientos de animales, la ausencia de detección y aislamiento de los casos positivos), así como el transporte hasta el matadero con una situación elevada de estrés, son factores que contribuyen a mantener y difundir los reservorios de *Salmonella* spp. en las explotaciones. En los mataderos la falta de separación de animales positivos de los sanos en los locales de estabulación, y las malas prácticas de faenado, fundamentalmente durante la evisceración, contribuyen a la contaminación de las carnes (12).

Durante el procesado de los alimentos es importante realizar adecuados tratamientos térmicos y de envasado, que impidan la multiplicación y el crecimiento de la bacteria. La pérdida de la cadena de frío, los calentamientos insuficientes, las manipulaciones incorrectas, formulaciones indebidas que no alcancen los niveles suficientes de acidificación, deshidrataciones incompletas, los envasados permeables, etc., podrían producir un mantenimiento de los niveles de *Salmonella* spp. iniciales y favorecer su multiplicación.

5.1.4. Características de la enfermedad

Generalmente se caracteriza por la aparición brusca de fiebre, dolor abdominal, diarrea, náuseas, vómitos, cefalea, mialgias y otros síntomas sistémicos. Los síntomas aparecen entre 6 y 72 horas (generalmente de 12 a 36 horas) después de la ingesta de alimentos contaminados, y tiene una duración de entre 2 y 7 días. La dosis infectiva puede oscilar desde 10 a 10¹¹ bacterias. Los alimentos con alto porcentaje de grasa o proteína protegen a la salmonela de la acidez gástrica, por lo que en estos la dosis infectiva puede ser inferior. En la mayoría de los casos, los síntomas de salmonelosis son relativamente leves y los pacientes se recuperan sin tratamiento específico. Sin embargo, en algunos casos, particularmente en niños pequeños y en ancianos, la deshidratación causada por la enfermedad puede ser grave y poner en peligro la vida. La infección sistémica es una complicación que aparece en aproximadamente el 5% de los casos, siendo más frecuente en pacientes inmunodeprimidos, pudiendo cursar con meningitis, encefalopatía, endocarditis, neumonía, abscesos, osteomielitis, celulitis o artritis. La infección en mujeres embarazadas, aumenta el riesgo de aparición de complicaciones (13).

5.1.5. Medidas de prevención y control

Las principales medidas de prevención de la enfermedad en el hogar son el lavado de manos después de manipular alimentos crudos (huevos, carne o vegetales sin lavar), o animales (especialmente reptiles y tortugas) y el cocinado completo a 70°C durante 2 minutos de los alimentos de más riesgo, especialmente huevos, carne de cerdo y de aves y carne picada.

El Reglamento (CE) 2073/2005, relativo a criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, desarrolla criterios microbiológicos para *Salmonella* spp. en diferentes categorías de alimentos. Existen “Criterios de Seguridad Alimentaria” que se aplican durante toda la vida útil del alimento y cuyo incumplimiento implicaría una retirada del producto del mercado y “Criterios de Higiene del Proceso” que el operador deberá verificar durante las fases concretas de producción y cuyos incumplimientos requieren la adopción de las acciones correctoras recogidas en el Reglamento.

En las tablas 2 y 3 se muestra un resumen de las categorías de alimentos a las que se les aplican dichos criterios.

Tabla 2.- Criterios de seguridad alimentaria para *Salmonella* spp.

Criterios de seguridad alimentaria para <i>Salmonella</i> spp. Categorías de alimentos
Alimentos listos para el consumo que contengan huevo crudo
Carne fresca de aves
Carne picada y preparados de carne
Carne separada mecánicamente
Productos cárnicos
Ovoproductos
Crustáceos y moluscos cocidos
Semillas germinadas
Frutas y hortalizas troceadas (listas para consumo)
Zumos de frutas y hortalizas no pasteurizados (listos para consumo)
Preparados deshidratados para lactantes y alimentos dietéticos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes menores de seis meses
Preparados deshidratados de continuación
Gelatina
Colágeno
Quesos
Mantequilla
Nata
Leche en polvo y suero en polvo
Carne de reptiles
Helados de origen lácteo

Tabla 3.- Criterios de higiene del proceso para *Salmonella* spp.

Criterios de higiene del proceso para <i>Salmonella</i> spp. Categorías de alimentos
Canales bovinas
Canales porcinas
Canales ovinas y caprinas
Canales de pollos de engorde y pavos
Canales equinas

5.2. *Listeria monocytogenes*

5.2.1. Introducción

La listeriosis es una enfermedad de transmisión alimentaria causada por la bacteria *Listeria monocytogenes*. Es la enfermedad humana de origen alimentario más grave, en cuanto a tasa de hospitalización (99%) y mortalidad (15,6%). Hay 21 especies dentro del género *Listeria*, de las cuales solo dos son patógenas para el hombre y los animales: *L. monocytogenes*, patógena para el hombre y animales (en los que suele causar abortos) y *L. ivanovii*, patógena para los animales, pero raras veces para el hombre (13).

L. monocytogenes es un bacilo Gram-positivo, móvil a 20°C-25°C pero no a 37°C y que no forma endosporas. Es anaerobio facultativo y microaerofílico. La especie *L. monocytogenes* se divide en 4 linajes evolutivos (I-IV) y 13 serovares, basándose en antígenos somáticos y flagelares. Históricamente el serotipo 4b, ha sido el más prevalente en casos clínicos humanos, y el menos aislado en alimentos. Sin embargo, durante la última década el serotipo 1/2 a, ha sido el más prevalente tanto en alimentos como en muestras ambientales, y ha estado frecuentemente ligado a enfermedad en el hombre, causando brotes de toxiinfección alimentaria en Europa y Norteamérica. Actualmente el método de la secuenciación del genoma completo (WGS) ha mejorado el estudio de los brotes, al permitir ligar casos esporádicos asociados con distintos productos alimenticios y regiones, a una única fuente.

Listeria monocytogenes puede multiplicarse incluso a temperaturas de refrigeración, entre 2°C y 4°C. El cocinado a temperaturas superiores a los 70°C durante 2 minutos destruye la bacteria. En la tabla 4 se indican sus características de crecimiento.

Tabla 4.- Características de crecimiento de *Listeria monocytogenes*

	Mínimo	Crecimiento óptimo	Máximo
Temperatura	-2°C	30°C-37°C	45°C
pH	4,0-4,3	7	9,6
Actividad de agua	0,92	0,99	-
% de NaCl que inhibe el crecimiento			12%

5.2.2. Fuentes de infección

L. monocytogenes es una bacteria ubicua, de carácter telúrico y ampliamente distribuida en el ambiente, tanto en el medio agrario (suelo, plantas, forraje, materia fecal, aguas residuales, agua) como en los lugares de elaboración de alimentos. Los ensilados mal elaborados (insuficiente acidificación) pueden contener grandes cantidades de la bacteria, y ser la causa de la infección en rumiantes. En las granjas de ganado porcino, la alimentación húmeda es un factor de riesgo de contaminación. La bacteria llega al ambiente procedente de las heces de animales enfermos o portadores, tanto domésticos como salvajes.

Según el informe “EU One Health Zoonoses Report 2020”, en el año 2020, se declararon 20 brotes de toxiinfecciones alimentarias por *Listeria* spp. en Europa, con 163 casos, de los cuales 126 fueron hospitalizados y murieron 30 personas (la mitad de las muertes por toxiinfección alimentaria declaradas en 2020) (14, 15).

Se puede mencionar el último brote producido recientemente en España en 2019 que tuvo un gran impacto en la Salud Pública, causado por recuentos elevados de *Listeria monocytogenes*, en una carne mechada que estaba lista para el consumo.

La tendencia al alza, en general, en el número de brotes por *Listeria* spp. desde 2016, así como en el número de casos hospitalizados es preocupante. En los últimos cinco años ha sido responsable tanto de pequeños brotes familiares, como de brotes transfronterizos, además el lugar donde se producen los brotes es muy variado, preocupando especialmente hospitales y residencias de ancianos.

5.2.3. Factores de riesgo

Según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), el 92% de los casos de listeriosis invasiva serían atribuibles a dosis superiores a 100.000 unidades formadoras de colonias por porción (16). Suponiendo un tamaño de porción promedio de 50 g, esto correspondería a una concentración de *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo por encima de 2.000 ufc/g en el momento del consumo. No obstante, hay que tener en cuenta, que la dosis infectiva depende también de factores individuales, como el estado inmunitario, edad, o personas sometidas a tratamientos con inhibidores de la bomba de protones, que elevan el pH del estómago estimulando el crecimiento de la microbiota intestinal y alterando su capacidad inmunomoduladora y antiinflamatoria. Por este motivo, una pequeña proporción de casos están asociados con alimentos listos para el consumo, con niveles más bajos de *Listeria monocytogenes*. La población de mayor riesgo son los ancianos, embarazadas, recién nacidos, y personas inmunodeprimidas. Hay que tener en cuenta que, en la Unión Europea, el grupo de población con más de 65 años está aumentando, y que, además, en el caso de las personas mayores, son frecuentes prácticas como almacenar alimentos con fechas de caducidad rebasadas y/o a temperaturas por encima de las recomendadas, lo que tiene un impacto importante en el riesgo de listeriosis.

Los alimentos más frecuentemente asociados con la listeriosis son los listos para el consumo refrigerados con una vida útil prolongada, siendo principalmente:

- Alimentos listos para el consumo, que no han necesitado un cocinado previo a su consumo. Alimentos con fechas de caducidad larga, envasados al vacío, etc.
- Productos cárnicos listos para el consumo como salchichas cocidas, patés, loncheados, carne mechada (brote en España 2019) (17).
- Pescados ahumados (salmón, trucha, anguilas)
- Productos lácteos (quesos de pasta blanda, leche cruda y helados elaborados con leche cruda)
- Ensaladas preparadas, así como verduras y frutas frescas (especialmente melones).

La persistencia de *Listeria monocytogenes* en el ambiente de fabricación es la principal causa de contaminación de alimentos, causada tanto por unas deficientes condiciones de higiene, como por la alta capacidad adaptativa de la bacteria a diversos factores físico-químicos, como por ejemplo su capacidad de formar biofilms.

5.2.4. Características de la enfermedad

La listeriosis es una enfermedad que suele aparecer en forma de casos esporádicos, y cuyo interés epidemiológico radica en la posibilidad de transmisión vertical humana y en la aparición, en los últimos años, de algunos brotes importantes de transmisión alimentaria. Desde 2015, es una enfermedad de declaración obligatoria, lo que supone una importante mejora en la notificación de casos. Sin embargo, los brotes son difíciles de investigar, debido al largo periodo de incubación de la listeriosis (5-70 días), que dificulta el estudio de los alimentos consumidos por los enfermos.

Se suele manifestar como un cuadro febril leve en personas sin enfermedades de base, pero puede causar meningoencefalitis, septicemia o ambos en neonatos y adultos y aborto en las mujeres embarazadas. La meningoencefalitis (rara en la embarazada) puede comenzar de forma repentina o puede ser subaguda, particularmente en inmunodeprimidos y en ancianos.

5.2.5. Medidas de prevención y control

La normativa de la UE (Reglamento 2073/2005) exige que los alimentos listos para el consumo que pueden presentar riesgo contengan un máximo de 100 ufc/g, requiriéndose en algunos casos la ausencia de la bacteria en 25 g de alimento, proporcionando un elevado margen de seguridad. Cuando sea necesario, el operador responsable de la elaboración del producto, realizará estudios de vida útil, para garantizar el cumplimiento del criterio de *L. monocytogenes*; esto es aplicable especialmente a los alimentos listos para el consumo que puedan favorecer el crecimiento de *L. monocytogenes* y puedan suponer un riesgo para la salud pública en relación con dicha bacteria. Además (Artículo 5.2 del Reglamento 2073/2005) los explotadores de empresas alimentarias que produzcan alimentos listos para el consumo susceptibles de plantear un riesgo de *L. monocytogenes* para la salud pública deberán tomar siempre muestras de las zonas y el equipo de producción, como parte de su plan de muestreo, con el fin de detectar la posible presencia de dicha bacteria (18, 19).

En la tabla 5 se muestra un resumen de las categorías de alimentos a las que se les aplican los criterios de seguridad alimentaria.

Tabla 5.- Criterios de seguridad alimentaria para *Listeria monocytogenes* en los diferentes alimentos

Criterios de seguridad alimentaria para <i>Listeria monocytogenes</i> . Categorías de alimentos
Alimentos listos para el consumo destinados a lactantes y alimentos listos para el consumo destinados a usos médicos especiales (<i>Listeria</i> spp. no detectada en ninguna de 10 submuestras)
Alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> , que no sean destinados a los lactantes ni a usos médicos especiales (<i>Listeria</i> spp. no detectada en ninguna de 5 submuestras)
Alimentos listos para el consumo que no pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> , que no sean los destinados a lactantes ni usos médicos especiales (≤ 100 ufc/g en las cinco submuestras)

5.3. *Campylobacter* spp.

5.3.1. Introducción

La campilobacteriosis es la enfermedad humana de origen alimentario que cuenta con el mayor número de casos declarados (unos 120.946 casos en 2020 con un descenso del 33,4% respecto a los declarados en 2019 debido al impacto de la pandemia COVID-19) en la Unión Europea (4). Las infecciones humanas se producen principalmente por bacterias termotolerantes (capaces de crecer a 41,5°C) del género *Campylobacter* spp., siendo las especies más comunes *C. jejuni*, seguida de *C. coli* y *C. lari*; menor incidencia tiene el *C. fetus*, una especie no termotolerante. La dosis infectiva es generalmente baja (entre 500 y 850 bacterias pueden llegar a producir la infección). Los microorganismos del género *Campylobacter* son bacilos Gram-negativos con forma de espiral y microaerófilos (necesitan una atmósfera de 5-10% de oxígeno y 3-10% de dióxido de carbono). Estos microorganismos no presentan características particulares de resistencia a la sal o los ácidos. Sus características de crecimiento se resumen en la tabla 6.

Tabla 6.- Características de crecimiento de *Campylobacter* spp.

	Crecimiento óptimo	Extremos (inhibición del crecimiento)
Temperatura	41,5°C	30°C-45°C
pH	6,5-7,5	4,9-9,0
Actividad de agua	0,997	0,987
% de NaCl	0,5%	0%-15% a 19%
O ₂	3-5%	0%-15% a 19%
CO ₂	10%	

5.3.2. Fuentes de infección

Campylobacter spp. está ampliamente extendido en la naturaleza. El principal reservorio es el tracto digestivo de animales sanos, silvestres y domésticos, principalmente pollos y también vacuno, cerdo y oveja. Sobrevive en los ambientes protegidos de la sequedad, permaneciendo hasta tres meses en las superficies húmedas, el estiércol o el agua. Las especies más patógenas se desarrollan a una temperatura óptima de 42°C, y no crecen por debajo de los 30°C; no obstante, se considera que son sensibles al calor, ya que no sobreviven cuando se cocinan por completo los alimentos. Las fuentes de infección más comunes son el consumo de carne de pollo poco cocinada y otros alimentos listos para el consumo que han estado en contacto con carne de ave cruda contaminada, así como la leche cruda (la contaminación de la leche se produce con las heces de ganado vacuno portador). La carne normalmente se contamina desde el intestino de las aves sanas durante su procesado.

La contaminación cruzada de otros alimentos (por ejemplo, vegetales), durante la preparación y el cocinado de la carne, se describe como una importante ruta de transmisión. Otras fuentes habituales son el consumo de agua de bebida no tratada, la leche cruda y el contacto con aves vivas y con animales domésticos.

Según el informe “EU One Health Zoonoses Report 2020”, en el año 2020 *Campylobacter* spp. fue la 4ª causa más frecuente de toxiinfección alimentaria en la UE, causando 317 brotes (14). Los alimentos implicados con mayor frecuencia fueron, como en años anteriores la carne de pollo y la leche cruda, siendo principalmente:

- Carne de ave
- Carne de cerdo y bovino
- Leche cruda

- Contaminación cruzada (vegetales)
- Agua de bebida

5.3.3. Características de la enfermedad

Esta bacteria es la causa más frecuente de gastroenteritis en el mundo desarrollado; ocasiona de 5% a 14% de los casos de diarrea en todo el mundo. Los niños menores de 5 años de edad y los adultos jóvenes muestran la mayor incidencia. Aunque la mayoría de los casos son esporádicos, se han producido brotes asociados a alimentos, en particular pollo mal cocinado, leche no higienizada y agua sin potabilizar. La campilobacteriosis también causa la diarrea del viajero.

La infección por *Campylobacter* spp. se caracteriza por diarrea (a menudo con heces sanguinolentas), dolor abdominal, malestar, fiebre, náuseas y vómitos. El periodo de incubación es de 2-5 días. La sintomatología suele durar una semana y, en general, no más de 10 días. Otros cuadros clínicos menos frecuentes incluyen meningitis o un síndrome similar a la fiebre tifoidea y en algunas ocasiones se pueden presentar complicaciones como convulsiones febriles, artritis reactiva (1%), síndrome de Guillain-Barré (0,1%), eritema nodoso o urticaria. Muchas infecciones son asintomáticas. *C. fetus*, a diferencia de *C. jejuni*, no suele causar diarrea, pero puede producir manifestaciones sistémicas como bacteriemia, meningitis, infección vascular y abscesos.

5.3.4. Medidas de prevención y control

En el año 2017, teniendo en cuenta varios informes de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (19) relativos a la prevalencia de *Campylobacter* spp. en pollos de engorde (75% de canales contaminadas en mataderos), y a las posibilidades de control de *Campylobacter* spp. en la cadena de producción de aves de corral, se modificó el Reglamento 2073/2005 sobre criterios microbiológicos, y se introdujo el **criterio de higiene** del proceso para *Campylobacter* spp. en canales de pollos de engorde, que el operador deberá verificar tras la refrigeración de las mismas, y cuyos incumplimientos requieren la adopción de las acciones correctoras recogidas en el Reglamento (21).

5.4. *Escherichia coli* O157:H7

5.4.1. Introducción

La infección por *E. coli* productora de toxinas Shiga (STEC) en humanos es la tercera zoonosis más frecuente en la UE. En 2020, se notificaron en la UE 4.446 casos confirmados de esta infección. La mayor incidencia se observó en menores de 5 años (14). La infección por cepas STEC es una enfermedad de declaración obligatoria en España.

Escherichia coli es una bacteria Gram-negativa, anaerobia facultativa, móvil; sus características de crecimiento se resumen en la tabla 7.

Tabla 7.- Características de crecimiento de *Escherichia coli*

	Crecimiento óptimo	Extremos (inhibición del crecimiento)
Temperatura	40°C	6°C-45,5°C
pH	6-7	4,4-9
Actividad de agua	0,995	0,95
% de NaCl	0%	8,5%

E. coli forma parte de la microbiota habitual del intestino de personas y animales, y se elimina a través de las heces. Aunque la mayoría de las cepas son inofensivas, algunas pueden causar graves enfermedades de transmisión alimentaria. Las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se clasifican en 6 grupos. Entre ellos, los de mayor importancia son *E. coli* enterohemorrágica, verotoxigénica y productora de toxinas Shiga (también conocidos por sus siglas en inglés como EHEC, VTEC y STEC, respectivamente). Determinados serogrupos de STEC (O157, O26, O103, O111, O145 y O104:H4) están reconocidos como los que provocan la mayor parte de los casos de síndrome urémico hemolítico (SUH) que se han producido en la UE. Dos tipos principales de toxinas Shiga (Stx1 y Stx2) se han asociado con cepas que causan enfermedades humanas. Aunque el serotipo O157:H7 se considera clínicamente el más importante, se estima que hasta el 50% de las infecciones son causadas por serotipos no O157. Aunque la presentación clínica de las infecciones no-O157 STEC puede variar, pueden ser tan virulentas como las infecciones por O157:H7. Se estima que la ingestión de 600 bacterias puede desencadenar el SHU en niños menores de 5 años (22).

5.4.2. Fuentes de infección

El principal reservorio de la bacteria es el tracto digestivo de los rumiantes, en especial el ganado vacuno, ya que son portadores sanos. Puede sobrevivir durante largos periodos en el medio ambiente, tanto en el suelo como en el agua, pudiendo proliferar en agua y alimentos de origen animal y vegetal. La transmisión se produce sobre todo por el consumo de alimentos contaminados. Se puede transmitir también por el consumo de agua contaminada, así como por el contacto con animales y sus heces. La transmisión fecal-oral de una persona a otra se produce cuando hay deficiencias en la higiene de las manos por parte de una persona infectada, que contamina los alimentos al manipularlos.

Los alimentos que con mayor frecuencia se han asociado a brotes por *E. coli* O157 son los siguientes:

- Carnes de vacuno troceadas o picadas poco cocinadas
- Leche cruda y productos lácteos con leche cruda (sobre todo quesos)
- Vegetales crudos (lechuga, brotes de rábano blanco, semillas germinadas)
- Zumo de manzana sin pasteurizar
- Agua contaminada (potable o recreativa)

Es importante destacar que, en vegetales de hoja como lechugas y espinacas regadas con aguas contaminadas, la bacteria puede penetrar en el tejido de la planta, además de contaminar la superficie. El cocinado completo de los alimentos inactiva la bacteria, sin embargo puede sobrevivir en ambientes ácidos, como productos cárnicos fermentados, quesos, zumos de frutas y ensaladas aliñadas.

5.4.3 Características de la enfermedad

Esta enfermedad es relevante para la salud pública debido a que puede producir brotes y complicaciones graves. El periodo de incubación puede ser largo (entre 2 a 10 días), aunque la mediana está en 3-4 días. Suele cursar como gastroenteritis aguda, se inicia con calambres abdominales, a menudo acompañada de fiebre leve y en ocasiones vómitos. La diarrea típicamente sanguinolenta es leve y autolimitada en la mayoría de los casos y la recuperación habitualmente se produce entre cinco a siete días. Alrededor del 15% de los niños diagnosticados con infección por *E. coli* O157 desarrollan la complicación grave del síndrome hemolítico urémico (SHU) considerado como la causa más común de insuficiencia renal aguda en niños europeos; esta proporción es mucho menor entre los adultos (23).

5.4.4. Medidas de prevención y control

El Reglamento 2073/2005, establece los límites microbiológicos aplicables al control de *E. coli* como criterio de higiene de procesos en muchas categorías de alimentos para garantizar adecuadas prácticas de higiene y que su presencia en los mismos no suponga un riesgo para la salud del consumidor. Adicionalmente, los operadores de empresas alimentarias que produzcan brotes de semillas germinadas tienen la

obligación de vigilar específicamente los serogrupos O157, O26, O103, O111, O145 y O104:H4, en las semillas germinadas crudas listas para el consumo. También se debe controlar la presencia de STEC en el agua de riego utilizada para la germinación de semillas. En las tablas 8 y 9 se indican los criterios de seguridad alimentaria y de higiene del proceso para *E. coli* y *E. coli* STEC.

Tabla 8.- Criterios de seguridad alimentaria para *E. coli* y *E. coli* STEC en los diferentes alimentos

Criterios de seguridad alimentaria para <i>E. coli</i> y <i>E. coli</i> STEC Categorías de alimentos
Moluscos bivalvos vivos y equinodermos, tunicados y gasterópodos marinos vivos (solo <i>E. coli</i>)
Brotes (sin contar los que hayan sido sometidos a tratamiento para eliminar <i>Salmonella</i> spp. y STEC): <i>E. coli</i> productora de toxinas Shiga (STEC) O157, O26, O111, O103, O145 y O104:H4

Tabla 9.- Criterios de higiene del proceso para *E. coli* en los diferentes alimentos

Criterios de higiene del proceso para <i>E. coli</i> Categorías de alimentos
Carne picada, carne separada mecánicamente y preparados cárnicos
Queso elaborado con leche o suero tratados térmicamente, y mantequilla o nata elaboradas con leche cruda
Productos sin cáscara y concha de crustáceos y moluscos cocinados
Frutas y hortalizas troceadas listas para el consumo, y zumos de frutas y hortalizas no pasteurizados

5.5. TOXINAS ESTAFILOCÓCICAS

5.5.1. Introducción

Las enterotoxinas estafilocócicas son polipéptidos de entre 20 y 30 KDa, termoestables y resistentes a las enzimas digestivas, que se producen e ingieren preformadas en los alimentos contaminados con *Staphylococcus aureus* y otros estafilococos coagulasa positivos, principalmente *S. intermedius*, que tienen los genes productores de estas toxinas. En el año 2020 se notificaron en Europa 44 brotes de intoxicación alimentaria por enterotoxinas estafilocócicas, con 412 casos, casi la mitad de brotes que, en 2019, año en el que se produjeron 77 brotes con 1464 casos, reducción debida fundamentalmente al impacto de la pandemia COVID 19, ya que la mayor parte de los brotes se producen en el ámbito familiar o en establecimientos de restauración comercial (20).

S. aureus es un microorganismo Gram-positivo, anaerobio facultativo que no forma esporas. Se han descrito 21 serotipos de *S. aureus*, pero solo 6 han estado implicados en brotes de intoxicación alimentaria. Otras especies de estafilococos coagulasa positivos (*S. intermedius*) también pueden producir enterotoxinas, pero el que se aísla con mayor frecuencia en alimentos es *S. aureus*.

5.5.2. Fuentes de infección

Los estafilococos son microorganismos ubicuos, que se encuentran en la piel, membranas mucosas y cavidad naso-faríngea de animales de sangre caliente, y especialmente del hombre. También causan mastitis clínicas y subclínicas en rumiantes. Se encuentra en cocinas, neveras, ambiente hospitalario y locales de preparación de alimentos y en diversos alimentos, a los que llega procedente de la piel o membranas

mucosas del hombre o animales portadores. Para que se formen enterotoxinas en un alimento éste tiene que tener condiciones que favorezcan el crecimiento del microorganismo y la producción de enterotoxinas, y mantenerse el tiempo suficiente a la temperatura adecuada. En la tabla 10 se describen los principales factores que influyen en el crecimiento de *S. aureus* y de la producción de toxinas.

Tabla 10.- Características de crecimiento de *S. aureus* y de producción de toxinas.

	Crecimiento		Producción toxinas	
	Óptimo	Extremos	Óptimo	Extremos
Temperatura	35°C-41°C	6°C-48°C	34°C-40°C	10°C-45°C
pH	6-7	4-10	7-8	5-9,6
Actividad de agua	0,99	0,83-0,99	0,99	0,86-0,99
% de NaCl	0-4	0-20	0-4	0-10
Atmósfera	aeróbica	aero-anaeróbica	aeróbica	aero-anaeróbica

Una vez formada la toxina en el alimento, ésta es resistente a los tratamientos de inactivación que normalmente se aplican en la industria o en el hogar (tratamiento térmico, altas presiones hidrostáticas, incluso radiaciones ionizantes).

S. aureus puede aislarse de gran variedad de alimentos; los que mayor riesgo tienen son los que sufren muchas manipulaciones:

- Alimentos muy manipulados y recontaminados tras el tratamiento térmico, como la carne de aves, jamón cocido loncheado, ensaladas de arroz o variadas, pasteles con crema.
- Alimentos que se fermentan con acidificación lenta, como algunos quesos o carnes curadas como el salami.
- Productos desecados o con baja actividad de agua, como la leche en polvo, la pasta o el pescado desecado.

En el año 2020, los alimentos implicados en brotes fueron muy variados:

- Productos de pastelería (masas rellenas de crema)
- Quesos y productos lácteos (helados)
- Carne y productos cárnicos de todas las especies (jamón cocido)
- Huevos y ovoproductos
- Pescados y productos de la pesca, moluscos, crustáceos y derivados
- Alimentos mixtos, como ensaladas de pollo y huevos

5.5.3. Características de la enfermedad

La enfermedad causada por las toxinas de *S. aureus* se caracteriza por la aparición brusca de vómitos y diarreas, con un periodo de incubación muy corto, de unas 3-6 horas. Su incidencia suele estar subestimada, debido al carácter leve y autolimitado del proceso, y a la falta de confirmación microbiológica en la mayoría de los casos. Según algunos estudios epidemiológicos, la dosis infectiva puede estar entre 24-144 nanogramos de toxina.

5.5.4 Medidas de prevención y control

Las principales medidas de prevención consisten en evitar que los alimentos se contaminen a partir de los portadores de la bacteria (higiene de manos, evitar manipular alimentos por personas con lesiones en la piel o con catarros), y evitar la multiplicación de la bacteria y producción de toxinas manteniendo la cadena del frío.

Adicionalmente, el Reglamento 2073/2005 sobre criterios microbiológicos en alimentos, desarrolla Criterios de Higiene del Proceso para los estafilococos coagulasa positivos en algunos alimentos, que el operador deberá verificar durante unas fases concretas de producción y cuyos incumplimientos requieren la adopción de acciones correctoras. Este Reglamento también establece Criterios de Seguridad Alimentaria para las enterotoxinas estafilocócicas en leche y productos lácteos. Ambos criterios se resumen en la tabla 11.

Tabla 11.- Criterios de seguridad alimentaria y de higiene del proceso para estafilococos coagulasa positivos y enterotoxinas.

Criterios de seguridad alimentaria para enterotoxinas estafilocócicas Categorías de alimentos
Quesos, leche en polvo y suero en polvo
Criterios de higiene del proceso de estafilococos coagulasa positivos Categorías de alimentos
Quesos, leche en polvo y suero en polvo
Productos sin cáscara y sin concha de crustáceos y moluscos cocinados

5.6. *Clostridium perfringens* y *Clostridium botulinum*

En el año 2020 se produjeron en la Unión Europea 32 brotes de intoxicación alimentaria por toxinas de *Clostridium perfringens*, con 682 casos, 10 hospitalizaciones y 2 muertes (1 en España por carne de cerdo y productos derivados), y 9 por toxina botulínica (1 en España, asociado a productos vegetales), con 34 casos, y todos ellos fueron hospitalizados (20).

Clostridium perfringens es una bacteria Gram-positiva, anaerobia pero aerotolerante, y formadora de esporas; produce una toxiinfección por ingestión de células vegetativas presentes en el alimento. Produce varias toxinas, entre ellas una enterotoxina que es la causante de la toxiinfección alimentaria, y que solo se sintetiza cuando la bacteria esporula, normalmente en el intestino delgado. Se encuentra en el intestino de los animales y de las personas y está ampliamente distribuida en el ambiente: en el suelo, en el polvo, en la vegetación y en los alimentos, especialmente de origen animal.

Clostridium botulinum, es una bacteria Gram-positiva, anaerobia estricta, que también forma esporas y produce normalmente una intoxicación cuando se ingiere una neurotoxina preformada en el alimento. Las cepas se dividen en 4 grupos (I-IV) y hay 7 tipos de toxinas botulínicas (A-G), siendo las A, B y E las más comunes. Algunas cepas atípicas de *C. butyricum* y *C. baratii* también pueden producir neurotoxinas. Al igual que *C. perfringens*, se encuentra en el intestino de animales y personas, y está ampliamente distribuida en el ambiente.

5.6.2. Fuentes de infección

La mayoría de las gastroenteritis por *C. perfringens* se producen por el consumo de guisos a base de carne (cocido, salsas de carne, estofados, lentejas, albóndigas, etc.), preparados en grandes cantidades y con antelación al consumo. Aunque el cocinado destruye casi todas las formas vegetativas, no destruye las esporas. Cuando el enfriamiento de los alimentos es lento, el microorganismo se multiplica rápidamente a temperaturas entre 30-50°C, hasta alcanzar la dosis infectiva (10^5 ufc/g).

C. botulinum, produce normalmente una intoxicación, cuando la toxina se ingiere preformada en el alimento. No obstante, en el caso del botulismo intestinal, en niños menores de 12 meses y en adultos inmunodeprimidos, se produce una toxemia provocada por la ingestión de bacterias o esporas, por ejemplo, tras el consumo de miel contaminada o por inhalación de polvo contaminado. La toxina botulínica se forma en los alimentos cuando hay fallos en el procesamiento (calentamiento insuficiente, pH >4,5, insuficiente sal o nitritos, contaminación con especias, fugas en el cierre de los botes), y permanece estable mucho tiempo, pero se destruye con el calentamiento. Los alimentos más comúnmente implicados son las conservas caseras y los productos elaborados artesanalmente.

A continuación, se resumen los principales alimentos implicados en ambas toxiinfecciones:

C. perfringens:

- Guisos a base de carne, preparados en grandes cantidades en restauración social, enfriados lentamente, y mal recalentados: cocido, alimentos ricos en almidón como lentejas o garbanzos en salsa, estofados, albóndigas.

C. botulinum:

- Carne salada y curada de ternera
- Jamón serrano casero, salchichas, patés
- Pescado salado y envasado al vacío, pescado marinado o fermentado (toxina tipo E)
- Miel contaminada con esporas (botulismo infantil)

5.6.3. Características de la enfermedad

En el caso de *C. perfringens* a las 10-12 horas de haber consumido el alimento, aparece una gastroenteritis con diarrea acuosa, malestar general y dolor abdominal, que suele durar de 12 a 24 horas. La enfermedad afecta más a los niños y a los ancianos. La ingestión de 10^5 formas vegetativas es suficiente para que la bacteria se multiplique en el intestino delgado, y alcance hasta 10^9 ufc/g de contenido, allí esporula y produce la toxina.

La intoxicación por neurotoxinas de *C. botulinum* produce una parálisis bilateral flácida, sin afectación de nervios sensitivos, y descendente, hombros, brazos, antebrazos y así sucesivamente. El periodo de incubación es de 6-36 horas. La toxina botulínica es el veneno biológico más potente que existe, siendo suficiente la ingestión de 70 µg, es decir unos pocos gramos de alimento contaminado para la intoxicación. En el caso del botulismo intestinal en niños, la ingestión de 10-100 bacterias, es decir unos miligramos de miel o la inhalación de polvo pueden causar la toxemia.

5.6.4. Medidas de prevención y control

La Unión Europea no ha establecido ningún criterio de seguridad alimentaria para estos dos microorganismos. En el caso de *C. perfringens* su investigación periódica en los alimentos tiene utilidad limitada, y en el caso de *C. botulinum* se requieren estrictas medidas de seguridad para trabajar con la toxina en el laboratorio. Por tanto, la prevención es fundamental.

Para *C. perfringens*, en establecimientos de restauración social, aquellos alimentos que se preparen con antelación se enfriarán pasando de 63°C a 10°C en menos de 2 horas, y se mantendrán refrigerados hasta el consumo. El recalentamiento también deberá ser rápido, en menos de 1 hora.

Para *C. botulinum*, es fundamental la esterilización de conservas que tengan un pH mayor de 4,5. Los productos con baja acidez se mantendrán en refrigeración. Las carnes curadas deben tener un mínimo del 10% de sal, y 150 mg/g de nitritos para inhibir su crecimiento, además de un control estricto de la actividad de agua. También es importante el etiquetado adecuado en la miel, para evitar su consumo por niños menores de 1 año.

5.7. *Bacillus cereus*

5.7.1. Introducción

En el año 2020 se produjeron en la Unión Europea 71 brotes de intoxicación alimentaria por toxinas de *Bacillus cereus* (6 de ellos en España), con 835 casos, 10 hospitalizaciones y 1 fallecimiento (24).

Bacillus cereus es una bacteria Gram-positiva, formadora de esporas y anaerobia facultativa. Pertenecce a un grupo de especies relacionadas, denominado "*Bacillus cereus sensu lato*", que incluye además *B. thurigiensis*, *B. anthracis* (agente causal del ántrax) y *B. weihenstephanensis* (cepas psicrotrofas de *B. cereus*). Algunas cepas de *B. cereus* pueden producir una toxina emética termoestable, llamada cereulida, que es la responsable del síndrome emético. Produce también enterotoxinas termolábiles, que provocan diarrea (síndrome diarreico).

5.7.2. Fuentes de infección

Bacillus cereus tiene reservorio telúrico, se encuentra en la materia orgánica en descomposición, en la tierra, y debido a la resistencia de sus esporas puede contaminar casi todos los alimentos, especialmente los de origen vegetal. Además, las esporas de *B. cereus* se pueden adherir al acero inoxidable y acumularse en los equipos y lugares donde se procesan los alimentos. El riesgo para el consumidor se produce cuando los alimentos contaminados se mantienen a temperatura ambiente, donde el microorganismo se multiplica, produciendo y liberando toxinas. En casi todos los brotes, los alimentos han sido cocinados y/o enfriados lentamente después de su elaboración. El síndrome emético se produce la mayor parte de las veces por consumo de productos ricos en almidón, como el arroz o la pasta.

Los alimentos más frecuentemente implicados en brotes son los siguientes:

- Comidas preparadas en general.
- Productos a los que se añaden especias o hierbas aromáticas.
- Alimentos deshidratados reconstituídos añadiendo agua caliente (sopas, purés de patatas, leche en polvo) o cocinados en agua (pasta, arroz, semolina), que se mantienen entre 4°C y 55°C y no se consumen de inmediato.

5.7.3. Características de la enfermedad

El síndrome emético se produce por la ingestión de la toxina cereulida, preformada en el alimento durante el crecimiento del *B. cereus*; tiene un periodo de incubación corto (30 minutos a 6 horas), y cursa con náuseas, vómitos, y diarrea. Hacen falta entre 5-10 µg de toxina/Kg de peso corporal, y concentraciones de *B. cereus* de al menos 10⁶ ufc/g de alimento. El síndrome diarreico está causado por la ingestión de células vegetativas o esporas, que producen la toxina en el intestino, y se asocia a recuentos de, al menos, 10⁵ ufc/g de alimento. Su periodo de incubación es de 8-16 horas, y produce una diarrea acuosa. En ambos casos puede haber complicaciones (septicemia, enterocolitis necrotizante, fallo hepático, incluso muerte) en recién nacidos prematuros o en personas inmunodeprimidas (25).

5.7.4 Medidas de prevención y control

Para prevenir la toxiinfección por *B. cereus*, especialmente en establecimientos de restauración colectiva, es importante evitar la germinación de las esporas y la multiplicación de las células vegetativas. Aquellos alimentos que no vayan a ser consumidos de inmediato deberán mantenerse a más de 63°C, o bien ser enfriados rápidamente y mantenidos en refrigeración hasta su consumo.

La legislación europea (Reglamento 2073/2005) no establece ningún criterio de seguridad alimentaria para *B. cereus*, pero sí se establece un criterio de higiene del proceso, como se indica en la tabla 12.

Tabla 12.- Criterios de higiene del proceso de *Bacillus cereus* en los diferentes alimentos.

Criterios de higiene del proceso de <i>Bacillus cereus</i> Categorías de alimentos
Preparados deshidratados para lactantes (menores de seis meses de edad)
Alimentos dietéticos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes menores de seis meses

En cualquier caso, a la hora de investigar un brote por *B. cereus*, hay que tener en cuenta que la toxina emética (cereulida) es muy estable, y puede estar presente en el alimento, aunque la bacteria se haya inactivado por tratamiento térmico, o incluso puede haber llegado preformada al alimento en uno de los ingredientes utilizados. Por tanto, el recuento de *B. cereus* en el alimento implicado no es un indicador fiable.

5.8. PARASITOSIS: *Anisakis* spp.

5.8.1. Introducción

Anisakis spp. es un parásito que se puede encontrar en el pescado y en los cefalópodos (calamar, pulpo, sepia, ...) y provoca alteraciones digestivas (anisakiasis) y reacciones alérgicas que, en ocasiones, pueden ser graves. La anisakiasis sólo se contrae si se come pescado o cefalópodos parasitados crudos o sometidos a preparaciones que no matan al parásito, ya que las larvas pasan activas al aparato digestivo. La anisakiasis humana es un problema de salud pública cuya incidencia está aumentando en los últimos años en todo el mundo, sobre todo en aquellos países con elevado consumo de pescado. Ello es debido principalmente a la mayor presencia del parásito en el pescado capturado, a la existencia de nuevos hábitos gastronómicos consistentes en el consumo de pescado crudo o sometido a preparaciones que no matan al parásito y a la disponibilidad de mejores técnicas de diagnóstico.

La familia *Anisakidae* incluye varios géneros, de los cuales los géneros *Anisakis* (especialmente *A. simplex*) y *Pseudoterranova* son los más frecuentemente implicados en la anisakiasis humana.

Los *Anisakis* son nematodos que parasitan a distintos animales marinos según sus diferentes fases larvarias. Cuando estos animales mueren, las larvas del *Anisakis* atraviesan las paredes de su tubo digestivo pudiendo llegar a los músculos (carne), a otras vísceras como el hígado o incluso llegar a niveles cercanos a la piel. Las larvas son redondas, de unos 3 centímetros de largo y 1 milímetro de ancho, de color blanco casi transparente o de color pardo y pueden enrollarse en forma de espiral. Se pueden encontrar también encapsuladas en la musculatura de los peces. Cuando están vivas, las larvas se mueven. La práctica de eviscerar los pescados (retirar las tripas) en alta mar y arrojar sus vísceras al agua favorece la propagación del parásito y, por tanto, la aparición de un mayor número de pescados infestados.

5.8.2. Fuentes de infección

El *Anisakis* se encuentra distribuido a nivel mundial en mares y océanos. Cualquier especie de pescado marino puede estar parasitada, incluidas las especies migratorias, como la anguila o el salmón. También puede encontrarse en cefalópodos y crustáceos. El tratamiento térmico (60°C/1 minuto) y la congelación (-20°C ≥ 24 horas o -35°C ≥ 15 horas) destruyen el parásito. Los tratamientos de salazón, escabechado, marinado, o ahumado en frío, no siempre aseguran su destrucción (26).

Los alimentos que pueden contener *Anisakis* spp. son los siguientes:

- Pescados, por ejemplo: salmón, bacalao, sardina, boquerón, merluza, pescadilla, bonito, caballa, abadejo, arenque, calamares, sepia, pulpo, chopitos y chocos.
- Crustáceos: langosta, langostino, bogavante, gamba, camarón, nécora, centollo, etc.
- Preparaciones caseras a base de pescado crudo o poco cocinado, como:
 - boquerones en vinagre y otros pescados en escabeche
 - salazones, carpaccio, tartar y otras especialidades a base de pescado crudo
 - pescados marinados como el ceviche
 - arenques y otros pescados crudos preparados en salmuera
 - pescados ahumados de las especies: arenque, caballa, espadín y salmón (salvaje) del Atlántico o del Pacífico.
- Si no se cocinan por encima de 60°C, hay que congelarlos previamente. Las industrias que venden este tipo de productos han de congelarlos previamente

Los alimentos en los que no se encuentran larvas de *Anisakis* spp.:

- Ostras, mejillones, almejas, coquinas y demás moluscos bivalvos.
- Pescados de aguas continentales (ríos, lagos, pantanos...) y piscifactorías de agua dulce. Este es el caso, entre otros, de truchas y carpas.
- Las semiconservas como las de anchoas (en envase metálico, de vidrio u otras presentaciones).
- Los pescados desecados salados como el bacalao o las mojamás.

5.8.3. Características de la enfermedad

Cuando la larva se adhiere o penetra en la mucosa del tubo digestivo del humano se producen los síntomas característicos: dolor abdominal de tipo cólico acompañado o no de vómitos y náuseas y alteración del ritmo intestinal. En otras personas puede presentarse una alergia posteriormente, aunque las larvas presentes en el pescado se hayan inactivado por congelación o por cocción. Además, en algunas personas pueden producirse reacciones inmediatas de tipo alérgico: desde urticaria hasta choque anafiláctico (taquicardia, dificultad respiratoria, tos, fatiga...). El periodo de incubación varía entre unas horas en los casos de reacciones alérgicas, hasta 5 días, para los síntomas intestinales. La presencia de una sola larva es suficiente para causar los síntomas.

5.8.4. Medidas de prevención y control

El Reglamento (CE) N° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios, establece que los operadores de las empresas alimentarias deben garantizar que los productos de la pesca se hayan sometido a un examen visual con el fin de detectar los parásitos visibles antes de ser puestos en el mercado. No se pueden poner en el mercado para uso humano productos de la pesca que estén claramente contaminados con parásitos. Además, establece la obligación de que los operadores que comercialicen productos de la pesca que vayan a consumirse crudos o escabechados, en salazón o sometidos a cualquier otro tratamiento si este es insuficiente para matar el parásito viable, sometan a esos productos a congelación a -20°C durante un periodo mínimo de 24 horas, o a -35°C durante un periodo mínimo de 15 horas. Sin embargo, no hace falta que los operadores lleven a cabo el tratamiento por congelación mencionado anteriormente en los

productos de la pesca sometidos a un tratamiento térmico que permita alcanzar una temperatura interior mínima de 60°C durante un minuto como mínimo, o que hayan sido sometidos a congelación durante suficiente tiempo como para matar a los parásitos viables.

En España, adicionalmente a la normativa comunitaria, con el objeto de contribuir a la solución del problema, el Real Decreto 1420/2006, de 1 de diciembre, sobre prevención de la parasitosis por *Anisakis* en productos de la pesca suministrados por establecimientos que sirven comida a los consumidores finales o a colectividades, establece la obligación de que dichos establecimientos pongan en conocimiento de los consumidores que los productos de la pesca afectados por el Real Decreto han sido sometidos a congelación en los términos establecidos.

5.9. PARASITOSIS: *Trichinella spiralis*

5.9.1. Introducción

La triquinosis es la enfermedad producida por la presencia de larvas enquistadas de un parásito del género *Trichinella*. Se produce por el consumo de carne o productos cárnicos crudos o insuficientemente cocinados de especies de animales infestadas por este parásito. Se ha descrito en carnes de cerdo, jabalí caballo, si bien en otros países se han producido casos por consumo de carne de oso, foca o morsa. En España, las especies habitualmente identificadas son *T. spiralis* y *T. britovi*. En 2014 se detectó por primera vez en España *T. pseudospiralis* (27).

En 2020 se notificaron 117 casos confirmados de triquinosis en humanos en la Unión Europea, lo que representa un aumento del número de casos en comparación con 2019. A pesar de ello, la tendencia en el número de casos no ha aumentado ni disminuido significativamente entre 2016 y 2020. En España, donde es una enfermedad de declaración obligatoria, en 2019 se notificó solamente 1 caso confirmado de triquinosis en humanos (20,24).

La gran mayoría de los brotes están relacionados con el consumo de jabalíes cazados para autoconsumo sin análisis de triquina.

5.9.2. Fuentes de infección

Trichinella spp. es un nematodo de tamaño microscópico. El parásito adulto se localiza en el intestino delgado de mamíferos, aves o reptiles, pero las larvas se diseminan a través del torrente sanguíneo e invaden el tejido muscular de los mamíferos susceptibles, localizándose fundamentalmente en los músculos estriados de mayor actividad y alta concentración de oxígeno (pilares diafragmáticos, maseteros, intercostales, linguales, etc.). La triquina no se inactiva mediante el curado, la desecación, el ahumado ni el cocinado en microondas. El cocinado es eficaz cuando se alcanza un mínimo de 71°C durante un minuto en el centro de la pieza de carne. La congelación depende del grosor de la pieza. Algunas especies de triquina que afectan a animales de caza y a los caballos son más resistentes a la congelación. Las temperaturas de referencia están calculadas para congeladores industriales y no son extrapolables a los congeladores domésticos; van desde los -15° C durante 20 días para carnes de un grosor inferior a 15 cm, hasta 30 días, para grosores de hasta 50 cm.

Los alimentos más frecuentemente implicados son:

- Carnes y productos cárnicos procedentes de cacerías o matanzas domésticas sin control sanitario, principalmente carnes de cerdo o jabalí consumidas crudas o poco cocinadas, y sus derivados (por ejemplo, embutidos).
- Carne de caballo consumida cruda o poco cocinada.

5.9.3. Características de la enfermedad

La manifestación clínica en el ser humano es variable, dependiendo de la sensibilidad del individuo, de su estado inmunitario y de la cantidad de larvas ingeridas, pudiendo manifestarse como una infestación asintomática hasta una enfermedad grave y mortal. Los primeros síntomas, debidos a la presencia de los nematodos en el intestino delgado, pueden aparecer entre los 3 y 5 días tras la ingestión, pudiendo presentar un cuadro de gastroenteritis con dolor abdominal, náuseas, vómitos y diarreas. Este cuadro puede ser muy difuso y puede pasar a veces inadvertido por su fugacidad y poca intensidad de los síntomas. Los síntomas sistémicos, una vez que las larvas atraviesan la pared del intestino, aparecen un poco después, entre 8 y 15 días tras la ingestión del alimento contaminado. La aparición repentina de molestias y dolores musculares, el edema de los párpados superiores y la fiebre son signos tempranos característicos y comunes. La dosis infectiva oscila entre 70 y 300 larvas, dependiendo de la especie de triquina, la sensibilidad del receptor y la forma de preparación de la carne.

5.9.4. Medidas de prevención y control

El Reglamento de Ejecución (UE) 2015/1375 de la Comisión de 10 de agosto de 2015 por el que se establecen normas específicas para los controles oficiales de la presencia de triquinas en la carne, establece requisitos concretos para prevenir la enfermedad humana provocada por el consumo de carne infectada por triquinas, como la obligación de someter toda la carne de cerdo y jabalí destinada a su comercialización para consumo humano a un análisis de triquina. A nivel nacional, el Real Decreto 1086/2020, de 9 de diciembre, por el que se regulan y flexibilizan determinadas condiciones de aplicación de las disposiciones de la Unión Europea en materia de higiene de la producción, ha establecido que en el caso de las especies porcina y equina y de la carne de caza de especies sensibles a la triquina, la autoridad competente de la comunidad autónoma establecerá un sistema que permita que todos los animales se sometan a un análisis de detección de triquina antes de su consumo. Además, en España existe la tradición de realizar el sacrificio de lechones de entre 3 y 5 semanas de edad, con la finalidad exclusiva de someter a las canales a un tratamiento culinario, por lo que se solicitó un informe al Comité Científico de la AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición) sobre el riesgo de transmisión de triquinosis al hombre por consumo de carne de lechones sacrificados en las primeras semanas de vida, la cual concluyó que, de forma general, los cerdos de hasta 5 semanas de edad (lo que comprende la gran mayoría de sacrificios de lechones) tienen un riesgo bajo de transmisión de triquinosis. Esta evaluación del riesgo permitió incluir una excepción en la normativa de la Unión Europea, de manera que las canales de lechones no destetados de menos de 5 semanas no necesitan ser analizadas (28).

5.10. *Norovirus*

5.10.1. Introducción

Los *Norovirus* (y otros *Calicivirus*) son la principal causa de gastroenteritis no bacteriana en individuos de todas las edades y constituyen la causa más frecuente de brotes de gastroenteritis aguda, a menudo asociados al consumo de agua y alimentos contaminados, en instituciones como residencias de ancianos, colegios, hospitales, hoteles, cruceros, etc. En concreto en Europa, en 2019 fueron la segunda causa de toxiinfecciones alimentarias (después de *Salmonella* spp.), dando lugar a 457 brotes y 11.125 casos (20, 24).

Los *Norovirus* (NoV) son miembros de la familia *Caliciviridae* y como tales son virus no envueltos con cápside icosaédrica en cuyo interior albergan un genoma ARN de cadena simple. Una característica muy importante del genoma de los NoV es su elevada variabilidad. No se han podido replicar en cultivo celular, por lo que solo se dispone de técnicas moleculares para su detección. Los NoV se clasifican en cinco grandes genogrupos. Los NoV humanos pertenecen a los genogrupos I (GI), II (GII) y IV (GIV). Cada genogrupo contiene múltiples genotipos que emergen y varían temporalmente. Los genogrupos se denominan por números romanos y los genotipos por números árabes (29).

5.10.2. Fuentes de infección

La transmisión de los NoV humanos se produce, principalmente, vía ingestión de agua o alimentos contaminados, así como por contacto persona-persona o por contacto con fómites contaminados. Los brotes de toxiinfección alimentaria suelen tener lugar en invierno, y normalmente se ven amplificados por la transmisión directa persona a persona, vía fecal-oral, incluso por los aerosoles generados en los vómitos. Los manipuladores de alimentos tienen un papel fundamental en la contaminación de los alimentos, sobre todo en alimentos que se consumen fríos, como ensaladas o sándwiches, y no deben tocar los alimentos hasta tres días después de la desaparición de los síntomas. Los NoV sobreviven a la congelación y a la desecación, solo se inactivan con tratamientos de 71°C durante 1 minuto, y se han asociado al consumo de bivalvos cocidos al vapor. Asimismo, soportan concentraciones de hasta 10 ppm de cloro.

Los alimentos de mayor riesgo para la contaminación por NoV se pueden clasificar en dos categorías:

a) Alimentos contaminados durante el proceso de producción:

- Con el agua de riego: vegetales y especialmente bayas como las fresas.
- Con el agua de inmersión: fundamentalmente moluscos bivalvos vivos cultivados en aguas contaminadas con vertidos fecales, ya que filtran el agua y concentran el virus en el hepatopáncreas.
- Agua de bebida.

b) Alimentos contaminados durante la manipulación por una persona infectada:

- Sándwiches, ensaladas, y otros alimentos manipulados que se consumen sin tratamiento térmico posterior.

5.10.3. Características de la enfermedad

Los NoV afectan a personas de todos los grupos de edad y sexo, aunque existen variaciones individuales en la susceptibilidad debidas a factores genéticos. El período de incubación de la enfermedad oscila de 10 a 51 horas y la dosis infecciosa es baja, de entre 18 y 1.000 partículas víricas. Por otra parte, estos niveles de virus son excretados por pacientes antes de mostrar ninguna sintomatología e incluso después de que ésta haya cesado. Se estima que las gastroenteritis por NoV de origen alimentario representan entre un 12% y un 47% del total de gastroenteritis por NoV y el resto se originaría por contacto persona-persona o contacto con fómites contaminados (FAO/OMS, 2008) (30). La enfermedad cursa como una gastroenteritis aguda, con vómitos, diarrea y en ocasiones fiebre y tiene una duración de entre dos y tres días, aunque en niños y ancianos puede complicarse con deshidratación y alargarse hasta seis días.

5.10.4. Medidas de prevención y control

El Reglamento (EU) 2073/2005 sobre criterios microbiológicos establece para los moluscos bivalvos vivos comercializados durante su vida útil, un criterio de seguridad alimentaria para *E. coli*, como indicador de contaminación fecal. También se establece *E. coli* como criterio de higiene del proceso, para las frutas y hortalizas que se consumen crudas y los zumos de frutas y hortalizas no pasteurizados. Asimismo, el Reglamento 853/2004, sobre higiene de los productos de origen animal, clasifica las zonas de producción de moluscos bivalvos vivos en tres categorías (A-C) según la calidad microbiológica del agua. Solo los moluscos bivalvos procedentes de las zonas A pueden destinarse al consumo humano directo; los de las zonas B y C deberán depurarse antes y, si no se depuran, deberán haber sido esterilizados en contenedores cerrados herméticamente, o haber sufrido uno de los tratamientos térmicos que se detallan en el mismo.

Sin embargo, los criterios microbiológicos clásicos basados en recuentos de *E. coli* en el agua de cultivo o en tejido de bivalvo no garantizan la ausencia de virus en los bivalvos. Por ello, es recomendable la detección y/o cuantificación de virus ya sea en las aguas de cultivo o en el propio molusco bivalvo.

A nivel de industrias o establecimientos de restauración, es fundamental la formación de los manipuladores de alimentos, evitar que las personas con síntomas de diarrea manipulen alimentos, la selección de las materias primas, especialmente de moluscos bivalvos vivos y frutas y hortalizas, y el tratamiento térmico completo de los alimentos, o en el caso de las frutas y hortalizas que se consuman crudas, la desinfección de las mismas.

5.11. *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC)

5.11.1. Introducción

E. coli es una bacteria zoonótica que se encuentra en el tracto gastrointestinal de todos los seres humanos y en la mayoría de los animales de sangre caliente y forma parte de la microbiota bacteriana normal. Sin embargo, algunas cepas de *E. coli*, pueden causar enfermedades y provocar infecciones graves en las personas a través del consumo de alimentos contaminados.

5.11.2. Patogenicidad

Existen al menos siete grupos diferentes de cepas de *E. coli* en función de sus características genéticas de virulencia:

- EAEC (enteroagregativo)
- ETEC (enterotoxigénico)
- STEC (productores de toxina Shiga)
- EPEC (enteropatógeno)
- EIEC (enteroinvasivo)
- DAEC (adherencia difusa)
- AIEC (adherente invasivo)

Los más conocidos son los STEC y los EAEC por su patogenicidad en los seres humanos y por los brotes registrados ya que son los que causan mayor número de infecciones.

Una complicación es la aparición de cepas de patogenicidad cruzada, es decir cepas que portan genes de patogenicidad asociados a más de un grupo, por ejemplo, cepas de EAEC portadoras de genes *stx*, lo que ocurre cuando los genes *stx*, codificados por un bacteriófago, se transfieren a otro patotipo. Esto ocurrió en el brote del año 2011 (Alemania y Francia) vinculado al consumo de brotes de semillas de alholva, asociado con un EAEC anómalo (STEC O104:H4) el cual había adquirido la capacidad de producir toxinas Shiga (31).

El grupo *E. coli* productor de shigatoxinas (STEC, también conocidos como VTEC) está fuertemente asociado con la colitis hemorrágica y con el síndrome urémico hemolítico que puede producir fallo renal. Son patógenos zoonóticos, se transmiten por alimentos y agua contaminados y, en algunos casos, por contacto directo con animales, aguas de baño o persona a persona por vía fecal oral.

Las infecciones por STEC se caracterizan por la producción de toxinas Shiga (Stx), llamadas así por su parecido a la producida por *Shigella dysenteriae* serotipo 1, también llamadas verocitoxinas (VT), por su citotoxicidad para las células Vero. Las toxinas Shiga se agrupan en dos tipos principales (Stx1 y Stx2) codificadas por genes de un bacteriófago integrado en el cromosoma de *E. coli*. Casi todas las STEC producen el efecto adherencia y borrado (bacterias A/E), las cuales poseen el gen *eae*, y producen destrucción localizada de las microvellosidades del borde en cepillo del intestino humano.

El principal serotipo de *E. coli* productor de toxina Shiga es O157:H7, pero también pueden producir shigatoxinas los serotipos O26, O45, O91, O103, O111, O121, O145, O146 y el O104.

5.11.3. Fuentes de infección

El reservorio principal es el tracto gastrointestinal del ganado vacuno joven y otros mamíferos herbívoros grandes (animales rumiantes), aunque estas cepas pueden sobrevivir durante largos periodos en el medio ambiente, incluso con pH muy bajo, y pueden proliferar en vegetales y otros alimentos y bebidas. Los humanos también pueden desempeñar una función en la transmisión de persona a persona. Los alimentos de mayor riesgo son fundamentalmente:

- Carne de vacuno cruda o poco cocinada.
- Carne, en general, de rumiantes picada fermentada y sus productos derivados (hamburguesas, embutidos...).
- Leche cruda y productos lácteos frescos sin tratamiento térmico suficiente.
- Vegetales, semillas germinadas, frutas y zumos sin pasteurizar.

5.11.4. Características de la enfermedad.

El periodo de incubación puede ser largo (entre 2 a 10 días), aunque la mediana suele ser de 3-4 días. La dosis infectiva es muy baja (incluso 2 ufc/25 g). Poco se sabe de las diferencias en la susceptibilidad y en la inmunidad, pero la enfermedad se produce en todos los grupos de edad. Los niños menores de 5 años son más propensos a desarrollar síndrome urémico hemolítico y los ancianos, en general, tienen mayor riesgo de complicaciones.

5.11.5. Métodos de detección

Los mejores métodos de detección son aquellos que permiten aislar e identificar los genes de virulencia (*vtx1*, *vtx2*, *stx*, *eae*, etc) como la PCR. La opinión científica de la EFSA sobre evaluación de la patogenicidad de STEC y el riesgo para la salud pública de la contaminación de los alimentos con STEC, adoptada en diciembre de 2019, recomienda desarrollar y validar métodos de WGS (secuenciación genómica) para caracterizar las cepas aisladas en animales, alimentos, piensos, y humanos, que permitan estudiar las tendencias y detectar cepas emergentes.

6. TOMA DE MUESTRAS, CONSERVACIÓN, TRANSPORTE Y PREPARACIÓN DE ALIMENTOS PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Todos estos aspectos se desarrollan en el presente Procedimiento nº 78 de forma independiente en el PNT-MA-01a (Toma de muestras de alimentos, conservación y transporte) y en el PNT-MA-01b (Preparación de muestras para análisis microbiológico de alimentos).

7. PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE TRABAJO PARA LA DETECCIÓN / RECuento DE LOS DISTINTOS MICROORGANISMOS EN EL LABORATORIO

Todos estos aspectos se desarrollan en forma de PNTs independientes en el presente Procedimiento nº 78 en los siguientes documentos: PNT-MA-02, PNT-MA-03, PNT-MA-04, PNT-MA-05, PNT-MA-06, PNT-MA-07, PNT-MA-08, PNT-MA-09, PNT-MA-10, PNT-MA-11, PNT-MA-12, PNT-MA-13 y PNT-MA-14 (ver índice de Documentos Técnicos).

8. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- World Health Organization. Food safety – a worldwide public health issue. 1998a.
- 2.- <https://www.who.int/data/gho/publications/world-health-statistics>
- 3.- Control de calidad de los alimentos. Sistemas de control. Legislación alimentaria. Financiación. Infraestructura. Desarrollo de capacidad. Gestión de recursos humanos. Comercio exterior. Inocuidad alimentaria. Agentes interesados. Comunicación. Codex Alimentarius. No. 7/1, Editor: FAO and WHO/Agrovoc. <https://www.fao.org/food-safety/food-control-systems/es/>.
- 4.- https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/noticias_efsa/2021/zoonosis.htm.
- 5.- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health Zoonoses Report (2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021); <https://www.efsa.europa.eu/es/efsajournal/pub/6971>.
- 6.- Real Decreto 2210/1995, de 28 de diciembre, por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica./ Orden SSI/445/2015, de 9 de marzo, por la que se modifican los anexos I, II y III del Real Decreto 2210/1995, de 28 de diciembre, por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, relativos a la lista de enfermedades de declaración obligatoria, modalidades de declaración y enfermedades endémicas de ámbito regional./Protocolos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Disponibles en: https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/PROTOCOLOS/PROTOCOLOS%20EN%20BLOQUE/PROTOCOLOS_RENAVE-ciber.pdf.
- 7.- https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/salmonela.htm.
- 8.- Chattaway MA, Langridge GC, Wain J. *Salmonella* nomenclature in the genomic era: a time for change. Sci Rep. 2021;11(1):7494.
- 9.- Álvarez Martínez M, Buesa Gómez J, Castillo García J, Vila Estapé J. Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. 2008. 30. Vila Estapé J (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado E, Cantón R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2008. ISBN-978-84-612-7852-7.
- 10.- Crump JA. Progress in typhoid fever epidemiology. Clin Infect Dis. 2019;68(Suppl 1):S4-S9.
- 11.- Larkin L, Pardos de la Gandara M, Hoban A, Pulford C, Jourdan-Da Silva N, de Valk H, et al. Investigation of an international outbreak of multidrug-resistant monophasic *Salmonella* Typhimurium associated with chocolate products, EU/EEA and United Kingdom, February to April 2022. Euro Surveill. 2022;27(15):2200314.
- 12.- Jiménez Manso A. Zoonosis alimentarias: Salmonella. Medidas de prevención y control en los establecimientos alimentarios. Dirección General de Salud Pública. Consejería de Sanidad. Comunidad de Madrid. 2016. <https://www.comunidad.madrid/publicacion/ref/17940>.
- 13.- Chlebicz A, Śliżewska K. Campylobacteriosis, salmonellosis, yersiniosis, and listeriosis as zoonotic foodborne diseases: a review. Int J Environ Res Public Health. 2018;15(5):863.
- 14.- <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/european-union-one-health-2020-zoonoses-report>.
- 15.- Félix B, Sevellec Y, Palma F, Douarre PE, Felten A, Radomski N, et al. A European-wide dataset to uncover adaptive traits of *Listeria monocytogenes* to diverse ecological niches. Nature Scientific Data. 2022; 9:190.
- 16.- https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/listeria.htm.
- 17.- https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/listeriosis/docs/Informe_cierre_Listeriosis_20190927.pdf.
- 18.- Íñigo Núñez S, Jiménez Manso A. Zoonosis alimentarias. *Listeria*: medidas de prevención en los establecimientos alimentarios. Dirección General de Salud Pública. Consejería de Sanidad. Comunidad de Madrid. 2015. <https://www.comunidad.madrid/publicacion/ref/17846>.
- 19.- Íñigo Núñez S, Jiménez Manso A. Guía de estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. Dirección General de Salud Pública. Consejería de Sanidad. Comunidad de Madrid. 2012. <https://www.comunidad.madrid/publicacion/ref/17308>.
- 20.- <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2021.6971>.
- 21.- Íñigo Núñez S, Jiménez Manso A. Zoonosis alimentarias. *Campylobacter*: medidas de prevención en los establecimientos alimentarios. Dirección General de Salud Pública. Consejería de Sanidad. Comunidad de Madrid. 2015. <https://www.comunidad.madrid/publicacion/ref/17847>.
- 22.- Youngster BA, McAdam AJ. Shiga toxin producing *Escherichia coli*. Clin Lab Med. 2015; 35:247-72.

- 23.- Bruyand M, Mariani-Kurkdjian P, Gouali M, de Valk H, King LA, Le Hello S, et al. Hemolytic uremic syndrome due to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. *Med Mal Infect*. 2018;48:167-174.
- 24.- <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/monitoring-foodborne-diseases>.
- 25.- Dietrich R, Jessberger N, Ehling-Schulz M, Märklbauer E, Granum PE. The food poisoning toxins of *Bacillus cereus*. *Toxins (Basel)*. 2021;13(2):98.
- 26.- Rahmati AR, Kiani B, Afshari A, Moghaddas E, Williams M, Shamsi S. World-wide prevalence of *Anisakis* larvae in fish and its relationship to human allergic anisakiasis: a systematic review. *Parasitol Res*. 2020; 119:3585-3594.
- 27.- Zamora MJ, Alvarez M, Olmedo J, Blanco MC, Pozio E. *Trichinella pseudospiralis* in the Iberian peninsula. *Vet Parasitol*. 2015; 210:255-259.
- 28.- Castro Fernández FJ, Muñoz Manso FJ, Samperio Rodríguez. Zoonosis alimentarias: investigación de triquina en carne. Dirección General de Salud Pública. Consejería de Sanidad. Comunidad de Madrid. 2016. <https://www.comunidad.madrid/publicacion/ref/179> .
- 29.- De Graaf M, van Beek J, Koopmans MPG. Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nat Rev Microbiol*. 2016; 14:421-433.
- 30.- https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/EMPRES_Food_Safety_Series_1.pdf.
- 31.- Chattaway MA, Dallman T, Okeke IN, Wain J. Enterohaggative *E. coli* O104 from an outbreak of HUS in Germany 2011, could it happen again?. *J Infect Dev Ctries*. 2011; 5:425-436.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Toma de muestras de alimentos, conservación y transporte	PNT-MA-01a	
		Edición N° 01	Página 1 de 7

PNT-MA-01a

Toma de muestras de alimentos, conservación y transporte

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2022	Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Toma de muestras de alimentos, conservación y transporte	PNT-MA-01a	
		Edición N° 01	Página 2 de 7

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo del presente documento es describir el procedimiento de toma de muestras de alimentos y su transporte al laboratorio. No se incluyen los planes de muestreo. Se describe la toma de muestras de todo tipo de alimentos, incluyendo bloques de alimentos congelados, muestras de canales de animales (pero no de superficies), carne y alimentos a granel. No se incluyen las muestras ambientales.

2. FUNDAMENTO

La toma de muestras de alimentos tiene una enorme importancia para la interpretación de los resultados. Es importante que el laboratorio reciba una muestra representativa del lote del producto implicado y que no haya sufrido daño o transformación durante el almacenamiento o el transporte. Para ello la muestra deberá protegerse de contaminaciones externas ocasionadas por el aire, el recipiente de toma de muestras, los equipos de toma de muestras o por una incorrecta manipulación.

Siempre que sea posible la muestra debería enviarse en su envase original. Si el producto es voluminoso o se encuentra en un recipiente demasiado grande, se transfiere una alícuota en condiciones asépticas a un recipiente estéril. El recipiente para muestras estéril deberá abrirse durante el mínimo tiempo necesario para introducir la muestra, cerrándose inmediatamente después.

Las muestras deben identificarse de manera clara y completa, irán acompañadas de un volante de toma de muestras, y la información debe registrarse. La información sobre la temperatura durante la recogida de la muestra y en el momento de su recepción es útil para el laboratorio a la hora de proporcionar los resultados, por lo que también se registrará.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- ISO/TS 17728. Microbiology of the food chain — Sampling techniques for microbiological analysis of food and feed samples.

4. MUESTRAS

4.1. PRINCIPIOS GENERALES

La muestra debe ser representativa del alimento a muestrear, aunque en ocasiones durante la aparición de un brote, nos podemos encontrar con poca cantidad de muestra.

Se realizará la toma de muestras preferentemente en el lugar de consumo del alimento que se asocie al origen del brote (domicilio particular o establecimiento industrial, de restauración o minorista) y si es posible, en el establecimiento elaborador del alimento, o en su caso, en el que realizó la distribución o almacenamiento del alimento.

Para realizar la elección de los parámetros a investigar, se seguirán las recomendaciones de los epidemiólogos, según las encuestas epidemiológicas.

En el caso de que la toma de muestras se realice en industria o en establecimiento de restauración, será preferible que se efectúe sobre los envases originales del propio fabricante. En el caso de la realización de la

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Toma de muestras de alimentos, conservación y transporte	PNT-MA-01a	
		Edición N° 01	Página 3 de 7

investigación sobre muestras testigo, se tomará el envase original del propio establecimiento. En caso distinto a los mencionados anteriormente, la toma de muestras se realizará sobre envases estériles. En caso de que en el brote alimentario que se esté investigando hayan intervenido los huevos en la elaboración del alimento sospechoso, se realizará la toma de muestras de los huevos restantes con los que se hubiera realizado la preparación, en el domicilio o en el establecimiento donde se haya producido el brote.

La técnica de muestreo no debe modificar la microbiota intrínseca del alimento, bien por contaminación con los instrumentos de muestreo o el ambiente, bien por muerte o crecimiento bacteriano durante el transporte. La cantidad mínima requerida, así como las instrucciones sobre la forma de obtener la muestra, producto que se va a muestrear y lotes, necesidad de ropa protectora o instrumentos específicos para el muestreo, se acordarán previamente entre el laboratorio y el cliente.

El laboratorio definirá los criterios para la aceptación de la muestra en su recepción y las desviaciones permitidas.

La muestra debe ir identificada de forma inequívoca, y etiquetada.

En el volante de petición de muestras figurará toda la información necesaria para la trazabilidad de la muestra y la correcta interpretación de resultados.

Las muestras deben ser manipuladas, envasadas y transportadas al laboratorio de manera que no se altere su identidad e integridad.

La manipulación de la muestra, incluido el transporte no afectará la carga microbiológica. Las muestras que no estaban congeladas en el momento del muestreo no se congelarán, ya que la congelación de la muestra puede afectar a la viabilidad de la microbiota y dar lugar a falsos negativos, o a recuentos inferiores a los reales. Si por motivos excepcionales, como elevada temperatura ambiente, o retraso en el transporte es necesario congelar la muestra, se acordará previamente con el laboratorio, y se reflejará en la expresión de los resultados. Las muestras para la investigación de *Campylobacter* spp, *Clostridium perfringens* o *Bacillus cereus*, no se podrán congelar, ya que estos microorganismos son extremadamente sensibles a la congelación.

4.2. MATERIAL NECESARIO

Dependiendo del producto a muestrear, el material necesario varía. En todos los casos el equipo utilizado para la toma de muestras estará al menos limpio o estéril dependiendo del caso.

- Materiales para la descontaminación de envases, instrumentos de muestreo o la superficie de la muestra: etanol 70% v/v, y toallitas o hisopos impregnados con alcohol o agente bactericida.

- Envases para contener la muestra de tamaño y capacidad adecuados: bolsas de plástico, cajas para contener productos frágiles, como huevos, y botes o tubos para muestras a granel o líquidas, todos ellos con etiquetas resistentes al agua.

- Instrumentos para el muestreo: dependiendo del tipo de producto harán falta cucharas, sondas, jeringas, instrumentos de muestreo en profundidad, sierras de mano para bloques de productos congelados, cuchillos, escalpelos, instrumentos para abrir ostras o vaciar las conchas de moluscos bivalvos, materiales absorbentes, etc.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Toma de muestras de alimentos, conservación y transporte	PNT-MA-01a	
		Edición N° 01	Página 4 de 7

- Ropa protectora para la persona que realiza el muestreo: guantes, gafas, gorro, mascarillas, cubrebocas, etc.
- Termómetro con sonda calibrado, para registrar la temperatura cuando las muestras no estén a temperatura ambiente.

4.3. TÉCNICAS DE MUESTREO

La toma de muestras variará según se tomen alimentos envasados o a granel (estas pueden ser de productos en polvo, líquidos, sólidos o congelados en bloques). También se tendrá en cuenta si el alimento está a temperatura ambiente, refrigerado, congelado, o si se cogen muestras de alimento que están calientes en el momento.

En algunos casos, es recomendable tomar una muestra adicional para poder registrar la temperatura durante el transporte.

Las muestras que estén calientes, refrigeradas, congeladas o a temperatura ambiente, deberán ir en contenedores diferentes.

- Muestras de productos a granel (sólidos, líquidos, en polvo o granulados), que podrán estar refrigerados, a temperatura ambiente, o congelados: se etiquetará previamente el recipiente de la toma de muestras. Tomar la muestra del producto con el instrumento adecuado y estéril o desinfectarlo previamente, e introducirla en el recipiente de toma de muestras (botes para productos en polvo, sólidos o materiales impregnados; cajas para productos frágiles; botellas para líquidos, etc.) y cerrarlo bien para evitar el vertido. Las botellas con líquidos no se llenarán más de tres cuartas partes para poder homogeneizar la muestra en el laboratorio, y evitar el vertido. Para algunos productos es necesario tomar varias muestras de distintos lugares del contenedor, y homogeneizarlas luego en una sola muestra. El recipiente de la muestra se introducirá dentro de una caja con aislante si se trata de productos a temperatura ambiente, o una nevera de toma de muestras para productos refrigerados.

- Muestras de bloques de productos congelados: en algunas ocasiones puede ser necesario tomar muestras de grandes bloques de carne o pescado congelados, en estos casos será necesario emplear una sierra eléctrica para obtener una muestra del tamaño adecuado, y realizar cortes en distintos lugares del bloque. Se ajustará la velocidad de rotación a 900 revoluciones por minuto aproximadamente, para evitar calentar el producto o dispersar polvo de producto. Utilizar también una espátula o una cuchara para recoger pequeños trozos que se hayan formado e introducirlos en el recipiente de muestreo, que estará previamente etiquetado. El recipiente de la muestra se introducirá en una nevera u otro contenedor que permita transportarla al laboratorio en condiciones de congelación.

- Muestras de productos envasados: se tomará el producto envasado con cuidado de no dañar el envase y se introducirá en una bolsa de toma de muestras, o una caja si es necesario (por ejemplo, envases de huevos), etiquetar el contenedor, y colocarlo en recipiente refrigerado, congelador, o en caja con aislante adecuado al estado de la muestra. Las muestras de productos refrigerados o congelados se tomarán lo más rápido posible, para evitar que su temperatura aumente durante el muestreo.

- Muestras de productos calientes: puede tratarse de productos que se estén cocinando en el momento, ya preparados y mantenidos en caliente, o recalentados para el servicio: es importante que el material de la toma de muestras sea resistente al calor. Se tomará la porción de muestra con el instrumento adecuado

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Toma de muestras de alimentos, conservación y transporte	PNT-MA-01a	
		Edición N° 01	Página 5 de 7

y se introducirá en el recipiente de toma de muestras previamente etiquetado, cerrándolo a continuación para evitar el vertido.

- Productos destinados directamente al consumidor final en restaurantes: podrán estar o no envasados. Tomar una porción del producto con el instrumento adecuado e introducirla en el recipiente adecuado, que se introducirá en una caja con aislante térmico, refrigerada o congelada según el estado de la muestra. Si el producto se encuentra ya emplatado, se utilizará una bolsa de tamaño adecuado para verter el contenido del plato en ella, y si es necesario se utilizará una espátula u otro instrumento para vaciar bien el plato. La bolsa se etiquetará y se introducirá en el contenedor adecuado.

4.4 TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

Inmediatamente después de realizar la recolección, las muestras se introducirán en un contenedor que las proteja, y a la temperatura adecuada, como por ejemplo una nevera o caja isoterma con acumuladores. No se empleará hielo suelto, ya que puede producir contaminación si el recipiente se rompe o tiene fugas. La muestra deberá empaquetarse de manera que se eviten roturas o derrames. Las muestras que no necesiten refrigeración pueden embalarse en un recipiente, utilizando material de embalado adecuado que impida su rotura. No se colocarán las muestras en contacto directo con superficies congeladas ya que esto puede alterar la microbiota intrínseca.

La muestra irá convenientemente identificada con todos los detalles necesarios. Cuando sea necesario se precintará, para evitar su manipulación hasta la llegada al laboratorio.

El tiempo de transporte al laboratorio debe ser lo más corto posible, y no debería ser mayor de 24 horas. La temperatura durante el transporte deberá estar controlada. Los productos calientes no podrán ir en el mismo contenedor que los que estén a temperatura ambiente, refrigerados o congelados.

Salvo normas específicas que indiquen otras alternativas, se recomiendan las siguientes temperaturas durante el transporte:

- Productos estables: temperatura ambiente, por debajo de 40°C.
- Productos congelados o ultracongelados: menos de -15°C, preferiblemente menos de -18°C.
- Productos refrigerados: entre 1°C y 8°C
- Moluscos bivalvos vivos: se mantendrán entre 0°C y 10°C, nunca se congelarán.

4.5 DOCUMENTACIÓN DE ACOMPAÑAMIENTO

Las muestras irán acompañadas de un volante de petición de análisis firmado por la persona que realiza el muestreo y con los siguientes datos requeridos por el laboratorio:

- Lugar, fecha y hora del muestreo.
- Naturaleza, número e identificación de las muestras.
- Propósito del muestreo, y microorganismos a analizar.
- Información que se considere relevante, por ejemplo, dificultades en conseguir la cantidad de muestra requerida.
- Nombre del propietario del establecimiento donde se toman las muestras o casa particular.
- Número de lote, fecha de elaboración, fecha de caducidad y otra información relevante sobre el producto.
- Temperatura de la toma de muestras.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Toma de muestras de alimentos, conservación y transporte	PNT-MA-01a	
		Edición N° 01	Página 6 de 7

4.6 CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

Los criterios de aceptación y rechazo se acordarán previamente con el laboratorio.

En el momento de la recepción se comprueba el estado de las muestras (integridad, temperatura, identificación y cantidad), si sus condiciones no son satisfactorias o si las muestras son insuficientes, el laboratorio debería rechazarlas. En circunstancias especiales, pueden analizarse, tras discusión y acuerdo con el cliente, no obstante, el informe de análisis debe mostrar reservas sobre la validez de los resultados.

Las muestras admitidas en el laboratorio se identifican de forma que se pueda seguir su trazabilidad a lo largo de todas las etapas de su paso por el laboratorio.

Se registra la siguiente información:

- Fecha y hora de la recepción.
- Detalles sobre la toma de muestras: día y hora de la toma, estado de las muestras.
- Nombre y dirección del cliente.
- En el caso de muestras perecederas, se registra la temperatura del transporte o de una muestra adicional tomada para esta finalidad.

Se considerarán incidencias relacionadas con la recepción de la muestra: el retraso en el transporte, la conservación defectuosa (temperatura inadecuada o medio de transporte inadecuado) y que la muestra sea insuficiente para las determinaciones solicitadas. En este último caso se consultará al personal sanitario responsable de la petición el orden de prioridad de las peticiones.

Se considerarán motivos de rechazo los siguientes:

- Muestras sin identificar y que no haya sido posible resolver la incidencia.
- Muestras derramadas.
- Muestras recogidas en contenedor no estéril, en formol o con otros aditivos.

5. PROCEDIMIENTOS RELACIONADOS

Ver PNTs de este procedimiento SEIMC nº 78

- a. Procedimiento para la preparación de muestras (PNT-MA-01b)
- b. *Salmonella* spp. (PNT-MA-02)
- c. *Listeria monocytogenes* (PNT-MA-03 y PNT-MA-04)
- d. *Campylobacter* spp. (PNT-MA-05)
- e. *E. coli* O157:H7 (PNT-MA-06)
- f. Toxina estafilocócica (PNT-MA-07)
- g. *Clostridium perfringens* y *Clostridium botulinum* (PNT-MA-08 y PNT-MA-09)
- h. *Bacillus cereus* (PNT-MA-10)
- i. Parasitosis: *Anisakis* spp. y *Trichinella spiralis* (PNT-MA-11 y PNT-MA-12)
- j. *Norovirus* (PNT-MA-13)
- k. *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) (PNT-MA-14)

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Toma de muestras de alimentos, conservación y transporte	PNT-MA-01a	
		Edición N° 01	Página 7 de 7

6. RESPONSABILIDADES

La toma de las muestras, incluyendo los correspondientes registros, se realiza por técnicos superiores o por Técnicos de grado medio de laboratorio, debidamente cualificados.

La supervisión/validación la realiza el facultativo responsable y aplica a todas las actividades que se realizan durante el proceso de toma de muestras hasta que estas son entregadas en el laboratorio.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. ISO/TS 17728. Microbiology of the food chain — Sampling techniques for microbiological analysis of food and feed samples.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Preparación de muestras para análisis microbiológico de alimentos	PNT-MA-01b	
		Edición N° 01	Página 1 de 6

PNT-MA-01b

Preparación de muestras para análisis microbiológico de alimentos

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2022	Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Preparación de muestras para análisis microbiológico de alimentos	PNT-MA-01b	
		Edición N° 01	Página 2 de 6

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Describir la preparación de las muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Se describen las operaciones a realizar en las muestras de alimentos previamente a su análisis microbiológico. Se trata de un documento general aplicable a procedimientos cualitativos y cuantitativos.

2. FUNDAMENTO

Durante la investigación de un brote de origen alimentario se debe realizar una toma de muestras para su análisis en el laboratorio con el fin de identificar el agente causal. En los brotes alimentarios pueden estar implicados distintos tipos de alimentos que es necesario preparar adecuadamente antes de proceder a su análisis.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- ISO 7218. Microbiología de alimentos y productos para la alimentación animal. Requisitos generales y directrices para los análisis microbiológicos.
- ISO 6887-1. Microbiología de la cadena alimentaria. Preparación de muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para análisis microbiológicos. Parte1: Normas generales para la preparación de la suspensión inicial y las diluciones decimales.
- ISO 6887-2. Microbiología de la cadena alimentaria. Normas específicas para la preparación de carne y productos cárnicos.
- ISO 6887-3. Microbiología de la cadena alimentaria. Normas específicas para la preparación de pescado y productos de la pesca.
- ISO 6887-4. Microbiología de la cadena alimentaria. Normas específicas para la preparación de productos diversos.
- ISO 6887-5. Microbiología de la cadena alimentaria. Normas específicas para la preparación de leche y productos lácteos.

4. MUESTRAS

4.1 RECEPCIÓN DE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO

Al recibir la muestra en el laboratorio se comprueba su estado, se revisan los recipientes buscando defectos físicos aparentes, se registra la fecha y hora de la recepción, así como la fecha y hora de la toma de muestra. En el caso de muestras perecederas se registra la temperatura de transporte o la temperatura de una muestra ficticia incluida con esta finalidad.

Si durante el transporte se hubiera modificado el estado físico original de la muestra, se reflejará en el informe de ensayo por los posibles cambios microbiológicos producidos (por ejemplo, muestra congelada en origen y recibida descongelada).

La muestra ha de venir acompañada de una solicitud de análisis donde debe estar detallado el perfil microbiológico a determinar en función del estudio epidemiológico del brote.

Las muestras admitidas en el laboratorio se documentan de manera que se pueda seguir su evolución a lo largo del tiempo hasta el momento de elaborar el informe de análisis. La identidad, codificación y

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Preparación de muestras para análisis microbiológico de alimentos	PNT-MA-01b	
		Edición N° 01	Página 3 de 6

los registros deben asegurar su trazabilidad a lo largo de todas las etapas de su paso por el laboratorio.

4.2. ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS HASTA SU ANÁLISIS (ISO 7218)

En general, una vez recibida la muestra, si no se va a realizar el análisis de manera inmediata, se almacena en condiciones que eviten toda modificación de los microorganismos presentes, prestando especial atención a la temperatura de conservación.

- Productos estables: Temperatura ambiente, entre 18°C y 27°C.
- Productos congelados o ultracongelados: < -18°C.
- Productos inestables a temperatura ambiente, refrigerados y productos alterados: 3°C ± 2°C.

Las muestras se analizan lo antes posible tras su recepción, preferiblemente en un plazo de 24 horas. En todos los casos los ensayos se realizarán dentro de la fecha de consumo preferente o caducidad.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Se debe disponer de un diluyente universal como el agua de peptona tamponada
- En los diferentes PNTs de este procedimiento SEIMC n° 78 se incluyen los medios de cultivo, reactivos y productos específicos para cada la realización de cada procedimiento.

6. APARATOS Y MATERIALES

- Pinzas estériles
- Tijeras y/o bisturís estériles
- Cucharas
- Espátulas
- Balanza granataria sensibilidad ± 0,1 g
- Vórtex
- Bolsas de Stomacher con y sin filtros
- Tubos de vidrio (8 mm de diámetro y 160 mm de longitud)
- Pipetas graduadas estériles con capacidad nominal de 1 ml y 10 ml
- Placas de Petri de diámetro aproximado 90 mm
- Homogeneizador tipo Stomacher
- Cabina de seguridad biológica clase II
- Refrigerador capaz de operar a 5°C ± 3°C
- Congelador capaz de operar a -20°C ± 5°C

7. PROCESAMIENTO

7.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Consultar la norma general ISO 6887-1 y las normas específicas ISO 6887-2 a 5 en función de la naturaleza del producto.

En caso de recibir muestras congeladas éstas se deben descongelar, bien a temperatura ambiente (18°C-27°C) durante un máximo de 3 h o bien a 5°C±3°C durante un máximo de 24h.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Preparación de muestras para análisis microbiológico de alimentos	PNT-MA-01b	
		Edición N° 01	Página 4 de 6

En la norma general ISO 6887-1 se describen las directrices para la preparación de muestras especiales: alimentos multicomponente, productos secos/duros, deshidratados, productos ácidos, con alto contenido en grasa, envasados, muestras de superficies, etc.

Antes de comenzar con la preparación se deben adoptar unas precauciones higiénicas para que todo el trabajo se desarrolle en condiciones asépticas.

Precauciones higiénicas:

- Descontaminar antes y después del análisis las superficies de trabajo.
- Emplear instrumental estéril.
- Evitar corrientes de aire y movimientos innecesarios de personas durante el análisis.
- Separar actividades “limpias” y “sucias” en tiempo y lugar (especialmente importante para muestras de alto riesgo como carnes crudas o huevos crudos).
- Evitar formación de aerosoles.
- Trabajar preferentemente en cabina de seguridad.

7.2. PESADA DE LA MUESTRA

Se hará en condiciones asépticas estrictas, con material estéril, en una zona delimitada que garantice la ausencia de contaminaciones cruzadas (Cabinas de flujo laminar- o en las proximidades de la llama de un mechero o similar).

- Alimentos sólidos: se pesa la cantidad necesaria de muestra, en balanza o diluidor gravimétrico. Se emplean cucharas o espátulas estériles y bolsas de plástico estériles con o sin filtro.
- Alimentos líquidos: generalmente se procesan directamente después de agitar convenientemente la muestra, a fin de asegurar un reparto uniforme de los microorganismos.
 - Métodos cuantitativos: en general se pesan 10 - 25 g ó ml
 - Métodos cualitativos: en general se pesan 25 g ó ml

La tolerancia de la pesada es del $\pm 5\%$.

Todos los datos de la pesada se deben registrar para asegurar la trazabilidad de los resultados.

7.3. PREPARACIÓN DE LA DILUCIÓN 1:10, 10^{-1} , SUSPENSIÓN MADRE O SUSPENSIÓN INICIAL

Añadir a la pesada de X g, preferiblemente no inferior a 10 g en métodos cuantitativos y en general de 25 g en métodos cualitativos, la cantidad de diluyente estéril para obtener la dilución deseada. La tolerancia del volumen para la realización de diluciones decimales es de $\pm 2\%$.

Para métodos cuantitativos el diluyente universal más ampliamente utilizado es agua de peptona tamponada (APT). En estos métodos se pretende que el diluyente no produzca modificaciones cualitativas ni cuantitativas en la microbiota de los alimentos que van a ser analizados, sin suprimir ni favorecer su desarrollo. No obstante, se debe consultar la norma específica del parámetro en la que se indica el diluyente a emplear. Para métodos cualitativos la norma específica establece el diluyente a utilizar.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Preparación de muestras para análisis microbiológico de alimentos	PNT-MA-01b	
		Edición N° 01	Página 5 de 6

Si la suspensión madre debe tener un título de 1:10, la cifra de pesada obtenida del alimento se multiplica por 9 y el resultado de la multiplicación será el número de ml de diluyente que hay que incorporar a la muestra para obtener dicha dilución. La temperatura del diluyente debe ser del mismo orden que la de la muestra a analizar (en general temperatura ambiente), salvo productos particulares como cacao, gelatina, leche en polvo, mantequilla que será algo más elevada (entre 37°C-47°C).

Puede ser necesario, en ciertos casos, principalmente para aquellos productos cuya primera dilución resulte demasiado viscosa, añadir más diluyente, lo que deberá tenerse en cuenta en el cálculo de los resultados. En el caso de productos líquidos la suspensión madre la constituye el mismo producto.

7.4. HOMOGENEIZACIÓN

La suspensión madre se lleva al homogeneizador peristáltico durante 1-2 minutos, según la naturaleza del producto. Las fuerzas combinadas de fricción y percusión producen una suspensión homogénea entre la muestra y los microorganismos.

El uso de bolsas con filtro permite retener partículas gruesas o restos del alimento que no se homogeneizan adecuadamente. Si no se emplean bolsas con filtro hay que dejar que las partículas más gruesas se depositen, dejando reposar la muestra 15 minutos como máximo. Con el sobrenadante de la suspensión se llevarán a cabo las determinaciones analíticas deseadas.

Cuando se trate de productos alimenticios con riesgo de perforar la bolsa de plástico, se pondrá doble o triple bolsa, con objeto de prevenir la pérdida de diluyente.

Nota para métodos cuantitativos: esta primera dilución, en caso de ausencia de crecimiento, únicamente permite expresar el resultado como inferior a 10 ufc/g. Si fuera necesario descender por debajo de este umbral se puede realizar una suspensión con una cantidad inferior de diluyente. Se deberá tener en cuenta en el cálculo de los resultados. Hay que recordar que la siembra de esta suspensión puede, eventualmente, presentar dificultades debidas al desequilibrio de la relación inóculo/ medio.

Para los métodos cualitativos esta dilución madre homogeneizada constituye la primera fase del análisis (en general fase de pre-enriquecimiento).

7.5. PREPARACIÓN DE DILUCIONES DECIMALES (MÉTODOS CUANTITATIVOS)

A partir de la suspensión madre homogeneizada se procederá a la preparación de las diluciones decimales que sean necesarias en función de las especificaciones legales del producto y si no las hubiera dependerá de la naturaleza del mismo y de la carga de microorganismos que se espera encontrar.

Para ello, se repartirá el diluyente (en general, APT) en tubos de ensayo de capacidad apropiada, en cantidad tal que después de la esterilización cada tubo contenga 9 ml del diluyente (incertidumbre de medida $\pm 2\%$).

Con la ayuda de una pipeta estéril se trasvasa 1 ml de la suspensión madre (dilución 10^{-1}) a un nuevo tubo que contenga 9 ml de diluyente estéril a temperatura apropiada, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente. Mezclar cuidadosamente empleando un agitador excéntrico mecánico durante 5-10 segundos para obtener la dilución 10^{-2} . Repetir con la dilución 10^{-2} , si es necesario, las operaciones descritas anteriormente utilizando una nueva pipeta en cada dilución y obtener así diluciones decimales consecutivas.

El tiempo transcurrido entre el final de la preparación de la suspensión madre y el momento en que el inóculo entra en contacto con el medio de cultivo no debe sobrepasar los 45 minutos, limitando a 30 minutos el tiempo

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Preparación de muestras para análisis microbiológico de alimentos	PNT-MA-01b	
		Edición N° 01	Página 6 de 6

transcurrido entre el final de la preparación de la suspensión madre y el momento en que el inóculo entra en contacto con el medio de cultivo no debe sobrepasar los 45 minutos, limitando a 30 minutos el tiempo transcurrido entre la preparación de la suspensión madre y el comienzo de la preparación de las diluciones decimales.

A partir de aquí se seguirá el protocolo establecido en la norma específica tanto en los métodos cualitativos como cuantitativos.

7.6. CONSERVACIÓN DE MUESTRAS DESPUÉS DEL ANÁLISIS

En general, las muestras de laboratorio se conservan hasta que se hayan obtenido todos los resultados, o durante un tiempo mayor si fuera necesario. Se empaquetan en un recipiente estéril (bolsa de plástico) y se devuelven a su temperatura de almacenamiento. Los productos perecederos deben congelarse.

8. TRATAMIENTO DE RESIDUOS

Deben cumplirse las disposiciones nacionales sobre seguridad y medio ambiente. Debe establecerse un sistema de identificación de materiales y de sus recipientes para:

- Residuos no contaminados (restos de alimentos no analizados) que se puede eliminar junto con los residuos generales.
- Material contaminado, para su autoclavado y eliminación o solo para eliminación si va a ser incinerado.
- Material contaminado para autoclavado y reciclado.
- Otros materiales.

9. RESPONSABILIDADES

La preparación de muestras para su análisis y todas las actividades de laboratorio incluyendo los correspondientes registros se realiza por técnicos superiores o por técnicos de grado medio de laboratorio, debidamente cualificados.

La supervisión/validación la realiza el facultativo responsable y aplica a todas las actividades analíticas y no analíticas: revisión de procedimientos, controles de calidad y emisión e interpretación de resultados.

10. PROCEDIMIENTOS RELACIONADOS

Ver PNTs de este procedimiento SEIMC n° 78:

- a. Procedimiento para la preparación de muestras (PNT-MA-01b)
- b. *Salmonella* spp. (PNT-MA-02)
- c. *Listeria monocytogenes* (PNT-MA-03 y PNT-MA-04)
- d. *Campylobacter* spp. (PNT-MA-05)
- e. *E. coli* O157:H7 (PNT-MA-06)
- f. Toxina estafilocócica (PNT-MA-07)
- g. *Clostridium perfringens* y *Clostridium botulinum* (PNT-MA-08 y PNT-MA-09)
- h. *Bacillus cereus* (PNT-MA-10)
- i. Parasitosis: *Anisakis* spp. y *Trichinella spiralis* (PNT-MA-11 y PNT-MA-12)
- j. Norovirus (PNT-MA-13)
- k. *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) (PNT-MA-14)

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Foodborne disease outbreaks. Guidelines for investigation and control. WHO 2008.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Salmonella</i> spp. en muestras de alimentos	PNT-MA-02	
		Edición N° 01	Página 1 de 10

PNT-MA-02

Detección de *Salmonella* spp. en muestras de alimentos

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2022	Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Salmonella</i> spp. en muestras de alimentos	PNT-MA-02	
		Edición N° 01	Página 2 de 10

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo del presente documento es estandarizar la metodología para la detección de *Salmonella* spp. en muestras de alimentos y unificar criterios de aplicación para el procesamiento de muestras de alimentos.

2. FUNDAMENTO

Este documento basado en la norma ISO 6579-1/2017, especifica un método horizontal para la detección de distintas serovariedades de *Salmonella* spp., en una cantidad de masa, volumen o área de superficie determinados

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - Part 1: Detection of *Salmonella* spp. ISO 6579-1/2017
- Doyle MP, Diez Gonzalez F, Hill C. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. 5th edition. American Society for Microbiology. 2019.
- Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foods-tuffs.

4. MUESTRAS

Consultar el PNT-MA-01a (Toma de muestras de alimentos, conservación y transporte) y PNT-MA-01b (Preparación de muestras para análisis microbiológico de alimentos) de este procedimiento SEIMC n° 78.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, SOLUCIONES Y MATERIALES DE REFERENCIA

5.1. MEDIOS DE CULTIVO

- Agua de peptona tamponada
- Caldo Rappaport-Vassiliadis con soja (RVS)
- Caldo Tetratiónato-Novobiocina de Muller Kauffmann (MKTn)
- Agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD)
- Agar *Salmonella*-*Shigella* o cualquier otro medio sólido selectivo
- Agar hierro tres azúcares (TSI)
- Agar urea de Christensen
- Caldo para descarboxilación L-lisina (LDC)
- Detección de β -galactosidasa (opcional)
- Medio para reacción del indol (opcional)
- Agar nutritivo

5.2. REACTIVOS Y SOLUCIONES

- Reactivo para reacción del indol (opcional)
- Solución salina

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Salmonella</i> spp. en muestras de alimentos	PNT-MA-02	
		Edición N° 01	Página 3 de 10

- Antisueros para *Salmonella*:
- Somáticos monovalentes: OSA y OSB ó
 - Polivalente O
 - Antisuero Vi
 - Antisuero flagelar Polivalente H
 - Kit de identificación de Enterobacteriales (API 20E o similar)

5.3. MATERIALES DE REFERENCIA

- Utilizar cepas de referencia como control positivo con los medios de pre-enriquecimiento. Proceder con los controles como con las muestras a analizar.
- Las cepas de referencia para utilizar como controles positivos pueden ser: *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Salmonella typhimurium* o *Salmonella infantis*
- Los cultivos a utilizar como controles se deben preparar y usar de la misma manera que los medios de cultivo para efectuar los análisis.
- El inóculo debe estar comprendido entre 10 y 100 células por frasco y su preparación se indica a continuación:
 - a) Preparar una suspensión del microorganismo elegido en solución fisiológica con una turbidez igual al n° 1 de la escala de McFarland ($3,0 \times 10^8$ UFC/ml).
 - b) Efectuar 6 diluciones decimales del mismo en solución fisiológica. Inocular 0,1 ml de la dilución 10^{-6} en el caldo a probar (aproximadamente 30 células).
- Como controles negativos se incluyen todos los medios a utilizar inoculados con agua de peptona tamponada.

6. APARATOS Y MATERIALES

- Pinzas estériles
- Tijeras y/o bisturíes estériles
- Pipetas Pasteur estériles
- Portaobjetos
- Asas de siembra estériles
- Asas de inoculación estériles
- Vórtex
- Bolsas de Stomacher
- Tubos de vidrio (8 mm de diámetro y 160 mm de longitud)
- Pipetas graduadas estériles con capacidad nominal de 0,1ml; 1ml; 2 ml; 10 ml y 25 ml
- Placas de Petri de diámetro aproximado 90 mm y opcionales de tamaño grande (140 mm)
- Homogeneizador tipo Stomacher
- Equipo de esterilización húmeda (autoclave)
- Equipo de esterilización seca
- Cabina de secado u horno capaz de operar entre 25°C-50°C
- Cabina de flujo laminar
- Incubadora capaz de operar en un rango entre 34°C-38°C
- Incubadora capaz de operar a 37°C +/- 1°C
- Incubadora o baño de agua termostático capaz de operar a 41,5°C +/- 1°C
- pHmetro que tenga una exactitud de calibración de +/- 0,1 unidad de pH a 20°C - 25°C
- Cabina de seguridad biológica clase II

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Salmonella</i> spp. en muestras de alimentos	PNT-MA-02	
		Edición N° 01	Página 4 de 10

- Baño de agua termostático capaz de operar entre 47°C- 50°C
- Baño de agua termostático capaz de operar a 37°C +/- 1°C
- Baño termostático de agua capaz de operar a 45°C +/- 1°C
- Refrigerador capaz de operar a 5°C +/- 3°C
- Congelador capaz de operar a -20°C +/- 5°C
- Micropipeta de 20-200 µl
- Tips con filtro capacidad 200 µl

7. PROCESAMIENTO

7.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

7.1.1 Muestra para analizar y pre-enriquecimiento

Batir el contenido del envase a fin de homogenizar la muestra, siempre y cuando la consistencia del producto lo permita. Tomar asépticamente 25 g de muestra y agregar 225 ml de agua de peptona tamponada (APT) en una bolsa de Stomacher. Si la porción de la muestra a analizar es diferente a 25 g, usar la cantidad necesaria de pre-enriquecimiento que lleve a una relación aproximada de 1/10 (masa/volumen). Homogeneizar en Stomacher durante 1 minuto.

En caso de muestras compuestas por más de una unidad, conformar los 25 g con partes proporcionales de cada submuestra hasta completar los 25 g necesarios. Por ejemplo 5 (cinco) submuestras, se procesan extrayendo 5 g de cada una de ellas hasta conformar los 25 g. Agregar 225 ml de APT. Homogeneizar e incubar las bolsas de stomacher a 34°C-38°C durante 18 +/- 2 h.

Nota: La norma de referencia ISO 6579-1/2017 ha sido validada para porciones analíticas de 25 g. Se pueden utilizar porciones analíticas más pequeñas sin validación/verificación adicional mientras que se mantenga la misma proporción entre el volumen del caldo de pre-enriquecimiento y la porción analítica.

Para porciones analíticas mayores que la inicialmente validada, es necesario efectuar el estudio de validación/verificación para determinar que no hay efectos negativos en la detección de *Salmonella* spp. Las muestras se procesarán en una cabina de flujo laminar.

7.2 EJECUCIÓN DEL ENSAYO

7.2.1 Enriquecimiento selectivo general

- Permitir que el medio de enriquecimiento selectivo (caldo RVS) se equilibre con la temperatura ambiente, si es que se ha mantenido en refrigeración.
- Evitar en lo posible la transferencia de partículas de material (muestra) desde el caldo de pre-enriquecimiento a los medios de enriquecimiento selectivos.
- Tras la incubación, está permitido almacenar el enriquecimiento selectivo a 5°C por un máximo de 72 h.
- Transferir 0,1 ml del cultivo obtenido en el punto 7.1.1. a un tubo que contenga 10 ml de caldo RVS.
- Transferir 1 ml del cultivo obtenido en 7.1.1. en un tubo que contenga 10 ml de caldo MKTTn.
- Incubar el caldo RVS inoculado durante 24 hs +/- 3 h a 41,5°C +/- 1°C (en incubadora o baño de agua termostático).
- Incubar el caldo MKTTn inoculado durante 24 h +/- 3 h a 37°C +/- 1°C.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Salmonella</i> spp. en muestras de alimentos	PNT-MA-02	
		Edición N° 01	Página 5 de 10

7.2.2 Aislamiento

Aislamiento general:

- A partir de los cultivos de enriquecimiento selectivo inocular los dos medios de aislamiento. El primer medio de aislamiento es el agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD). El segundo medio es a elección del laboratorio.

- Elegir el segundo medio selectivo que sea complementario con el agar XLD, y que se base en diferentes características de diagnóstico para facilitar la detección de las salmonellas lactosa positivas o H₂S negativas.

- Si las placas de agar XLD y del segundo medio selectivo se encontraban refrigeradas, sacarlas del refrigerador y dejarlas en el interior de la cabina de flujo laminar para que se equilibren con la temperatura ambiente. Si es necesario secar la superficie de las placas antes de su uso.

- Usando el cultivo obtenido en el caldo RVS, tras la incubación de 24 h $\pm$ 3 h, inocular con un asa estéril la superficie de una placa de Petri (grande o mediana) que contenga el primer medio de cultivo selectivo (agar XLD) a fin de obtener colonias aisladas (*ver Nota). Opcionalmente, en caso de tratarse de muestras en las que se sospeche que contienen una gran contaminación, pueden utilizarse una placa grande o dos placas medianas, una después de la otra usando el mismo asa de cultivo. Proceder de la misma forma con el segundo medio sólido selectivo a elección, usando una nueva asa y placas de Petri de tamaño adecuado.

- Usando el cultivo obtenido en el caldo MKTTn tras la incubación durante 24 h $\pm$ 3 h, repetir el procedimiento descrito con los dos medios sólidos selectivos (agar XLD y el segundo medio a elección).

- Colocar las placas invertidas e incubarlas en la estufa de 37°C $\pm$ 1°C. Tras la incubación de 24 h $\pm$ 3 h, examinar las placas para observar la presencia de colonias típicas y de colonias atípicas de *Salmonella* spp.. Marcar la posición de la colonia en la placa. Las colonias típicas de *Salmonella* spp. que crecen en el agar XLD tienen un centro negro y una pequeña zona transparente levemente rosada debido al cambio de color del indicador.

Nota: Las variantes de colonias de *Salmonella* spp. sulfhídrico negativas crecen en el agar XLD como colonias rosadas con centro rosado más oscuro. Las cepas de *Salmonella* spp. lactosa-positivas, crecen en el agar XLD como colonias amarillas con o sin centro negro. Incubar el segundo medio selectivo sólido a la temperatura apropiada y examinar después del tiempo adecuado para determinar la presencia de colonias con características presuntivas de ser *Salmonella* spp.

- En agar SS, las colonias aparecen traslúcidas con centro negro. En caso de ser sulfhídrico negativas, las colonias de *Salmonella* spp. aparecerán como colonias pequeñas y traslúcidas sin centro negro.

(* Nota: en el caso de no obtenerse colonias lo suficientemente aisladas, se efectuarán reaislamientos en los mismos agares en los cuales se presentaron las colonias.

7.2.3. Confirmación

La combinación de los resultados de los test bioquímicos y serológicos indican si el aislamiento corresponde al género *Salmonella*.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Salmonella</i> spp. en muestras de alimentos	PNT-MA-02	
		Edición N° 01	Página 6 de 10

Alternativamente se puede realizar la identificación de las colonias crecidas en los diferentes medios mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) y proceder después con los test serológicos de confirmación. El empleo de técnicas alternativas de identificación requiere la validación previa por parte del laboratorio.

7.2.3.1 Selección de colonias para la confirmación

Para la identificación bioquímica se pueden realizar pruebas bioquímicas manuales preparadas en el laboratorio (ver apartado 7.2.3.2), utilizar un kit de identificación de Enterobacterales comercial, que se debe utilizar siguiendo las instrucciones del fabricante (ejemplo: API 20E) o bien realizar la identificación mediante MALDI-TOF.

Nota: La apariencia de las colonias de *Salmonella* spp. puede variar según los diferentes tipos de serovariedades y también según los lotes de medios de cultivos selectivos. En estos casos es muy útil realizar la identificación mediante MALDI-TOF de todos los diferentes tipos de colonias crecidas. A la colonia identificada como *Salmonella* spp. se le realizará un subcultivo en agar nutritivo para realizar posteriormente la confirmación serológica (pasar al punto 7.2.3.3).

- En caso de no disponer de MALDI-TOF para la identificación de las diferentes colonias se procederá como sigue:

- Marcar en las placas aquellas colonias que sean sospechosas.
- Seleccionar al menos una colonia considerada como típica o sospechosa para subcultivar y confirmar. Si ésta es negativa, seleccionar hasta cuatro colonias sospechosas obtenidas de los otros medios de aislamiento.
- Realizar un subcultivo de las colonias seleccionadas en placas con agar nutritivo o agar tripticosa soja para obtener un buen crecimiento de la colonia aislada. Incubar las placas inoculadas a 34°C-38°C durante 24 h +/- 3 h. Utilizar cultivos puros para la confirmación bioquímica y serológica.
- Realizar las siguientes pruebas bioquímicas (temperatura de incubación a 37°C +/- 1°C).

Nota: alternativamente si hay colonias puras aisladas disponibles en el medio de aislamiento selectivo las pruebas bioquímicas pueden realizarse directamente de la colonia sospechosa bien aislada del medio selectivo. El paso por el agar no selectivo puede entonces realizarse, en forma paralela a las pruebas bioquímicas, para confirmar la pureza de la colonia elegida.

7.2.3.2. Pruebas bioquímicas

Inocular los medios de confirmación bioquímica con la colonia seleccionada. Para la confirmación de *Salmonella* spp. es necesario efectuar por lo menos los test mencionados como requeridos. Si los mismos no permiten una identificación clara, entonces se realizarán los tests especificados como optativos.

Agar hierro- tres azúcares (agar TSI):

Estriar la superficie inclinada y punzar la columna vertical. Incubar a 37°C +/- 1°C durante 24 h +/- 3 h. Interpretar los cambios en el medio de la siguiente forma:

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Salmonella</i> spp. en muestras de alimentos	PNT-MA-02	
		Edición N° 01	Página 7 de 10

Columna vertical:

- Amarilla: glucosa positiva (fermentación de glucosa)
- Rojo o sin alteración: glucosa negativa (sin fermentación de glucosa)
- Negro: formación de sulfuro de hidrógeno
- Burbujas o rajaduras: formación de gas a partir de la glucosa

Superficie inclinada:

- Amarillo: lactosa y/o sacarosa positiva (lactosa y/o sacarosa, utilizadas)
- Rojo o sin alteración: lactosa o sacarosa negativa (sin utilización –fermentación- de lactosa ni sacarosa)

Los cultivos típicos de *Salmonella* spp. muestran la superficie inclinada alcalina (roja y la columna vertical ácida (amarilla), con formación de gas y de sulfuro de hidrógeno (ennegreciendo el agar). Esto se da en el 90% de los casos. Cuando se aísla una *Salmonella* spp. lactosa-positiva, la superficie inclinada del TSI es amarilla. Por consiguiente, la confirmación preliminar de los cultivos de *Salmonella* spp. no se debe basar sólo en los resultados de la prueba del agar TSI.

Caldo para la descarboxilación de la L-lisina:

Inocular justo por debajo de la superficie del caldo. Incubar a 37°C +/- 1°C durante 24 h +/- 3 h. Si tras la incubación aparece turbidez y el medio muestra un color púrpura, esto indica una reacción positiva. El color amarillo indica reacción negativa.

Agar urea:

Estriar la superficie inclinada del agar. Incubar a 37°C +/- 1°C durante 24 h +/- 3 h. Si la reacción es positiva, la urea es hidrolizada y libera amoníaco, produciéndose un cambio del color del rojo de fenol a rojo- púrpura y luego a un color cereza intenso. A menudo, la reacción se visualiza después de 2 a 4 horas de incubación.

Prueba de la β -galactosidasa (opcional):

Suspender un asa cargada de la colonia sospechosa en un tubo que contenga 0,25 ml de solución salina. Agregar una gota de tolueno y agitar el tubo. Colocar el tubo en un baño de agua a 37°C y dejar aproximadamente 5 minutos. Agregar 0,25 ml de reactivo β -galactosidasa y mezclar. Volver a colocar el tubo en el baño de agua a 37°C y dejar durante 24 h +/-3 h. El color amarillo indica reacción positiva. A menudo la reacción aparece después de los 20 minutos. En caso de disponer de discos para la detección de β -galactosidasa, seguir las indicaciones del fabricante.

Prueba del indol:

Inocular un tubo que contenga 5 ml del medio triptona/triptófano con la colonia sospechosa. Incubar a 37°C $\pm$ 1°C durante 24 h +/- 3 h. Tras la incubación, agregar 1 ml del reactivo de Kovacs. La formación de un anillo rojo indica una reacción positiva. Un anillo marrón amarillento indica una reacción negativa.

Una vez realizadas las pruebas bioquímicas se procede a su interpretación. Generalmente *Salmonella* spp. presenta reacciones como las que se muestran en la Tabla 1.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Salmonella</i> spp. en muestras de alimentos	PNT-MA-02	
		Edición N° 01	Página 8 de 10

Tabla 1.- Interpretación de los resultados de las pruebas bioquímicas

Ensayos	Cepas de <i>Salmonella</i> .spp									
	S. Typhi		S. Paratyphi A		S. Paratyphi B		S. Paratyphi C		Otras cepas	
	Reacción	%+ ^c	Reacción	%+ ^c	Reacción	%+ ^d	Reacción	%+ ^d	Reacción	%+ ^c
TSI ácido de la glucosa	+	100	+	100	+	100	+	100	+	100
TSI gas de la glucosa	- ^e	0	+	96,1	+	96,1	+	96,1	+	92
TSI ácido de la lactosa	-	2	-	0	-	0	-	0	-	1 ^h
TSI ácido de la sacarosa	-	0	-	0,6	-	0,6	-	0,6	-	1
TSI producción de sulfuro de hidrógeno	+	97	-	10	+	100	+	100	+	92
Hidrólisis de urea	-	0	-	0	-	0	-	0	-	1
Descarboxilación de lisina	+	98	-	0	+	95	+	100	+	95
Reacción β-galactosidasa	-	0	-	0	-		-		-	2 ^h
Reacción de indol	-	0	-	1,2	-	1,2	-	1,2	-	1

c Porcentaje que indica que no todos los aislamientos de las distintas serovariedades de *Salmonella* muestran una reacción marcada + o -. Las reacciones también pueden variar entre y dentro de las serovariedades.
d Celdas vacías: No hay porcentajes disponibles en la literatura.
e *Salmonella* Typhi es anaerogénica.
h *Salmonella* entérica subespecie *arizonae* y *diarizonae* siempre dan positiva la reacción de la β-galactosidasa. Algunas cepas o subespecies *arizonae* y *diarizonae* pueden fermentar la lactosa.

7.2.3.3 Confirmación serológica

Los aislamientos detectados como *Salmonella* bioquímicamente (o mediante MALDI-TOF) deben ser sometidos a ensayos serológicos. Las colonias puras se deben cultivar en un agar no selectivo y determinar si presentan auto-aglutinación. En aquellas colonias en las que se produzca auto-aglutinación no se pueden aglutinar con los antiseros correspondientes para determinar la presencia de antígenos de *Salmonella* spp.

A continuación, se describe el método para la confirmación serológica, pero en función de los tipos de antiseros que se utilizan para la detección de antígenos O y H y de los diferentes fabricantes este método puede variar y, en cualquier caso, se deben seguir siempre las instrucciones del fabricante.

Eliminación de cepas auto-aglutinantes

En un portaobjetos colocar una gota de solución salina. Utilizando un asa tomar parte de una colonia y dispersarla en la solución hasta obtener una suspensión turbia y homogénea.

Mover el portaobjetos suavemente durante 5 a 60 segundos. Observar la suspensión, preferentemente contra un fondo oscuro.

Si en la suspensión se ve la aparición de grumos, esto indica que la bacteria auto-aglutina y la confirmación serológica será complicada. Descartar estas colonias y continuar con aquellas que no auto-aglutinen.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Salmonella</i> spp. en muestras de alimentos	PNT-MA-02	
		Edición N° 01	Página 9 de 10

Test somático OSA y OSB o Polivalente somático

En un portaobjetos o lámina de vidrio, colocar una gota del antisuero O (ya sea el polivalente o el OSA/OSB). Partiendo de una colonia pura que no auto-aglutine, tomar con un asa parte de la misma y dispersarla en la solución hasta obtener una suspensión turbia y homogénea.

Mover el portaobjetos suavemente durante 5 a 60 segundos. Observar la suspensión, preferentemente contra un fondo oscuro.

Si en la suspensión se ve la aparición de grumos, esto indica que la colonia aglutina y se considera una reacción positiva.

Consideraciones a tener en cuenta:

Si el cultivo en estudio no reacciona con ninguno de los antisueros (OSA/OSB o polivalente) y bioquímicamente pertenece al género *Salmonella* puede ser:

a) una serovariedad no comprendida en dichos antisueros, en tal caso remitir la cepa a un laboratorio de referencia.

b) una serovariedad que presente un antígeno de envoltura Vi (S. Typhi, Paratyphi C y algunas cepas de *Salmonella* Dublin). En este caso se enfrenta el antisuero Vi. Si la aglutinación con este antisuero da positiva, se hace una suspensión de la bacteria en 1 ml de solución fisiológica, se calienta 30 minutos a 100°C y se repite la aglutinación con los antisueros somáticos.

Serotipificación flagelar

En un portaobjetos o lámina de vidrio, colocar una gota del antisuero polivalente H. Partiendo de una colonia pura que no auto-aglutine, tomar con un asa parte de la misma y dispersarla en la solución hasta obtener una suspensión turbia y homogénea.

Mover el portaobjetos suavemente durante 5 a 60 segundos. Observar la suspensión, preferentemente contra un fondo oscuro.

Si en la suspensión se ve la aparición de grumos, esto indica que la colonia aglutina y se considera una reacción positiva.

Interpretación de reacciones bioquímicas y serológicas

En la Tabla 2 se expresa la interpretación de las pruebas confirmatorias realizadas a las colonias investigadas.

Tabla 2.- Interpretación de pruebas confirmatorias de *Salmonella* spp.

Reacciones bioquímicas	Auto-aglutinación	Reacciones serológicas	Interpretación
Típicas	No	Antígenos O, Vi o H positivos	Las cepas se consideran <i>Salmonella</i>
Típicas	No	Todas las reacciones son negativas	Pueden ser <i>Salmonella</i>
Típicas	Si	No analizadas debido a que presentaron auto-aglutinación	Pueden ser <i>Salmonella</i>
No son reacciones típicas	---	---	No se consideran cepas de <i>Salmonella</i>

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de <i>Salmonella</i> spp. en muestras de alimentos	PNT-MA-02	
		Edición N° 01	Página 10 de 10

8. INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- Se informarán los resultados obtenidos para cada muestra, que luego serán validados por el facultativo responsable.

- De acuerdo con la interpretación de los resultados, indicar: *Salmonella* SE DETECTA o NO SE DETECTA en la porción analizada de X g, X ml o área de superficie de muestra.

- Detección de *Salmonella* spp.: Se detecta/no se detecta en X g, X ml, X cm² (ISO 6579-1/2017)

En el momento de realizar la interpretación de los resultados, hay que tener en cuenta el Reglamento de la Comisión N°2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios ANEXO I – Capítulo 1 “Criterios de seguridad alimentaria”, en donde la tolerancia para la detección de *Salmonella* es 0 “cero”, es decir, que dependiendo de la matriz las muestras se informarán como se detecta/no se detecta en X g.

9. RESPONSABILIDADES

El procesamiento de las muestras y todas las actividades de laboratorio, así como sus correspondientes registros, se realiza por técnicos superiores o por técnicos de grado medio de laboratorio, debidamente cualificados.

La supervisión/validación la realiza el facultativo responsable y aplica a todas las actividades analíticas y no analíticas: revisión de procedimientos, controles de calidad y emisión e interpretación de resultados. Los auxiliares técnicos que intervienen son responsables de llevar a cabo las actividades concernientes a la preparación de la muestra y la preparación de los materiales y medios de cultivo necesarios y de llevar los registros correspondientes.

10. IDENTIFICACIÓN DE FUENTES DE INCERTIDUMBRE

Origen	Fuentes de incertidumbre	Forma de control
Instrumental	Incertidumbre asociada a las pesadas	Calibración anual y Verificación diaria de las balanzas.
Temperatura	Incubadoras	Termómetros calibrados.
Medios de cultivo y reactivos	Calidad y homogeneidad de los medios de cultivo y reactivos	Método ecométrico. Utilización de cultivos de referencia.
Humanas	Experiencia y pericia del personal en la interpretación de los resultados	Pruebas intralaboratorio. Pruebas de proficiencia Internacionales.

11. MEDIDAS DE SEGURIDAD Y CONDICIONES AMBIENTALES

Dado que las muestras a manipular pueden contener patógenos de clase II, es importante observar durante el proceso y ensayo la aplicación de prácticas de bioseguridad acordes con los niveles evaluados de riesgo.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - Part 1: Detection of *Salmonella* spp. ISO 6579-1/2017.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Listeria monocytogenes</i> en muestras de alimentos	PNT-MA-03	
		Edición N° 01	Página 1 de 9

PNT-MA-03

Investigación de *Listeria monocytogenes* en muestras de alimentos

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2022	Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Listeria monocytogenes</i> en muestras de alimentos	PNT-MA-03	
		Edición N° 01	Página 2 de 9

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo del presente documento es estandarizar la metodología para la investigación de *Listeria monocytogenes* y unificar criterios de aplicación para el procesamiento de muestras de alimentos.

2. FUNDAMENTO

Este documento basado en la norma ISO 11290-1/2017, especifica un método horizontal para la detección de *Listeria monocytogenes*, en una cantidad de masa, volumen o área de superficie determinados.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp.- Part 1: Detection method. ISO 11290-1/2017
- Doyle MP, Diez Gonzalez F, Hill C. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. 5th edition. American Society for Microbiology. 2019.
- Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs.

4. MUESTRAS

Consultar el PNT-MA-01a (Toma de muestras de alimentos, conservación y transporte) y PNT-MA-01b (Preparación de muestras para análisis microbiológico de alimentos) de este procedimiento SEIMC n° 78.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1. MEDIOS DE CULTIVO

- Caldo Half-Fraser (CHF)
- Caldo Fraser (CF)
- Agar según Ottaviani y Agosti (ALOA)
- Agar Oxford, Palcam u Oxford modificado (MOX)
- Agar Triptona soja con extracto de levadura (TSYEA)
- Agar movilidad (opcional)
- Agar sangre (ovina o bovina)
- L-ramnosa
- D-xilosa

5.2. REACTIVOS Y SOLUCIONES

- Solución peróxido de hidrógeno al 3% – Test Catalasa (opcional)
- Kit de identificación (API LISTERIA o similar)
- Colorantes para tinción de Gram

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Listeria monocytogenes</i> en muestras de alimentos	PNT-MA-03	
		Edición N° 01	Página 3 de 9

5.3. MATERIALES DE REFERENCIA

- A fin de controlar la capacidad de los medios de enriquecimiento e identificación para soportar el crecimiento de *Listeria monocytogenes* se debe introducir en un frasco de control una dilución del cultivo de referencia de una cepa aislada recientemente.
- Agregar 10-100 células de *Listeria monocytogenes* por frasco. Proceder con los frascos de control como un análisis de cultivos para demostrar que se recuperó el cultivo del control positivo.
 1. Se necesita por lo menos una cepa de *Listeria monocytogenes* como control positivo.
 2. Se necesita por lo menos una cepa de *Listeria innocua* como control negativo en la prueba de hemólisis.
 3. Se necesita una cepa β -hemolítica de *Staphylococcus aureus* y una cepa de *Rhodococcus equi*.
 Los cultivos de control con *L. monocytogenes* se deben preparar y usar en la misma forma que los cultivos del material donde se van a efectuar los análisis.
- El inóculo debe estar comprendido entre 10 y 100 células por frasco y su modo de preparación es como sigue:
 - a) Preparar una suspensión del microorganismo elegido en solución fisiológica con una turbidez igual al n°1 de la escala de McFarland ($3,0 \times 10^8$ UFC/ml).
 - b) Efectuar 6 diluciones decimales en solución fisiológica. Inocular 0,1ml de la dilución 10^{-6} en el caldo a probar (aproximadamente 30 células).
- Como controles negativos se incluyen todos los medios a utilizar inoculados a partir del caldo Half Fraser.
- Cepas de *Staphylococcus aureus* y *Rhodococcus equi* para la realización del CAMP Test (opcional).

6. APARATOS Y MATERIALES

- Pinzas estériles
- Tijeras y/o bisturíes estériles
- Pipetas Pasteur estériles
- Portaobjetos
- Asas de siembra estériles 10 μ l
- Asas de inoculación estériles
- Vórtex
- Bolsas de Stomacher
- Tubos de vidrio (8 mm de diámetro y 160 mm de longitud)
- Pipetas graduadas estériles con capacidad nominal de 0,1ml; 1ml y 10 ml
- Placas de Petri de diámetro aproximado 90 mm
- Balanza granataria sensibilidad $\pm 0,1$ g
- Homogeneizador tipo Stomacher
- Equipo de esterilización húmeda (autoclave)
- Equipo de esterilización seca
- Cabina de secado u horno capaz de operar entre 25°C - 50°C
- Cabina de flujo laminar
- Incubadora capaz de operar a 30°C $\pm 1^\circ$ C
- Incubadora capaz de operar a 37°C $\pm 1^\circ$ C
- Incubadora capaz de operar a 25°C $\pm 1^\circ$ C (opcional)
- Peachímetro que tenga una exactitud de calibración de $\pm 0,1$ unidad de pH a 20°C - 25°C
- Cabina de seguridad biológica clase II

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Listeria monocytogenes</i> en muestras de alimentos	PNT-MA-03	
		Edición N° 01	Página 4 de 9

- Refrigerador capaz de operar a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$
- Congelador capaz de operar a $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$
- Microscopio

7. PROCESAMIENTO

7.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Preparar la suspensión inicial. Agregar a la porción de 25 g o 25 ml de muestra, 225 ml del caldo de enriquecimiento selectivo primario (Caldo Half Fraser CHF) para obtener una relación aproximada de 1/10 (masa/volumen). Homogeneizar. Las muestras se procesarán en una cabina de flujo laminar.

Nota: La norma de referencia ISO 11290-1/2017 ha sido validada para porciones analíticas de 25 g o 25 ml. Se pueden utilizar porciones analíticas más pequeñas sin validación/verificación adicional mientras que se mantenga la misma proporción entre el volumen del caldo de pre-enriquecimiento y la porción analítica. Para porciones analíticas mayores que la inicialmente validada, es necesario efectuar el estudio de validación/verificación para determinar que no hay efectos negativos en la detección de *Listeria monocytogenes* o *Listeria* spp.

7.2. EJECUCIÓN DEL ENSAYO

7.2.1. Enriquecimiento primario

- Incubar al caldo Half Fraser durante $25 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$ a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Nota: Se puede observar una coloración negra durante la incubación

7.2.2. Enriquecimiento secundario

- Tras la incubación del caldo de enriquecimiento primario, transferir 0,1 ml del cultivo obtenido a un tubo con 10 ml de caldo Fraser, CF.
- Incubar durante $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

7.2.3. Aislamiento e identificación

1. A partir del enriquecimiento primario (CHF) incubado durante $25 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$ a 30°C , tomar con un asa de siembra una porción de cultivo e inocularla en la superficie del primer medio selectivo (ALOA) y del segundo medio a elección, con el fin de obtener colonias bien separadas.
2. A partir del enriquecimiento secundario (CF) incubado durante $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ a 37°C , tomar con un asa de siembra una porción de cultivo e inocularla en la superficie del primer medio selectivo (ALOA) y del segundo medio a elección con el fin de obtener colonias bien separadas.
3. Invertir las placas obtenidas en 1 y 2 e incubarlas a 37°C (ALOA) y en el caso del segundo medio selectivo según las instrucciones del fabricante.
4. El primer medio selectivo (ALOA) se debe incubar un total de $48 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$. Para el segundo medio

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Listeria monocytogenes</i> en muestras de alimentos	PNT-MA-03	
		Edición N° 01	Página 5 de 9

selectivo, seguir las instrucciones del fabricante.

5. Examinar las placas a las 24 h $\pm$ 2 hs de incubación, en busca de colonias presuntivas de *Listeria monocytogenes*. En caso de obtener colonias sospechosas de *Listeria monocytogenes*, la incubación de las placas se termina en este momento. En cambio, si no hay crecimiento a las 24 h, se deben re-incubar las placas durante 24 h más, hasta completar un total de 48 h $\pm$ 2 h.

Nota: tras la incubación, las placas pueden guardarse en nevera a 5°C por un máximo de 48 h antes de la lectura de las mismas.

6. Detección e interpretación de colonias típicas de *Listeria monocytogenes*:

AGAR OTTAVIANI AGOSTI (ALOA): colonias azul verdosas, rodeadas por un halo opaco.

Nota:

- Algunas cepas de *L. monocytogenes* presentan un halo débil o algunas veces sin halo, en casos de estrés particularmente estrés ácido.
- Algunas cepas raras de *L. monocytogenes* se caracterizan por una leve actividad PIPLC (fosfatidil-inositol-fosfolipasa C). Estas cepas se pueden detectar tras una incubación de más de 4 días. Algunos de estos aislamientos pueden ser patógenos.

AGAR MOX y OXFORD: a las 24 h de incubación las colonias son pequeñas (1 mm), grises, rodeadas de un halo negro. A las 48 h de incubación las colonias aumentan un poco su tamaño (2 mm), se ennegrecen y siguen rodeadas de un halo negro.

AGAR PALCAM: si se ha incubado el medio en forma micro-aerófila, dejar al aire 1 h. A las 24 h, el crecimiento de las listerias es pequeño, gris verdoso o verde oliva, de 1,5 mm a 2 mm de diámetro, a veces con centro negro, pero siempre con halo negro. Después de 48 h de incubación las colonias son de color verde, de 1,5 mm a 2 mm de diámetro, con una depresión central, rodeadas de un halo negro.

7.2.4 Confirmación

7.2.4.1 Selección de colonias para confirmación

De cada placa de medio de aislamiento selectivo seleccionar al menos 1 colonia sospechosa para su confirmación. Es suficiente con que se confirme un aislamiento por muestra. Si la primera colonia es negativa, entonces continuar con otras de los distintos medios selectivos, hasta un máximo de 5 colonias por cada placa de cada medio selectivo.

Estriar las colonias típicas de *Listeria monocytogenes* en la superficie de agar TSYEA o en agar sangre, de manera que permita el crecimiento de colonias bien aisladas. Incubar las placas a 37°C $\pm$ 1°C durante 18-24 h o hasta que se obtenga un crecimiento satisfactorio y abundante.

Utilizar placas de agar sangre para ver si las colonias presentan hemólisis.

Al finalizar la incubación se deben buscar colonias aisladas. En caso de que no se haya conseguido un buen aislamiento, realizar un subcultivo en un medio sólido no selectivo para permitir un buen aislamiento y crecimiento adecuado de las colonias.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Listeria monocytogenes</i> en muestras de alimentos	PNT-MA-03	
		Edición N° 01	Página 6 de 9

Continuar con las pruebas de confirmación a partir del medio sólido no selectivo.

• **Aspecto microscópico:** (opcional en caso de utilizar medios sólidos selectivos para *Listeria* spp. patógenas)
A partir de una colonia aislada, realizar en un portaobjetos una tinción de Gram. Los microorganismos pertenecientes a *Listeria* spp., incluyendo *Listeria monocytogenes*, aparecen como bacilos delgados cortos o coco-bacilos Gram-positivos.

• **β-Hemólisis:** si las colonias tienen características morfológicas compatibles con *Listeria* spp., entonces inocular placas de agar sangre para determinar si existe reacción de hemólisis.

Secar la superficie del agar antes de usar. Dibujar una cuadrícula en el fondo de la placa, marcando de 4 a 25 espacios por placa según la cantidad de aislamientos que se analizarán. Tomar cada colonia típica de la placa de TSYEA que se desea probar y punzar un espacio para cada cultivo usando un asa de inoculación. También punzar cultivos de control positivo (*Listeria monocytogenes*) y control negativo (*Listeria innocua*), si es posible en la misma placa.

Tras la incubación a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$, analizar las colonias inoculadas y los controles de análisis. *Listeria monocytogenes* muestra una zona leve y angosta de aclaración (β-hemólisis). *Listeria innocua* no muestra zonas claras alrededor de la punción. Mantener las placas en una luz brillante para comparar los cultivos de análisis con los controles.

• **Reacción de la catalasa:** (opcional): picar una colonia típica y suspenderla en una gota de solución de peróxido de hidrógeno al 3% en un portaobjetos. *Listeria* spp. es catalasa positiva, y se demuestra mediante la formación de burbujas de gas.

• **Fermentación de hidratos de carbono:** inocular cada caldo de fermentación de hidratos de carbono con una colonia aislada del agar no selectivo. Incubar durante 24-48 h a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. El color amarillo indica reacciones positivas (formación de ácido). L-Ramnosa y D-Xilosa se utilizan para confirmar *Listeria monocytogenes*, siendo **L-Ramnosa positiva y D-Xilosa negativa**.

• **Alternativas:** utilizar kits comerciales de pruebas bioquímicas. Ejemplo: API LISTERIA, MICRO ID, o similar. También se puede realizar la identificación de las colonias crecidas en los diferentes medios mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF), pero dado que con este método no es posible diferenciar *Listeria monocytogenes* de otras especies de *Listeria*, cuando el sistema indica que se trata de *Listeria* spp. es necesario realizar siempre la prueba de β-hemólisis mediante el CAMP test utilizando una cepa patrón de *Staphylococcus aureus* para poder diferenciar *Listeria monocytogenes*. El empleo de técnicas alternativas de identificación requiere la validación previa por parte del laboratorio.

• **Prueba de CAMP:** (opcional): esta prueba se utiliza cuando existe un resultado difícil de interpretar. Este test permite demostrar que la hemólisis se debe realmente a la actividad de la listeriolisina.

1.- Para el CAMP test tradicional aplicar una línea de estriado de *Staphylococcus aureus* y otra de *Rhodococcus equi*, como cultivos de referencia, en una placa de agar sangre en forma paralela y opuestas a 3 o 4 cm de distancia (ver figura 1).

2.- Estriar el cultivo a probar perpendicular a los dos cultivos de referencia. El estriado del cultivo a probar debe estar a 1–2 mm de cada cultivo de referencia. Estos cultivos tanto el cultivo problema como los de referencia no se deben tocar. De la misma manera, estriar cultivos control de *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* y *Listeria ivanovii*.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Listeria monocytogenes</i> en muestras de alimentos	PNT-MA-03	
		Edición N° 01	Página 7 de 9

3.- Incubar 18-24 h a 37°C. Si se usan placas de doble capa, incubar a 37°C durante 12-18 h.

4.- Examinar los cultivos de referencia estriados, a fin de observar el incremento de la β -hemólisis a ambos extremos próximos a los cultivos de referencia. La presencia de una zona de β -hemólisis indica una reacción CAMP positiva. La ausencia de un incremento en la β -hemólisis indica una reacción CAMP negativa.

Listeria monocytogenes es CAMP positiva para la estria de *Staphylococcus aureus* utilizada como referencia y CAMP negativa para *Rhodococcus equi*. En contraste, *Listeria ivanovii* es CAMP positiva para *Rhodococcus equi* y CAMP negativa para la estria de *Staphylococcus aureus*. Ver figura 1.

5.- Si se sospecha que una *Listeria* spp. β -hemolítica no da positivo el CAMP test con cualquiera de los cultivos de referencia en 24 h $\pm$ 2 h, continuar la incubación a 37°C $\pm$ 2°C hasta cumplir un tiempo total de 48 h $\pm$ 2 h y volver a examinar.

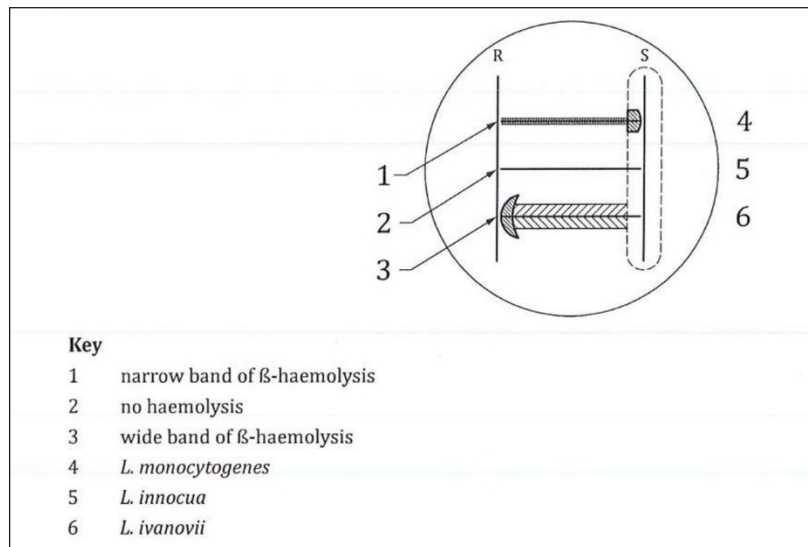


Figura 1.- Inoculación e interpretación del CAMP test

7.2.5. Interpretación de los resultados

Los microorganismos del género *Listeria* son pequeños bacilos o cocobacilos delgados Gram-positivos a las 24 h $\pm$ 2 h de incubación, móviles y catalasa positivos.

Listeria monocytogenes, *Listeria ivanovii* y *Listeria seeligeri*, producen β -hemólisis en agar sangre. De las tres, la única que utiliza la L-Ramnosa y no la D-Xilosa es la *Listeria monocytogenes*. Ver tablas 1 y 2.

Tabla 1. Interpretación de las pruebas de identificación de *Listeria* spp.

Especies	Hemólisis	Producción de ácido		CAMP Test	
		Ramnosa	Xilosa	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	+	-	+	+	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-
<i>L. grayi</i>	-	V	-	-	-

* reacción débil

V reacción variable

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Listeria monocytogenes</i> en muestras de alimentos	PNT-MA-03	
		Edición N° 01	Página 8 de 9

Tabla 2. Pruebas confirmatorias para *Listeria monocytogenes*

	Pruebas	Resultados
Obligatorias	Aspecto microscópico ^a β-hemólisis L-Ramnosa D-Xilosa	Delgados bacilos cortos o cocobacilos + + -
Opcionales	Catalasa CAMP Test	+ +
^a opcional en caso de utilizar medios sólidos selectivos para <i>Listeria</i> spp. patógenas		

8. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Se informarán los resultados obtenidos para cada muestra que luego serán validados por el facultativo responsable.

De acuerdo con la interpretación de los resultados, indicar *Listeria monocytogenes* SE DETECTA o NO SE DETECTA en la porción analizada de X g, X ml o área de superficie de muestra.

Investigación de *Listeria monocytogenes*: Se detecta/no se detecta en X g, X ml, X cm² (ISO 11290-1/2017)

En el momento en el que se realiza la interpretación de los resultados, hay que tener en cuenta el Reglamento de la Comisión N°2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios ANEXO I – Capítulo 1 “Criterios de seguridad alimentaria”, en donde la tolerancia para la detección de *Listeria monocytogenes* es 0 “cero”, es decir que dependiendo de la matriz las muestras se informarán como se detecta o no se detecta en X g.

9. RESPONSABILIDADES

El procesamiento de las muestras y todas las actividades de laboratorio, así como sus correspondientes registros, se realiza por técnicos superiores o por técnicos de grado medio de laboratorio, debidamente cualificados. La supervisión/validación la realiza el facultativo responsable y aplica a todas las actividades analíticas y no analíticas: revisión de procedimientos, controles de calidad y emisión e interpretación de resultados.

Los auxiliares técnicos que intervienen son responsables de llevar a cabo las actividades concernientes a la preparación de la muestra y la preparación de los materiales y medios de cultivo necesarios y de llevar los registros correspondientes.

10. IDENTIFICACIÓN DE FUENTES DE INCERTIDUMBRE

Origen	Fuentes de incertidumbre	Forma de control
Instrumental	Incertidumbre asociada a las pesadas	Calibración anual y Verificación diaria de las balanzas.
Temperatura	Incubadoras	Termómetros calibrados.
Medios de cultivo y reactivos	Calidad y homogeneidad de los medios de cultivo y reactivos	Método ecométrico. Utilización de cultivos de referencia.
Humanas	Experiencia y pericia del personal en la interpretación de los resultados	Pruebas intralaboratorio. Pruebas de proficiencia Internacionales.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Listeria monocytogenes</i> en muestras de alimentos	PNT-MA-03	
		Edición N° 01	Página 9 de 9

11. MEDIDAS DE SEGURIDAD Y CONDICIONES AMBIENTALES

El laboratorio debe disponer de una CABINA DE BIOSEGURIDAD BIOLÓGICA TIPO IIA, para realizar los ensayos que así lo requieran, a fin de proteger al personal de eventuales formaciones de aerosoles con el microorganismo.

Se debe autoclavar la totalidad del material que se utiliza en las investigaciones de *Listeria monocytogenes*, se haya o no confirmado su aislamiento.

Se prohíbe la participación en los análisis de investigación de *Listeria monocytogenes* a mujeres embarazadas e individuos inmunocomprometidos.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. - Part 1: Detection method ISO 11290-1/2017.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recuento de <i>Listeria monocytogenes</i> en alimentos	PNT-MA-04	
		Edición N° 01	Página 1 de 9

PNT-MA-04

Recuento de *Listeria monocytogenes* en alimentos

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2022	Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recuento de <i>Listeria monocytogenes</i> en alimentos	PNT-MA-04	
		Edición N° 01	Página 2 de 9

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo del presente documento es establecer las condiciones para el recuento de *Listeria monocytogenes* en alimentos para consumo humano, productos para la alimentación animal y muestras ambientales en áreas de producción y manipulación de alimentos por la técnica de recuento en placa.

2. FUNDAMENTO

Se describe un método analítico basado en la norma ISO 11290-2. "Método horizontal para la detección y recuento de *Listeria monocytogenes* y *Listeria* spp Parte-2: Método de recuento". Se basa en la determinación del número de colonias de *Listeria monocytogenes* en una cantidad determinada de la muestra problema, si el producto es líquido, o en la suspensión inicial en el caso de otros productos. Se realiza por la técnica de siembra en superficie en un agar selectivo/diferencial. Tras la incubación, se confirman las colonias características y se calcula el número de *L. monocytogenes* por gramo o mililitro de la muestra.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- ISO 7218. Microbiología de alimentos y productos para la alimentación animal. Requisitos generales y directrices para los análisis microbiológicos.
- ISO/TS 17728. Microbiología de la cadena alimentaria. Técnicas de muestreo para el análisis microbiológico de muestras de alimentos y productos para la alimentación animal.
- ISO 11290-2. Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección y recuento de *Listeria monocytogenes* y *Listeria* spp Parte-2: Método de recuento.
- ISO 6887-1. Microbiología de la cadena alimentaria. Preparación de muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para análisis microbiológicos. Parte1: Normas generales para la preparación de la suspensión inicial y las diluciones decimales.
- ISO 6887-2. Microbiología de la cadena alimentaria. Normas específicas para la preparación de carne y productos cárnicos.
- ISO 6887-3. Microbiología de la cadena alimentaria. Normas específicas para la preparación de pescado y productos de la pesca.
- ISO 6887-4. Microbiología de la cadena alimentaria. Normas específicas para la preparación de productos diversos.
- ISO 6887-5. Microbiología de la cadena alimentaria. Normas específicas para la preparación de leche y productos lácteos.
- ISO 11133. Microbiología de alimentos, productos para la alimentación animal y agua. Preparación, producción almacenamiento y rendimiento de medios de cultivo.
- ISO 14461-2. Leche y productos lácteos. Control de calidad en laboratorios microbiológicos. Parte2. Determinación de la fiabilidad de los recuentos de colonias de placas paralelas y diluciones posteriores.
- ISO 19036. Microbiología de alimentos y productos para la alimentación animal. Directrices para la estimación de incertidumbre en determinaciones cuantitativas.

4. MUESTRAS

Consultar el PNT-MA-01a (Toma de muestras de alimentos, conservación y transporte) y PNT-MA-01b (Preparación de muestras para análisis microbiológico de alimentos) de este procedimiento SEIMC n° 78.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recuento de <i>Listeria monocytogenes</i> en alimentos	PNT-MA-04	
		Edición N° 01	Página 3 de 9

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y MATERIALES DE REFERENCIA

5.1. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

Mantener en refrigeración a 2 - 8°C todos los medios de cultivo y reactivos, atemperando antes de su uso.

- Diluyente: Agua de peptona tamponada (APT).
- Tubos de agua de peptona tamponada (9 ml) para la preparación de diluciones decimales.
- Placas de agar de recuento selectivo / diferencial: agar *Listeria* Ottaviani Agosti (ALOA).
- Placas de agar sangre.
- Caldo xilosa.
- Caldo ramnosa.
- Agua oxigenada (peróxido de hidrógeno) de 10 volúmenes al 3% (m/m).
- Reactivos para la tinción de Gram.

5.2. MATERIALES DE REFERENCIA

Cepas para el control de calidad:

- *S. aureus* β-hemolítico
- *S aureus* (Test de CAMP)
- *Rhodococcus equi* (Test de CAMP)
- *Listeria monocytogenes*
- *Listeria innocua*
- *Listeria ivanovii*
- *Enterococcus faecalis*

6. APARATOS Y MATERIALES

- Balanza o dosidiluidor gravimétrico.
- Triturador/ Homogeneizador de muestras.
- Mechero Bunsen
- Estufa regulable a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Estufa de esterilización regulada a $170 \pm 10^\circ\text{C}$ durante 1 hora.
- Autoclave regulado a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ y 1 atmósfera de presión.
- pH-metro, capaz de realizar lecturas con resolución de $\pm 0,1$ unidades de pH a 25°C y proporcionar una exactitud de 0,1 unidades de pH.
- Espátulas o cucharas estériles.
- Asas de cultivo.
- Pipetas estériles de 1 ml, graduadas en 0,1 ml
- Bolsas para Stomacher estériles con/sin filtro.
- Microscopio.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recuento de <i>Listeria monocytogenes</i> en alimentos	PNT-MA-04	
		Edición N° 01	Página 4 de 9

7. PROCESAMIENTO

Se deben mantener precauciones de seguridad e higiene: *L. monocytogenes* está catalogado dentro del grupo 2 del RD 664/1997. Se debe realizar el procesamiento en cabina de flujo laminar o en la zona de protección de un mechero Bunsen.

7.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Consultar el procedimiento de preparación de muestras para análisis microbiológico, PNT-MA-01b de este procedimiento n° 78.

7.2. SIEMBRA EN AGAR ALOA. INCUBACIÓN Y SELECCIÓN DE PLACAS

-Transferir con pipeta estéril 0,1 ml de la suspensión madre (o directamente de la muestra si es líquida) y 0,1 ml de las diluciones decimales a la superficie de una placa de agar ALOA de 90 mm.

Si se desea estimar recuentos bajos se puede incrementar el límite de detección transfiriendo 1,0 ml de la muestra problema si es líquida o 1,0 ml de la suspensión madre para otros productos, sobre la superficie de 3 placas (90 mm) o de 1 placa de 140 mm de Agar ALOA. Repetir la operación con las diluciones decimales 10^{-1} para productos líquidos y 10^{-2} para productos sólidos. Inocular más diluciones si fuera necesario. De acuerdo con la norma ISO 7218, si solo se inocula una dilución se ha de realizar un duplicado.

Distribuir cuidadosamente el inóculo con un asa estéril lo más rápidamente posible sobre la superficie de la/s placa/s de agar ALOA, sin tocar las paredes. Usar una nueva asa estéril para cada dilución. Dejar las placas cerradas a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos para que el inóculo sea absorbido en el agar e incubar las placas en posición invertida durante 24 ± 2 horas en aerobiosis en estufa regulada a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

En caso de crecimiento débil, si no se observan colonias o en ausencia de colonias típicas o de halos dudosos después de 24 ± 2 horas de incubación, prolongar la incubación de las placas durante 24 ± 2 horas complementarias.

Se consideran colonias sospechosas o típicas de *L. monocytogenes* las verdes-azules rodeadas de un halo opaco, por la producción de fosfolipasa C, específica de *L. monocytogenes* y la incapacidad de metabolizar la xilosa. Las colonias de *L. ivanovii* son también verde-azuladas y rodeadas de halo opaco.

Algunas cepas de *L. monocytogenes* están rodeadas de un halo muy pálido (o incluso no muestran ningún halo) en caso de estrés, particularmente de estrés ácido.

Algunas *L. monocytogenes* se caracterizan por una actividad lenta de la PIPLC (fosfolipasa C fosfatidil inositol). En este caso las colonias típicas se detectan cuando la duración total de la incubación es más larga, por ejemplo 4 días. Algunas de estas cepas pueden ser patógenas.

Tras el período de incubación, contar todas las colonias sospechosas de *L. monocytogenes*. Se seleccionan las placas que contengan menos de 150 colonias si se emplean 3 placas de 90 mm de ALOA o menos de 360 colonias si se emplea 1 placa de 140 mm.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recuento de <i>Listeria monocytogenes</i> en alimentos	PNT-MA-04	
		Edición N° 01	Página 5 de 9

Si se emplean 3 placas de 90 mm de agar ALOA, para la selección de colonias considerar las tres como una única placa.

Para la confirmación de las colonias sospechosas de *L. monocytogenes* seleccionar, de cada placa, 5 colonias en total, representativas de cada tipo de colonia; si hay menos de 5 colonias sospechosas en la placa, confirmar todas.

Nota. En este paso se puede utilizar la identificación mediante MALDI-TOF para obtener la identificación de *Listeria* spp. sin necesidad de inocular todas las colonias sospechosas, sino solamente aquellas identificadas como *Listeria* spp. mediante este método. El empleo de técnicas alternativas de identificación requiere la validación previa por parte del laboratorio.

Inocular las colonias seleccionadas sobre placas de agar sangre, previamente secadas, para permitir el desarrollo de colonias perfectamente aisladas y así obtener un cultivo puro para la confirmación posterior. Se pueden emplear otros agares de aislamiento general como agar nutritivo o agar TSYA pero el uso de agar sangre en esta etapa permite, además, realizar el ensayo de la hemólisis.

Incubar a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18 - 24 horas o hasta crecimiento satisfactorio. Si las colonias no quedan bien aisladas se transferirá otra colonia característica a una nueva placa de agar sangre.

7.3. PRUEBAS DE CONFIRMACIÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Listeria monocytogenes*

A partir de las colonias crecidas en agar sangre se realizarán los siguientes ensayos:

7.3.1. Ensayos obligatorios:

- Producción de hemólisis.

Ver apartado anterior. Registrar el resultado obtenido tras la incubación a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18 - 24 h.

Incluir un control positivo (*L. monocytogenes*) y un control negativo (*Listeria innocua*).

- Utilización de carbohidratos.

A partir de las colonias crecidas en agar sangre, transferir el contenido de un asa a dos tubos de caldo de fermentación de carbohidratos (Caldo ramnosa y caldo xilosa).

Se incuban a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante un máximo de 5 días. Una coloración amarilla indica una reacción positiva (formación de ácido) y tiene lugar, generalmente, a las 24 - 48 h. Se deben inspeccionar cada día.

Incluir controles: *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*.

7.3.2. Ensayos opcionales:

Se realizarán si los obligatorios no son concluyentes.

- Test de la catalasa.

Incluir un control positivo: *S. aureus* y un control negativo: *Enterococcus faecalis*.

- Tinción de Gram.

- Test de CAMP.

Incluir controles: *L. monocytogenes*, *L. innocua* y *L. ivanovii*

- Test de movilidad a 25°C :

a) Por microscopía, tras incubación a 25°C en un medio líquido

b) Por crecimiento característico en agar motilidad tras incubación a 25°C .

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recuento de <i>Listeria monocytogenes</i> en alimentos	PNT-MA-04	
		Edición N° 01	Página 6 de 9

De acuerdo con la norma ISO 7218 se pueden emplear otros procedimientos alternativos de confirmación una vez que hayan sido verificados por el laboratorio: galerías miniaturizadas para identificación bioquímica, PCR etc.

7.4. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Las cepas de *L. monocytogenes* son bacilos cortos/cocobacilos Gram-positivos, catalasa positivos, β-hemolíticos, test de CAMP positivo para *S. aureus* y negativo para *R. equi*, móviles a 25°C, fermentadores de ramnosa y no fermentadores de xilosa.

8. CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS (ISO 7218)

8.1. CASO GENERAL

Utilizar los recuentos de las placas que contengan un máximo de 150 - 360 colonias características a nivel de dos diluciones consecutivas y que al menos una de las placas contenga 10 colonias características. Se aplica el método de cálculo después de la identificación de las colonias, para lo cual en primer lugar se calcula el número de colonias por placa y a continuación el número de colonias por muestra.

Cálculo del número de colonias por placa:

Cuando el método utilizado requiere identificación de colonias, se identifica un número determinado A de colonias sospechosas (generalmente 5) de cada placa escogida para el recuento de colonias. Tras la identificación se calcula el número de colonias de cada placa "a" que cumplen los criterios de identificación, utilizando la ecuación:

$$a = \frac{b}{A} x C$$

donde:

b: número de colonias características que responden a los criterios de identificación.

A: número de colonias ensayadas.

C: es el número total de colonias sospechosas contadas en cada placa.

Hay que redondear a números enteros. Si la cifra siguiente es inferior a 5, la cifra precedente no se modifica; si la cifra siguiente es superior o igual a 5, la cifra precedente se aumenta en 1 unidad.

Cálculo del número de colonias por muestra:

El número de microorganismos identificados N presentes en la muestra se calcula mediante la fórmula:

$$N = \frac{\sum a}{V \cdot 1,1^d}$$

Siendo V el volumen inoculado en cada placa y d la dilución correspondiente a la primera dilución escogida. (d=1, cuando no hay dilución; muestras líquidas, por ejemplo).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recuento de <i>Listeria monocytogenes</i> en alimentos	PNT-MA-04	
		Edición N° 01	Página 7 de 9

El resultado se redondea como se ha descrito anteriormente y se expresa como un número comprendido entre 1,0 y 9,9 multiplicado por 10x, donde x es la potencia apropiada de 10. Representa el número (ufc) de microorganismos por ml (para los productos líquidos) o por g (para el resto de productos) de muestra. Si se emplea más de 1 dilución, el porcentaje entre el recuento de colonias de las 2 diluciones se espera que sea del 10%. Se deben aplicar los límites propuestos por la norma ISO 14461-2. Si no se cumplen, los resultados deben ser interpretados con precaución.

8.2. RECUENTOS BAJOS

8.2.1. Menos de 10 colonias. Caso en el que la placa de la muestra para análisis (productos líquidos), suspensión inicial (resto de productos) o primera dilución contiene menos de 10 colonias.

El intervalo óptimo de precisión corresponde a un recuento de entre 10 y 150- 360 colonias. La precisión disminuye rápidamente al reducirse el número de colonias por debajo de 10. Sin embargo, en función del objetivo del análisis, se puede definir un límite de determinación inferior basado en un recuento inferior a 10.

Si la placa contiene menos de 10 colonias, pero como mínimo 4, el resultado se calcula siguiendo la fórmula del caso general, expresándolo como *“número estimado de microorganismos x por ml (productos líquidos) o por gramo (resto de productos)”*.

El término número estimado significa una estimación menos precisa del valor verdadero.

Si el resultado total oscila entre 1 y 3, la precisión del análisis es demasiado baja y el resultado debe expresarse como: *“Hay microorganismos presentes, pero a un nivel inferior a (4 / V*d) por gramo o ml”*.

8.2.2.- Ausencia de colonias. Caso en que la placa de la muestra para análisis (productos líquidos), suspensión inicial (resto de productos), o primera dilución inoculada no contiene colonias. El resultado se expresa de la siguiente manera:

*“Menos de 1/V*d microorganismos por ml.”* (productos líquidos) o *“Menos de 1/V*d microorganismos por gramo”* (resto de productos).

d: es el factor de dilución de la suspensión inicial, o de la primera dilución inoculada o escogida (d = 100 = 1, cuando se inocula directamente la muestra para análisis).

V es el volumen de inóculo utilizado en ml.

8.3. RECUENTOS ALTOS

Si el recuento de colonias (colonias totales, colonias típicas/sospechosas) en todas las placas de todas las diluciones inoculadas es mayor de 150-360, el resultado se expresa de la siguiente manera:

$> (150- 360/V*d) \times b/A$, expresado en ufc por ml (productos líquidos) o ufc por g (resto de productos).

d es el factor de dilución correspondiente a la última dilución inoculada.

V es el volumen de inóculo incluido en cada placa en ml.

b es el número de colonias que cumple los criterios de identificación dentro de las colonias ensayadas A.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recuento de <i>Listeria monocytogenes</i> en alimentos	PNT-MA-04	
		Edición N° 01	Página 8 de 9

8.4 OTROS CASOS

Consultar la norma ISO 7218.

En todos los casos el resultado se expresa como ufc/ml (para los productos líquidos), o ufc/g (para el resto de productos).

8.5. CÁLCULO DE INCERTIDUMBRE (U)

La norma ISO 17025 establece que los laboratorios de ensayo deben tener y deben aplicar procedimientos para estimar la incertidumbre de la medición en métodos cuantitativos.

Se recomienda aplicar lo establecido en la norma ISO 19036 que recoge una aproximación global a la incertidumbre de medida en ensayos microbiológicos adoptando un modelo *top-down* basado en la determinación de la desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorio. Es una aproximación basada en resultados experimentales, obtenidos por análisis repetido.

- Expresión de la incertidumbre en actividades de rutina:

Recuentos inferiores a 10 colonias por placa serán emitidos como estimados, como ya se ha descrito, y no procederá coherentemente la estimación de incertidumbre al no existir precisión y exactitud suficientes.

La estimación de incertidumbres aplicará para un número de colonias ≥ 10 y $\leq 150 - 360$ colonias por placa.

Los resultados analíticos, cuando proceda, se expresarán como $N \pm U$, siendo N la mejor estimación del valor verdadero y $U = \text{incertidumbre expandida (K = 2)}$.

8.6. INFORME DE ENSAYO

El informe de ensayo recogerá toda la información exigible según ISO 17025. La información requerida se define en la norma ISO 11290-2:

- Información necesaria para la completa identificación de la muestra.
- Especificar el método utilizado (ISO 11290-2).
- Se indicarán todos los detalles considerados opcionales.
- Resultado del análisis.
- Todos los detalles inherentes a cualquier incidencia que pueda influir en el resultado del ensayo

9. RESPONSABILIDADES

El procesamiento de las muestras y todas las actividades de laboratorio, así como sus correspondientes registros, se realiza por técnicos superiores o por técnicos de grado medio de laboratorio, debidamente cualificados.

La supervisión/validación la realiza el facultativo responsable y aplica a todas las actividades analíticas y no analíticas: revisión de procedimientos, controles de calidad y emisión e interpretación de resultados.

Los auxiliares técnicos que intervienen son responsables de llevar a cabo las actividades concernientes a la preparación de la muestra y la preparación de los materiales y medios de cultivo necesarios y de llevar los registros correspondientes.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recuento de <i>Listeria monocytogenes</i> en alimentos	PNT-MA-04	
		Edición N° 01	Página 9 de 9

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Controles de calidad

- Control de medios de cultivo:

Se realiza de acuerdo a lo establecido en la norma ISO11133 que define los criterios de productividad, selectividad y especificidad de cada medio, así como las cepas de control empleadas en cada ensayo.

Los equipos empleados en las actividades analíticas deben someterse a actividades periódicas de mantenimiento y de calibración o verificación de acuerdo a un plan establecido (ISO 7218).

- Controles de calidad del método:

Control de calidad interno:

- Controles de recuperación y de precisión mediante el empleo de muestras contaminadas artificialmente. Los resultados se aprovechan para la evaluación en continuo a través del empleo de gráficos de control.
- Control de precisión en muestras de rutina (duplicados de ensayo).
- Ensayos de muestras estériles (blancos), con el fin de controlar la esterilidad de los medios y materiales auxiliares utilizados y, en general, obtener información sobre la buena práctica en la realización de los análisis.

Control de calidad externo:

A través de la participación del laboratorio en ejercicios de intercomparación. Son pruebas de laboratorio realizadas sobre muestras preparadas por empresas especializadas acreditadas en las que se comparan los resultados analíticos obtenidos con los de otros laboratorios del mismo campo de actividad.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. UNE-EN ISO/ IEC 17025: Requisitos generales relativos a la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Campylobacter</i> spp. en alimentos	PNT-MA-05	
		Edición N° 01	Página 1 de 9

PNT-MA-05

Investigación de *Campylobacter* spp. en alimentos

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2022	Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Campylobacter</i> spp. en alimentos	PNT-MA-05	
		Edición N° 01	Página 2 de 9

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo del presente documento es estandarizar la metodología para la investigación de *Campylobacter* spp. y unificar criterios de aplicación para el procesamiento de muestras de alimentos.

2. FUNDAMENTO

Este documento basado en la norma ISO 10272-1/2017, especifica un método horizontal para la detección de *Campylobacter* spp., en una cantidad de masa, volumen o área de superficie determinados.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Campylobacter* spp.- Part 1: Detection method. ISO 10272-1/2017.
- Doyle MP, Diez Gonzalez F, Hill C. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. 5th edition. American Society for Microbiology. 2019.
- Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foods-tuffs.

4. MUESTRAS

Consultar el PNT-MA-01a (Toma de muestras de alimentos, conservación y transporte) y PNT-MA-01b (Preparación de muestras para análisis microbiológico de alimentos) de este procedimiento SEIMC n° 78.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y MATERIALES DE REFERENCIA

5.1. MEDIOS DE CULTIVO

- Caldo Bolton
- Caldo Preston
- Agar desoxicolato-cefoperazona-carbón modificado (mCCD)
- Segundo agar selectivo para detección de *Campylobacter* (opcional)
- Agar sangre Columbia
- Agar nutritivo

5.2. REACTIVOS Y SOLUCIONES

- Reactivo para la detección de producción de oxidasa
- Reactivo para la detección de catalasa
- Reactivo para la detección de hidrólisis del hipurato
- Discos de indoxil-acetato
- Agua destilada estéril

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Campylobacter</i> spp. en alimentos	PNT-MA-05	
		Edición N° 01	Página 3 de 9

5.3. MATERIALES DE REFERENCIA

Utilizar cepas de referencia como controles positivos con los medios de pre-enriquecimiento. Proceder con los controles como con las muestras a analizar.

Las cepas de referencia que se recomiendan utilizar como controles positivos, son cepas de *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* y *Campylobacter lari*.

6. APARATOS Y MATERIALES

- Pinzas estériles
- Tijeras y/o bisturíes estériles
- Balanza granataria sensibilidad $\pm 0,1$ g
- Portaobjetos
- Microscopio (preferentemente con contraste de fase)
- Asas de siembra estériles (10 μ l y 1 μ l)
- Asas de inoculación estériles
- Vórtex
- Bolsas de Stomacher
- Tubos de vidrio (8 mm de diámetro y 160 mm de longitud)
- Pipetas graduadas estériles con capacidad nominal de 1 ml y 10 ml
- Placas de Petri de diámetro aproximado 90 mm
- Homogeneizador tipo Stomacher
- Equipos para generar atmósfera microaeróbica, con contenido de oxígeno $5\% \pm 2\%$, dióxido de carbono $10\% \pm 3\%$, hidrógeno $\leq 10\%$ (opcional), con el nitrógeno balanceado
- Equipo de esterilización húmeda (autoclave)
- Equipo de esterilización seca
- Cabina de flujo laminar
- Incubadora capaz de operar a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Incubadora capaz de operar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Incubadora capaz de operar a $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Peachímetro que tenga una exactitud de calibración de $\pm 0,1$ unidad de pH a $20^{\circ}\text{C} - 25^{\circ}\text{C}$
- Cabina de seguridad biológica clase II
- Baño de agua termostático capaz de operar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Refrigerador capaz de operar a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$
- Congelador capaz de operar a $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$

7. PROCESAMIENTO

7.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Los microorganismos del género *Campylobacter* son muy sensibles a las temperaturas de congelación, pero sobreviven muy bien a bajas temperaturas. Por este motivo, las muestras a analizar no deben estar congeladas sino refrigeradas a 3°C . Por otro lado, son muestras que deben analizarse lo antes posible.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Campylobacter</i> spp. en alimentos	PNT-MA-05	
		Edición N° 01	Página 4 de 9

Dependiendo del tipo de muestra y del propósito del ensayo, se pueden utilizar tres procedimientos de detección:

- **Procedimiento de detección A:** detección de *Campylobacter* spp. por enriquecimiento, en muestras con bajo número de estos microorganismos y bajo nivel de microbiota acompañante y/o con cepas de *Campylobacter* spp. "estresadas". Ejemplo: productos cocidos o congelados.
- **Procedimiento de detección B:** detección de *Campylobacter* spp. por enriquecimiento, en muestras con bajo número de estos microorganismos y alto nivel de microbiota acompañante. Ejemplo: carnes crudas (incluyendo aves de corral) o leche cruda.
- **Procedimiento de detección C:** detección de *Campylobacter* spp. directamente en placa, en muestras con alto número de cepas de este microorganismo. Ejemplo: carne cruda de aves de corral.

Si existe poca información acerca de cuál sería el mejor método a utilizar de acuerdo al tipo particular de muestra, entonces utilizar el Procedimiento de detección C en paralelo con uno de los Procedimientos de detección A y/o B.

7.2. ENRIQUECIMIENTO EN MEDIOS LÍQUIDOS SELECTIVOS

Nota: Dejar atemperar el medio de enriquecimiento a temperatura ambiente antes de su uso.

Procedimiento de detección A:

- Transferir 10 g o 10 ml de la muestra a analizar a una bolsa de Stomacher. Agregar 90 ml de medio de enriquecimiento líquido (caldo Bolton). La dilución obtenida es 1:10. Homogeneizar.
- Incubar de 4-6 h en atmósfera microaeróbica a 37°C y luego a 41,5°C durante 44 h $\pm$ 4 h.

Procedimiento de detección B:

- Transferir 10 g o 10 ml de la muestra a analizar a una bolsa de Stomacher. Agregar 90 ml de medio de enriquecimiento líquido (caldo Preston). La dilución obtenida es 1:10. Homogeneizar.
- Incubar en atmósfera microaeróbica a 41,5°C durante 24 h $\pm$ 2 h.

Las muestras se procesarán en una cabina de flujo laminar.

Nota: Este procedimiento ha sido validado para porciones analíticas de 10 g o 10 ml. Se pueden utilizar porciones analíticas más pequeñas sin validación/verificación adicional mientras que se mantenga la misma proporción entre el volumen del caldo de pre-enriquecimiento y la porción analítica.

Para porciones analíticas mayores que la inicialmente validada, es necesario efectuar el estudio de validación/verificación para determinar que no hay efectos negativos en la detección de *Campylobacter* spp.

Procedimiento de detección C: No se utiliza técnica de enriquecimiento. En este caso, utilizar una cantidad de líquido apropiado. Ejemplo: caldo Preston 1 en 2 (fracción de volumen). Mezclar bien.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Campylobacter</i> spp. en alimentos	PNT-MA-05	
		Edición N° 01	Página 5 de 9

7.3 AISLAMIENTO EN MEDIOS SÓLIDOS SELECTIVOS

Procedimiento de detección A:

A partir del enriquecimiento en caldo Bolton, sembrar con asa estéril dos medios sólidos selectivos.

- Agar desoxicolato-cefoperazona-carbón modificado (mCCD)
- Segundo agar selectivo para detección de *Campylobacter* spp. (que utilice principios selectivos diferentes de los del agar mCCD).

Las placas se incuban a 41,5°C, en atmósfera microaeróbica, y se examinan a las 44 h $\pm$ 4 h para detectar la presencia de colonias sospechosas de *Campylobacter* spp.

Procedimiento de detección B:

A partir del enriquecimiento en caldo Preston, sembrar con asa estéril en agar desoxicolato-cefoperazona-carbón modificado (mCCD).

- Incubar a 41,5°C, en atmósfera microaeróbica, y examinar a las 44 h $\pm$ 4 hs para detectar la presencia de colonias sospechosas de *Campylobacter* spp.

Procedimiento de detección C:

La porción a analizar se estría directamente o se estría después de suspenderse en una cantidad de líquido apropiada, en placa de agar mCCD.

- Incubar a 41,5°C, en atmósfera microaeróbica, y examinar a las 44 h $\pm$ 4 h para detectar la presencia de colonias sospechosas de *Campylobacter* spp.
- En el agar mCCD las colonias típicas se ven de color grisáceo y a menudo presentan brillo metálico. Además, son colonias planas, húmedas y que tienen tendencia a difundir en la superficie del agar. Las colonias tienden a difundir menos en superficies de agares más secos. La apariencia de las colonias puede variar, no solo de cepa en cepa, sino también de un lote a otro del medio de cultivo selectivo utilizado.

Nota: Utilizar un segundo medio sólido selectivo que utilice principios selectivos diferentes de los del agar mCCD, mejora la detección de *Campylobacter* spp., especialmente en presencia de microbiota acompañante resistente a cefalosporinas de tercera generación como cefoperazona.

7.4. CONFIRMACIÓN

Si se dispone de MALDI-TOF, la identificación de *Campylobacter* spp. puede realizarse directamente a partir de las colonias crecidas con sospecha de tratarse de este género sin necesidad de otras pruebas adicionales. La espectrometría de masas (MALDI-TOF) permite la identificación directa de las diferentes especies del género *Campylobacter*. El empleo de técnicas alternativas de identificación requiere la validación previa por parte del laboratorio.

Si no se dispone de MALDI-TOF, seguir el procedimiento que se describe a continuación.

Campylobacter spp. pierde culturabilidad rápidamente en el aire. Para hacer una correcta distinción entre reacciones confirmatorias positivas y negativas, utilizar cepas control. Ejemplo: *Campylobacter jejuni* (control positivo) y *Escherichia coli* (control negativo).

Alternativamente, además de las pruebas de confirmación e identificación aquí mencionadas, pueden realizarse otros tests (PCR, métodos serológicos, etc.)

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Campylobacter</i> spp. en alimentos	PNT-MA-05	
		Edición N° 01	Página 6 de 9

Las colonias sospechosas de *Campylobacter* spp. se examinan al microscopio, para ver morfología y movilidad. Además, hay que subcultivarlas en agar sangre y luego confirmar por detección de actividad oxidasa y test de crecimiento aeróbico a 25°C. Opcionalmente, las especies de *Campylobacter* spp. se pueden identificar mediante pruebas bioquímicas y/o métodos moleculares.

7.4.1. Selección de colonias para confirmación

7.4.1.1 Seleccionar al menos una colonia típica o sospechosa de *Campylobacter* spp. para purificación y detección. Una colonia por muestra confirmada es suficiente. Si la primera colonia es negativa, seleccionar hasta cuatro colonias sospechosas más.

Nota: Si es necesario guardar las placas originales de aislamiento para ensayos de confirmación y/o identificación, hacerlo preferentemente en condiciones microaeróbicas y a 5°C.

7.4.1.2 Estriar cada una de las colonias aisladas en una placa de agar sangre Columbia para el crecimiento de colonias bien aisladas. Incubar las placas en atmósfera microaeróbica a 41,5°C durante 24-48 h. Utilizar cultivos de colonias frescas y bien aisladas para hacer el examen de morfología y movilidad, ausencia de crecimiento aeróbico a 25°C y presencia de actividad oxidasa.

Examen de morfología y movilidad:

Examinar un cultivo fresco, proveniente de una placa de agar sangre, para ver morfología y movilidad utilizando un microscopio. Retener aquellas colonias que sean bacilos curvos con movimiento espiralado "sacacorchos".

Estudio de crecimiento aeróbico a 25°C:

A partir de colonias aisladas en agar sangre, inocular la superficie de otro agar sangre. Incubar las placas en aerobiosis, a 25°C durante 44 h $\pm$ 4 h. Examinar las placas para ver ausencia de crecimiento de colonias.

Detección de actividad oxidasa:

Utilizando un asa, tomar parte de una colonia bien aislada en un agar sangre y estriar sobre un papel de filtro embebido con el reactivo de oxidasa. La aparición de un color malva, violeta o azul oscuro dentro de los 10 segundos indica que la reacción es positiva. En caso de utilizar un *kit* comercial para oxidasa, seguir las instrucciones del fabricante.

7.4.2. Interpretación

Campylobacter spp. da resultados como los que se muestran en la tabla 1.

Campylobacter spp. está presente, si al menos una colonia presenta las características.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Campylobacter</i> spp. en alimentos	PNT-MA-05	
		Edición N° 01	Página 7 de 9

Tabla 1. Características del género *Campylobacter*

Morfología	Pequeños bacilos curvos ^a
Movilidad	Movimiento espiralado “sacacorchos”
Crecimiento aeróbico a 25°C	-
Actividad Oxidasa	+
+ Positivo - Negativo ^a Cultivos viejos pierden rápidamente la forma y el movimiento característico y se convierten en formas cocoides con menos movilidad.	

8. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Campylobacter* (OPCIONAL)

Entre los microorganismos del género *Campylobacter* que crecen a 41,5°C, las especies que se encuentran más frecuentemente son *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*. Sin embargo, se han descrito otras especies. Las características que permiten diferenciarlas se detallan en la tabla 2.

8.1. DETECCIÓN DE ACTIVIDAD CATALASA

Partiendo de colonias aisladas en agar sangre, tomar una porción y colocarla en una gota de solución de peróxido de hidrógeno en un portaobjetos. El test es positivo si se observan burbujas dentro de los 30 segundos.

Confirmar los resultados utilizando controles positivos (*Campylobacter jejuni*) y negativos (*Enterococcus faecalis*).

8.2. DETECCIÓN DE HIDRÓLISIS DEL HIPURATO

- Seleccionar colonias aisladas en agar sangre. Utilizando un asa, tomar un inóculo cargado para preparar una suspensión en un tubo que contenga 0,4 ml de solución de hipurato de sodio, teniendo cuidado de no incorporar nada de agar a la suspensión.
- Agitar para mezclar bien. Incubar durante 2 h ± 5 min en baño de agua a 37°C o 4 h ± 5 min en estufa a 37°C.
- Cuidadosamente, agregar 0,2 ml de solución de ninhidrina a la parte de arriba de la solución de hipurato de sodio. No agitar. Incubar 5-10 min a 37°C. Interpretar los resultados.
- Un color violeta oscuro indica reacción positiva.
- Un color violeta pálido o la ausencia de aparición de color, indica una reacción negativa.
- Confirmar los resultados utilizando controles positivos (*Campylobacter jejuni*) y controles negativos (*Campylobacter coli*).

8.3. DETECCIÓN DE HIDRÓLISIS DEL INDOXIL-ACETATO

- Tomar con un asa una porción de colonia del agar sangre, colocarla sobre un disco de indoxil-acetato, agregar una gota de agua destilada estéril.
- Si el indoxil-acetato es hidrolizado, el color cambiará a un azul oscuro dentro de los 5-10 minutos. Si no

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Campylobacter</i> spp. en alimentos	PNT-MA-05	
		Edición N° 01	Página 8 de 9

hay cambio de color indica que no ha habido reacción.

- Confirmar los resultados utilizando controles positivos (*Campylobacter jejuni*) y controles negativos (*Campylobacter lari*).
- Si se utilizan discos de indoxil-acetato comerciales, seguir las instrucciones del fabricante.

8.4. INTERPRETACIÓN

Las especies del género *Campylobacter* con crecimiento a 41,5°C se pueden identificar de acuerdo con la tabla 2.

Tabla 2. Características de las diferentes especies de *Campylobacter*

Características	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Actividad catalasa	+	+	+	- o débil
Hidrólisis del hipurato	+ ^a	-	-	-
Hidrólisis del indoxil-acetato	+	+	-	+
+ Positivo - Negativo ^a Se han descrito algunas cepas de <i>C. jejuni</i> como hipurato-negativas.				

9. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Se informarán los resultados obtenidos para cada muestra, que luego serán validados por el facultativo responsable.

De acuerdo con la interpretación de los resultados, informar *Campylobacter* spp. DETECTADO o NO DETECTADO en la porción analizada, especificando la masa en gramos o el volumen en mililitros.

Investigación de *Campylobacter* spp. Detectado/No detectado en X g, X ml (ISO 10272-1/2017)

10. RESPONSABILIDADES

El procesamiento de las muestras y todas las actividades de laboratorio, así como sus correspondientes registros, se realiza por técnicos superiores o por técnicos de grado medio de laboratorio, debidamente cualificados.

La supervisión/validación la realiza el facultativo responsable y aplica a todas las actividades analíticas y no analíticas: revisión de procedimientos, controles de calidad y emisión e interpretación de resultados.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Campylobacter</i> spp. en alimentos	PNT-MA-05	
		Edición N° 01	Página 9 de 9

Los auxiliares técnicos que intervienen son responsables de llevar a cabo las actividades concernientes a la preparación de la muestra y la preparación de los materiales y medios de cultivo necesarios y de llevar los registros correspondientes.

11. IDENTIFICACIÓN DE FUENTES DE INCERTIDUMBRE

Origen	Fuentes de incertidumbre	Forma de control
Instrumental	Incertidumbre asociada a las pesadas	Calibración anual y Verificación diaria de las balanzas.
Temperatura	Incubadoras	Termómetros calibrados.
Medios de cultivo y reactivos	Calidad y homogeneidad de los medios de cultivo y reactivos	Método ecométrico. Utilización de cultivos de referencia.
Humanas	Experiencia y pericia del personal en la interpretación de los resultados	Pruebas intralaboratorio. Pruebas de proficiencia Internacionales.

12. MEDIDAS DE SEGURIDAD Y CONDICIONES AMBIENTALES

Dado que las muestras a manipular pueden contener patógenos de clase II, es importante observar durante el proceso y ensayo, la aplicación de prácticas de bioseguridad acordes con los niveles evaluados de riesgo.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Campylobacter* spp. - Part 1: Detection method ISO 10272-1/2017.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Escherichia coli</i> O157 en alimentos	PNT-MA-06	
		Edición N° 01	Página 1 de 8

PNT-MA-06

Investigación de *Escherichia coli* O157 en alimentos

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2022	Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Escherichia coli</i> O157 en alimentos	PNT-MA-6	
		Edición N° 01	Página 2 de 8

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo del presente documento es estandarizar la metodología para la investigación de *Escherichia coli* O157 y unificar criterios de aplicación para el procesamiento de muestras de alimentos.

2. FUNDAMENTO

Este documento basado en la norma documento basado en la norma ISO 16654/2001, especifica un método horizontal para la detección de *Escherichia coli* O157, en una cantidad de masa o volumen determinados.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Escherichia coli* O157 ISO 16654/2001.
- Doyle MP, Diez Gonzalez F, Hill C. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. 5th edition. American Society for Microbiology. 2019.
- Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foods-tuffs.

4. MUESTRAS

Consultar el PNT-MA-01a (Toma de muestras de alimentos, conservación y transporte) y PNT-MA-01b (Preparación de muestras para análisis microbiológico de alimentos) de este procedimiento SEIMC n° 78.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, SOLUCIONES Y MATERIALES DE REFERENCIA

5.1. MEDIOS DE CULTIVO

- Caldo triptona soja modificado + novobiocina (mTSB + N)
- Agar MacConkey-sorbitol con cefixima y telurito (CT-SMAC)
- Segundo medio selectivo de aislamiento. Utilizar un medio que sea complementario al CT-SMAC y de uso apropiado para la detección de *Escherichia coli* O157
- Agar nutritivo
- Medio triptona/triptófano

5.2. REACTIVOS Y SOLUCIONES

- Partículas inmunomagnéticas anti-*Escherichia coli* O157
- E-Buffer
- Reactivo de Kovac's para indol
- Solución salina
- Antisueros para *Escherichia coli* O157
- Kit de identificación de Enterobacterales (API 20E o similar).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Escherichia coli</i> O157 en alimentos	PNT-MA-06	
		Edición N° 01	Página 3 de 8

5.3. MATERIALES DE REFERENCIA

Utilizar cepas de referencia como controles positivos con los medios de pre-enriquecimiento. Proceder con los controles como con las muestras a analizar.

Las cepas de referencia que se recomiendan utilizar como controles positivos, son cepas de *E. coli* O157 que no contengan factores de virulencia atribuidos a patogenicidad.

6. APARATOS Y MATERIALES

- Pinzas estériles
- Tijeras y/o bisturíes estériles
- Balanza granataria sensibilidad $\pm 0,1$ g
- Pipetas Pasteur estériles
- Diseminadores "palos de hockey" estériles
- Portaobjetos
- Asas de siembra estériles
- Asas de inoculación estériles
- Vórtex
- Bolsas de Stomacher
- Tubos de vidrio (8 mm de diámetro y 160 mm de longitud)
- Pipetas graduadas estériles con capacidad nominal de 1 ml y 10 ml
- Placas de Petri de diámetro aproximado 90 mm
- Homogeneizador tipo Stomacher
- Equipo de esterilización húmeda (autoclave)
- Equipo de esterilización seca
- Cabina de secado u horno capaz de operar entre 25°C - 50°C
- Cabina de flujo laminar
- Incubadora capaz de operar a 37°C ± 1 °C
- Incubadora capaz de operar a 41,5°C ± 1 °C
- Peachímetro que tenga una exactitud de calibración de $\pm 0,1$ unidad de pH a 20°C - 25°C
- Cabina de seguridad biológica clase II
- Baño de agua termostático capaz de operar entre 44°C - 47°C
- Refrigerador capaz de operar a 5°C ± 3 °C
- Congelador capaz de operar a -20°C ± 5 °C
- Micropipeta de 20-200 μ l
- Tips con filtro capacidad 200 μ l
- Separador magnético con rack magnético
- Tubos eppendorf capacidad 1,5 ml
- Agitador por rotación con soporte para tubos eppendorf

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Escherichia coli</i> O157 en alimentos	PNT-MA-06	
		Edición N° 01	Página 4 de 8

7. PROCESAMIENTO

7.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

7.1.1. Muestra para analizar, pre-enriquecimiento e incubación

Nota: Desinfectar el paquete de la muestra antes de la apertura. Las muestras se procesarán en una cabina de flujo laminar. Es recomendable utilizar bolsas de Stomacher con filtro para reducir la interferencia de las partículas de alimentos con los *kits* de inmunocaptura.

Para preparar la suspensión inicial, transferir asépticamente la porción de muestra a analizar (X g o X ml) a una bolsa de Stomacher. Agregar (9X ml) del caldo mTSB + novobiocina (mTSB + N). Mezclar bien. El caldo debe estar atemperado a 41,5°C. La dilución obtenida será 1/10 (masa/volumen o volumen en volumen).

Incubar las muestras y los controles a 41,5°C durante 6 h. Subsecuentemente, continuar la incubación durante 12 a 18 h adicionales (tiempo total de incubación, 18-24 h).

La primera incubación de 6 h debe continuarse con una separación inmunomagnética seguida por el aislamiento en agares selectivos. En este estadio, se puede llegar a detectar un presunto positivo, que después de las 18 h de incubación se puede volver negativo.

7.2. SEPARACIÓN INMUNOMAGNÉTICA (IMS)

7.2.1. General

La separación inmunomagnética, debe realizarse tras 6 h de incubación, y en caso de ser necesario, a las 12 o 18 h de incubación.

Las instrucciones para realizar la IMS se detallan a continuación como guía general. Deberán seguirse las indicaciones del fabricante de las partículas inmunomagnéticas anti-*Escherichia coli* O157.

7.2.2. Inmunocaptura

Nota: utilizar técnicas asépticas para evitar contaminaciones externas y formación de aerosoles. Realizar este procedimiento dentro de una cabina de seguridad biológica clase II. Usar guantes.

- Utilizando el separador magnético y las partículas inmunomagnéticas recubiertas de anticuerpos, realizar el procedimiento de captura/separación.

- Mezclar el pre-enriquecimiento ya incubado. Agregar 20 µl de las partículas inmunomagnéticas a un tubo eppendorf. Tomar 1 ml del pre-enriquecimiento y transferirlo al tubo eppendorf que contiene las partículas. Mezclar la suspensión en el agitador por rotación con soporte para tubos eppendorf, durante 10 minutos.

7.2.3. Separación

Colocar cada tubo eppendorf en el *rack* (soporte) magnético y permitir, gracias a un movimiento de inver-

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Escherichia coli</i> O157 en alimentos	PNT-MA-06	
		Edición N° 01	Página 5 de 8

sión del rack de 180°, que las partículas magnéticas se amontonen en el tubo del lado del magneto. Abrir la tapa y con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril, eliminar el líquido, teniendo cuidado de no tocar las perlas adheridas a la pared. Repetir este paso para cada uno de los tubos con una pipeta nueva. Agregar 1 ml del buffer de lavado y tapar el tubo. Quitar el magneto del rack. Mezclar nuevamente el contenido de los tubos con el movimiento de inversión de 180°. Después, colocar nuevamente el magneto en el rack y dejar que las partículas se adhieran a la pared.

Continuar con la eliminación del líquido con pipeta Pasteur. Repetir estos lavados varias veces. A continuación del último lavado y de la extracción del líquido, quitar los tubos del separador magnético y agregar 100 µl del buffer de lavado. Re-suspender las partículas magnéticas.

Nota: tener cuidado en el momento de agregar el buffer de lavado. Evitar las contaminaciones cruzadas. Este procedimiento puede ser difícil de aplicar a productos grasos o quesos frescos.

7.3 AISLAMIENTO EN AGARES SELECTIVOS E IDENTIFICACIÓN DE COLONIAS DE *E. coli* O157

7.3.1. Siembra en placa

Utilizando una micropipeta, transferir 50 µl de las partículas magnéticas re-suspendidas a una placa, previamente secada, de agar MacConkey sorbitol con cefixima y telurito, y otros 50 µl al segundo agar selectivo elegido. Estriar las partículas utilizando un diseminador “palo de hockey”, para poder obtener colonias bien aisladas sobre el agar.

Incubar el CT-SMAC a 37°C durante 18-24 h, y el segundo agar selectivo según las indicaciones del fabricante.

Dependiendo del tipo de muestra a analizar y de su microbiota acompañante, al finalizar la incubación del pre-enriquecimiento será más o menos difícil la tarea de encontrar colonias de *E. coli* O157 aisladas. En caso de saber que no se logrará el aislamiento debido a lo anteriormente mencionado, se podrán realizar diluciones de la preparación de la IMS o sembrar volúmenes menores de 50 µl por placa.

7.3.2. Reconocimiento de colonias típicas de *E. coli* O157

En el agar CT-SMAC, las colonias típicas son transparentes y casi sin color, con una apariencia amarillada-amarillenta y un diámetro aproximado de 1 mm.

Examinar el segundo agar selectivo para el aislamiento de colonias de *E. coli* O157 siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.4. CONFIRMACIÓN

7.4.1. Selección de colonias para la confirmación

Si se dispone de MALDI-TOF se realizará la identificación de *E. coli* a partir de al menos cinco colonias sospechosas mediante este sistema y posteriormente se procederá con la confirmación serológica. Ocasionalmente, la identificación de colonias a partir de medios selectivos y de colonias coloreadas puede

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Escherichia coli</i> O157 en alimentos	PNT-MA-06	
		Edición N° 01	Página 6 de 8

dar fallos en la identificación mediante MALDI-TOF (ausencia de picos), en este caso se subcultivarán las colonias sospechosas en agar nutritivo y se realizará la identificación en las colonias crecidas en este medio. La confirmación serológica se realizará a partir de colonias crecidas en medio nutritivo.

En caso de no disponer de MALDI-TOF se procederá como se indica a continuación.

Tomar cinco colonias típicas de cada placa. Si un agar selectivo contiene menos de cinco colonias, entonces se examinarán todas.

Realizar un subcultivo de cada una de las colonias en un agar nutritivo para obtener el crecimiento de colonias bien aisladas. Incubar las placas a 37°C durante 18-24 h.

Para realizar los tests confirmatorios, utilizar solamente cultivos puros en el agar nutritivo.

7.4.2. Confirmación bioquímica: formación de indol

Inocular una colonia pura, proveniente del agar nutritivo, en un tubo que contenga medio triptona/triptófano. Incubar a 37°C durante 24 h.

Agregar 1 ml del reactivo de Kovac's y dejar a temperatura ambiente durante 10 minutos.

La formación de un color rojo indica reacción positiva. Un color amarillo/amarronado indica reacción negativa.

Nota: para la identificación bioquímica se puede utilizar un *kit* de identificación de enterobacterias comercial, que debe ser utilizado según las instrucciones del fabricante (ejemplo: Api 20E).

7.4.3. Confirmación serológica

Solamente se deberán examinar con el antisuero para *E. coli* O157, aquellas colonias que hayan dado positiva la reacción del indol.

Eliminación de cepas auto-aglutinantes:

En un portaobjetos colocar una gota de solución salina. Utilizando un asa tomar parte de una colonia, proveniente del agar nutritivo, y dispersarla en la solución hasta obtener una suspensión turbia y homogénea. Mover el portaobjetos suavemente durante 30 a 60 segundos. Observar la suspensión, preferentemente contra un fondo oscuro.

Si en la suspensión se ve la aparición de grumos, esto indica que la bacteria auto-aglutina y la confirmación serológica no se podrá realizar.

Reacción con el antisuero *E. coli* O157:

Utilizando una colonia pura del agar nutritivo, tomar con un asa parte de la misma, suspenderla en una gota de solución salina y agregar una pequeña gota del antisuero para *E. coli* O157.

Si hay aglutinación dentro del minuto, entonces se considera que la reacción es positiva.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Escherichia coli</i> O157 en alimentos	PNT-MA-06	
		Edición N° 01	Página 7 de 8

7.4.4. Identificación positiva

Considerar como positivos aquellos aislamientos que hayan dado indol positivo y reaccionado con el anti-suero para O157 u O157 más H7 si está disponible.

7.5. CARACTERIZACIÓN MÁS EXHAUSTIVA

Para una caracterización más exhaustiva como por ejemplo detección de antígenos flagelares o características patogénicas, los cultivos deberán enviarse a un laboratorio de referencia.

8. INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- Se informarán los resultados obtenidos para cada muestra, que luego serán validados por el facultativo responsable.

- De acuerdo con la interpretación de los resultados, informar la SE DETECTA o NO SE DETECTA de *Escherichia coli* O157 en la porción analizada, especificando la masa en gramos o el volumen en mililitros.

Investigación de *Escherichia coli* O157 Se detecta/No se detecta en X g, X ml (ISO 16654/2001)

9. RESPONSABILIDADES

El procesamiento de las muestras y todas las actividades de laboratorio, así como sus correspondientes registros, se realiza por técnicos superiores o por técnicos de grado medio de laboratorio, debidamente cualificados. La supervisión/validación la realiza el facultativo responsable y aplica a todas las actividades analíticas y no analíticas: revisión de procedimientos, controles de calidad y emisión e interpretación de resultados.

Los auxiliares técnicos que intervienen son responsables de llevar a cabo las actividades concernientes a la preparación de la muestra y la preparación de los materiales y medios de cultivo necesarios y de llevar los registros correspondientes.

10. IDENTIFICACIÓN DE FUENTES DE INCERTIDUMBRE

Origen	Fuentes de incertidumbre	Forma de control
Instrumental	Incertidumbre asociada a las pesadas	Calibración anual y Verificación diaria de las balanzas.
Temperatura	Incubadoras	Termómetros calibrados.
Medios de cultivo y reactivos	Calidad y homogeneidad de los medios de cultivo y reactivos	Método ecométrico. Utilización de cultivos de referencia.
Humanas	Experiencia y pericia del personal en la interpretación de los resultados	Pruebas intralaboratorio. Pruebas de proficiencia Internacionales.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Escherichia coli</i> O157 en alimentos	PNT-MA-06	
		Edición N° 01	Página 8 de 8

11. MEDIDAS DE SEGURIDAD Y CONDICIONES AMBIENTALES

Dado que las muestras a manipular pueden contener patógenos de clase II, es importante observar durante el proceso y ensayo, la aplicación de prácticas de bioseguridad acordes con los niveles evaluados de riesgo.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Microbiology of the food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157 ISO 16654/2001.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de toxinas estafilocócicas en alimentos	PNT-MA-07	
		Edición N° 01	Página 1 de 8

PNT-MA-07

Detección de toxinas estafilocócicas en alimentos

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2022	Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de toxinas estafilocócicas en alimentos	PNT-MA-7	
		Edición N° 01	Página 2 de 8

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo del presente documento es establecer las condiciones para la detección de toxinas estafilocócicas en productos alimenticios por una técnica de enzimo-inmunoanálisis.

2. FUNDAMENTO

Se describe un método analítico basado en la norma ISO 19020. "Método horizontal para la detección inmunoenzimática de enterotoxina estafilocócica en los productos alimenticios"

Se trata de un método de cribado para la detección de las enterotoxinas SEA a SEE. Consiste en dos etapas principales:

- Extracción seguida de una etapa de concentración por diálisis
- Detección inmunoenzimática mediante el empleo del kit comercial VIDAS SET 2.

El VIDAS SET2 está basado en el método ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*, ensayo de fluorescencia ligado a enzima). Es un *kit* de detección rápida automatizado que detecta, sin diferenciar, las enterotoxinas estafilocócicas A a E, usando un cono que sirve a la vez de fase sólida y de sistema de pipeteo para esta prueba. El interior del cono está recubierto con anticuerpos anti-enterotoxinas. Los reactivos para el ensayo se proporcionan listos para el empleo y predosificados en los cartuchos sellados.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- ISO 7218. Microbiología de alimentos y productos para la alimentación animal. Requisitos generales y directrices para los análisis microbiológicos.
- ISO/TS 17728. Microbiología de la cadena alimentaria. Técnicas de muestreo para el análisis microbiológico de muestras de alimentos y productos para la alimentación animal.
- EN ISO 19020. Método horizontal para la detección inmunoenzimática de enterotoxina estafilocócica en los productos alimenticios.
- ISO 3696. Agua para uso en análisis de laboratorio. Especificación y métodos de ensayo.
- ISO 11133. Microbiología de alimentos, productos para la alimentación animal y agua. Preparación, producción almacenamiento y rendimiento de medios de cultivo.

4. MUESTRAS

Consultar el PNT-MA-01a (Toma de muestras de alimentos, conservación y transporte) y PNT-MA-01b (Preparación de muestras para análisis microbiológico de alimentos) de este procedimiento SEIMC n° 78.

La cantidad de muestra necesaria para llevar a cabo el ensayo deberá ser como mínimo de 100 g, suficiente para poder realizar el ensayo, posibles repeticiones y controles de calidad internos, en su caso. Como porción para análisis se utilizan 25 g o 25 ml de la muestra homogeneizada.

En el caso de un brote de origen alimentario causado por estafilococos el tamaño de la muestra puede ser inferior a 25 g. Los análisis se realizarán, según se describe a continuación, de manera proporcional al peso de muestra para análisis. El laboratorio de referencia de la UE para estafilococos coagulasa positivos recomienda a los laboratorios nacionales de referencia que sea al menos de 10 g. La proporción entre el peso de la porción para análisis y el extracto concentrado, debería ser aproximadamente de cinco veces.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de toxinas estafilocócicas en alimentos	PNT-MA-07	
		Edición N° 01	Página 3 de 8

Por ejemplo, para porciones de análisis de 25 g, extractos concentrados de 5,0 g a 5,5 g (máximo 5,8 g en los extractos pegajosos). Para muestras de 12,5 g el peso del extracto concentrado debe estar entre 2,5 g y 2,8 g (máximo 2,9 g para los extractos pegajosos).

Las muestras se conservan en refrigeración ($3 \pm 2^{\circ}\text{C}$) hasta el momento de su análisis y siempre dentro de la fecha de caducidad/consumo preferente del alimento. Si por causas extraordinarias (falta de reactivos, etc.) no se pudiera realizar el análisis de la muestra, ésta se conservará congelada. En este caso, las muestras se descongelan completamente a una temperatura de $3 \pm 2^{\circ}\text{C}$ antes de comenzar los análisis. Para evitar pérdidas de toxinas se recomienda no congelar y descongelar repetidamente las muestras antes de comenzar los análisis.

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Agua destilada o desmineralizada.
- Ácido clorhídrico 1N o 5N.
- Hidróxido sódico 1N o 5N.
- Polietilenglicol 20 000 (PEG) al 30% (30 g de PEG en 70 ml agua destilada).
- Solución salina tampón fosfato (solución PBS) ($\text{NaCl}/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 145 mM/10 mM), pH 7,3 $\pm$ 0,2.
- Etanol al 70% (disolución para el lavado de los electrodos).
- VIDAS SET2 *kit*, *kit* comercial. Conservar entre $3 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Contiene:
 - 30 Cartucho SET2. Cada cartucho está formado por 10 pocillos recubiertos de una hoja de aluminio sellada y etiquetada. La etiqueta incluye un código de barras donde se indica principalmente el código de la prueba, el número de lote y la fecha de caducidad del producto. El primer pocillo tiene una parte precortada para facilitar la introducción de la muestra. El último pocillo (pocillo óptico) es una cubeta que permite la lectura por fluorescencia. Los diferentes reactivos para los análisis están contenidos en los pocillos intermedios.
 - 30 Conos SET2, su interior está recubierto con anticuerpos anti-enterotoxinas de estafilococos.
 - Estándar (S1) SET2 (1 vial con 6 ml), contiene enterotoxina A purificada ($< 1,0$ ng/ml) + conservante + estabilizante proteico.
 - Control positivo (C1) SET2 (1 vial con 6 ml), contiene enterotoxina A purificada ($< 1,0$ ng/ml) + conservante + estabilizante proteico.
 - Control negativo (C2) SET2 (1 vial con 6 ml), contiene TRIS-buffer salino (TSB) (150 mmol/l)- Tween pH 7,6 + conservante.
 - Tampón de extracción concentrado SET2 (R1) (1 frasco con 55 ml), contiene TRIS 2,5 mol/l- Tween 10 g/l-MIT 10g/l pH8,0.
 - Especificaciones de fábrica con los datos de referencia necesarios para calibrar el test: código de barras MLE impreso en la etiqueta de la caja.

6. APARATOS Y MATERIALES

- Batidora de laboratorio/ Mezclador de muestras.
- Balanza analítica.
- Bolsas Stomacher tamaño pequeño, sin filtro.
- Sistema de homogeneización, giratorio o peristáltico. Si es peristáltico (Stomacher) emplear bolsas sin filtro.
- Agitador a temperatura ambiente; por ejemplo, agitador orbital o agitador magnético.
- pH-metro y electrodo.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de toxinas estafilocócicas en alimentos	PNT-MA-07	
		Edición N° 01	Página 4 de 8

- Centrífuga capaz de alcanzar como mínimo 3130g, si es posible con refrigeración.
- Membranas de diálisis con un punto de corte de peso molecular (MWCO; *molecular weight cut off*) de 6000-8000 daltons.
- Cierres para las membranas de diálisis.
- Pipetas estériles de 10 y 1 mililitros.
- Material de filtración: embudos, lana de vidrio o lana de algodón.
- Bandeja poco profunda.
- Frasco lavador.
- Guantes, mascarillas y gafas de laboratorio.
- Frigorífico a $3 \pm 2^{\circ}\text{C}$ o $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ y congelador ($< -18^{\circ}\text{C}$)
- Micropipetas.
- Equipo VIDAS: es un inmunoanalizador compacto, automatizado y multiparamétrico empleado en determinaciones microbiológicas basado en la tecnología ELFA (ensayo de fluorescencia ligado a enzima). El analizador VIDAS realiza automáticamente las diferentes etapas del análisis, incluyendo la impresión de informes. Incluye:
 - Analizador VIDAS
 - Ordenador VIDAS (con el software del VIDAS PC).
 - Impresora.
 - Estufa/baño de agua regulado a $38 \pm 2^{\circ}\text{C}$

Materiales de referencia

Enterotoxinas estafilocócicas liofilizadas (SEA a SEE).

7. PROCESAMIENTO

7.1. PREPARACIÓN DE LA PORCIÓN PARA ANÁLISIS

Como las enterotoxinas estafilocócicas pueden estar heterogéneamente distribuidas en la muestra, mezclar la totalidad de la muestra, si es posible, o una parte representativa, con un mezclador.

7.2. EXTRACCIÓN

- En el caso de productos líquidos, tomar 25 ml de la muestra homogeneizada y 25 g para los productos sólidos. A estos últimos añadir aproximadamente 40 ml de agua destilada o desmineralizada a $38 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Homogeneizar la mezcla usando una batidora u homogeneizador giratorio. Esta fase es especialmente importante en los productos con alto contenido en materia grasa. Aclarar el sistema con agua destilada o desmineralizada (con la mínima cantidad de agua posible).

Nota: cuanto mayor sea el volumen de líquido utilizado, mayor será la longitud de membrana de diálisis necesaria.

A los productos líquidos no se añaden los 40 ml de agua.

En caso de muestras vinculadas a un brote por estafilococos, si la porción de análisis es inferior a 25 g se reduce la cantidad de agua en igual proporción.

- Agitar la muestra en la placa agitadora, a temperatura ambiente ($18-27^{\circ}\text{C}$), durante 30 a 60 minutos, para permitir que la toxina difunda.
- Medir el pH de las muestras y anotar el resultado.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de toxinas estafilocócicas en alimentos	PNT-MA-07	
		Edición N° 01	Página 5 de 8

- Acidificar la muestra, si fuera necesario, con unas gotas de HCl (5N o 1N), para obtener un pH entre 3,5 y 4,0, registrándose como pH tras la acidificación.
- Si el pH es <3,0 coger otros 25 g de muestra y comenzar desde el principio.
- Centrifugar la muestra al menos a 3130 g durante mínimo 15 min a temperatura ambiente (18-27°C).

En muestras con alto contenido graso se realizará la centrifugación en condiciones de refrigeración (aproximadamente 4°C) para eliminar las partículas de grasa antes de la diálisis.

- Recoger el sobrenadante y medir el pH del mismo tras la primera centrifugación, registrándolo como pH tras la primera centrifugación. Este pH debe estar comprendido entre 3,0 y 4,5. Si este no es el caso, acidificar mediante la adición de HCl (1N o 5N), hasta obtener un pH entre 3,5 y 4,0 y centrifugar de nuevo como se ha descrito. Medir el pH en el sobrenadante para comprobar que se encuentra entre 3,5 y 4.
- Si el sobrenadante no está suficientemente claro, centrifugar de nuevo según se ha descrito.
- Si el pH <3, la estructura tridimensional de las enterotoxinas estafilocócicas (SEs) podría haberse dañado; en ese caso coger otros 25 g de muestra y comenzar desde el principio.
- Neutralizar el sobrenadante obtenido usando hidróxido sódico (5N o 1N) para obtener un pH entre 7,4 y 7,6. El pH medido se registra como pH tras neutralización. Si el pH es > 9,0, la estructura tridimensional de la SEs podría haberse dañado. En ese caso, coger otros 25 g de muestra y proceder desde el principio. Centrifugar otra vez como se ha descrito.
- Se recoge toda la fase acuosa neutralizada para la etapa de concentración.
- En el caso de muestras con un alto contenido en materia grasa, una vez finalizado los análisis el electrodo se puede limpiar utilizando etanol al 70%, para disolver las partículas de grasa.
- Existe un procedimiento alternativo de extracción que solo puede utilizarse en ocasiones limitadas, como ante la sospecha de una intoxicación y nunca se puede utilizar para leche y productos lácteos. Se diferencia del protocolo descrito en que se omite la fase de concentración por diálisis:
 - Se recoge el volumen necesario de la fase acuosa neutralizada y se procede directamente con la etapa de detección. La fase acuosa neutralizada restante se conserva a una temperatura de $3\pm 2^{\circ}\text{C}$ o de $5\pm 3^{\circ}\text{C}$.
 - Si se obtienen resultados negativos para las SEs, se realiza a lo largo del mismo día la etapa de concentración del resto de la fase acuosa neutralizada y se repite la detección utilizando el extracto concentrado.

7.3 DIÁLISIS. CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO

- Preparar la disolución de PEG
- Cortar un fragmento de membrana de diálisis, (suficiente longitud como para contener el extracto completo).
- Sumergir la membrana de diálisis en agua a temperatura ambiente durante al menos 30 min.
- Enjuagar la membrana con agua (interior y exterior).
- Cerrar un extremo de la membrana con un cierre, llenarla con la fase acuosa neutralizada utilizando un embudo, y una pequeña cantidad de lana de vidrio o de lana de algodón para eliminar las partículas en suspensión.
- Cerrar el otro extremo de la membrana con un segundo cierre.
- Colocar la membrana de diálisis en una bandeja poco profunda cubierta con solución de PEG.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de toxinas estafilocócicas en alimentos	PNT-MA-07	
		Edición N° 01	Página 6 de 8

- Permitir que los extractos se concentren durante toda la noche a $3 \pm 2^{\circ}\text{C}$ o $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Si el extracto no queda suficientemente concentrado, (es decir, quedan más de 5 ml en la membrana de diálisis), se dejan en la disolución de PEG durante más tiempo, hasta 3 días, o se añade más PEG en polvo sobre la membrana

7.4. RECUPERACIÓN DEL EXTRACTO CONCENTRADO

- Sacar la membrana de diálisis de la solución de PEG y lavar la parte de fuera de la misma con agua para quitar todas las trazas que puedan quedar de PEG.

- Se abre uno de los extremos de la membrana y se recupera el extracto concentrado enjuagando con solución de PBS, en el caso de que el extracto contenga leche o productos lácteos, o agua, para el resto de las matrices.

- Lavar la parte interna de la membrana de diálisis para obtener un peso final de extracto concentrado de 5,0 - 5,5 g (máximo 5,8 g para extractos pegajosos) por cada 25 g de porción para análisis.

El extracto final se introduce en un tubo de vidrio o polipropileno pesando su contenido, y en su caso, repitiendo la operación de lavado hasta alcanzar el peso deseado.

Durante esta etapa crítica se recomienda:

- Frotar la parte interna de la membrana de diálisis (un lado contra el otro) con los dedos para despegar y recuperar el máximo de enterotoxinas.

- Ir añadiendo pequeñas alícuotas de PBS o agua de forma repetida y lavar varias veces el interior de la membrana para recuperar todas las enterotoxinas.

7.5. CONSERVACIÓN DEL EXTRACTO

Si el extracto concentrado se va a analizar en un plazo de 48 h se conserva a $3 \pm 2^{\circ}\text{C}$ o $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Si es un plazo mayor se conserva a $\leq -18^{\circ}\text{C}$, (salvo indicación en contra del fabricante del *kit* de detección utilizado). Una vez descongelado se agita con vortex antes de la etapa de detección.

7.6. DETECCIÓN. PROTOCOLO DEL KIT VIDAS SET2

A partir del extracto se detectan las enterotoxinas mediante el Kit VIDAS SET2. Según las indicaciones del fabricante la determinación debe ser realizada inmediatamente después de la extracción.

Si se forma espuma se comprueba que el pipeteo se realiza de la fase líquida.

Este *kit* de detección cumple los criterios de funcionamiento (sensibilidad, especificidad y LOD50) correspondientes a todo el procedimiento, definidos en la norma ISO 19020.

Según establece la norma, los criterios exigidos son:

- Sensibilidad y especificidad $>90\%$

- LOD50 $<0,06$ ng SEs/g. Este valor se basa en el BMD (dosis de riesgo) estimado para SEA (enterotoxina estafilocócica A) de 6,1 ng y asumiendo una ingestión de 100 g de alimento.

Se han de seguir rigurosamente las indicaciones del fabricante del *kit* durante la fase de detección. Una vez finalizado el proceso se obtienen los resultados de valor de test (VT) y valor de fluorescencia relativa (RFV) para cada muestra y los controles así como la interpretación de los resultados.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de toxinas estafilocócicas en alimentos	PNT-MA-07	
		Edición N° 01	Página 7 de 8

Umbral e interpretación de resultados:

Valor del test, interpretación:

< 0,13 Negativo

≥ 0,13 Positivo

Un resultado con un valor del test inferior al valor umbral indica una muestra en la cual no se detectan enterotoxinas estafilocócicas SEA-SEE o con una concentración de enterotoxinas inferior al límite de detección. Un resultado con un valor del test superior o igual al valor umbral indica una muestra en la cual se detectan enterotoxinas estafilocócicas SEA a SEE.

Posibles interferencias:

La detección inmunológica de enterotoxinas estafilocócicas puede plantear diversos problemas. Se han publicado reacciones inespecíficas para algunos *kits* comerciales disponibles, en función de la matriz alimentaria o de alimentos contaminados por microorganismos distintos a *Staphylococcus* spp. Así mismo, pueden presentarse interferencias atribuidas a enzimas endógenas como la fosfatasa alcalina o la lactoperoxidasa presentes en la leche cruda. Estas interferencias son debidas a que el alimento presenta actividad fosfatasa alcalina o lactoperoxidasa que pueden utilizar los sustratos de algunos *kits* y provocar señal del cromógeno. El VIDAS SET2 puede presentar una interferencia debida a alimentos que presenten actividad fosfatasa alcalina ya que es la enzima presente en el conjugado responsable de la hidrólisis del sustrato.

La fosfatasa alcalina está normalmente presente en la leche cruda y productos lácteos elaborados con leche cruda. En el caso de resultados positivos por el método VIDAS SET2 y se sospeche la presencia de fosfatasa alcalina se actuará de la manera siguiente:

- 1.- Introducir en un tubo 600 µl del extracto concentrado.
 - 2.- Llevar a cabo un tratamiento por calor a 80°C durante 2 minutos (para destruir la fosfatasa alcalina). Para ello una vez atemperado el baño a 80°C se introducirán dos tubos tipo Falcon, uno con 600 µl de extracto y otro con 600 µl de agua con un termómetro calibrado en su interior. Cuando la temperatura en el termómetro alcance 80°C se comienza a contar el tiempo (2 minutos).
 - 3.- Tras enfriar, volver a realizar la detección mediante VIDAS SET2.
- Como este tratamiento por calor puede hacer perder la actividad serológica de las enterotoxinas presentes en el extracto concentrado, esto no se lleva a cabo antes del paso de detección para no obtener resultados falsos negativos.

Ante situaciones de este tipo, (muestras con actividad fosfatasa alcalina) con resultados negativos tras el tratamiento térmico o, en general, muestras con resultados dudosos se recomienda llevar a cabo pruebas de confirmación enviando el resto de muestra al Laboratorio Nacional de Referencia.

8. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- Se expresará:
 - Se detecta en X g o ml de la porción para análisis.
 - No se detecta en X g o ml de la porción para análisis.
- (Ver Anexo I)

9. RESPONSABILIDADES

El procesamiento de las muestras y todas las actividades de laboratorio, así como sus correspondientes registros, se realiza por técnicos superiores o por técnicos de grado medio de laboratorio, debidamente cualificados.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Detección de toxinas estafilocócicas en alimentos	PNT-MA-07	
		Edición N° 01	Página 8 de 8

La supervisión/validación la realiza el facultativo responsable y aplica a todas las actividades analíticas y no analíticas: revisión de procedimientos, controles de calidad y emisión e interpretación de resultados.

Los auxiliares técnicos que intervienen son responsables de llevar a cabo las actividades concernientes a la preparación de la muestra y la preparación de los materiales y medios de cultivo necesarios y de llevar los registros correspondientes.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Controles de calidad

- Control de equipos:

Los equipos empleados en las actividades analíticas deben someterse a actividades periódicas de mantenimiento y de calibración o verificación de acuerdo a un plan establecido (ISO 7218).

- Controles de calidad del método

Control de calidad interno:

- Controles de sensibilidad y de precisión mediante el empleo de muestras contaminadas artificialmente a un nivel próximo al límite de detección.
- Duplicados de ensayo (control de precisión en muestras de rutina).
- Ensayo blanco con cada serie analítica.

Control de calidad externo:

A través de la participación del laboratorio en ejercicios de intercomparación. Son pruebas de laboratorio realizadas sobre muestras preparadas por empresas especializadas acreditadas en las que se comparan los resultados analíticos obtenidos con los de otros laboratorios del mismo campo de actividad.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. UNE-EN ISO/ IEC 17025: Requisitos generales relativos a la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.

ANEXO I

Límites microbiológicos. Criterios de seguridad alimentaria.

Reglamento CE 2073 Relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimentarios

Categoría de alimentos	Microorganismos, sus toxinas y metabolitos	Plan de muestreo ⁽¹⁾		Límites ⁽²⁾		Método analítico de referencia ⁽³⁾	Fase en la que se aplica el criterio
		n	c	m	M		
1.21. Quesos, leche en polvo y suero en polvo, tal como se contempla en los criterios para los estafilococos coagulasa positivos en el capítulo 2.2 del presente anexo	Enterotoxinas estafilocócicas	5	0	No detectado en 25 g		► M9 EN ISO 19020 ◀	Productos comercializados durante su vida útil

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recuento de <i>Clostridium perfringens</i> en alimentos	PNT-MA-08	
		Edición N° 01	Página 1 de 8

PNT-MA-08

Recuento de *Clostridium perfringens* en alimentos

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2022	Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recuento de <i>Clostridium perfringens</i> en alimentos	PNT-MA-08	
		Edición N° 01	Página 2 de 8

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El presente procedimiento establece las condiciones para el recuento de *Clostridium perfringens* en alimentos para consumo humano, productos para la alimentación animal y muestras ambientales en áreas de producción y manipulación de alimentos, por la técnica de recuento en placa.

2. FUNDAMENTO

Se describe un método analítico basado en la norma ISO 7937. “Microbiología de alimentos y productos para la alimentación animal. Método horizontal para el recuento de *Clostridium perfringens*. Técnica de recuento de colonias”.

Se basa en la determinación del número de colonias de *Clostridium perfringens* en una cantidad determinada de la muestra problema, si el producto es líquido, o en la suspensión inicial en el caso de otros productos. Se realiza por la técnica de siembra en profundidad empleando un agar selectivo/diferencial. Tras la incubación, se confirman las colonias características y se calcula el número de *Clostridium perfringens* por gramo o mililitro de la muestra.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- UNE-EN ISO/ IEC 17025. Requisitos generales relativos a la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.
- ISO 7218. Microbiología de alimentos y productos para la alimentación animal. Requisitos generales y directrices para los análisis microbiológicos.
- ISO/TS 17728. Microbiología de la cadena alimentaria. Técnicas de muestreo para el análisis microbiológico de muestras de alimentos y productos para la alimentación animal.
- ISO 7937. Microbiología de alimentos y productos para la alimentación animal. Método horizontal para el recuento de *Clostridium perfringens*. Técnica de recuento de colonias.
- ISO 6887-1. Microbiología de la cadena alimentaria. Preparación de muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para análisis microbiológicos. Parte 1: Normas generales para la preparación de la suspensión inicial y las diluciones decimales.
- ISO 6887-2. Microbiología de la cadena alimentaria. Normas específicas para la preparación de carne y productos cárnicos.
- ISO 6887-3. Microbiología de la cadena alimentaria. Normas específicas para la preparación de pescado y productos de la pesca.
- ISO 6887-4. Microbiología de la cadena alimentaria. Normas específicas para la preparación de productos diversos.
- ISO 6887-5. Microbiología de la cadena alimentaria. Normas específicas para la preparación de leche y productos lácteos.
- ISO 11133. Microbiología de alimentos, productos para la alimentación animal y agua. Preparación, producción almacenamiento y rendimiento de medios de cultivo.
- ISO 14461-2. Leche y productos lácteos. Control de calidad en laboratorios microbiológicos. Parte 2. Determinación de la fiabilidad de los recuentos de colonias de placas paralelas y diluciones posteriores.
- ISO 19036. Microbiología de alimentos y productos para la alimentación animal. Directrices para la estimación de incertidumbre en determinaciones cuantitativas.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recuento de <i>Clostridium perfringens</i> en alimentos	PNT-MA-08	
		Edición N° 01	Página 3 de 8

4. MUESTRAS

Consultar el PNT-MA-01a (Toma de muestras de alimentos, conservación y transporte) y PNT-MA-01b (Preparación de muestras para análisis microbiológico de alimentos) de este procedimiento SEIMC n° 78.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

Mantener en refrigeración todos los medios de cultivo y reactivos, atemperando antes de su uso.

- Agar TSC (triptosa-sulfito-cicloserina).
- Caldo tioglicolato
- Medio lactosa-sulfito con campana Durham
- Agua de peptona tamponada (APT)
- Tubos con agua de peptona tamponada (9 ml).
- Sobres generadores de una atmosfera adecuada que favorezca el desarrollo y cultivo de microorganismos anaerobios.
- Indicador de anaerobiosis.

6. APARATOS Y MATERIALES

- Balanza o dosificador gravimétrico.
- Triturador/ Homogeneizador de muestras.
- Mechero Bunsen
- Espátulas o cucharas estériles.
- Bolsas para Stomacher estériles con/sin filtro.
- Tubos de ensayo preferentemente de 16 mm diámetro y 160 mm largo.
- Campanas Durham, de tamaño 35 mm de largo por 7 mm de diámetro.
- Pipetas estériles de 1 ml, graduadas en 0,1 ml.
- Placas de Petri, de un diámetro de 90 mm
- Estufa regulable a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Estufa regulable a $46^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.
- Estufa de esterilización (criterio $170 \pm 10^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora).
- Autoclave regulado a $121 \pm 3^{\circ}\text{C}$ y 1 atmósfera de presión.
- Jarras para anaerobiosis o cualquier aparato para cultivo de anaerobios.
- pH-metro, capaz de realizar lecturas con resolución de $\pm 0,1$ unidades de pH a 25°C y proporcionar una exactitud de 0,1 unidades de pH.
- Baño termostático regulado a $44^{\circ}\text{C} - 47^{\circ}\text{C}$.
- Asas de cultivo.

Cepas para el control de calidad:

- *Clostridium perfringens*
- *Escherichia coli*
- *Clostridium sporogenes*

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recuento de <i>Clostridium perfringens</i> en alimentos	PNT-MA-08	
		Edición N° 01	Página 4 de 8

7. PROCESAMIENTO

Precauciones de seguridad e higiene: *Clostridium perfringens* está catalogado dentro del grupo 2 del RD 664/1997. Es necesario realizar el procesamiento en cabina de flujo laminar o en la zona de protección de un mechero Bunsen.

7.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Consultar el PNT-MA-01b (Preparación de muestras para análisis microbiológico de alimentos) de este procedimiento SEIMC n° 78.

7.2. SIEMBRA, INCUBACIÓN Y SELECCIÓN DE PLACAS

Transferir, por medio de una pipeta estéril, 1 ml de la muestra si es líquida, o 1 ml de la suspensión inicial para el resto de productos, a una placa Petri estéril de 90 mm. Se inoculara una placa por dilución para un mínimo de dos diluciones. De acuerdo con la norma ISO 7218, si solo se inoculara una dilución se ha de realizar un duplicado.

Añadir a cada placa aproximadamente 10 -15 ml del medio triptosa-sulfito-cicloserina, atemperado en baño de agua a 44 - 47°C. Mezclar cuidadosamente el inóculo con el medio de cultivo y dejar solidificar.

Una vez solidificado, añadir aproximadamente 10 ml del mismo medio de cultivo, igualmente atemperado a 44 - 47°C y dejar solidificar.

Incubar las placas en posición invertida en condiciones anaeróbicas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 20 ± 2 h; una incubación más larga puede tener como consecuencia un exceso de ennegrecimiento de las placas. Incluir una tira indicadora de anaerobiosis.

7.3 PRUEBAS DE CONFIRMACIÓN

Escoger las placas que tengan un máximo de 150 colonias características (colonias negras por reducción del sulfito del medio a sulfuro en presencia de una sal de hierro). Si es posible seleccionar placas representativas de diluciones sucesivas.

Seleccionar 5 colonias características y transferir, con asa de siembra, cada colonia seleccionada a caldo tioglicolato. Incubar en condiciones anaeróbicas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 18-24 h. Después de la incubación, transferir con pipeta estéril y sin demora, cinco gotas del medio tioglicolato a medio lactosa sulfito con campana Durham e incubar en condiciones aeróbicas a $46 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 18 - 24 h.

Examinar los tubos de lactosa sulfito para detectar la presencia de gas en la campana y ennegrecimiento del medio.

7.4. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Se consideran *C. perfringens* las colonias características en el agar TSC que forman gas (al menos $\frac{1}{4}$ de la campana de Durham) y precipitado negro de sulfuro de hierro en el medio lactosa sulfito.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recuento de <i>Clostridium perfringens</i> en alimentos	PNT-MA-08	
		Edición N° 01	Página 5 de 8

En caso de producirse ennegrecimiento del medio y menos de ¼ de gas en la campana de Durham, transferir sin demora, 5 gotas del caldo lactosa-sulfito a otro nuevo tubo de caldo lactosa-sulfito, incubándolo en condiciones aeróbicas a $46 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 18 - 24 h. Examinar los tubos como se ha indicado anteriormente.

De acuerdo con la norma ISO 7218 se pueden emplear otros procedimientos alternativos de confirmación una vez que hayan sido verificados por el laboratorio: galerías miniaturizadas para identificación bioquímica, PCR, etc.

8. CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS (ISO 7218)

8.1. CASO GENERAL

Utilizar los recuentos de las placas que contengan un máximo de 150 colonias características a nivel de dos diluciones consecutivas y que al menos una de las placas contenga 10 colonias características.

Se aplica el método de cálculo después de la identificación de las colonias, para lo cual en primer lugar se calcula el número de colonias por placa y a continuación el número de colonias por muestra.

Cálculo del número de colonias por placa:

Cuando el método utilizado requiere identificación de colonias, se identifica un número determinado A de colonias sospechosas (generalmente 5) de cada placa escogida para el recuento de colonias. Tras la identificación se calcula el número de colonias de cada placa "a" que cumplen los criterios de identificación, utilizando la ecuación:

$$a = \frac{b}{A} \times C$$

donde:

b: número de colonias características que responden a los criterios de identificación.

A: número de colonias ensayadas.

C: es el número total de colonias sospechosas contadas en cada placa.

Hay que redondear a números enteros. Si la cifra siguiente es inferior a 5, la cifra precedente no se modifica; si la cifra siguiente es superior o igual a 5, la cifra precedente se aumenta en 1 unidad.

Cálculo del número de colonias por muestra:

El número de microorganismos identificados N presentes en la muestra se calcula mediante la fórmula:

$$N = \frac{\sum a}{V \times 1,1^d}$$

Siendo V el volumen inoculado en cada placa y d la dilución correspondiente a la primera dilución escogida. (d=1, cuando no hay dilución; muestras líquidas, por ejemplo).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recuento de <i>Clostridium perfringens</i> en alimentos	PNT-MA-08	
		Edición N° 01	Página 6 de 8

El resultado se redondea como se ha descrito anteriormente y se expresa como un número comprendido entre 1,0 y 9,9 multiplicado por 10^x , donde x es la potencia apropiada de 10. Representa el número (ufc) de microorganismos por ml (para los productos líquidos) o por g (para el resto de productos) de muestra.

Si se emplea más de 1 dilución, el porcentaje entre el recuento de colonias de las 2 diluciones se espera que sea del 10%. Se deben aplicar los límites propuestos por la norma ISO 14461-2. Si no se cumplen, los resultados deben ser interpretados con precaución.

8.2. RECuentOS BAJOS

8.2.1. Menos de 10 colonias. Caso en el que la placa de la muestra para análisis (productos líquidos), suspensión inicial (resto de productos) o primera dilución contiene menos de 10 colonias.

El intervalo óptimo de precisión corresponde a un recuento de entre 10 y 150 colonias. La precisión disminuye rápidamente al reducirse el número de colonias por debajo de 10. Sin embargo, en función del objetivo del análisis, se puede definir un límite de determinación inferior basado en un recuento inferior a 10.

Si la placa contiene menos de 10 colonias, pero como mínimo 4, el resultado se calcula siguiendo la fórmula del caso general, expresándolo como “*número estimado de microorganismos x por ml (productos líquidos) o por gramo (resto de productos)*”.

El término número estimado significa una estimación menos precisa del valor verdadero.

Si el resultado total oscila entre 1 y 3, la precisión del análisis es demasiado baja y el resultado debe expresarse como: “*Hay microorganismos presentes, pero a un nivel inferior a $(4 / V \cdot d)$ por gramo o ml*”.

8.2.2. Ausencia de colonias. Caso en que la placa de la muestra para análisis (productos líquidos), suspensión inicial (resto de productos), o primera dilución inoculada no contiene colonias. El resultado se expresa de la siguiente manera:

“Menos de $1/V \cdot d$ microorganismos por ml.” (productos líquidos) o “Menos de $1/V \cdot d$ microorganismos por gramo” (resto de productos).

d: es el factor de dilución de la suspensión inicial, o de la primera dilución inoculada o escogida ($d = 100 = 1$, cuando se inocula directamente la muestra para análisis).

V es el volumen de inóculo utilizado en ml.

8.3. RECuentOS ALTOS

Si el recuento de colonias (colonias totales, colonias típicas/sospechosas) en todas las placas de todas las diluciones inoculadas es mayor de 150, el resultado se expresa de la siguiente manera:

$> (150/V \cdot d) \times b/A$, expresado en ufc por ml (productos líquidos) o ufc por g (resto de productos).

d es el factor de dilución correspondiente a la última dilución inoculada.

V es el volumen de inóculo incluido en cada placa en ml.

b es el número de colonias que cumple los criterios de identificación dentro de las colonias ensayadas A.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recuento de <i>Clostridium perfringens</i> en alimentos	PNT-MA-08	
		Edición N° 01	Página 7 de 8

8.4. OTROS CASOS. Consultar la norma ISO 7218

En todos los casos el resultado se expresa como ufc /ml (para los productos líquidos), o ufc/g (para el resto de productos).

8.5. CÁLCULO DE INCERTIDUMBRE (U)

La norma ISO 17025 establece que los laboratorios de ensayo deben tener y deben aplicar procedimientos para estimar la incertidumbre de la medición en métodos cuantitativos.

Se recomienda aplicar lo establecido en la norma ISO 19036 que recoge una aproximación global a la incertidumbre de medida en ensayos microbiológicos adoptando un modelo *top-down* basado en la determinación de la desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorio. Es una aproximación basada en resultados experimentales, obtenidos por análisis repetido.

- Expresión de la incertidumbre en actividades de rutina:

Recuentos inferiores a 10 colonias por placa serán emitidos como estimados, como ya se ha descrito, y no procederá coherentemente la estimación de incertidumbre al no existir precisión y exactitud suficientes. La estimación de incertidumbres aplicará para un número de colonias ≥ 10 y ≤ 150 colonias por placa. Los resultados analíticos, cuando proceda, se expresarán como $N \pm U$, siendo N la mejor estimación del valor verdadero y U = incertidumbre expandida ($K = 2$).

8.6. INFORME DE ENSAYO

El informe de ensayo recogerá toda la información exigible según ISO 17025. La información requerida se define en la norma ISO 7937:

- Información necesaria para la completa identificación de la muestra.
- Especificar el método utilizado (ISO 7937).
- Se indicarán todos los detalles considerados opcionales.
- Resultado del análisis.
- Todos los detalles inherentes a cualquier incidencia que pueda influir en el resultado del ensayo

9. RESPONSABILIDADES

El procesamiento de las muestras y todas las actividades de laboratorio, así como sus correspondientes registros, se realiza por técnicos superiores o por técnicos de grado medio de laboratorio, debidamente cualificados. La supervisión/validación la realiza el facultativo responsable y aplica a todas las actividades analíticas y no analíticas: revisión de procedimientos, controles de calidad y emisión e interpretación de resultados.

Los auxiliares técnicos que intervienen son responsables de llevar a cabo las actividades concernientes a la preparación de la muestra y la preparación de los materiales y medios de cultivo necesarios y de llevar los registros correspondientes.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recuento de <i>Clostridium perfringens</i> en alimentos	PNT-MA-08	
		Edición N° 01	Página 8 de 8

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Controles de calidad

- Control de medios de cultivo:

Se realiza de acuerdo a lo establecido en la norma ISO 11133 que define los criterios de productividad, selectividad y especificidad de cada medio así como las cepas de control empleadas en cada ensayo.

- Control de equipos:

Los equipos empleados en las actividades analíticas deben someterse a actividades periódicas de mantenimiento y de calibración o verificación de acuerdo a un plan establecido (ISO 7218).

- Controles de calidad del método:

Control de calidad interno:

- Controles de recuperación y de precisión mediante el empleo de muestras contaminadas artificialmente. Los resultados se aprovechan para la evaluación en continuo a través del empleo de gráficos de control.
- Control de precisión en muestras de rutina (duplicados de ensayo).
- Ensayos de muestras estériles (blancos), con el fin de controlar la esterilidad de los medios y materiales auxiliares utilizados y, en general, obtener información sobre la buena práctica en la realización de los análisis.

Control de calidad externo:

A través de la participación del laboratorio en ejercicios de intercomparación. Son pruebas de laboratorio realizadas sobre muestras preparadas por empresas especializadas acreditadas en las que se comparan los resultados analíticos obtenidos con los de otros laboratorios del mismo campo de actividad.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. UNE-EN ISO/ IEC 17025: Requisitos generales relativos a la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de clostridios productores de neurotoxina botulínica A, B, E, y F	PNT-MA-09	
		Edición N° 01	Página 1 de 19

PNT-MA-09

Investigación de clostridios productores de neurotoxina botulínica A, B, E, y F

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2022	Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de clostridios productores de neurotoxina botulínica A, B, E, y F	PNT-MA-09	
		Edición N° 01	Página 2 de 19

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo del presente procedimiento es estandarizar la metodología para la investigación de clostridios productores de neurotoxina botulínica A, B, E y F, y unificar criterios de aplicación para el procesamiento de muestras de alimentos.

2. FUNDAMENTO

Este procedimiento, basado en la norma ISO 17919, especifica un método horizontal para la detección molecular de clostridios portadores de los genes A, B, E y F de la neurotoxina botulínica mediante un método de PCR. Este método detecta los genes y no las toxinas, por lo que un resultado positivo no significa necesariamente la presencia de estas toxinas en la muestra investigada. Esta especificación técnica es aplicable a productos para consumo humano.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Microbiology of the food chain - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens - Detection of botulinum type A, B, E and F neurotoxin-producing clostridia – ISO 17919/2013.
- Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens - Requirements for amplification and detection for qualitative methods. ISO 20838/2006.
- Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations – ISO 7218

4. MUESTRAS

Consultar el PNT-MA-01a (Toma de muestras de alimentos, conservación y transporte) y PNT-MA-01b (Preparación de muestras para análisis microbiológico de alimentos) de este procedimiento SEIMC n° 78.

4.1. RECEPCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO

Es importante que el laboratorio reciba una muestra verdaderamente representativa que no haya sido dañada o cambiada durante su transporte o almacenamiento.

Al recibir la muestra en el laboratorio se comprueba su estado, se revisan los recipientes buscando defectos físicos aparentes, se registra la fecha y hora de la recepción, así como la fecha y hora de la toma de muestra. En el caso de muestras perecederas se registra la temperatura de transporte o la temperatura de una muestra ficticia incluida con esta finalidad.

Si durante el transporte se hubiera modificado el estado físico original de la muestra, se reflejará en el informe de ensayo por los posibles cambios microbiológicos producidos (por ejemplo, muestra congelada en origen y recibida descongelada).

La muestra ha de venir acompañada de una solicitud de análisis donde debe estar detallado el perfil microbiológico a determinar en función del estudio epidemiológico del brote.

Las muestras admitidas en el laboratorio se documentan de manera que se pueda seguir su evolución a lo

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de clostridios productores de neurotoxina botulínica A, B, E, y F	PNT-MA-09	
		Edición N° 01	Página 3 de 19

largo del tiempo hasta el momento de elaborar el informe de análisis. La identidad, codificación y los registros deben asegurar su trazabilidad a lo largo de todas las etapas de su paso por el laboratorio.

En general, una vez recibida la muestra, si no se va a realizar el análisis de manera inmediata, se almacena en condiciones que eviten cualquier tipo de alteración, prestando especial atención a la temperatura de conservación.

Las muestras se analizan lo antes posible tras su recepción, preferiblemente en un plazo de 24 horas. En todos los casos los ensayos se realizarán dentro de la fecha de consumo preferente o caducidad.

4.2. CONSERVACIÓN DE MUESTRAS DESPUÉS DEL ANÁLISIS

En general, las muestras de laboratorio se conservan hasta que se hayan obtenido todos los resultados, o durante un tiempo mayor si fuera necesario. Se empaquetan en un recipiente estéril (bolsa de plástico) y se devuelven a su temperatura de almacenamiento.

4.3. TRATAMIENTO DE RESIDUOS

Deben cumplirse las disposiciones nacionales sobre seguridad y medio ambiente. Debe establecerse un sistema de identificación de materiales y de sus recipientes para:

- Residuos no contaminados (restos de alimentos no analizados) que se puede eliminar junto con los residuos generales.
- Material contaminado, para su autoclavado y eliminación o solo para eliminación si va a ser incinerado.
- Material contaminado para autoclavado y reciclado.
- Otros materiales.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1 MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y SOLUCIONES

- Caldo triptona-peptona-glucosa-extracto de levadura (TPGY)
- Caldo triptona-peptona-glucosa-extracto de levadura tamponado
- Buffer fosfato
- Polisorbato 80
- Disodio hidrógeno fosfato (Na_2HPO_4)
- Sodio dihidrógeno fosfato monohidrato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- Cloroformo (CHCl_3)
- Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) 96%
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sal disódica (Na_2EDTA) $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2$
- Bromuro de hexadecil(trimetil)amonio [(bromuro de cetil(trimetil)amonio, CTAB] $\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$
- Ácido clorhídrico (HCl) 37%
- Isopropanol $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$
- Proteinasa K (aprox. 20 U/mg)
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Agua calidad biología molecular
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Tris(hidroximetil)aminometano (Tris) $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de clostridios productores de neurotoxina botulínica A, B, E, y F	PNT-MA-09	
		Edición N° 01	Página 4 de 19

- Buffer de extracción CTAB, [CTAB]=20 g/l, [NaCl]=1,4 mol/l, [tris]=0,1 mol/l, [Na₂EDTA]= 0,02 mol/l (Ajustar el pH a 8,0 con HCl o NaOH)
- Buffer de precipitación CTAB, [CTAB]=5 g/l, [NaCl]=0,04 mol/l
- Solución de cloruro de sodio, [NaCl]=1,2 mol/l
- Solución de etanol (C₂H₅OH) al 70%
- Solución de proteinasa K (20 mg/l), disuelta en agua destilada estéril. No autoclavar. Almacenar a -20°C, evitar congelar y descongelar.
- Buffer Tris EDTA (TE) [Tris]= 0,01 mol/l, [EDTA]= 0,001 mol/l
- ADN polimerasa termoestable
- Trifosfatos de desoxirribonucleósidos (dNTPs)
- Solución buffer PCR
- Primers y sondas

5.2. MATERIALES DE CONTROL

- *C. botulinum* (cepas proteolíticas y no proteolíticas)
- Control interno de amplificación (IAC)

6. APARATOS Y MATERIALES

- Pinzas estériles
- Pipetas Pasteur estériles
- Tijeras y/o bisturíes estériles
- Cuchillos estériles
- Vórtex
- Baño de agua termostático capaz de operar a 50°C ± 1°C
- Centrifuga para tubos de 50 ml y 100 ml con aceleración regulable hasta 12000 x g
- Filtro de membrana, filtro de nitrocelulosa, tamaño de poro 0,45 µm
- Tubos de centrifuga, capacidad 50 ml y 100 ml
- Baño de agua termostático capaz de operar a 30°C ± 1°C, 65°C ± 1°C y 100°C ± 1°C
- Jarra de anaerobiosis
- Incubadora capaz de operar a 30°C ± 1°C
- Matrazes y frascos de diferentes capacidades
- Tubos de microcentrifuga con capacidades de 1,5 ml y 2 ml
- Termo bloque, con frecuencia de mezcla entre 300 r/min y 1400 r/min
- Microcentrifuga capaz de operar a 12000 x g con capacidad para tubos de 1,5 ml y 2 ml
- Bolsas de Stomacher
- Pipetas graduadas estériles con capacidad nominal de 5 ml y 10 ml
- Balanza granataria sensibilidad ± 0,1 g
- Equipo de esterilización
- Cabina de flujo laminar
- Peachímetro
- Cabina de seguridad biológica clase II
- Equipo de PCR Real Time
- Micropipetas con capacidad 1 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl y 1000 µl
- Tips con filtro
- Consumibles asociados a la PCR

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de clostridios productores de neurotoxina botulínica A, B, E, y F	PNT-MA-09	
		Edición N° 01	Página 5 de 19

7. PROCESAMIENTO

7.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA ANTES DEL ENRIQUECIMIENTO

Consultar el PNT-MA-01b (Preparación de muestras para análisis microbiológico de alimentos) de este procedimiento SEIMC n° 78.

7.1.1. General

Ver Anexo A.

Se recomienda analizar al menos 25 g, especialmente para muestras de miel. Sin embargo, si la muestra es limitada, pueden analizarse cantidades más pequeñas.

7.1.2. Preparación de la muestra de miel

Colocar el recipiente que contenga la miel en un baño de agua a $50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 30 min para fundir la miel. Invertir el recipiente varias veces para mezclar la muestra. Pesar $25\text{ g} \pm 2\text{ g}$ de miel en un tubo de centrifuga estéril con una capacidad de 100 ml y agregar al menos 50 ml de agua destilada o desionizada estéril que contenga 1% de fracción volumétrica de polisorbato 80, precalentado a $50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Mezclar hasta que la solución sea homogénea.

Centrifugar la mezcla a $12000 \times g$ durante 30 min.

Retirar el sobrenadante con cuidado y pasarlo por un filtro de membrana de $0,45\text{ }\mu\text{m}$. En caso de bloqueo, pasar el sobrenadante restante a través de un filtro nuevo.

En los pasos siguientes, utilizar todos los filtros que se hayan usado.

Almacenar el sedimento temporariamente a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

7.2. ENRIQUECIMIENTO MICROBIANO

7.2.1. Inoculación

7.2.1.1. General

Quitar el oxígeno disuelto del medio de enriquecimiento a través de un hervor durante 10 min a 15 min en un baño de agua.

Si la muestra es ácida o acidificante, el caldo de enriquecimiento que debe utilizarse es el caldo triptona-peptona- glucosa-extracto de levadura tamponado.

7.2.1.2. Inoculación de la porción de ensayo

7.2.1.2.1. Recuperación de células vegetativas y esporas

Ajustar la temperatura del medio de enriquecimiento a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en un baño de agua. Transferir la porción de ensayo al medio de enriquecimiento desgasificado para obtener una dilución final de 10–1.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de clostridios productores de neurotoxina botulínica A, B, E, y F	PNT-MA-09	
		Edición N° 01	Página 6 de 19

7.2.1.2.2. Recuperación de esporas

Ajustar la temperatura del medio de enriquecimiento a $65^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en un baño de agua. Transferir la porción de ensayo al medio de enriquecimiento precalentado para obtener una dilución final de 10–1 a $65^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Después de la inoculación, mantener el matraz o frasco a $65^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante otros 10 min y luego enfriar rápidamente a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en un baño de agua.

7.2.1.3. Inoculación de porciones de ensayo de miel

Ajustar la temperatura del caldo de enriquecimiento a $65^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Transferir el sedimento (7.1.2) a un matraz o frasco y el filtro o filtros a un segundo matraz o frasco, cada uno con al menos 10 ml del caldo de enriquecimiento precalentado. En todos los casos asegurarse de que los filtros queden cubiertos con suficiente líquido. Incubar ambos matraces o frascos a $65^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 10 min en un baño de agua.

NOTA: las muestras de miel solo se analizan en busca de esporas.

7.2.2. Incubación

Incubar en condiciones anaeróbicas a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Después de $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ de incubación, retirar 1 ml de enriquecimiento para el análisis por PCR. Retornar inmediatamente a las condiciones de anaerobiosis.

Si el resultado del primer ensayo de PCR es negativo, continuar la incubación de las muestras en las mismas condiciones durante $48 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ adicionales. Después, transferir 1 ml del enriquecimiento a un matraz o frasco que contenga 9 ml de caldo de enriquecimiento fresco. Incubar en condiciones anaeróbicas a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $18 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$. Realizar un segundo ensayo de PCR.

7.2.3. Controles de proceso

Se deben incluir controles de proceso positivos y negativos.

Nota. Ver Anexo C, ejemplo de un método para la preparación de esporas.

7.3. PREPARACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

7.3.1. General

Utilizar un procedimiento apropiado para la extracción de ácidos nucleicos de bacterias Gram-positivas.

Se da un ejemplo de procedimiento en 7.3.2 a 7.3.4.

Este procedimiento consta de un paso de lisis (lisis térmica en presencia de CTAB) seguido de varios pasos de extracción para eliminar inhibidores, como polisacáridos y proteínas.

Una vez preparada la porción de ensayo, aplicar el protocolo de extracción y purificación de ADN indicado en 7.3.2 a 7.3.4.

Se requiere una adaptación a escala, de las masas y los volúmenes del buffer en función del tamaño seleccionado de la porción de ensayo.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de clostridios productores de neurotoxina botulínica A, B, E, y F	PNT-MA-09	
		Edición N° 01	Página 7 de 19

7.3.2. Extracción de muestras

Transferir 1000 µl del cultivo de enriquecimiento (7.2.2) a un tubo de microcentrifuga. Centrifugar durante 5 min a aproximadamente 12000 × g. Descartar el sobrenadante (acuoso).

Añadir al pellet 500 µl de buffer de extracción CTAB precalentado a 65°C y mezclar suavemente hasta que el pellet se haya lisado. Incubar durante 30 min a 65°C, con agitación. Añadir 20 µl de solución de proteinasa-K, mezclar suavemente e incubar durante 30 min a 65°C, con agitación.

Centrifugar durante 10 min a aproximadamente 12000 × g. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo. Agregar 0,7 a 1 volumen de cloroformo y mezclar bien.

Centrifugar durante 15 min a aproximadamente 12000 × g. Transferir el sobrenadante (acuoso) a un nuevo tubo.

7.3.3. Precipitación con CTAB

Añadir 2 volúmenes del tampón de precipitación CTAB. Incubar durante 60 min a temperatura ambiente sin agitación. Centrifugar durante 15 min a 12000 × g. Descartar el sobrenadante. Disolver el ADN precipitado añadiendo 350 µl de solución de NaCl. Añadir 350 µl de cloroformo y mezclar bien. Centrifugar durante 10 min a 12000 × g. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo.

NOTA: la precipitación con CTAB no es necesaria para todas las matrices, solo para matrices ricas en proteínas y polisacáridos. Alternativamente, es posible una purificación en fase sólida del ADN (por ejemplo, mediante el uso de columnas giratorias) asumiendo que los resultados son equivalentes.

7.3.4. Precipitación del ADN

Añadir 0,6 volúmenes de isopropanol, mezclar suavemente invirtiendo el tubo y mantener el tubo a temperatura ambiente durante 20 min. Centrifugar durante 15 min a 12000 × g. Descartar el sobrenadante. Añadir al tubo 500 µl de solución de etanol e invertir varias veces. Este es el paso crítico que garantiza la eliminación completa de CTAB. Centrifugar durante 10 min a 12000 × g. Descartar el sobrenadante. Secar el sedimento de ADN y volver a disolverlo en 100 µl de un buffer apropiado (por ejemplo, buffer TE). Este es el ADN *stock*. Conservarlo a -20°C hasta su utilización.

7.4. AMPLIFICACIÓN POR PCR

Se pueden utilizar diferentes procedimientos para la amplificación por PCR.

La detección del producto de la PCR puede basarse en la detección de la señal de fluorescencia.

Un método de PCR en tiempo real se encuentra descrito en el Anexo B.

7.4.1. Controles de PCR

7.4.1.1 Control negativo de PCR

Se utiliza agua libre de ADN como control negativo.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de clostridios productores de neurotoxina botulínica A, B, E, y F	PNT-MA-09	
		Edición N° 01	Página 8 de 19

7.4.1.2. Control positivo de PCR

Se utiliza una mezcla de ADN, de clostridios productores de toxina botulínica (BoNT) positiva para las cuatro secuencias diana (genes de neurotoxina tipo A, B, E y F). Aproximadamente 100 copias de cada uno.

7.4.1.3. Control de amplificación (IAC)

Utilizar un IAC apropiado. En el Anexo B se da un ejemplo de un IAC heterólogo.

7.4.2. Detección de productos de PCR

Se pueden utilizar diferentes procedimientos para la detección de productos de PCR. En el Anexo B se describe un método de PCR en tiempo real.

7.5. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos, incluidos los controles, deben ser inequívocos y los controles deben producir los resultados esperados, de lo contrario, se debe repetir el procedimiento.

El resultado de la PCR es:

- a) Positivo, si se ha detectado y confirmado un producto de PCR específico y todos los controles dan los resultados esperados.
- b) Negativo dentro de los límites de detección, si no se ha detectado un producto de PCR específico y todos los controles dan los resultados esperados.

Un resultado positivo de PCR no indica automáticamente la presencia de neurotoxinas botulínicas. Para confirmar la presencia de neurotoxinas, se aplicarán métodos adecuados dirigidos directamente a la detección de las toxinas.

8. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Se informarán los resultados obtenidos para cada muestra, que luego serán validados por el facultativo responsable.

De acuerdo con la interpretación de los resultados, informar *C. botulinum* productor de neurotoxina tipo A, B, E y/o F: DETECTADO o NO DETECTADO en la porción analizada, especificando la masa en gramos o el volumen en mililitros.

Investigación de *C. botulinum* productor de neurotoxina tipo A: Detectado/No detectado en X g, X ml (ISO 17919/2013)

Investigación de *C. botulinum* productor de neurotoxina tipo B: Detectado/No detectado en X g, X ml (ISO 17919/2013)

Investigación de *C. botulinum* productor de neurotoxina tipo E: Detectado/No detectado en X g, X ml (ISO 17919/2013)

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de clostridios productores de neurotoxina botulínica A, B, E, y F	PNT-MA-09	
		Edición N° 01	Página 9 de 19

Investigación de *C. botulinum* productor de neurotoxina tipo B: Detectado/No detectado en X g, X ml (ISO 17919/2013)

Investigación de *C. botulinum* productor de neurotoxina tipo E: Detectado/No detectado en X g, X ml (ISO 17919/2013)

Investigación de *C. botulinum* productor de neurotoxina tipo F: Detectado/No detectado en X g, X ml (ISO 17919/2013)

9. RESPONSABILIDADES

El procesamiento de las muestras y todas las actividades de laboratorio, así como sus correspondientes registros, se realiza por técnicos superiores o por técnicos de grado medio de laboratorio, debidamente cualificados.

La supervisión/validación la realiza el facultativo responsable y aplica a todas las actividades analíticas y no analíticas: revisión de procedimientos, controles de calidad y emisión e interpretación de resultados.

Los auxiliares técnicos que intervienen son responsables de llevar a cabo las actividades concernientes a la preparación de la muestra y la preparación de los materiales y medios de cultivo necesarios y de llevar los registros correspondientes.

10. IDENTIFICACIÓN DE FUENTES DE INCERTIDUMBRE

Origen	Fuentes de incertidumbre	Forma de control
Instrumental	Incertidumbre asociada a las pesadas	Calibración anual y Verificación diaria de las balanzas.
Micropipetas	Incertidumbre asociada a su medición	Calibración cada 5 años. Verificación anual.
pH	pHmetro	Calibración diaria.
Kits	Calidad asociada a fabricación y conservación.	Controles positivos y negativos del <i>kit</i> .
Humanas	Experiencia y pericia del personal en la interpretación de los resultados	Pruebas intralaboratorio. Pruebas de proficiencia Internacionales.

11. MEDIDAS DE SEGURIDAD Y CONDICIONES AMBIENTALES

Es importante observar durante el proceso y ensayo, la aplicación de prácticas de bioseguridad acordes con los niveles evaluados de riesgo.

12. BIBLIOGRAFÍA

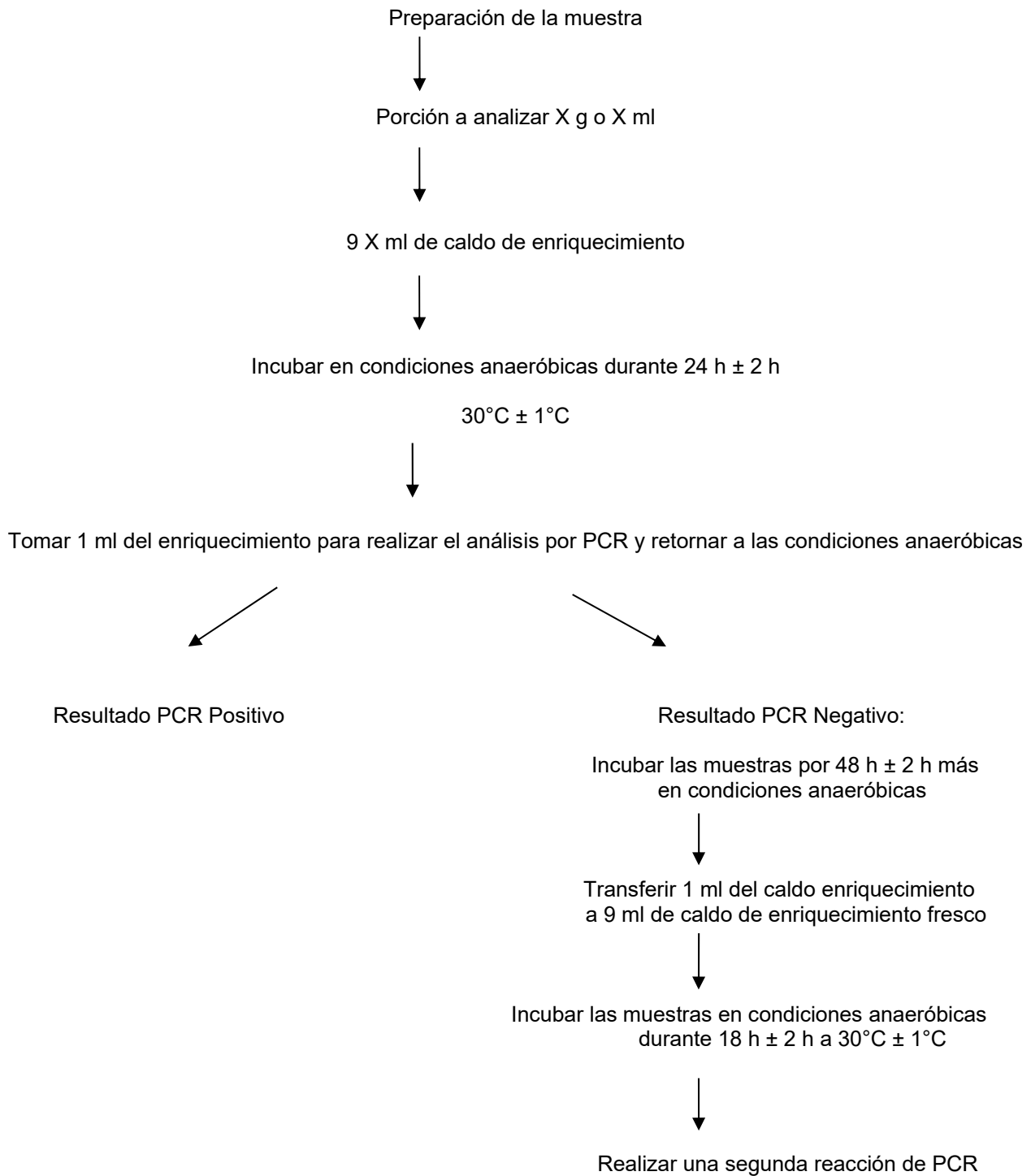
1. Microbiology of the food chain - Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens - Detection of botulinum type A, B, E and F neurotoxin-producing clostridia – ISO 17919/2013.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de clostridios productores de neurotoxina botulínica A, B, E, y F	PNT-MA-09	
		Edición N° 01	Página 10 de 19

13. ANEXOS

Anexo	Título	Número de páginas
ANEXO A	Diagrama de flujo del procedimiento	1
ANEXO B (Informativo)	Ensayos para la detección de genes que codifican para neurotoxina botulínica tipos A, B, E y F mediante PCR en tiempo real	4
ANEXO C (Informativo)	Preparación de esporas de <i>Clostridium botulinum</i>	4

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de clostridios productores de neurotoxina botulínica A, B, E, y F	PNT-MA-09	
		Edición N° 01	Página 11 de 19

ANEXO A**DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCEDIMIENTO**

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de clostridios productores de neurotoxina botulínica A, B, E, y F	PNT-MA-09	
		Edición N° 01	Página 12 de 19

ANEXO B (Informativo)

ENSAYO PARA LA DETECCIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PARA NEUROTOXINA BOTULÍNICA TIPOS A, B, E Y F MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL

B. ENSAYO PCR MULTIPLEX

B.1. INTRODUCCIÓN

Este anexo describe un método de PCR múltiplex en tiempo real basado en sondas tecnología TaqMan®⁷⁾ para la detección de genes que codifican para la neurotoxina botulínica tipo A, B, E y F.

B.2. CARACTERÍSTICAS DEL DESEMPEÑO

B.2.1 General

El método ha sido validado para ADN extraído de varias cepas de referencia de *C. botulinum* tipo A, B, E y F y de muestras contaminadas naturalmente.

B.2.2. Evaluación teórica del método

La evaluación teórica se realizó realizando una búsqueda de similitud de secuencias en la base de datos GenBank/EMBL/DDBJ. El resultado de la búsqueda confirmó una identidad completa solo con las secuencias objetivo esperadas.

B.2.3. Selectividad

B.2.3.1. Test de inclusividad

La inclusividad del método se probó con 14 cepas de *C. botulinum* tipo A, 20 de *C. botulinum* tipo B, 2 de *C. botulinum* tipo E y 1 de *C. botulinum* tipo F.

B.2.3.2. Test de exclusividad

La exclusividad del método se probó con 34 organismos no objetivo. No se detectaron reacciones cruzadas con los organismos no objetivo.

B.2.4. Sensibilidad

B.2.4.1. Pruebas de sensibilidad utilizando muestras contaminadas artificialmente

El límite de detección se evaluó midiendo muestras contaminadas artificialmente con diferentes niveles de inoculación (0,1 ufc a 10 ufc y 10 ufc a 100 ufc antes del enriquecimiento) en 10 g de distintos alimentos (pescado enlatado, salchichas enlatadas y miel) usando el método de cultivo. Según los resultados, la tasa de falsos positivos para el método que utiliza muestras contaminadas artificialmente es del 0 % y la tasa de falsos negativos es del 0 %. El límite de detección para el método descrito es de 1 a 10 ufc o esporas por porción de prueba antes del enriquecimiento.

B.2.4.2. Pruebas de sensibilidad utilizando muestras naturalmente contaminadas

El límite de detección se evaluó midiendo 20 muestras naturalmente contaminadas (por ejemplo, miel, materia vegetal y carnes enlatadas) usando el método de cultivo como método de referencia. Según los resultados, la tasa de falsos positivos para el método que utiliza muestras contaminadas de forma natural es del 0% y la tasa de falsos negativos es del 0%.

NOTA: los experimentos se realizaron con porciones de ensayo de 10 g.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de clostridios productores de neurotoxina botulínica A, B, E, y F	PNT-MA-09	
		Edición N° 01	Página 13 de 19

B.2.5. Controles analíticos

Todas las pruebas se realizaron utilizando controles de proceso positivos y negativos y adicionalmente un IAC heterólogo para PCR.

B.2.6. Instrumentos y reactivos

La validación se realizó con el Stratagene MX 3000P⁸) y con el Stratagene MX 3005P⁹) usando el 2× Brilliant Multiplex qPCR MasterMix¹⁰).

B.3. PRINCIPIO

Los fragmentos de ADN específicos de los genes BoNT/A, B, E y F se amplifican mediante una PCR multiplex en tiempo real. Los productos de la PCR se detectan midiendo la fluorescencia de las sondas.

B.4. REACTIVOS

B.4.1. Agua libre de nucleasas

B.4.2. MasterMix para PCR real time (lista para usar)

Una MasterMix lista para usar contiene buffer de PCR, solución de MgCl₂, solución de dNTP, un sistema de descontaminación opcional (dUTP que incluye uracilo N-glicosilasa) y Taq polimerasa. Además, se adapta principalmente al termociclador utilizado. Seguir las instrucciones de uso del fabricante.

B.4.3. Plásmido pUC 19 (L09137)

B.4.4. Oligonucleótidos

Ver tabla B.1

Tabla B.1.- Secuencias de oligonucleótidos

Tipo	Primer	Secuencia (5' - 3')	
A	CBOT A fw	TCT TAC gCg AAA Tgg TTA Tgg	
	CBOT A re	TgC CTg CAC CTA AAA gAg gA	
	CBOT A S	^c HEX-Tgg TTT TgA ggA gTC ACT TgA A-TAMRA ^b	
B	CBOT B fw	AggA ggA gTg gAg CGR ^e AAA	
	CBOT B re	TTC CCT TgA TgC AAA ATg AT	
	CBOT B S	^a FAM-CCT ggg CCA gTT TTA AAT gA-TAMRA ^b	
E	CBOT E fw	TCA gCA CCT ggA CTT TCA gA	
	CBOT E re	CAT gTT gTT CTA TAT CAC TTg TTC CA	
	CBOT E S	^a FAM-TCC AAA ATg ATg CTT ATA TAC CAA AA-TAMRA ^b	
F	CBOT F fw	ATA Cgg ggC TAg ggg AgT TA	
	CBOT F re	AAA TCC TgA CCT CCA AAg gTT	
	CBOT F S	^c HEX-CCg AAA AAC CCA TAA ggC TA-TAMRA ^b	
Control Interno de Amplificación (IAC)	IAC_pUC_fw	TgT gAA ATA CCg CAC AgA Tg	
	IAC_pUC_re	AgC Tgg CgT AAT AgC gAA g	
	IAC_pUC_S	^d ROX-gAg AAA ATA CCg CAT CAg gC-TAMRA ^b	
a FAM: 6-carboxifluoresceína b TAMRA: 6-carboxitetrametilrodamina c HEX: 5'-(hexaclorofluoresceína) d ROX: carboxi-X-rodamina e En la secuencia de oligonucleótidos, R es (A, G)			

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de clostridios productores de neurotoxina botulínica A, B, E, y F	PNT-MA-09	
		Edición N° 01	Página 14 de 19

Nota: no se ha probado ni validado el uso de otros marcadores de fluorescencia para las sondas.

B.5. EQUIPOS

B.5.1. Equipamiento utilizado para PCR

B.5.1.1. Pipetas y tips con filtro, con capacidad entre 1 µl y 1000 µl.

B.5.1.2. Tubos de microcentrífuga, con capacidad de 1,5 ml y 2,0 ml.

B.5.1.3. Microtubos de PCR de pared delgada, tubos de reacción de 0,2 ml o 0,5 ml, microplacas de PCR multipocillo u otro equipo adecuado.

B.5.1.4. Equipo de PCR en tiempo real.

B.6. PROCEDIMIENTO

B.6.1. PCR setup

El método se describe para un volumen total de PCR de 25 µl por reacción con los reactivos enumerados en las Tablas B.2 y B.3. La PCR también se puede realizar en un volumen mayor si las soluciones se ajustan adecuadamente. Los valores finales de los reactivos que se describen en las tablas B.2 y B.3 han demostrado ser adecuados.

Se utilizan dos sistemas multiplex, uno para la detección del IAC y de genes que codifican para las neurotoxinas tipo A, B y otro para la detección de genes, que codifican para las neurotoxinas tipo E y F.

Tabla B.2.- Adición de reactivos (PCR triplex en tiempo real - BoNT/A, B e IAC)

Reactivo		Valor final	Volumen por muestra µl
Templado ADN		Máximo 250 ng	5
TaqMan® ADN polimerasa	2 x Brilliant Multiplex qPCR MasterMix ¹⁰⁾	1 x	12,5
Buffer PCR			
Solución MgCl ₂			
Solución de dNTP			
Primers para BoNT/A, B e IAC (según tabla B.1)		0,3 µmol/ l c/u	0,75 c/u
Sondas para BoNT/A, B e IAC (según tabla B.1)		0,2 µmol/ l c/u	0,5 c/u
Agua libre de nucleasas			0,5
Plásmido pUC 19, 1 fg		1 fg	1

Tabla B.3.- Adición de reactivos (PCR duplex en tiempo real - BoNT/E y F)

Reactivo		Valor final	Volumen por muestra µl
Templado ADN		Máximo 250 ng	5
TaqMan ^{®7)} ADN polimerasa	2 x Brilliant Multiplex qPCR MasterMix ¹⁰⁾	1 x	12,5
Buffer PCR			
Solución MgCl ₂			
Solución de dNTP			
Primers para BoNT/E y F (según Tabla B.1)		0,5 µmol/ l c/u	1,25 c/u
Sondas para BoNT/E y F (según Tabla B.1)		0,2 µmol/ l c/u	0,5 c/u
Agua libre de nucleasas			1,5

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de clostridios productores de neurotoxina botulínica A, B, E, y F	PNT-MA-09	
		Edición N° 01	Página 15 de 19

7) TaqMan® es una marca registrada de Roche Molecular Systems. Esta información se proporciona para orientación de los usuarios de este documento. Se pueden utilizar productos equivalentes.

8) Stratagene MX 3000P es el nombre comercial de un producto suministrado por Agilent Technologies. Esta información se proporciona para orientación de los usuarios de este documento. Se pueden usar productos equivalentes si se puede demostrar que conducen a los mismos resultados.

9) Stratagene MX 3005P es el nombre comercial de un producto suministrado por Agilent Technologies. Esta información se proporciona para orientación de los usuarios de este. Se pueden usar productos equivalentes si se puede demostrar que conducen a los mismos resultados.

10) 2× Brilliant Multiplex qPCR MasterMix es el nombre comercial de un producto suministrado por Agilent Technologies. Esta información se proporciona para orientación de los usuarios de este documento. Se pueden usar productos equivalentes si se puede demostrar que conducen a los mismos resultados.

B.6.2. Controles de PCR

B.6.2.1. Control negativo de PCR

Se utiliza agua libre de ADN como Control Negativo.

B.6.2.2. Control positivo de PCR

Se utiliza una mezcla de ADN, de clostridios productores de BoNT, positiva para las cuatro secuencias diana (genes de neurotoxina tipo A, B, E y F). Aproximadamente 100 copias de cada uno.

B.6.2.3. Control de amplificación (IAC)

Utilizar un IAC apropiado. En B.6 se da un ejemplo de un IAC heterólogo.

B.6.3. Programa de temperatura-tiempo

El programa de temperatura-tiempo como se describe en la tabla B.4 se ha utilizado para el estudio de validación utilizando los sistemas Stratagene MX 3000P8) y Stratagene MX 3005P9) en combinación con 2× Brilliant Multiplex qPCR MasterMix®10).

El uso de otros termocicladores puede hacer necesaria una adaptación. El tiempo de activación y desnaturalización inicial depende de la polimerasa utilizada.

Si se utiliza una polimerasa de arranque en caliente, seguir las instrucciones de uso del fabricante, a menos que el protocolo indique lo contrario.

Tabla B.4.- Programa de temperatura-tiempo

Activación y desnaturalización inicial	10 min / 95°C
Número de ciclos (amplificación)	45
Amplificación	15 s / 95°C
	60 s / 55°C

B.6.4. Interpretación de resultados

El valor de umbral (*threshold*) para determinar el ciclo de umbral, Ct, debe ser definido por el facultativo o por el *software* específico del termociclador.

Una muestra positiva genera un gráfico de amplificación con al menos la fase exponencial de una curva de amplificación típica.

La curva de amplificación de estas muestras cruza el umbral definido después de un cierto número de ciclos.

Se considera positiva una muestra con una señal de fluorescencia por encima del *threshold*.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de clostridios productores de neurotoxina botulínica A, B, E, y F	PNT-MA-09	
		Edición N° 01	Página 16 de 19

ANEXO C (Informativo)

PREPARACIÓN DE ESPORAS DE *Clostridium botulinum*

C.1. INTRODUCCIÓN

Este anexo describe la preparación de esporas de *C. botulinum* (cepas proteolíticas y no proteolíticas) para el control del proceso (7.2.3). En la figura C.1. se puede ver un diagrama de flujo de la preparación de esporas.

C.2. MEDIOS DE CULTIVO

Se pueden utilizar otros medios de cultivo de enriquecimiento aprobados siempre que se demuestre un rendimiento equivalente.

C.2.1. Caldo Anellis modificado

C.2.1.1. Fase sólida

C.2.1.2. Fase líquida

C.2.2. Medio bifásico

C.2.2.1. Fase sólida

C.2.2.2. Fase líquida

C.3. REACTIVOS

C.3.1. Reactivos para la limpieza de esporas

C.3.1.1. Cloruro de sodio, NaCl

C.3.1.2. Solución de cloruro de sodio disuelta en agua estéril [NaCl]= 0,85 g/l

C.3.2. Reactivos para tinción de Gram

C.3.2.1. Cristal violeta $[(CH_3)_2NC_6H_4]_2C:C_6H_4:N+(CH_3)_2Cl$

C.3.2.2. Etanol C_2H_5OH 96 %

C.3.2.3. Oxalato de amonio $NH_4OCOCOONH_4$

C.3.2.4. Agua

C.3.2.5. Cristales de yodo

C.3.2.6. Yoduro de potasio

C.3.2.7. Safranina $C_{20}H_{19}ClN_4$

C.3.2.8. Solución de safranina $[C_{20}H_{19}ClN_4]= 0,1 \text{ g/l}$

C.3.2.9. Tinción con cristal violeta

Disolver 2 g de colorante cristal violeta (C.3.2.1) en 20 ml de etanol (C.3.2.2) y 0,8 g de oxalato de amonio en 80 ml de agua. Mezclar suavemente las dos soluciones juntas. La mezcla es estable durante 2 a 3 años.

C.3.2.10. Yodo para tinción de Gram

Disolver 2 g de yoduro de potasio (C.3.2.6) en 2 ml de agua destilada. Los cristales se disuelven y la solución se vuelve muy fría. Disolver los cristales de yodo (C.3.2.5) en la solución de yoduro de potasio. Diluir la mezcla con 298 ml de agua. La mezcla es estable durante 2 a 3 años.

C.3.2.11. Aceite de inmersión

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de clostridios productores de neurotoxina botulínica A, B, E, y F	PNT-MA-09	
		Edición N° 01	Página 17 de 19

C.4. EQUIPOS

C.4.1. Equipos para enriquecimiento microbiano

C.4.1.1. *Baño de agua termostático capaz de operar a 30°C ± 1°C*

C.4.1.2. *Jarra de anaerobiosis o gabinete anaeróbico*

C.4.1.3. *Incubadora capaz de operar a 30°C ± 1°C*

C.4.2.4. *Frascos o botellas de capacidad adecuada*

C.4.2. Equipos para la limpieza de esporas

C.4.2.1. *Baño de limpieza por ultrasonido con frecuencia de operación hasta 38 Hz*

C.4.2.2. *Centrífuga para tubos de 50 ml y 100 ml y con aceleración regulable hasta 6000 × g*

C.4.2.3. *Microscopio óptico con un valor de aumento de la lente del objetivo de hasta 100×*

C.4.2.4. *Portaobjetos*

C.5. PROCEDIMIENTO

C.5.1. Inoculación

C.5.1.1. *Cepas proteolíticas de C. botulinum (caldo Anellis modificado)*

Para el medio final, utilizar un volumen de sólido a líquido de 4 + 1. Después de enfriar la fase sólida del agar a 20°C-30°C, inocular la fase sólida (C.2.1.1) del medio con 1 ml de un cultivo TPGY (7.2) de una cepa proteolítica de *C. botulinum* y cubrirlo con la fase fluida (C.2.1.2).

C.5.1.2. *Cepas de C. botulinum no proteolíticas (medio bifásico).*

Para el medio final, usar un volumen de sólido a líquido de 2 + 1. Después de enfriar la fase sólida de agar a 20°C-30°C, inocular la fase sólida (C.2.2.1) del medio con 1 ml de un cultivo TPGY (7.2) de una cepa no proteolítica de *C. botulinum* y cubrirlo con la fase fluida (C.2.2.2).

C.5.2. Enriquecimiento

Incubar las cepas proteolíticas de *C. botulinum* en caldo Anellis modificado y las cepas no proteolíticas en un medio bifásico durante 7 días a 30°C ± 1°C en condiciones anaeróbicas.

C.5.3. Aislamiento y limpieza de esporas del cultivo de enriquecimiento

Centrifugar 20 ml de la parte líquida del cultivo de enriquecimiento durante 15 min a 6000 × g y descartar el sobrenadante.

Resuspender el sedimento en 20 ml de solución de cloruro de sodio (C.3.1.2). Centrifugar la muestra a 6000 × g durante 15 min y someterla a ultrasonido durante 5 min en un baño de limpieza por ultrasonido (C.4.2.1). Repetir cinco veces.

Suspender el sedimento en 1 ml de solución de cloruro de sodio (C.3.1.2). Centrifugar la muestra durante 1 h a 6000 × g y descartar el sobrenadante.

Resuspender el sedimento en 20 ml de solución de cloruro de sodio (C.3.1.2). Centrifugar la muestra a 6000 × g durante 15 min. Descartar el sobrenadante y someter la muestra a ultrasonido durante 5 min en un baño de limpieza (C.4.2.1). Repetir cuatro veces.

Resuspender el sedimento en 1 ml de solución de cloruro de sodio (C.3.1.2) y almacenar la suspensión de esporas, hasta su uso, a una temperatura de 1°C.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de clostridios productores de neurotoxina botulínica A, B, E, y F	PNT-MA-09	
		Edición N° 01	Página 18 de 19

C.5.4. Confirmación de los resultados

C.5.4.1. General

Se pueden utilizar diferentes procedimientos para la tinción de bacterias y esporas y microscopía para la confirmación de los resultados de aislamiento y limpieza.

C.5.4.2. Tinción de Gram

C.5.4.2.1. Preparación del frotis:

Transferir 1 gota o 2 gotas de la suspensión de esporas a un portaobjetos y distribuirlo de manera de que quede una película delgada uniforme.

Secar sobre una superficie plana. Después de secar al aire, pasar el portaobjetos por una llama dos o tres veces. Enfriar el portaobjetos antes de teñir.

C.5.4.2.2. Tinción:

Cubrir el frotis fijado con la tinción de violeta cristal (C.3.2.9). Dejar durante 30 segundos.

Lavar brevemente con agua para eliminar el exceso de cristal violeta.

Cubrir con yodo de Gram (C.3.2.10) durante 3 segundos. Enjuagar suavemente con agua corriente del grifo.

Decolorar dejando que la solución de etanol (C.3.2.2) fluya sobre el frotis y detenerse cuando el escurrimiento sea claro.

Lavar con agua del grifo y teñir con solución de safranina (C.3.2.8) durante 15 segundos. Eliminar el exceso de safranina con un flujo suave de agua del grifo.

Drenar el portaobjetos y secarlo al aire en posición vertical.

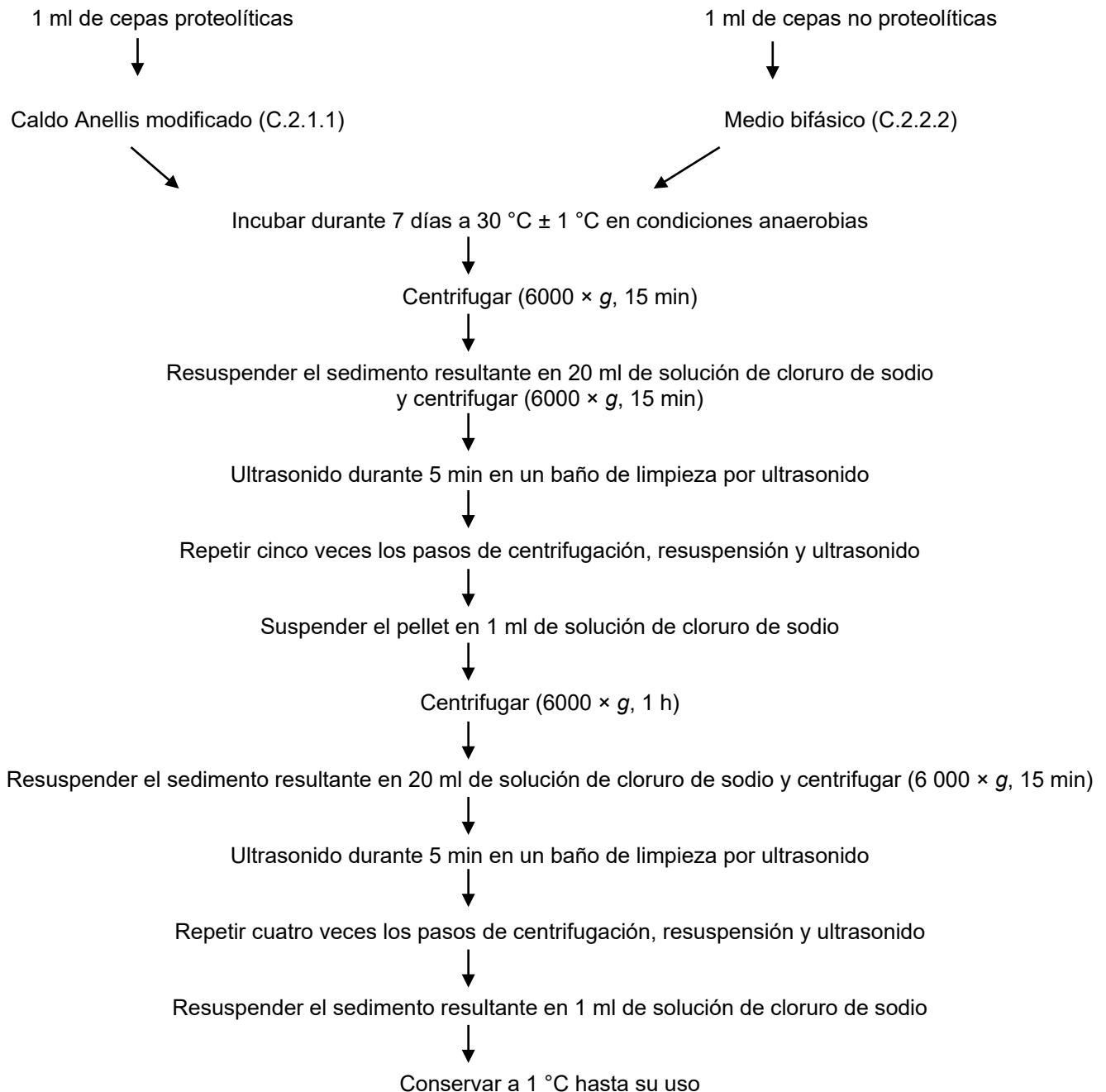
C.5.4.2.3. Examen microscópico:

Examinar el frotis bajo un microscopio óptico con un valor de aumento de 100× con aceite de inmersión (C.3.2.11).

Las células vegetativas de *C. botulinum* son bacterias grampositivas con forma de bastón y que generan endosporas subterminales. Las células vegetativas son azules. Las esporas pueden estar ubicadas dentro de la celda o estar como esporas libres. Solo debe haber unas pocas células vegetativas en el campo visual del microscopio.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de clostridios productores de neurotoxina botulínica A, B, E, y F	PNT-MA-09	
		Edición N° 01	Página 19 de 19

Figura C.1.- Diagrama de flujo de la preparación de esporas



Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recuento de <i>Bacillus cereus</i> presuntivo en alimentos	PNT-MA-10	
		Edición N° 01	Página 1 de 9

PNT-MA-10

Recuento de *Bacillus cereus* presuntivo en alimentos

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2022	Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recuento de <i>Bacillus cereus</i> presuntivo en alimentos	PNT-MA-10	
		Edición N° 01	Página 2 de 9

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El presente procedimiento establece las condiciones para el recuento de *Bacillus cereus* presuntivo en alimentos para consumo humano, productos para la alimentación animal y muestras ambientales en áreas de producción y manipulación de alimentos, por la técnica de recuento en placa.

2. FUNDAMENTO

Se describe un método analítico basado en la norma ISO 7932 “Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de *Bacillus cereus* presuntivos. Técnica de recuento de colonias a 30°C”.

Se basa en la determinación del número de colonias de *Bacillus cereus* presuntivo en una cantidad determinada de la muestra problema, si el producto es líquido, o en la suspensión inicial en el caso de otros productos a partir del número de colonias confirmadas aisladas en la superficie de un agar selectivo y diferencial.

La norma introduce el término presuntivo con el fin de reconocer el hecho de que la etapa de confirmación no permite la diferenciación de *B. cereus* de otras especies de *Bacillus* estrechamente relacionadas pero que se encuentran más raramente en alimentos, como *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis* y *B. mycoides*. No obstante, en el texto se indican algunos tests adicionales que se pueden realizar como complemento a las pruebas generales de confirmación.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- UNE-EN ISO/ IEC 17025: Requisitos generales relativos a la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.
- ISO 7218. Microbiología de alimentos y productos para la alimentación animal. Requisitos generales y directrices para los análisis microbiológicos.
- ISO/TS 17728. Microbiología de la cadena alimentaria. Técnicas de muestreo para el análisis microbiológico de muestras de alimentos y productos para la alimentación animal.
- ISO 7932. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de *Bacillus cereus* presuntivos. Técnica de recuento de colonias a 30°C.
- ISO 6887-1. Microbiología de la cadena alimentaria. Preparación de muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para análisis microbiológicos. Parte1: Normas generales para la preparación de la suspensión inicial y las diluciones decimales.
- ISO 6887-2. Microbiología de la cadena alimentaria. Normas específicas para la preparación de carne y productos cárnicos.
- ISO 6887-3. Microbiología de la cadena alimentaria. Normas específicas para la preparación de pescado y productos de la pesca.
- ISO 6887-4. Microbiología de la cadena alimentaria. Normas específicas para la preparación de productos diversos.
- ISO 6887-5. Microbiología de la cadena alimentaria. Normas específicas para la preparación de leche y productos lácteos.
- ISO 11133. Microbiología de alimentos, productos para la alimentación animal y agua. Preparación, producción almacenamiento y rendimiento de medios de cultivo.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recuento de <i>Bacillus cereus</i> presuntivo en alimentos	PNT-MA-10	
		Edición N° 01	Página 3 de 9

- ISO 14461-2. Leche y productos lácteos. Control de calidad en laboratorios microbiológicos. Parte 2. Determinación de la fiabilidad de los recuentos de colonias de placas paralelas y diluciones posteriores.
- ISO 19036. Microbiología de alimentos y productos para la alimentación animal. Directrices para la estimación de incertidumbre en determinaciones cuantitativas.
- ISO 14461-2. Leche y productos lácteos. Control de calidad en laboratorios microbiológicos. Parte 2. Determinación de la fiabilidad de los recuentos de colonias de placas paralelas y diluciones posteriores.
- ISO 19036. Microbiología de alimentos y productos para la alimentación animal. Directrices para la estimación de incertidumbre en determinaciones cuantitativas.

4. MUESTRAS

Consultar el PNT-MA-01a (Toma de muestras de alimentos, conservación y transporte) y PNT-MA-01b (Preparación de muestras para análisis microbiológico de alimentos) de este procedimiento SEIMC n° 78.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

Mantener en refrigeración todos los medios de cultivo y reactivos, atemperando antes de su uso.

- Placas de agar MYP (manitol-yema de huevo-polimixina).
- Placas de agar sangre
- Agua de peptona tamponada (APT)
- Tubos con agua de peptona tamponada (9 ml).

6. APARATOS Y MATERIALES

- Balanza o dosificador gravimétrico.
- Tritador/ Homogeneizador de muestras.
- Mechero Bunsen
- Espátulas o cucharas estériles.
- Bolsas para Stomacher estériles con/sin filtro.
- Asas estériles
- Pipetas estériles de 1 ml
- Bolsas para Stomacher estériles con/sin filtro.
- Estufa regulable a $30 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Estufa regulable a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Baño de agua regulado a $44 - 47^\circ\text{C}$
- Tubos de vidrio de 10 x 75 mm.
- Placas Petri de 90 mm o 140 mm

Cepas para el control de calidad:

- *Bacillus cereus*
- *Bacillus subtilis*
- *Escherichia coli*

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recuento de <i>Bacillus cereus</i> presuntivo en alimentos	PNT-MA-10	
		Edición N° 01	Página 4 de 9

7. PROCESAMIENTO

Precauciones de seguridad e higiene: *B. cereus* está catalogado dentro del grupo 2 del RD 664/1997. Trabajar en cabina de flujo laminar o en la zona de protección de un mechero Bunsen.

7.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Consultar el PNT-MA-01b (Preparación de muestras para análisis microbiológico de alimentos) de este procedimiento SEIMC n° 78.

El procedimiento que se describe permite el recuento global de esporas y células vegetativas de *B. cereus* presuntivo. Hay que tener en cuenta que las esporas de la mayoría de las cepas de *B. cereus* germinan rápidamente en la superficie de los medios de cultivo utilizados para el recuento, por lo que no es necesario recurrir a ningún tratamiento de choque con calor para provocar la germinación. No obstante, si se requiere un recuento específico de esporas o se quiere inhibir el crecimiento de células vegetativas se puede realizar previamente un tratamiento de choque a la muestra a 70°C durante 15 minutos.

7.2. SIEMBRA, INCUBACIÓN Y SELECCIÓN DE PLACAS

Inmediatamente antes de utilizarse, secar bien las placas de agar MYP, preferiblemente con las tapas quitadas y la superficie del agar boca abajo, en estufa regulada a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ hasta que se seque la superficie del agar.

- Transferir, mediante una pipeta estéril, 0,1 ml de la muestra si es líquida o 0,1 ml de la suspensión madre (10^{-1}) para el resto de los productos, en la superficie de placas de 90 mm de agar MYP. Repetir la operación con la dilución 10^{-2} y las diluciones siguientes, si es necesario.

- Se inocula una placa por dilución para un mínimo de dos diluciones. De acuerdo con la norma ISO 7218 si solo se inocula una dilución se ha de realizar un duplicado.

- Si se desea proceder al recuento de pequeñas cantidades de *Bacillus cereus* se puede aumentar el límite de detección sembrando 1 ml de la muestra a analizar si es líquida o 1 ml de la suspensión inicial para el resto de productos, sobre la superficie de 3 placas de 90 mm con medio de agar *Bacillus cereus*. En este caso considerar las tres placas como una a efectos de recuento y confirmación. Si se emplean placas de 140 mm se puede extender el inóculo de 1 ml en la superficie de una única placa.

- Extender el inóculo cuidadosamente con un asa estéril sin tocar los bordes de la placa. Utilizar un asa diferente para cada placa. Dejar las placas, con las tapas quitadas, a temperatura ambiente durante 15 minutos para permitir la absorción del inóculo.

- Incubar en posición invertida a 30°C durante 18-24 h. Examinar las placas y reincubar 24 h más si no existe crecimiento visible.

- Transcurrido el período de incubación seleccionar aquellas placas, preferiblemente a nivel de dos diluciones sucesivas, que contengan menos de 150 colonias. Las colonias sospechosas de *B. cereus* son grandes, rosas, ya que no fermentan el manitol que contiene el medio, y generalmente están rodeadas de una

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recuento de <i>Bacillus cereus</i> presuntivo en alimentos	PNT-MA-10	
		Edición N° 01	Página 5 de 9

zona de precipitación por la producción de lecitinasa.

- Si se emplean placas de 140 mm seleccionar aquellas que contengan menos de 360 colonias.
- Si las placas contienen numerosos microorganismos fermentadores del manitol, la producción de gran cantidad de ácido puede reducir o anular el color rosa característico de las colonias de *B. cereus*.
- Algunas cepas de *B. cereus* producen una escasa cantidad de lecitinasa y también existen cepas lecitinasa negativas por lo que las colonias rosas sin halo de precipitación también se deben confirmar.

7.3 PRUEBAS DE CONFIRMACIÓN

Seleccionar 5 colonias sospechosas de cada placa. Si existen menos de 5 colonias sospechosas confirmarlas todas.

Se puede realizar la identificación de todas las colonias directamente mediante MALDI-TOF si se dispone de este instrumento; en caso contrario se seguirá el procedimiento como se indica a continuación.

Si las placas presentan sobrecrecimiento y no es posible seleccionar colonias convenientemente aisladas, estríar 5 colonias sospechosas en placas de agar MYP, incubar a 30°C durante 18-24 h y seleccionar, de cada placa, una colonia de color rosa.

Transferir las colonias seleccionadas a placas de agar sangre realizando las estrías de manera que se pueda interpretar correctamente la reacción de hemólisis e incubar a 30°C durante 24 ± 2 h.

7.4. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Test	Resultados que confirman <i>B. cereus</i> presuntivo
Crecimiento en agar MYP	Colonias rosas rodeadas de un halo de precipitación
Hemólisis	Reacción positiva (*)

(*): la anchura de la zona de hemólisis puede variar.

Control de calidad del agar sangre para el test de hemólisis:

Control positivo: *Bacillus cereus*. Zona clara de β-hemólisis alrededor de las colonias.

Control negativo: *Bacillus subtilis*. No hay zona de hemólisis.

El grupo *Bacillus cereus* es muy diverso, con 7 grupos filogenéticos y un elevado número de especies. Existen tests adicionales que se pueden realizar para complementar los anteriores sobre todo en estudios epidemiológicos:

- Detección de los genes codificadores de la citotoxina K, *cytK-1* y *cytK-2*. Permiten la identificación de *Bacillus cytotoxicus*. En el Anexo C de la norma ISO 7932:2004/Amd 1 :2020 se describe un método validado mediante PCR que detecta ambas variantes del gen *cytK*.

- Detección de cereulida. Es un dodecadepsipéptido resistente al calor responsable del síndrome emético en las intoxicaciones de algunas cepas del grupo *Bacillus cereus*. El protocolo de cuantificación de

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recuento de <i>Bacillus cereus</i> presuntivo en alimentos	PNT-MA-10	
		Edición N° 01	Página 6 de 9

cereulida se describe en la norma ISO 18465. En el Anexo D de la norma ISO 7932:2004/Amd 1 :2020 se describe un método validado mediante PCR que detecta el gen de la cereulida péptido sintetasa (ces), implicado en la síntesis no ribosomal de cereulida.

- Test de motilidad para el screening de *B. anthracis* presuntivo. Se describe en el Anexo E de la norma ISO 7932:2004/Amd 1 :2020.

- Examen microscópico para la visualización de cristales parasporales de *Bacillus thuringiensis*. Se describe en el Anexo F de la norma ISO 7932:2004/Amd 1 :2020.

De acuerdo con la norma ISO 7218 se pueden emplear otros procedimientos alternativos de confirmación una vez que hayan sido verificados por el laboratorio: otros procedimientos de identificación bioquímica, PCR, MALDI-TOF, etc.

8. CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS (ISO 7218)

8.1. CASO GENERAL

Utilizar los recuentos de las placas que contengan un máximo de 150 - 360 colonias características a nivel de dos diluciones consecutivas y que al menos una de las placas contenga 10 colonias características.

Se aplica el método de cálculo después de la identificación de las colonias, para lo cual en primer lugar se calcula el número de colonias por placa y a continuación el número de colonias por muestra.

Cálculo del número de colonias por placa:

Cuando el método utilizado requiere identificación de colonias, se identifica un número determinado A de colonias sospechosas (generalmente 5) de cada placa escogida para el recuento de colonias. Tras la identificación se calcula el número de colonias de cada placa "a" que cumplen los criterios de identificación, utilizando la ecuación:

$$a = \frac{b}{A} \times C$$

donde:

b: número de colonias características que responden a los criterios de identificación.

A: número de colonias ensayadas.

C: es el número total de colonias sospechosas contadas en cada placa.

Hay que redondear a números enteros. Si la cifra siguiente es inferior a 5, la cifra precedente no se modifica; si la cifra siguiente es superior o igual a 5, la cifra precedente se aumenta en 1 unidad.

Cálculo del número de colonias por muestra:

El número de microorganismos identificados N presentes en la muestra se calcula mediante la fórmula:

$$N = \frac{\sum a}{V \times 1,1^d}$$

Siendo V el volumen inoculado en cada placa y d la dilución correspondiente a la primera dilución escogida. (d=1, cuando no hay dilución; muestras líquidas, por ejemplo).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recuento de <i>Bacillus cereus</i> presuntivo en alimentos	PNT-MA-10	
		Edición N° 01	Página 7 de 9

El resultado se redondea como se ha descrito anteriormente y se expresa como un número comprendido entre 1,0 y 9,9 multiplicado por 10^x , donde x es la potencia apropiada de 10. Representa el número (ufc) de microorganismos por ml (para los productos líquidos) o por g (para el resto de productos) de muestra.

Si se emplea más de 1 dilución, el porcentaje entre el recuento de colonias de las 2 diluciones se espera que sea del 10%. Se deben aplicar los límites propuestos por la norma ISO 14461-2. Si no se cumplen, los resultados deben ser interpretados con precaución.

8.2. RECuentos BAJOS

8.2.1. Menos de 10 colonias. Caso en el que la placa de la muestra para análisis (productos líquidos), suspensión inicial (resto de productos) o primera dilución contiene menos de 10 colonias.

El intervalo óptimo de precisión corresponde a un recuento de entre 10 y 150- 360 colonias. La precisión disminuye rápidamente al reducirse el número de colonias por debajo de 10. Sin embargo, en función del objetivo del análisis, se puede definir un límite de determinación inferior basado en un recuento inferior a 10. Si la placa contiene menos de 10 colonias, pero como mínimo 4, el resultado se calcula siguiendo la fórmula del caso general, expresándolo como “*número estimado de microorganismos x por ml (productos líquidos) o por gramo (resto de productos)*”.

El término número estimado significa una estimación menos precisa del valor verdadero.

Si el resultado total oscila entre 1 y 3, la precisión del análisis es demasiado baja y el resultado debe expresarse como: “*Hay microorganismos presentes, pero a un nivel inferior a $(4 / V \cdot d)$ por gramo o ml*”.

8.2.2. Ausencia de colonias. Caso en que la placa de la muestra para análisis (productos líquidos), suspensión inicial (resto de productos), o primera dilución inoculada no contiene colonias. El resultado se expresa de la siguiente manera:

“Menos de $1/V \cdot d$ microorganismos por ml.” (productos líquidos) o “Menos de $1/V \cdot d$ microorganismos por gramo” (resto de productos).

d: es el factor de dilución de la suspensión inicial, o de la primera dilución inoculada o escogida ($d = 10^0 = 1$, cuando se inocula directamente la muestra para análisis).

V es el volumen de inóculo utilizado en ml.

8.3. RECuentos ALTOS

Si el recuento de colonias (colonias totales, colonias típicas/sospechosas) en todas las placas de todas las diluciones inoculadas es mayor de 150-360, el resultado se expresa de la siguiente manera:

$> (150-360/V \cdot d) \times b/A$, expresado en ufc por ml (productos líquidos) o ufc por g (resto de productos).

d es el factor de dilución correspondiente a la última dilución inoculada.

V es el volumen de inóculo incluido en cada placa en ml.

b es el número de colonias que cumple los criterios de identificación dentro de las colonias ensayadas A.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recuento de <i>Bacillus cereus</i> presuntivo en alimentos	PNT-MA-10	
		Edición Nº 01	Página 8 de 9

8.4. OTROS CASOS. Consultar la norma ISO 7218

En todos los casos el resultado se expresa como ufc /ml (para los productos líquidos), o ufc/g (para el resto de productos).

8.5. CÁLCULO DE INCERTIDUMBRE (U)

La norma ISO 17025 establece que los laboratorios de ensayo deben tener y deben aplicar procedimientos para estimar la incertidumbre de la medición en métodos cuantitativos.

Se recomienda aplicar lo establecido en la norma ISO 19036 que recoge una aproximación global a la incertidumbre de medida en ensayos microbiológicos adoptando un modelo *top-down* basado en la determinación de la desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorio. Es una aproximación basada en resultados experimentales, obtenidos por análisis repetido.

- Expresión de la incertidumbre en actividades de rutina:

Recuentos inferiores a 10 colonias por placa serán emitidos como estimados, como ya se ha descrito, y no procederá coherentemente la estimación de incertidumbre al no existir precisión y exactitud suficientes.

La estimación de incertidumbres aplicará para un número de colonias ≥ 10 y $\leq 150 - 360$ colonias por placa. Los resultados analíticos, cuando proceda, se expresarán como $N \pm U$, siendo N la mejor estimación del valor verdadero y U = incertidumbre expandida ($K = 2$).

8.6. INFORME DE ENSAYO

El informe de ensayo recogerá toda la información exigible según ISO 17025. La información requerida se define en la norma ISO 7932:

- Información necesaria para la completa identificación de la muestra.
- Especificar el método utilizado (ISO 7932).
- Se indicarán todos los detalles considerados opcionales.
- Resultado del análisis.
- Todos los detalles inherentes a cualquier incidencia que pueda influir en el resultado del ensayo.

9. RESPONSABILIDADES

El procesamiento de las muestras y todas las actividades de laboratorio, así como sus correspondientes registros, se realiza por técnicos superiores o por técnicos de grado medio de laboratorio, debidamente cualificados. La supervisión/validación la realiza el facultativo responsable y aplica a todas las actividades analíticas y no analíticas: revisión de procedimientos, controles de calidad y emisión e interpretación de resultados.

Los auxiliares técnicos que intervienen son responsables de llevar a cabo las actividades concernientes a la preparación de la muestra y la preparación de los materiales y medios de cultivo necesarios y de llevar los registros correspondientes.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Recuento de <i>Bacillus cereus</i> presuntivo en alimentos	PNT-MA-10	
		Edición N° 01	Página 9 de 9

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Controles de calidad

- Control de medios de cultivo:

Se realiza de acuerdo a lo establecido en la norma ISO 11133 que define los criterios de productividad, selectividad y especificidad de cada medio, así como las cepas de control empleadas en cada ensayo.

- Control de equipos:

Los equipos empleados en las actividades analíticas deben someterse a actividades periódicas de mantenimiento y de calibración o verificación de acuerdo a un plan establecido (ISO 7218).

- Controles de calidad del método:

Control de calidad interno:

- Controles de recuperación y de precisión mediante el empleo de muestras contaminadas artificialmente. Los resultados se aprovechan para la evaluación en continuo a través del empleo de gráficos de control.

- Control de precisión en muestras de rutina (duplicados de ensayo).

- Ensayos de muestras estériles (blancos), con el fin de controlar la esterilidad de los medios y materiales auxiliares utilizados y, en general, obtener información sobre la buena práctica en la realización de los análisis.

Control de calidad externo:

A través de la participación del laboratorio en ejercicios de intercomparación. Son pruebas de laboratorio realizadas sobre muestras preparadas por empresas especializadas acreditadas en las que se comparan los resultados analíticos obtenidos con los de otros laboratorios del mismo campo de actividad.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. UNE-EN ISO/ IEC 17025: Requisitos generales relativos a la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.

ANEXO I

Límites microbiológicos. Criterios de seguridad alimentaria. Reglamento (CE) 2073/2005 Relativo a los Criterios Microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

⁽¹⁰⁾ Sobre una placa de Petri de 140 mm de diámetro o tres placas de Petri de 90 mm de diámetro se siembra 1 ml de inóculo.

Categoría de alimentos	Microorganismos	Plan de muestreo ⁽¹⁾		Límites ⁽²⁾		Método analítico de referencia ⁽³⁾	Fase en la que se aplica el criterio	Acción en caso de resultados insatisfactorios
		n	c	m	M			
2.2.11. Preparados deshidratados para lactantes y alimentos dietéticos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes menores de seis meses	Presunto <i>Bacillus cereus</i>	5	1	50 ufc/g	500 ufc/g	EN/ISO 7932 ⁽¹⁰⁾	Final del proceso de fabricación	Mejoras en la higiene de la producción. Prevención de la recontaminación. Selección de las materias primas

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de larvas de <i>Anisakis</i> spp. en productos de la pesca	PNT-MA-11	
		Edición N° 01	Página 1 de 7

PNT-MA-11

Investigación de larvas de *Anisakis* spp. en productos de la pesca

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2022	Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de larvas de <i>Anisakis</i> spp. en productos de la pesca	PNT-MA-11	
		Edición N° 01	Página 2 de 7

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Establecer las condiciones para la investigación de larvas de *Anisakis* spp. en pescado y sus productos derivados. Este procedimiento es de aplicación a muestras de pescado frescas o congeladas.

El rango de aplicación del método es presencia o ausencia de *Anisakis* spp. en una cantidad determinada de producto analizado.

2. FUNDAMENTO

Se describe el procedimiento, basado en el método descrito por el Laboratorio Comunitario de Referencia en su documento "*Standard Operating Procedure (SOP) Artificial digestión fish fillets for the isolation of Anisakidae and Opisthorchidae larval stages*".

Bajo la denominación "*Anisakis*" se engloban los nematodos del género *Anisakis*, un grupo de parásitos que pueden incluir en su ciclo vital al ser humano.

Estas larvas tienen origen intestinal y su reservorio es el pescado (hospedador intermediario) y los mamíferos marinos (hospedador definitivo), siendo adquiridos por el hombre fundamentalmente con el consumo de carne de pescado parasitado con *Anisakis* spp.

La técnica se fundamenta en los siguientes procesos: digestión de la muestra de carne en solución ácida de pepsina durante 20 minutos, tamizado de la solución ácida e identificación de la presencia de larvas mediante examen visual con equipo con lentes de aumento.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Procedimiento, basado en el método descrito por el Laboratorio Comunitario de Referencia en su documento "*Standard Operating Procedure (SOP) Artificial digestión fish fillets for the isolation of Anisakidae and Opisthorchidae larval stages*".
- Reglamento (CE) n° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal.

4. MUESTRAS

Las muestras serán trozos de pescado con sospecha de contener larvas. La preparación de la muestra se realizará tal como se describe en este procedimiento.

Para el transporte de las muestras hasta el laboratorio consultar el PNT-MA-01a (Toma de muestras de alimentos, conservación y transporte) de este procedimiento SEIMC n° 78.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Se podrán emplear medios comerciales. Ajustarse rigurosamente a las indicaciones del fabricante.
- Ácido clorhídrico al 25%. Para su manejo se deberán seguir las instrucciones del fabricante, así como las condiciones generales para la preparación y control de medios de cultivo y reactivos. **PRECAUCIONES:** fuertemente corrosivo.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de larvas de <i>Anisakis</i> spp. en productos de la pesca	PNT-MA-11	
		Edición N° 01	Página 3 de 7

- Pepsina. Se podrá emplear pepsina de concentración de 1:10000 NF (*US Nacional Formulary*), correspondiente a 1:12 500 BP (*British Pharmacopea*) y a 2 00 FIP (*Fédération Internationale de Pharmacie*), o pepsina líquida estabilizada con pepsina mínima de 660 unidades/ml de la Farmacia Europea. Para su manejo seguir las instrucciones del fabricante, así como las condiciones generales para la preparación y control de medios de cultivo y reactivos. **PRECAUCIONES:** nocivo.
- Agua. Se podrá emplear agua con calidad mínima de agua potable.
- Solución salina. Se ajustará a la composición:

a.....	NaCl	8,5	g
b.....	Agua	1000	ml

6. APARATOS Y MATERIALES

- Pipetas calibradas de valor nominal 1000 µl con 10 µl de resolución, de 2-10 ml con 0,1 ml de resolución y de 25 ml con 0,2 ml de resolución.
- Puntas de pipetas estériles para pipetas automáticas de 10.000 µl y 1.000 µl.
- Pipeteador con capacidad para pipetas de 10 a 30 ml.
- Pipetas Pasteur desechables.
- Pipetas de vidrio de clase A, graduadas, con 0,1 ml de resolución de 10 ml, 20 ml y 30 ml de capacidad.
- Probeta graduada de 2 litros de capacidad.
- Recipientes capaces de contener 100 g de muestra, como por ejemplo placas Petri de 140 mm de diámetro.
- Recipientes con capacidad mínima de dos litros, con boca de diámetro con capacidad para soportar el tamiz, tales como: embudos de decantación, vasos de precipitado, etc.
- Soportes con anillos y fijaciones para los embudos.
- Tamices con malla de 180 micras y diámetro exterior de 11 cm, provisto de una rejilla de acero inoxidable.
- Vaso de precipitados de vidrio de capacidad mínima de 3 litros.
- Pinzas y o lancetas.
- Cubeta o placas Petri para el cómputo de larvas de características similares a las descritas en el procedimiento.
- Papel aluminio.
- Barras cubiertas de teflón de 5 cm para la agitación.
- Cuchillos o tijeras y pinzas para limpiar y manipular las muestras.
- Lámpara de UV capaz de emitir a longitud de onda 360 ± 20 nm.
- Lupa o estereomicroscopio, con una fuente de luz de intensidad regulable bajo la platina y posibilidad de observación con aumentos de 20 a 40 veces.
- Agitador magnético con placa térmica y temperatura controlada.
- Termómetro calibrado para el rango de 41°C con resolución mínima de 0,5°C.
- Reloj avisador o cronometro con una resolución de 1 segundo.
- Granatario o similar calibrado con 0,1 g de resolución.
- Refrigerador capaz de alcanzar una temperatura de $3 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Flexo.
- Guantes.
- Gafas de protección ocular.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de larvas de <i>Anisakis</i> spp. en productos de la pesca	PNT-MA-11	
		Edición N° 01	Página 4 de 7

7. PROCESAMIENTO

7.1. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD E HIGIENE

Anisakis spp. es un nematodo parásito patógeno, está catalogado dentro del grupo 2 de acuerdo a la Directiva 2000/54/CE y el RD 664/1997.

Eliminar los residuos de las muestras positivas en envase de residuos biopeligrosos, o en su defecto inertizar éstos mediante autoclave (121°C durante al menos 30 minutos) antes de su eliminación.

Emplear guantes y pipeteador para manejar el ácido clorhídrico, de modo opcional se podrán emplear gafas para prevenir salpicaduras.

7.2. MODO OPERATIVO

Se analizará una muestra de peso mínimo de 100 g de muestra. Se priorizará víscera sobre músculo. El peso de muestra se entenderá libre de grasa o fascias.

7.3 PRUEBAS DE CONFIRMACIÓN

Si la muestra está congelada, descongelar las muestras:

- a) Manteniendo la muestra en refrigeración hasta 72 horas.
- b) A temperatura ambiente un máximo de 6 horas.

Cuando el examen de una muestra de un resultado positivo o incierto, se tomará una nueva muestra de 100 g. Pesar en granatario un mínimo de 100 g de cada muestra.

7.4. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

7.4.1. Disección

- Diseccionar la muestra, de modo que se pueda observar el conjunto de la muestra. La observación se realizará macroscópicamente, pudiendo emplearse la lupa, para una observación más detallada.
- Los *Anisakis* spp. tienen forma de gusano. La larva de *Anisakis* spp. presenta diferente color según la especie de que se trate, son de color blanquecino a marrón (cuando están encapsulados en músculo de pez pueden pasar a color pardo). Tiene una longitud de 15 a 30 mm y un grosor de 0,2 a 0,6 mm. Frecuentemente se observan enrollados sobre sí mismos (figura 1).
- Cuando se observen anisakis, serán retirados con pinzas, y depositados en una placa o cubeta, con solución salina, iluminados con un flexo.
- Las larvas inmóviles se pellizcarán ligeramente con pinzas. Observar si las larvas se mueven a intervalos durante un periodo de 15 a 20 minutos. Si no hay movimiento dejar la cubeta a temperatura ambiente y observar la placa en las 24 horas siguientes.
- Se podrá observar fluorescencia, mediante la iluminación de la larva con lámpara de fluorescencia. Los *Anisakis* spp. fluorescentes se consideran anisakis muertos.
- Cuando se observe movimiento se considerará demostrada la presencia de larvas vivas y se dará por finalizado el análisis.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de larvas de <i>Anisakis</i> spp. en productos de la pesca	PNT-MA-11	
		Edición N° 01	Página 5 de 7

- Cuando no se encuentren *Anisakis* spp. o se encuentren larvas muertas se procederá a la digestión de la muestra.

Figura 1.- Larva de *Anisakis* spp.



7.4.2. Digestión

- Sobre un vaso de precipitados de 3 litros adicionar 2 litros de agua medidos con probeta, calentar en agitador magnético con placa térmica a $41 \pm 1^\circ\text{C}$, controlando la temperatura con termómetro. Introducir un agitador y comenzar la agitación.
- Añadir con una pipeta $16 \pm 0,5$ ml de HCl 25% sobre el agua precalentada.
- Pesar $10 \pm 0,2$ g de pepsina si esta es sólida, o añadir con pipeta $30 \pm 0,5$ ml si es líquida.

PRECAUCIONES: es importante el orden de adición de los reactivos ya que la pepsina requiere un medio ácido para su activación. Adicionar siempre el ácido sobre el agua y no al revés. Adicionar lentamente. La reacción del ácido con el agua es fuertemente exotérmica.

- Trocear con tijeras las muestras obtenidas. Los fragmentos no tendrán más de un centímetro de lado aproximadamente.
- Llevar el pescado o la muestra troceada al vaso de precipitados con los reactivos.
- Cubrir el vaso de precipitados con una hoja de papel de aluminio.
- Mantener la solución en agitación a $41 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 20 ± 5 minutos controlados con reloj avisador regulando la velocidad de agitación de modo que se forme un remolino profundo sin salpicaduras.
- Una vez efectuada la digestión, verter el líquido de digestión a través del tamiz en el embudo de separación.

7.4.3. Observación

- Observar el tamiz buscando la presencia de larvas. La observación podrá realizarse microscópicamente, ayudándose de lupa cuando sea necesario.
- Se podrá recoger el contenido del tamiz en placa o cubeta invirtiendo el tamiz y lavando con agua.

7.5. MUESTRAS DE ANÁLISIS DE MENOS DE 100 g

- Cuando sea necesario analizar una cantidad que no supere los 100 g podrá añadirse a una muestra blanco, ya testada, hasta completar los 100 g y seguir el método descrito anteriormente.
- En el caso de muestras de hasta 50 g los líquidos de digestión y los reactivos podrán reducirse a 1 litro de agua, 8 ml de ácido clorhídrico y 5 g de pepsina.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de larvas de <i>Anisakis</i> spp. en productos de la pesca	PNT-MA-11	
		Edición N° 01	Página 6 de 7

7.6. FINALIZACIÓN DEL ANÁLISIS

- Cuando no se observen larvas tras la digestión se dará por finalizado el análisis.
- Cuando se encuentren larvas en movimiento se considerará presencia de larvas de *Anisakis* spp. viables y se podrá dar por finalizado el análisis.
- Si se encuentran larvas de *Anisakis* spp. inmóviles se cubrirán de solución salina manteniéndose a temperatura ambiente durante al menos 24 horas. Durante este periodo se observará la presencia de movimiento. Si las larvas permanecen inmóviles se les dará ligeros pellizcos con las pinzas a fin de estimular su movimiento. También se observará la presencia de fluorescencia.
- Si transcurrido el periodo de 24 horas no se detectan movimientos y/o se detecta fluorescencia se considerará que hay presencia de larvas de *Anisakis* spp. no viables en la muestra.

8. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

El resultado se expresará como:

- Ausencia: cuando después de la disección y la digestión de la muestra no se observan larvas.
- Presencia: cuando por observación después de la disección y/o digestión se detectan larvas. En función de su movilidad se indica en el informe si se detectan larvas viables o no viables.

9. RESPONSABILIDADES

El procesamiento de las muestras y todas las actividades de laboratorio, así como sus correspondientes registros, se realiza por técnicos superiores o por técnicos de grado medio de laboratorio, debidamente cualificados.

La supervisión/validación la realiza el facultativo responsable y aplica a todas las actividades analíticas y no analíticas: revisión de procedimientos, controles de calidad y emisión e interpretación de resultados.

Los auxiliares técnicos que intervienen son responsables de llevar a cabo las actividades concernientes a la preparación de la muestra y la preparación de los materiales y medios de cultivo necesarios y de llevar los registros correspondientes.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Controles de calidad

Se realizan de acuerdo a lo establecido en el “*Standard Operating Procedure (SOP) Artificial digestion fish fillets for the isolation of Anisakidae and Opisthorchidae larval stages*”

- Control de equipos:

Los equipos empleados en las actividades analíticas deben someterse a actividades periódicas de mantenimiento y de calibración o verificación de acuerdo a un plan establecido (ISO 7218).

- Controles de calidad del método:

Control de calidad interno:

- Controles de recuperación y de precisión mediante el empleo de muestras contaminadas artificialmente.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de larvas de <i>Anisakis</i> spp. en productos de la pesca	PNT-MA-11	
		Edición N° 01	Página 7 de 7

Los resultados se aprovechan para la evaluación en continuo a través del empleo de gráficos de control.

- Control de precisión en muestras de rutina (duplicados de ensayo).
- Ensayos de muestras estériles (blancos), con el fin de controlar la esterilidad de los reactivos y materiales auxiliares utilizados y, en general, obtener información sobre la buena práctica en la realización de los análisis.

Control de calidad externo:

A través de la participación del laboratorio en ejercicios de intercomparación. Son pruebas de laboratorio realizadas sobre muestras preparadas por empresas especializadas acreditadas en las que se comparan los resultados analíticos obtenidos con los de otros laboratorios del mismo campo de actividad.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Standard Operating Procedure (SOP) Artificial digestion fish fillets for the isolation of Anisakidae and Opisthorchidae larval stages. Documento en vigor tras la revisión de 10-09-2014.
2. Directiva 2000/54/CE para la protección de los trabajadores relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo.
3. Real Decreto 664/1997 para la protección de los trabajadores relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo.
4. Real Decreto 1940/2004 sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos.
5. Real Decreto 1420/2006, de 1 de diciembre, sobre prevención de la parasitosis por *Anisakis* spp. en productos de la pesca suministrados por establecimientos que sirven comida a los consumidores finales o a colectividades.
6. Reglamento (CE) N° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de larvas de <i>Trichinella spiralis</i> en carne de cerdo	PNT-MA-12	
		Edición N° 01	Página 1 de 8

PNT-MA-12

Investigación de larvas de *Trichinella spiralis* en carne de cerdo

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2022	Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de larvas de <i>Trichinella spiralis</i> en carne de cerdo	PNT-MA-12	
		Edición N° 01	Página 2 de 8

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Establecer las condiciones para la realización de la investigación de larvas triquina en carne, utilizando el método de referencia descrito en la Norma Europea EN ISO 18743: Detección de *Trichinella Larvae* en carne. Método físico por digestión artificial.

Este procedimiento es de aplicación a muestras de tejido muscular de cerdo o jabalí frescas o congeladas. El rango de aplicación del método es presencia o ausencia de triquina en una cantidad determinada de producto analizado.

2. FUNDAMENTO

Bajo la denominación “triquina” se engloban los nematodos del género *Trichinella*, un grupo de parásitos que pueden incluir en su ciclo vital al ser humano. Larvas musculares de *Trichinella*; ML: primer estadio larvario (L1) de nematodos que pertenecen al género *Trichinella*, que se localizan en el músculo estriado de animales y que pueden infectar a los humanos.

Tienen origen intestinal y su reservorio es la población animal silvestre y de cría, siendo adquiridos por el hombre fundamentalmente con el consumo de carne de porcino y carne de caza, fundamentalmente de jabalí, parasitadas con triquina.

El fundamento de la técnica es el siguiente: digestión de la muestra de carne en solución ácida de pepsina durante 30 minutos, tamizado de la solución ácida y decantación de la solución tamizada e identificación de la presencia de larvas mediante examen visual con equipo con lentes de aumento.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Guidelines on minimum recommendations for official laboratory appointed for the detection of *Trichinella* in meat_LER
- Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de marzo de 2017, relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios,
- ISO DIS- 18743. Microbiology of food and animal feed — Detection of *Trichinella Larvae* in meat — Physical method by digestion.

4. MUESTRAS

Las muestras, un mínimo 10 g, serán trozos carne de cerdo o jabalí de localizaciones preferentes con sospecha de contener larvas. Las localizaciones preferentes de las larvas son los músculos diafragma y masetero en cerdo blanco, y diafragma, pata delantera, maseteros y lengua en jabalí.

La preparación de la muestra se realizará como se describe en este procedimiento.

Para el transporte de las muestras hasta el laboratorio consultar el PNT-MA-01a (Toma de muestras de alimentos, conservación y transporte) de este procedimiento SEIMC n° 78.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de larvas de <i>Trichinella spiralis</i> en carne de cerdo	PNT-MA-12	
		Edición N° 01	Página 3 de 8

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Se podrán emplear medios comerciales. Ajustarse rigurosamente a las indicaciones del fabricante.
- Ácido clorhídrico al 25%. Para su manejo se deberán seguir las instrucciones del fabricante, así como las condiciones generales para la preparación y control de medios de cultivo y reactivos. **PRECAUCIONES:** fuertemente corrosivo.
- Pepsina. Se podrá emplear pepsina de concentración de 1:10000 NF (*US Nacional Formulary*), correspondiente a 1:12 500 BP (*British Pharmacopea*) y a 2 00 FIP (*Fédération Internationale de Pharmacie*), o pepsina líquida estabilizada con pepsina mínima de 660 unidades/ml de la Farmacia Europea. Para su manejo seguir las instrucciones del fabricante, así como las condiciones generales para la preparación y control de medios de cultivo y reactivos. **PRECAUCIONES:** nocivo.
- Agua. Se podrá emplear agua con calidad mínima de agua potable.
- Etanol (alcohol etílico del 70% al 90%).
- Hipoclorito sódico.

6. APARATOS Y MATERIALES

- Recipientes capaces de contener 100 g de muestra, como por ejemplo placas Petri de 140 mm de diámetro.
- Embudos de separación cónicos de capacidad mínima de dos litros, con boca de diámetro con capacidad para soportar el tamiz y llaves de seguridad de teflón.
- Soportes con anillos y fijaciones para los embudos.
- Tamices con malla de 180 micras y diámetro exterior de 11 cm, provisto de una rejilla de acero inoxidable.
- Vaso de precipitados de vidrio de capacidad mínima de 3 litros.
- Probetas graduadas de vidrio de una capacidad de entre 50 ml, 100 ml, 1000 ml y de 2000 ml de capacidad.
- Cubeta para el cómputo de larvas de características similares a las descritas en el Reglamento capítulo 1 apartado 1 m.
- Puntas de pipetas estériles para pipetas automáticas de 10.000 µl y 1.000 µl.
- Papel aluminio.
- Barras cubiertas de teflón de 5 cm para la agitación.
- Cuchillos o tijeras y pinzas para limpiar y manipular las muestras.
- Pipetas Pasteur desechables.
- Pipetas de vidrio de clase A, graduadas, con 0,1 ml de resolución de 20 ml y 30 ml de capacidad.
- Pipetas calibradas de valor nominal 1000 µl con 10 µl de resolución, de 2-10 ml con 0,1 ml de resolución y de 25 ml con 0,2 ml de resolución.
- Mezclador de cuchillas o picadora.
- Triquinoscopio provisto de tabla horizontal o estereomicroscopio, con una fuente de luz de intensidad regulable bajo la platina y posibilidad de observación con aumentos de 20 a 40 veces y de 60 a 100 veces.
- Agitador magnético con placa térmica y temperatura controlada.
- Termómetro calibrado para el rango de 45°C con resolución mínima de 0,5°C.
- Reloj avisador o cronometro con una resolución de 1 segundo.
- Pipeteador con capacidad para pipetas de 10 a 30 ml.
- Granatario o similar calibrado con 0,1 g de resolución.
- Refrigerador capaz de alcanzar una temperatura de $3 \pm 2^\circ\text{C}$

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de larvas de <i>Trichinella spiralis</i> en carne de cerdo	PNT-MA-12	
		Edición N° 01	Página 4 de 8

7. PROCESAMIENTO

7.1. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD E HIGIENE

Trichinella spp. es un nematodo parásito patógeno, está catalogado dentro del grupo 2 de acuerdo a la Directiva 2000/54/CE y el RD 664/1997.

7.2. MODO OPERATIVO

- Se analizará una muestra de peso mínimo de 5 g de músculo estriado fresco o congelado. En caso de cerdas de cría o verracos se analizará un peso mínimo de 10 g.

- Los músculos preferentes en especies animales seleccionadas son: en cerdo doméstico diafragma y masetero, en jabalí diafragma, pata delantera y lengua.

De forma excepcional:

- Se puede analizar un peso mínimo de 1 g si la muestra procede de los pilares del diafragma o de 2 g si se trata de cerdos de cría o verracos. Se analizará el doble de cantidad cuando las muestras estén congeladas.

- El peso de muestra se entenderá libre de grasa o fascias. Si se utiliza tejido de lengua debe retirarse la superficie dura no digerible de tejido conectivo antes del ensayo.

7.3 PRUEBAS DE CONFIRMACIÓN

Si la muestra está congelada, descongelar las muestras:

- Manteniendo la muestra en refrigeración hasta 72 horas.
- A temperatura ambiente un máximo de 6 horas.

Se pueden combinar muestras individuales para obtener tandas de trabajo.

Cuando el examen de una muestra colectiva de un resultado positivo o incierto, se tomará una nueva muestra de 20 g de cada cerdo. Las muestras de 20 g procedentes de cinco cerdos se analizarán según el método descrito en este procedimiento.

Si se detectan triquinas en el grupo de muestras de cinco cerdos, se tomarán nuevas muestras de 20 g de cada animal del grupo y se analizarán por separado.

- Pesar en granatario, un mínimo de 5 g de cada muestra. Puede realizarse la pesada por adición de las muestras hasta completar un grupo de trabajo, verificando que cada pesada individual está dentro de las tolerancias y que el peso de la tanda se encuentra entre 100 g y 115 g.

- Se debe tener la precaución de que cada porción de muestra para análisis está libre de grasa y fascias para lo que, si es necesario, se procederá a su limpieza con cuchillo o tijeras y pinzas antes de proceder a su pesada.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de larvas de <i>Trichinella spiralis</i> en carne de cerdo	PNT-MA-12	
		Edición N° 01	Página 5 de 8

7.4. MUESTRAS DE ANÁLISIS DE 100 g PESO TOTAL

7.4.1. Digestión

- Sobre un vaso de precipitado de 3 litros adicionar 2 litros de agua medidos con probeta, calentar en agitador magnético con placa térmica a $47 \pm 2^\circ\text{C}$, controlando la temperatura con termómetro. Introducir un agitador y comenzar la agitación.
- Añadir con una pipeta $16 \pm 0,5$ ml de HCl 25% sobre el agua precalentada.
- Pesar $10 \pm 0,2$ g de pepsina si esta es sólida, o añadir con pipeta $30 \pm 0,5$ ml si es líquida.

PRECAUCIONES: es importante el orden de adición de los reactivos ya que la pepsina requiere un medio ácido para su activación. Adicionar siempre el ácido sobre el agua y no al revés. Adicionar lentamente. La reacción del ácido con el agua es fuertemente exotérmica.

- Triturar en la picadora las muestras obtenidas en hasta obtener una homogeneización completa de densidad pastosa. La homogeneización de la muestra mejora si en la picadora y antes del picado se adiciona una pequeña cantidad de agua, alrededor de 20 ml obtenidos del agua precalentada preparada para la digestión. La mezcla/trituración debería prolongarse hasta que la carne quede bien troceada o picada (normalmente 5 ciclos de 5 segundos a 10 segundos cada uno) pero no debe prolongarse tanto como para dañar las larvas.
- Llevar la carne picada obtenida al vaso de precipitados con los reactivos.
- Enjuagar la picadora con una pequeña cantidad de líquido de digestión para quitar la carne que aún esté adherida.
- Cubrir el vaso de precipitados con una hoja de papel de aluminio.
- Mantener la solución en agitación a $45 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 30 minutos controlados con reloj avisador regulando la velocidad de agitación de modo que se forme un remolino profundo sin salpicaduras. En caso necesario, el tiempo de digestión puede prolongarse, pero no debe superar un tiempo total de 60 minutos.
- Una vez efectuada la digestión, verter el líquido de digestión a través del tamiz en el embudo de separación.
- Se enjuaga el vaso de precipitado de vidrio y el tamiz con un volumen adicional de agua corriente (100 ml como mínimo) para evitar pérdidas de larvas debido a que las larvas hayan quedado adheridas a la superficie del vaso de precipitados y del tamiz.
- Se considera satisfactorio el proceso de digestión si no permanece más del 5% del peso de la muestra en el tamiz. Si permanece tejido no muscular o tejido muscular no digerido en el tamiz en una cantidad superior a la indicada anteriormente, debe repetirse el proceso de digestión.

7.4.2. Decantación

- Dejar el líquido de digestión en el embudo durante 30 minutos controlados con reloj avisador.
- Abrir con rapidez y hasta su tope la llave de teflón y traspasar 40 ml del líquido de digestión a la probeta graduada. La apertura rápida y completa de la llave evita que las larvas queden adheridas a las paredes del embudo de decantación.
- Si por cualquier circunstancia se invalida el volumen decantado deberá realizarse un nuevo proceso de digestión.
- Si las muestras de músculo se han congelado antes de la digestión, es probable que las larvas de las

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de larvas de <i>Trichinella spiralis</i> en carne de cerdo	PNT-MA-12	
		Edición N° 01	Página 6 de 8

especies de *Trichinella* susceptibles a la congelación hayan muerto. Dado que dichas larvas se desenroscan tras su liberación del tejido muscular, su velocidad de sedimentación se reduce. Por consiguiente, el tiempo de sedimentación de las muestras musculares congeladas en las que se supone encontrar larvas muertas debe prolongarse hasta 60 minutos.

7.4.3. Obtención de la alícuota de la muestra para observación microscópica

- Dejar reposar a temperatura ambiente los 40 ml obtenidos en la decantación en probeta durante 10 minutos, controlados con reloj avisador.
- Aspirar, con cuidado para no agitar las capas formadas, 30 ml de líquido sobrenadante empleando una pipeta Pasteur desechable. Dejar un volumen de 10 ml.
- La muestra de 10 ml se verterá en la cubeta para el cómputo de larvas.
- Enjuagar la probeta que contuvo los 40 ml obtenidos en la primera decantación con un máximo de 10 ml de agua. Adicionar a la cubeta para proceder a su observación.

7.4.4. Observación microscópica

- Los líquidos de digestión se deben examinar de forma inmediata a su preparación; si ello no es posible, deben almacenarse en condiciones de refrigeración y el medio líquido de digestión debe examinarse el mismo día de la digestión.
- Empleando un triquinoscopio se deberá observar toda la superficie de la cubeta con un aumento de 10 a 20 veces siguiendo una sistemática de rastreo de izquierda a derecha y de arriba abajo.
- Cuando se observen zonas sospechosas o formas similares a parásitos deberán aplicarse aumentos de entre 60 y 100 veces.
- Es aconsejable durante la visualización enfocar y desenfocar la lente para mejorar la visualización en las diferentes capas de sedimento.
- Si se observa la presencia de *Trichinella* spp. las larvas deben transferirse lo más rápidamente posible a un vial pequeño de (de 1 ml a 2 ml) lleno de alcohol etílico del 70% al 90% (concentración final) para su conservación.
- Si las muestras de músculo se han congelado antes de la digestión, es probable que las larvas de las especies de *Trichinella* sensibles a la congelación hayan muerto. Las larvas muertas pueden tener una apariencia transparente y no enroscada; por lo tanto, su detección con el microscopio es difícil y debe prestarse una atención especial durante el examen del medio líquido de digestión.

7.4.5. Clarificación de la muestra tras la etapa de decantación

- Si el sedimento no es transparente y dificulta su observación, verter la muestra en una probeta graduada, llevar su volumen a 40 ml con agua y seguir el procedimiento descrito anteriormente.
- Este procedimiento podrá realizarse de 2-4 veces hasta que el líquido sea lo suficientemente claro como para una lectura fiable.
- Los medios líquidos (medios líquidos de digestión, sobrenadantes, líquidos de enjuagado, etc.) con larvas de *Trichinella* spp. deben descontaminarse por calentamiento a una temperatura no inferior a 70°C o por medios químicos alternativos (por ejemplo, con hipoclorito sódico a una concentración final del 0,01% de cloro activo, durante 3 horas como mínimo), antes de su lavado o su eliminación.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de larvas de <i>Trichinella spiralis</i> en carne de cerdo	PNT-MA-12	
		Edición N° 01	Página 7 de 8

7.5. MUESTRAS DE ANÁLISIS DE MENOS DE 100 g

- Cuando sea necesario analizar una cantidad que no supere los 15 g podrá añadirse a un grupo completo de 100 g y seguir el método descrito anteriormente.
- Las cantidades superiores a 15 g deberán analizarse como grupos completos.
- En el caso de grupos de hasta 50 g los líquidos de digestión y los reactivos podrán reducirse a 1 litro de agua, 8 ml de ácido clorhídrico y 5 g de pepsina.

8. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

El resultado se expresará como larvas de *Trichinella* “presencia” o “ausencia” en “X” gramos de muestra

9. RESPONSABILIDADES

El procesamiento de las muestras y todas las actividades de laboratorio, así como sus correspondientes registros, se realiza por técnicos superiores o por técnicos de grado medio de laboratorio, debidamente cualificados. La supervisión/validación la realiza el facultativo responsable y aplica a todas las actividades analíticas y no analíticas: revisión de procedimientos, controles de calidad y emisión e interpretación de resultados.

Los auxiliares técnicos que intervienen son responsables de llevar a cabo las actividades concernientes a la preparación de la muestra y la preparación de los materiales y medios de cultivo necesarios y de llevar los registros correspondientes.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Controles de calidad

Se realizan según lo descrito en la Norma Europea EN ISO 18743: Detección de *Trichinella* Larvae en carne. Método físico por digestión artificial.

- Control de equipos:

Los equipos empleados en las actividades analíticas deben someterse a actividades periódicas de mantenimiento y de calibración o verificación de acuerdo a un plan establecido (ISO 7218).

- Controles de calidad del método:

Control de calidad interno:

- Controles de recuperación y de precisión mediante el empleo de muestras contaminadas artificialmente. Los resultados se aprovechan para la evaluación en continuo a través del empleo de gráficos de control.
- Control de precisión en muestras de rutina (duplicados de ensayo).
- Ensayos de muestras estériles (blancos), con el fin de controlar la esterilidad de los reactivos y materiales auxiliares utilizados y, en general, obtener información sobre la buena práctica en la realización de los análisis.

Control de calidad externo:

A través de la participación del laboratorio en ejercicios de intercomparación. Son pruebas de laboratorio realizadas sobre muestras preparadas por empresas especializadas acreditadas en las que se comparan los resultados analíticos obtenidos con los de otros laboratorios del mismo campo de actividad.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de larvas de <i>Trichinella spiralis</i> en carne de cerdo	PNT-MA-12	
		Edición N° 01	Página 8 de 8

11. BIBLIOGRAFÍA

1. RD 664/1997 para la protección de los trabajadores relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo.
2. Real Decreto 1940/2004 sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos.
3. UNE-EN ISO 18743 (febrero 2016) Microbiología de la cadena alimentaria. Detección de *Trichinella larvae* en carne. Método físico por digestión artificial (ISO18743:2015).
4. UNE-EN ISO 7218, febrero 2008 Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Requisitos generales y guía para el examen microbiológico. (ISO7218:2007) y Amd 1 (ISO 7218:2007/Amd 1:2013).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Norovirus</i> en alimentos	PNT-MA-13	
		Edición N° 01	Página 1 de 27

PNT-MA-13 Investigación de *Norovirus* en alimentos

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2022	Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Norovirus</i> en alimentos	PNT-MA-13	
		Edición N° 01	Página 2 de 27

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo del presente procedimiento es estandarizar la metodología para la investigación de *Norovirus* y unificar criterios de aplicación para el procesamiento de muestras de alimentos.

2. FUNDAMENTO

Este documento, basado en la norma ISO 15216-2, especifica un método horizontal para la detección de *Norovirus*, en una cantidad de masa o volumen determinados. Este método, utiliza la técnica de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en tiempo real en un solo paso, para la detección de patógenos transmitidos por alimentos.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Microbiology of the food chain – Horizontal method for the determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR – Part 2: Method for detection ISO 15216.
- Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — Requirements for amplification and detection for qualitative methods. ISO 20838/2006.
- Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations – ISO 7218.

4. DEFINICIONES

4.1. DETECCIÓN DE *Norovirus*

Detección de ARN de *Norovirus* en una masa o volumen predeterminados de alimentos, o área de superficie de alimentos.

4.2. VIRUS PARA CONTROL DE PROCESO

Virus agregado a la porción de muestra antes de realizar la extracción, para controlar la eficiencia de la misma.

4.3. ARN VIRAL PARA CONTROL DE PROCESO

ARN liberado del virus para control de proceso, que se utiliza para producir datos de la curva estándar para la estimación de la eficiencia de extracción.

4.4. ARN VIRAL PARA CONTROL DE PROCESO

Control libre de ARN diana sometido a todos los pasos del procedimiento de extracción y detección de ARN para monitorizar cualquier evento de contaminación cruzada

4.5. CONTROL NEGATIVO DE PROCESO

Muestra libre de patógenos de la matriz alimentaria que pasa por todas las etapas del proceso analítico.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Norovirus</i> en alimentos	PNT-MA-13	
		Edición N° 01	Página 3 de 27

4.6. Sonda de hidrólisis

Sonda fluorescente acoplada a una molécula fluorescente y a una molécula extintora, que se separan estéricamente por la actividad exonucleasa 5'-3' de la enzima durante el proceso de amplificación.

4.7. CONTROL NEGATIVO DE RT-PCR

Alícuota de agua altamente pura utilizada como plantilla en una reacción de RT-PCR en tiempo real para controlar la contaminación en los reactivos de RT-PCR en tiempo real.

4.8. CONTROL EXTERNO DE (CE ARN)

ARN de referencia que se puede utilizar para evaluar la inhibición de la amplificación de una reacción de RT-PCR en tiempo real adecuada, que se agrega a una alícuota de muestra de ARN en una cantidad determinada en una reacción separada.

Ejemplo: ARN sintetizado por transcripción *in vitro* a partir de un plásmido que lleva una copia del gen diana.

4.9. VALOR C_q

Ciclo de cuantificación correspondiente al momento de la reacción donde se cuantifica el objetivo para una determinada reacción de RT-PCR en tiempo real.

Nota: este corresponde al punto en el que la fluorescencia de la reacción supera el nivel de umbral.

5. MUESTRAS

5.1. RECEPCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO

- Es importante que el laboratorio reciba una muestra verdaderamente representativa que no haya sido dañada o cambiada durante su transporte o almacenamiento.
- Al recibir la muestra en el laboratorio se comprueba su estado, se revisan los recipientes buscando defectos físicos aparentes, se registra la fecha y hora de la recepción, así como la fecha y hora de la toma de muestra. En el caso de muestras perecederas se registra la temperatura de transporte o la temperatura de una muestra ficticia incluida con esta finalidad.
- Si durante el transporte se hubiera modificado el estado físico original de la muestra, se reflejará en el informe de ensayo por los posibles cambios microbiológicos producidos (por ejemplo, muestra congelada en origen y recibida descongelada).
- La muestra ha de venir acompañada de una solicitud de análisis donde debe estar detallado el perfil microbiológico a determinar en función del estudio epidemiológico del brote.
- Las muestras admitidas en el laboratorio se documentan de manera que se pueda seguir su evolución a lo largo del tiempo hasta el momento de elaborar el informe de análisis. La identidad, codificación y los

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Norovirus</i> en alimentos	PNT-MA-13	
		Edición N° 01	Página 4 de 27

registros deben asegurar su trazabilidad a lo largo de todas las etapas de su paso por el laboratorio.

- Una vez recibida la muestra, si se va a analizar dentro de las 24 horas, se almacena a 5°C. Caso contrario, se almacena a -70°C para evitar cualquier tipo de alteración.

- Las muestras se analizan lo antes posible tras su recepción, preferiblemente en un plazo de 24 horas.

5.2. CONSERVACIÓN DE MUESTRAS DESPUÉS DEL ANÁLISIS

En general, las muestras se conservan hasta que se hayan obtenido todos los resultados, o durante un tiempo mayor si fuera necesario. Se empaquetan en un recipiente estéril (bolsa de plástico) y se devuelven a su temperatura de almacenamiento.

5.3. TRATAMIENTO DE RESIDUOS

Deben cumplirse las disposiciones nacionales sobre seguridad y medio ambiente. Debe establecerse un sistema de identificación de materiales y de sus recipientes para:

- Residuos no contaminados (restos de alimentos no analizados) que se pueden eliminar junto con los residuos generales.
- Material contaminado, para su autoclavado y eliminación o solo para eliminación si va a ser incinerado.
- Material contaminado para autoclavado y reciclado.
- Otros materiales.

6. REACTIVOS, SOLUCIONES Y MATERIALES DE CONTROL

6.1. REACTIVOS Y SOLUCIONES

- Agua calidad biología molecular
- Polietilenglicol (PEG), masa molecular relativa promedio de 8000
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Cloruro de potasio (KCl)
- Fosfato de hidrógeno disódico (Na_2HPO_4)
- Fosfato dihidrógeno de potasio (KH_2PO_4)
- Tris b
- Glicina
- Extracto de carne en polvo
- Proteinasa K
- Pectinasa de *Aspergillus niger* o *Aspergillus aculeatus*
- Cloroformo
- N-Butanol
- Hidróxido de sodio (NaOH) ($\geq 10 \text{ mol/l}$)
- Ácido clorhídrico (HCl) ($\geq 5 \text{ mol/l}$)
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sal disódica dihidratada
- Sílica y tampones de lisis, lavado y elución para la extracción de ARN viral (los reactivos deben ser capaces de tratar 500 μl de extracto de muestra, por reacción de lisis en un tampón caotrópico que contiene tiocianato de guanidinio y utilizando sílice como matriz de captura de ARN).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Norovirus</i> en alimentos	PNT-MA-13	
		Edición N° 01	Página 5 de 27

Después del tratamiento del ARN unido a sílice con uno o más tampones de lavado eliminando impurezas, el ARN debe eluirse en 100 µl de tampón de elución).

- Reactivos para RT-PCR en tiempo real de un solo paso (los reactivos deben permitir el tratamiento de 5 µl de ARN en un volumen total de 25 µl. Deben ser aptos para RT-PCR en un solo paso en tiempo real utilizando sondas de hidrólisis. La ADN polimerasa utilizada, debe tener una actividad de exonucleasa 5'-3' y suficiente sensibilidad para la detección de concentraciones esperadas de ARN viral en alimentos y superficies contaminadas con el virus).
- Primers y sondas de hidrólisis para la detección de norovirus GI y GII.
- Primers y sondas para la detección del virus de control de proceso.

6.2. REACTIVOS PREPARADOS

- Solución 5 x PEG/NaCl (500 g/l PEG 8000, 1,5 mol/l NaCl)
- Mezcla cloroformo/butanol (1:1 v/v)
- Solución de proteinasa K (3000 U/l)
- Solución salina tamponada con fosfato (PBS)
- Buffer tris/glicina/extracto de carne (TGBE)
- Solución Tris (1 mol/l)
- Solución de EDTA (0,5 mol/l)
- Buffer Tris EDTA (TE) (Tris 10 mmol/l, EDTA 1 mmol/l)
- MasterMix RT-PCR en tiempo real para la detección de norovirus y del virus de control de proceso (los reactivos se deben agregar en las cantidades que especifica el fabricante, teniendo en cuenta que se utilizan 20 µl de MasterMix en un volumen total de reacción de 25 µl).
- Virus para control de proceso.

La solución madre del virus para control de proceso debe diluirse en un factor mínimo de 10 en un tampón adecuado, por ejemplo: PBS. Esta dilución debe permitir la detección sin inhibición del genoma del virus de control de proceso durante la RT-PCR en tiempo real, pero aun así debe estar lo suficientemente concentrada para permitir la determinación reproducible de la dilución más baja utilizada para la curva estándar de ARN del virus de control de proceso (ver punto 8.4.2. de este PNT). Dividir la solución del virus de control de proceso en alícuotas de un solo uso y almacenarlas a una temperatura $\leq -15^{\circ}\text{C}$. Consultar el Anexo D para obtener detalles ilustrativos de la preparación del virus de control de proceso.

- Control externo de amplificación (CE ARN)

Se utilizará ARNss purificado que lleve la secuencia diana para el virus diana. Deberá contener niveles de ADN diana contaminante no superiores al 0,1% y no deberá provocar la inhibición de la RT-PCR. Se determinará la concentración de cada solución madre del control externo de amplificación (CE ARN) en copias por microlitro y se diluirán en un tampón apropiado (por ejemplo: TE) hasta una concentración de 1×10^2 a 1×10^5 copias de ADN por microlitro.

Dado que el EDTA puede actuar como inhibidor de la RT-PCR, el tampón utilizado para diluir el CE de ARN no debe contener EDTA en concentraciones más altas a 1 mmol/l. Dividir la preparación del control externo de amplificación (CE ARN) diluida, en alícuotas de un solo uso y almacenar a 5°C hasta 24 h, a $\leq -15^{\circ}\text{C}$ hasta 6 meses, o a $\leq -70^{\circ}\text{C}$ para un almacenamiento más prolongado. Consultar el Anexo F para detalles de un ejemplo de preparación de CE de ARN.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Norovirus</i> en alimentos	PNT-MA-13	
		Edición N° 01	Página 6 de 27

6.3. MATERIALES DE CONTROL

6.3.1. Virus para control de proceso

Se pueden producir pérdidas del virus objetivo en varias etapas durante la extracción del virus de la muestra y la extracción del ARN. Para controlar estas pérdidas, las muestras se enriquecen antes del procesamiento con una cantidad definida de un virus de control de proceso. El nivel de recuperación del virus de control de proceso se determinará para cada muestra.

El virus seleccionado para su uso como control de proceso, debe ser:

- un virus ARNss de sentido positivo, sin envoltura, cultivable y de un tamaño similar al virus objetivo, para proporcionar un buen modelo morfológico y fisicoquímico.
- deberá mostrar una persistencia en el medio ambiente similar a la del objetivo.
- deberá ser lo suficientemente distinto genéticamente al virus objetivo para que los ensayos de PCR no reaccionen de forma cruzada.
- su presencia en los alimentos o en las superficies no debería ser posible.

En el Anexo D se proporciona un ejemplo para la preparación del virus de control de proceso.

6.3.2. Control externo de amplificación (CE ARN)

Muchos productos alimenticios contienen sustancias que inhiben la RT-PCR. Para controlar esta inhibición de la RT-PCR en muestras individuales, se agrega un control externo de amplificación (CE ARN - especie de ARN que porta la secuencia diana de interés) a una alícuota de ARN de muestra y se analiza mediante el método de RT-PCR. La comparación de los resultados del ensayo con los resultados del CE ARN en ausencia de muestra de ARN, permite la determinación del nivel de inhibición de RT-PCR en cada muestra analizada. Además, en este método, el CE ARN actúa como un control positivo de la RT-PCR.

7. APARATOS Y MATERIALES

- Pinzas estériles
- Pipetas Pasteur estériles
- Tijeras y/o bisturíes estériles
- Fórceps estériles
- Cuchillos estériles
- Vórtex
- Refrigerador a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$
- Agitador capaz de operar a 500 oscilaciones/min
- Incubadora con agitación capaz de operar a $37^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ y 320 ± 20 oscilaciones/min o equivalente
- Agitadores de placas para utilizar a temperatura ambiente y a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de 60 ± 5 oscilaciones/min o equivalente
- Aspirador o equipo equivalente para remover sobrenadante
- Bloques de calentamiento capaces de operar a $95^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ o equivalente
- Baño de agua termostático capaz de operar a $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ o equivalente
- Centrifuga(s) y rotor(es) con las siguientes características:
 - a) 10000 x g a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ con capacidad para tubos de 35 ml
 - b) 10000 x g a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ con capacidad para tubos de 2 ml resistentes al cloroformo
 - c) 4000 x g operando con filtros centrífugos concentradores
- Microcentrifuga

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Norovirus</i> en alimentos	PNT-MA-13	
		Edición N° 01	Página 7 de 27

- Botellas, tubos de centrifuga y microcentrifuga de distintas capacidades 1,5 ml, 5 ml, 15 ml, 50 ml, etc.
- Hisopos estériles
- Bolsas de Stomacher con filtro (400 ml)
- Filtro de membrana con carga positiva con un tamaño de poro de 0,45 μm (47 mm de diámetro)
- Fuente de vacío o equipo de presión positiva equivalente y torre de filtrado con apertura para membrana de 47 mm de diámetro
- Filtros centrífugos concentradores con 15 ml de capacidad y corte de masa molecular relativa de 100 kDa
- Pipetas graduadas estériles con capacidad nominal de 5 ml y 10 ml
- Placas de Petri estériles
- Guantes de seguridad resistentes
- Balanza granataria sensibilidad $\pm 0,1$ g
- Equipo de esterilización
- Cabina de flujo laminar
- Peachímetro
- Equipo de extracción de ARN
- Cabina de seguridad biológica clase II
- Equipo de PCR en tiempo real
- Micropipetas con capacidad 10 μl , 20 μl , 200 μl y 1000 μl
- Tips con filtro
- Consumibles asociados a la RT-PCR en tiempo real

8. PROCESAMIENTO

8.1. PROCESAMIENTO GENERAL

Es importante que el laboratorio reciba una muestra representativa y sin daños ni modificaciones durante el transporte o almacenamiento, es decir, muestras congeladas no deben descongelarse antes de su recepción en el laboratorio.

El procedimiento debe realizarse como se muestra en el Anexo A.

Nota: los pasos de extracción y PCR deben realizarse en áreas separadas.

8.2. EXTRACCIÓN DEL VIRUS

La elección del método a utilizar depende del tipo de matriz a analizar.

8.2.1. Virus para control de proceso

Antes de procesar un lote de muestras, combinar la cantidad suficiente de alícuotas del virus de control de proceso para todas las muestras a analizar (calcular 10 μl por muestra más un excedente de 25 μl).

Conservar una alícuota de 20 $\mu\text{l} \pm 1$ μl del virus de control de proceso para la extracción de ARN y preparación de la curva estándar de ARN del virus de control de proceso (ver punto 8.4.2 de este PNT). Conservar a 5°C $\pm$ 3°C hasta 24 h, a $\leq -15^\circ\text{C}$ hasta 6 meses, o a una temperatura $\leq -70^\circ\text{C}$ para un almacenamiento más prolongado.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Norovirus</i> en alimentos	PNT-MA-13	
		Edición N° 01	Página 8 de 27

8.2.2. Control negativo de proceso

Se debe ejecutar una muestra de control negativo de proceso en paralelo con las muestras a analizar.

8.2.3. Superficies

Utilizando un hisopo de algodón estéril pre-humedecido con PBS, frotar intensamente la superficie a analizar (área máxima 100 cm²), aplicando un poco de presión para permitir la separación de las partículas del virus. Registrar el área aproximada del hisopado en centímetros cuadrados.

Procesar la muestra inmediatamente. De no ser así, colocar el hisopo en un recipiente adecuado y conservar a 5°C ± 3°C hasta 72 h, a ≤ -15°C hasta 6 meses, o a una temperatura ≤ -70°C para un almacenamiento más prolongado.

Agregar 10 µl ± 0,5 µl del virus de control de proceso (8.2.1). Inmediatamente después de agregar el virus de control de proceso, sumergir el hisopo en un tubo que contenga 490 µl ± 10 µl de tampón de lisis. Luego presionar contra la pared del tubo para liberar el líquido. Repetir el ciclo de inmersión y prensado, tres o cuatro veces para asegurar la máxima liberación de virus.

Continuar con la extracción de ARN (ver punto 8.3. de este PNT).

8.2.4. Frutos rojos y hortalizas de hoja, tallo y bulbo

Los frutos rojos y las hortalizas de hoja, tallo y bulbo para análisis pueden ser frescos o congelados. Las muestras no deben haber sido sometidas a ningún otro proceso que no sea trocear, cortar, lavar, descontaminar, envasar, etc. El barro adherido a la superficie de las muestras, debe eliminarse antes del análisis frotando suavemente, pero sin sumergir las muestras en agua.

Picar 25 ± 0,3 g de frutos rojos u hortalizas en trozos de aproximadamente 2,5 cm x 2,5 cm x 2,5 cm (si las frutas individuales son más pequeñas no es necesario picar). Transferir al compartimento de muestras de una bolsa con filtro de 400 ml. Añadir 10 µl ± 0,5 µl del virus de control de proceso (8.2.1) a la muestra. Agregar 40 ml ± 1 ml de tampón TGBE (para muestras de frutos rojos, agregar como tampón ≥ 30 unidades de pectinasa de *A. niger* o ≥ 1140 unidades de pectinasa de *A. aculeatus*).

Incubar a temperatura ambiente con agitación constante a una velocidad aproximada de 60 oscilaciones/min durante 20 min ± 1 min. En el caso de los frutos rojos ácidos, el pH del eluato debe controlarse cada 10 min durante la incubación. Si el pH cae por debajo de 9,0 deberá ajustarse a 9,5 ± 0,5 con NaOH. Prolongar el período de incubación durante 10 min cada vez que se ajuste el pH. No hacer más de tres ajustes de pH por muestra. Decantar el eluato del compartimento filtrado en un tubo de centrifuga (utilizar dos tubos si es necesario para recoger todo el volumen).

Clarificar por centrifugación a 10000 x g durante 30 min ± 5 min a 5°C ± 3°C. Decantar el sobrenadante en un solo tubo y ajustar el pH a 7,0 ± 0,5 con HCl (≥ 0,5 mol/l).

Añadir 0,25 volúmenes de solución 5 x PEG/NaCl (para obtener una concentración final de 100 g/l PEG, 0,3 mol/l NaCl). Homogeneizar agitando durante 60 segundos ± 5 segundos y luego incubar con agitación constante a una velocidad de aproximadamente 60 oscilaciones/min a 5°C ± 3°C durante 60 min ± 5 min.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Norovirus</i> en alimentos	PNT-MA-13	
		Edición N° 01	Página 9 de 27

Centrifugar a $10000 \times g$ durante $30 \text{ min} \pm 5 \text{ min}$ a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ (dividir el volumen en dos tubos de centrifuga si es necesario).

Decantar y desechar el sobrenadante, luego centrifugar a $10000 \times g$ durante $5 \text{ min} \pm 1 \text{ min}$ a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ para compactar el precipitado.

Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado en $500 \mu\text{l} \pm 10 \mu\text{l}$ de PBS. Para muestras que producen gránulos grandes después de la centrifugación, es posible que se requiera un volumen mayor de hasta $1000 \mu\text{l} \pm 20 \mu\text{l}$ de PBS, para resuspender completamente el gránulo. Si una sola muestra se ha dividido en dos tubos, volver a suspender ambos pellets paso a paso en la misma alícuota de PBS.

Para la extracción de hortalizas de hoja, tallo y bulbo, transferir la suspensión a un tubo adecuado y conservarla para la extracción de ARN. El extracto de la muestra se debe procesar inmediatamente, o almacenarlo a $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ hasta 24 h, a $\leq -15^\circ\text{C}$ hasta 6 meses, o a una temperatura $\leq -70^\circ\text{C}$ para un almacenamiento más prolongado.

Para la extracción de frutos rojos, se requiere un paso de extracción adicional. Transferir la suspensión a un tubo de centrifuga resistente al cloroformo. Agregar $500 \mu\text{l} \pm 10 \mu\text{l}$ de mezcla cloroformo/butanol. Agitar en vórtex para mezclar, luego incubar a temperatura ambiente durante 5 min. Si se utilizaron más de $500 \mu\text{l}$ de PBS para resuspender el sedimento, agregar un volumen igual de mezcla cloroformo/butanol.

Centrifugar a $10000 \times g$ durante $15 \text{ min} \pm 1 \text{ min}$ a $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$. Cuidadosamente, transferir la fase acuosa a un nuevo tubo. Conservar para la extracción de ARN. El extracto de la muestra se debe procesar inmediatamente, o almacenarlo a $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ hasta 24 h, a $\leq -15^\circ\text{C}$ hasta 6 meses, o a una temperatura $\leq -70^\circ\text{C}$ para un almacenamiento más prolongado.

8.2.5 Agua embotellada

Esta metodología es apropiada para volúmenes de hasta 2 litros. Para cada muestra, registrar el volumen analizado.

- Añadir $10 \mu\text{l} \pm 0,5 \mu\text{l}$ del virus de control de proceso (8.2.1) a la muestra a analizar. Agitar para mezclar.
- Usando una fuente de vacío o presión positiva, filtrar toda la muestra a través de una membrana de 47 mm cargada positivamente usando técnicas asépticas. Transferir el filtro a un tubo estéril, luego agregar $4 \text{ ml} \pm 0,1 \text{ ml}$ de tampón TGBE.
- Agregar $10 \text{ ml} \pm 0,2 \text{ ml}$ de tampón TGBE a la botella vacía que contenía la muestra. Agitar el tubo y la botella a una velocidad de unas 50 oscilaciones/min durante $20 \text{ min} \pm 5 \text{ min}$.
- Reunir los eluatos del tubo y la botella en un solo tubo limpio. Enjuagar las paredes internas de la botella con $2 \text{ ml} \pm 0,1 \text{ ml}$ adicionales de tampón TGBE, agitando suavemente e invirtiendo a mano. Agregarlo al tubo.
- Ajustar el pH de los eluatos a $7,0 \pm 0,5$ con HCl ($\geq 0,5 \text{ mol/l}$) y transferir a un filtro centrifugo concentrador. Centrifugar a $4000 \times g$ durante $15 \text{ min} \pm 1 \text{ min}$. Transferir el concentrado a un tubo limpio.
- Ajustar el volumen a $500 \mu\text{l} \pm 10 \mu\text{l}$ con PBS.
- Conservar para la extracción de ARN. El extracto de la muestra se debe procesar inmediatamente, o almacenarlo a $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ hasta 24 h, a $\leq -15^\circ\text{C}$ hasta 6 meses, o a una temperatura $\leq -70^\circ\text{C}$ para un almacenamiento más prolongado.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Norovirus</i> en alimentos	PNT-MA-13	
		Edición N° 01	Página 10 de 27

8.2.6. Moluscos bivalvos

Los moluscos bivalvos deberán estar vivos para el análisis o, si están congelados, sin daños. No deben someterse a ningún tratamiento térmico. Eliminar el lodo adherido al caparazón. Los moluscos bivalvos no deben volver a sumergirse en agua.

- Abrir, con un cuchillo estéril, las cáscaras de un mínimo de 10 moluscos. Al abrirlas, asegurarse de que la mano que esté sosteniendo el molusco se encuentre protegida por un guante de seguridad resistente.

- Diseccionar las glándulas digestivas de todos los animales con tijeras y fórceps o equivalente y transferir a una placa de Petri limpia. Se requiere una masa mínima de $2,0 \text{ g} \pm 0,2 \text{ g}$. Picar finamente las glándulas digestivas con un bisturí o un homogeneizador equivalente hasta obtener una consistencia pastosa, luego transferir una porción de $2,0 \text{ g} \pm 0,2 \text{ g}$ a un tubo de centrifuga.

- Los tejidos digestivos se deben procesar inmediatamente, o almacenarlos a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ hasta 24 h, a $\leq -15^{\circ}\text{C}$ hasta 6 meses, o a una temperatura $\leq -70^{\circ}\text{C}$ para un almacenamiento más prolongado. Los tejidos digestivos que quedan después de la extracción de la porción de $2,0 \text{ g} \pm 0,2 \text{ g}$ se pueden almacenar a $\leq -15^{\circ}\text{C}$ durante un máximo de 6 meses, o a $\leq -70^{\circ}\text{C}$ para un almacenamiento más prolongado.

- Agregar $10 \mu\text{l} \pm 0,5 \mu\text{l}$ del virus de control de proceso (8.2.1) directamente a la porción de $2,0 \text{ g} \pm 0,2 \text{ g}$ de muestra. Añadir $2,0 \pm 0,2 \text{ ml}$ de solución de proteinasa K y mezclar.

- Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ con una agitación aproximada de 320 oscilaciones/min en una incubadora con agitación o equivalente, durante $60 \text{ min} \pm 5 \text{ min}$. Realizar una segunda incubación colocando el tubo en un baño de agua o equivalente a $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante $15 \text{ min} \pm 1 \text{ min}$.

- Centrifugar a $3000 \times g$ durante $5,0 \text{ min} \pm 0,5 \text{ min}$. Decantar el sobrenadante en un recipiente limpio.

- Medir y registrar el volumen del sobrenadante en mililitros. Conservar para la extracción de ARN.

- El sobrenadante se debe procesar inmediatamente, o almacenarlo a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ hasta 24 h, a $\leq -15^{\circ}\text{C}$ hasta 6 meses, o a una temperatura $\leq -70^{\circ}\text{C}$ para un almacenamiento más prolongado.

8.3. EXTRACCIÓN DE ARN

Extraer el ARN de $500 \mu\text{l} \pm 10 \mu\text{l}$ de sobrenadante de cada muestra, utilizando un método adecuado basado en la lisis por tiocianato de guanidinio y en adsorción en sílice. Eluir el ARN purificado en $100 \mu\text{l} \pm 2 \mu\text{l}$ de tampón de elución y conservarlo para el análisis de RT-PCR en tiempo real.

El ARN extraído se debe procesar inmediatamente, o podrá almacenarse a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ hasta 24 h, a $\leq -15^{\circ}\text{C}$ hasta 6 meses, o a una temperatura $\leq -70^{\circ}\text{C}$ para un almacenamiento más prolongado.

Para cada lote de muestras a analizar, incluir un control negativo de extracción a menos que el ensayo incluya un control negativo de proceso (8.2.2).

Realizar la extracción de ARN, utilizando el mismo método en paralelo, en $500 \pm 10 \mu\text{l}$ de agua calidad biología molecular.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Norovirus</i> en alimentos	PNT-MA-13	
		Edición N° 01	Página 11 de 27

Nota: ver el Anexo E para obtener detalles ilustrativos de un método de extracción de ARN.

8.4. RT-PCR EN TIEMPO REAL

8.4.1. Exigencias generales

Los resultados de la dilución 10-1 del ARN de la muestra, sólo se utilizan si la inhibición de la RT-PCR está fuera de los límites de aceptabilidad para el ARN de la muestra sin diluir (valor del Cq del pocillo que contiene ARN de muestra sin diluir + CE ARN es $\geq 2,00$ veces el valor del Cq del pocillo que contiene agua + CE ARN) (ver apartado 9.3).

Cuando la inhibición de la RT-PCR está fuera de los límites de aceptabilidad para las muestras de ARN sin diluir, el análisis de RT-PCR en tiempo real de cada virus diana y virus de control de proceso debe repetirse utilizando el ARN de la muestra diluida a décimas. El ARN de la décima dilución de la muestra no debe omitirse del análisis inicial para frutos rojos y hortalizas de hoja, tallo y bulbo (matrices en donde a menudo la inhibición de RT-PCR está fuera de los límites de aceptabilidad).

8.4.2. Análisis de RT-PCR en tiempo real

8.4.2.1. Análisis del virus

Para cada muestra de ARN preparar diluciones 10-1 en agua calidad biología molecular.

Para cada muestra preparar:

- dos pocillos de una placa óptica con $5 \pm 0,5$ µl de la muestra de ARN sin diluir
- dos pocillos con $5 \mu\text{l} \pm 0,5 \mu\text{l}$ de la muestra de ARN dilución 10-1
- un pocillo con $5 \mu\text{l} \pm 0,5 \mu\text{l}$ de la muestra de ARN sin diluir más $1 \pm 0,2$ µl del CE ARN sin diluir (6.2)
- un pocillo con $5 \mu\text{l} \pm 0,5 \mu\text{l}$ de la muestra de ARN dilución 10-1 más $1 \pm 0,2$ µl del CE ARN sin diluir

Para el control CE ARN preparar:

- un pocillo con $5 \mu\text{l} \pm 0,5 \mu\text{l}$ de agua calidad biología molecular más $1 \pm 0,2$ µl del CE ARN sin diluir

Para los controles negativos preparar:

- dos pocillos con $5 \mu\text{l} \pm 0,5 \mu\text{l}$ de agua calidad biología molecular, que actúen como control negativo de la RT-PCR en tiempo real
- dos pocillos con $5 \mu\text{l} \pm 0,5 \mu\text{l}$ del control negativo de extracción de ARN o del ARN de control negativo de proceso

Añadir a cada pocillo $20 \mu\text{l} \pm 1 \mu\text{l}$ de la MasterMix pertinente de RT-PCR en tiempo real.

Nota: la MasterMix puede añadirse previamente a todos los pocillos, es decir, antes de añadir los ácidos nucleicos.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Norovirus</i> en alimentos	PNT-MA-13	
		Edición N° 01	Página 12 de 27

8.4.2.2. Análisis del virus de control de proceso

Para cada serie de muestras preparar $10\ \mu\text{l} \pm 0,5\ \mu\text{l}$ del virus de control de proceso (8.2.1) en un volumen de $500\ \mu\text{l} \pm 10\ \mu\text{l}$ de agua. Extraer y almacenar el ARN de cada serie de la misma manera en que se analizan las muestras.

Preparar diluciones 10^{-1} de cada muestra de ARN en agua calidad biología molecular.

Preparar diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} del ARN de virus del control de proceso en agua calidad biología molecular para cada virus testigo de proceso.

Para cada muestra preparar:

- un pocillo con $5\ \mu\text{l} \pm 0,5\ \mu\text{l}$ de muestra de ARN sin diluir
- un pocillo con $5\ \mu\text{l} \pm 0,5\ \mu\text{l}$ de muestra de ARN dilución 10^{-1}

Para la curva estándar del ARN del virus de control de proceso preparar:

- un pocillo con $5\ \mu\text{l} \pm 0,5\ \mu\text{l}$ de ARN del virus de control de proceso sin diluir
- un pocillo con $5\ \mu\text{l} \pm 0,5\ \mu\text{l}$ de ARN del virus de control del proceso dilución 10^{-1}
- un pocillo con $5\ \mu\text{l} \pm 0,5\ \mu\text{l}$ de ARN del virus de control del proceso dilución 10^{-2}
- un pocillo con $5\ \mu\text{l} \pm 0,5\ \mu\text{l}$ de ARN del virus de control del proceso dilución 10^{-3}

Para los controles negativos preparar:

- un pocillo con $5\ \mu\text{l} \pm 0,5\ \mu\text{l}$ de agua calidad biología molecular que actúe como control negativo de la RT-PCR en tiempo real
- un pocillo con $5\ \mu\text{l} \pm 0,5\ \mu\text{l}$ de control negativo de extracción de ARN o del ARN de control negativo de proceso

Añadir a cada pocillo $20\ \mu\text{l} \pm 1\ \mu\text{l}$ de la MasterMix de RT-PCR en tiempo real.

Nota: la MasterMix puede añadirse previamente a todos los pocillos, es decir, antes de añadir los ácidos nucleicos.

8.4.3. Amplificación

Someter la placa a un ciclo de reacción que incluya una etapa inicial de transcripción reversa y al menos 45 ciclos de PCR. La duración y las temperaturas de cada etapa (transcripción reversa, desactivación de RT, desnaturalización, hibridación, extensión) dependen de los reactivos utilizados. Seguir las indicaciones del fabricante.

Para los equipos de PCR en tiempo real en los que el usuario puede establecer el punto de recopilación de datos de fluorescencia, este se establecerá al final de la etapa de extensión.

Nota: ver Anexo B para detalles ilustrativos del método de amplificación.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Norovirus</i> en alimentos	PNT-MA-13	
		Edición N° 01	Página 13 de 27

8.4.4. Análisis de datos de fluorescencia

- Las curvas de amplificación deben analizarse utilizando el enfoque recomendado por el fabricante del equipo de PCR en tiempo real.
- Establecer el umbral (*threshold*) de modo que cruce el área donde las gráficas de amplificación (vista logarítmica) son paralelas (fase exponencial).
- Todas las curvas de amplificación se deben analizar para detectar resultados falsos positivos (reacciones con valores de Cq no asociados con la amplificación exponencial) causados por una señal de fondo alta o desigual. Esto se debe tener en cuenta y los resultados de cualquier reacción afectada de esta manera se deberán considerar negativos.
- Cuando los valores de Cq estén distorsionados, deberán registrarse los valores de Cq corregidos además de los valores generados por el *software*.
- Los valores de Cq corregidos se utilizarán para los cálculos de eficiencia.

9. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

9.1. GENERALIDADES

Cada control (CE ARN, ARN del virus de control de proceso) tiene un valor válido esperado o un rango de valores. Si el resultado observado para cualquier control es diferente del valor esperado, es posible que sea necesario volver a analizar las muestras.

Los controles negativos (agua calidad biología molecular y control negativo de extracción o de proceso) siempre deberán ser negativos. Si en estos controles se obtienen resultados positivos, todas aquellas muestras que den resultados positivos se deberán volver a analizar.

9.2. ELABORACIÓN DE CURVAS ESTÁNDAR DE ARN DEL VIRUS DE CONTROL DE PROCESO

Para elaborar una curva estándar, utilizar los valores obtenidos de la serie de diluciones del ARN de virus de control de proceso. Se deben representar los valores obtenidos de Cq en función del $\log_{10}$ de la concentración, para determinar r^2 (donde r es el coeficiente de correlación de Pearson), la pendiente y la ordenada al origen.

Curvas con valores de $r^2 < 0,980$, o cuya pendiente no se encuentre entre $-3,10$ y $3,60$ (correspondiente a eficiencias de amplificación entre 90% y 110 % aproximadamente), no se deben utilizar para los cálculos. En estos casos, comprobar los valores de Cq de la curva estándar para todos valores atípicos y eliminarlos de la serie. Repetir los cálculos para determinar r^2 , la pendiente y la ordenada al origen. Si la curva modificada tiene un valor de $r^2 < 0,980$, o la pendiente no está entre $-3,10$ y $-3,60$, la pendiente modificada no debe utilizarse para los cálculos.

9.3. CONTROL DE INHIBICIÓN DE LA RT-PCR

Si el valor de Cq del pocillo que contiene ARN de la muestra sin diluir + CE ARN es $< 2,00$ y mayor que el valor de Cq del pocillo que contiene agua + CE ARN, los resultados del ARN sin diluir se utilizarán para esa muestra. Si el valor de Cq del pocillo que contiene ARN de la muestra sin diluir + CE ARN es $\geq 2,00$ y mayor que el valor de Cq del pocillo que contiene agua + CE ARN, repetir la comparación con el pocillo de

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Norovirus</i> en alimentos	PNT-MA-13	
		Edición N° 01	Página 14 de 27

la muestra de ARN dilución 10^{-1} + CE ARN.

Si el valor de Cq del pocillo que contiene la muestra de ARN dilución 10^{-1} + CE ARN es $<2,00$ y mayor que el valor de Cq del pocillo que contiene agua + CE ARN, los resultados del pocillo de ARN dilución 10^{-1} se utilizarán para esa muestra. Si el valor de Cq del pocillo que contiene la muestra de ARN dilución 10^{-1} + CE ARN es $\geq 2,00$ y mayor que el valor de Cq del pocillo que contiene agua + CE ARN, es posible que los resultados no sean válidos y que sea necesario volver a analizar la muestra.

En la situación descrita anteriormente, las muestras de ARN sin diluir y diluidas (10^{-1}), se probaron simultáneamente. Cuando solo se prueba ARN de muestra sin diluir, y cuando el valor de Cq del pocillo que contiene ARN de muestra no diluido + CE ARN es $\geq 2,00$ más que el valor Cq del pocillo que contiene agua + CE ARN, la RT-PCR en tiempo real debe repetirse utilizando la muestra de ARN diluida (10^{-1}) y repetir el cálculo.

Nota 1: una muestra que muestre un nivel inaceptable de inhibición de RT-PCR, pero que produce un resultado positivo válido por todo lo demás, puede cuando corresponda, informarse como positiva.

Si el valor de Cq para el pocillo que contiene ARN de muestra sin diluir + CE ARN es $< 2,00$ y mayor que el valor Cq del pocillo que contiene agua + CE ARN, pero la muestra proporciona resultados positivos solo usando muestra de ARN diluido (10^{-1}), los resultados del ARN diluido (10^{-1}) deben ser utilizados para esta muestra.

Nota 2: si se utilizan métodos alternativos para determinar la inhibición de la RT-PCR, este procedimiento deberá adaptarse para proporcionar el mismo nivel de rigor.

9.4. CÁLCULO DE LA EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN

- Utilizar el valor de Cq del análisis del virus de control de proceso del pocillo que contiene ARN de la muestra de prueba (sin diluir o de la dilución 10^{-1}), dependiendo de los resultados de la inhibición de la RT-PCR (9.3) para estimar la recuperación del virus de control de proceso de la curva estándar de ARN del virus de control de proceso (si se utilizan resultados de muestras de ARN de la dilución 10^{-1} , multiplicar por 10 para corregir el factor de dilución).

- Recuperación del virus de control de procesos = $10^{(\Delta Cq/m)} \times 100\%$

ΔCq es el valor de Cq (ARN de la muestra) – valor de Cq (ARN del virus de control de proceso no diluido)
m es la pendiente de la curva estándar del ARN del virus de control de proceso

- Para muestras de moluscos bivalvos, calcular la eficiencia de extracción dividiendo la recuperación por 0,5 y multiplicando por el volumen total del homogeneizado medido.

- Rendimiento de extracción = $(p/0.5) \times v$

p es la recuperación del virus de control de proceso

v es el volumen total medido del sobrenadante en ml (ver 8.2.6)

- Para otras matrices, la eficiencia de extracción es igual a la recuperación del virus de control de proceso.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Norovirus</i> en alimentos	PNT-MA-13	
		Edición N° 01	Página 15 de 27

- Cuando la eficiencia de extracción es $<1\%$, los resultados de la muestra no son válidos y es posible que sea necesario volver a analizar la muestra.

- Si la curva estándar establecida para el ARN del virus de control de proceso muestra una pendiente ideal de $-3,32$, una muestra (no moluscos bivalvos) con un ΔCq de $0,00$ tiene un rendimiento del 100% de extracción y una muestra con un ΔCq de $6,64$ tiene un rendimiento de extracción del 1% . Cuando ΔCq es $\leq 6,64$, el rendimiento de extracción es $\geq 1\%$ y, por lo tanto, aceptable. Si ΔCq es $> 6,64$, el rendimiento de extracción es $< 1\%$ y, por lo tanto, no es aceptable.

- Para tipos específicos de frutos rojos, hortalizas de hoja, tallo o bulbo o moluscos bivalvos donde no existen datos de validación formal, se pueden aplicar otros umbrales de rendimiento de extracción, sujetos a la validación apropiada.

Nota 1: una muestra que muestre una eficiencia de extracción inaceptable, pero que produce un resultado positivo válido por todo lo demás, puede, si corresponde, informarse como positiva.

10. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

- Para superficies de alimentos, cuando se puede medir el área aproximada, los resultados positivos se expresarán como "genoma de *Norovirus* detectado en $X\text{ cm}^2$ ".

- Para superficies de alimentos, cuando no se puede medir el área aproximada, los resultados positivos se expresarán como "genoma de *Norovirus* detectado".

- Para otros tipos de muestras, los resultados positivos se expresarán como "genoma de *Norovirus* detectado en $X\text{ ml}$ " o "genoma de *Norovirus* detectado en $X\text{ g}$ ", donde X es la cantidad de muestra analizada.

- Si no se detecta el virus, los resultados de las superficies de los alimentos cuando se puede medir el área aproximada se expresarán como "genoma de *Norovirus* no detectado en $X\text{ cm}^2$ ". En caso de no poder medir el área aproximada, se informará "genoma de *Norovirus* no detectado".

- Para otros tipos de muestras, los resultados se expresarán como "genoma de *Norovirus* no detectado en $X\text{ ml}$ " o "genoma de *Norovirus* no detectado en $X\text{ g}$ ".

- Si no se obtiene un resultado válido, los resultados normalmente se expresarán como "sin resultado" o "resultado inválido".

- Sin embargo, si se obtiene un resultado positivo válido de una muestra que presente una inhibición de la RT-PCR o un rendimiento de extracción inaceptable, los resultados pueden expresarse como se detalla más arriba. Los detalles se deben incluir en el informe de ensayo.

11. RESPONSABILIDADES

El procesamiento de las muestras y todas las actividades de laboratorio, así como sus correspondientes registros, se realiza por técnicos superiores o por técnicos de grado medio de laboratorio, debidamente cualificados.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Norovirus</i> en alimentos	PNT-MA-13	
		Edición N° 01	Página 16 de 27

La supervisión/validación la realiza el facultativo responsable y aplica a todas las actividades analíticas y no analíticas: revisión de procedimientos, controles de calidad y emisión e interpretación de resultados.

Los auxiliares técnicos que intervienen son responsables de llevar a cabo las actividades concernientes a la preparación de la muestra y la preparación de los materiales y medios de cultivo necesarios y de llevar los registros correspondientes.

12. IDENTIFICACIÓN DE FUENTES DE INCERTIDUMBRE

Origen	Fuentes de incertidumbre	Forma de control
Instrumental	Incertidumbre asociada a las pesadas	Calibración anual y Verificación diaria de las balanzas.
Micropipetas	Incertidumbre asociada a su medición	Calibración cada 5 años años. Verificación anual.
pH	pHmetro	Calibración diaria.
Kits	Calidad asociada a fabricación y conservación.	Controles positivos y negativos del kit.
Humanas	Experiencia y pericia del personal en la interpretación de los resultados	Pruebas intralaboratorio. Pruebas de proficiencia Internacionales.

13. MEDIDAS DE SEGURIDAD Y CONDICIONES AMBIENTALES

Es importante observar durante el proceso y ensayo, la aplicación de prácticas de bioseguridad acordes con los niveles evaluados de riesgo.

14. ANEXOS

Anexo	Título	N° de páginas
ANEXO A	Diagrama de flujo del procedimiento	1
ANEXO B (Informativo)	Composición de la MasterMix para RT-PCR en un paso en tiempo real utilizando el sistema RNA Ultrasense™ en un paso para qRT-PCR de Invitrogen y condiciones de ciclado	1
ANEXO C (Informativo)	Secuencias de primers y sondas para la detección de <i>Norovirus</i> GI y GII (control de proceso)	2
ANEXO D (Informativo)	Crecimiento de la cepa MC ₀ de Mengovirus para su uso como control de proceso	1
ANEXO E (Informativo)	Extracción de ARN utilizando el sistema NucliSens® BioMerieux	2
ANEXO F (Informativo)	Soluciones madre de control externo de ARN (CE ARN)	3

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Norovirus</i> en alimentos	PNT-MA-13	
		Edición N° 01	Página 17 de 27

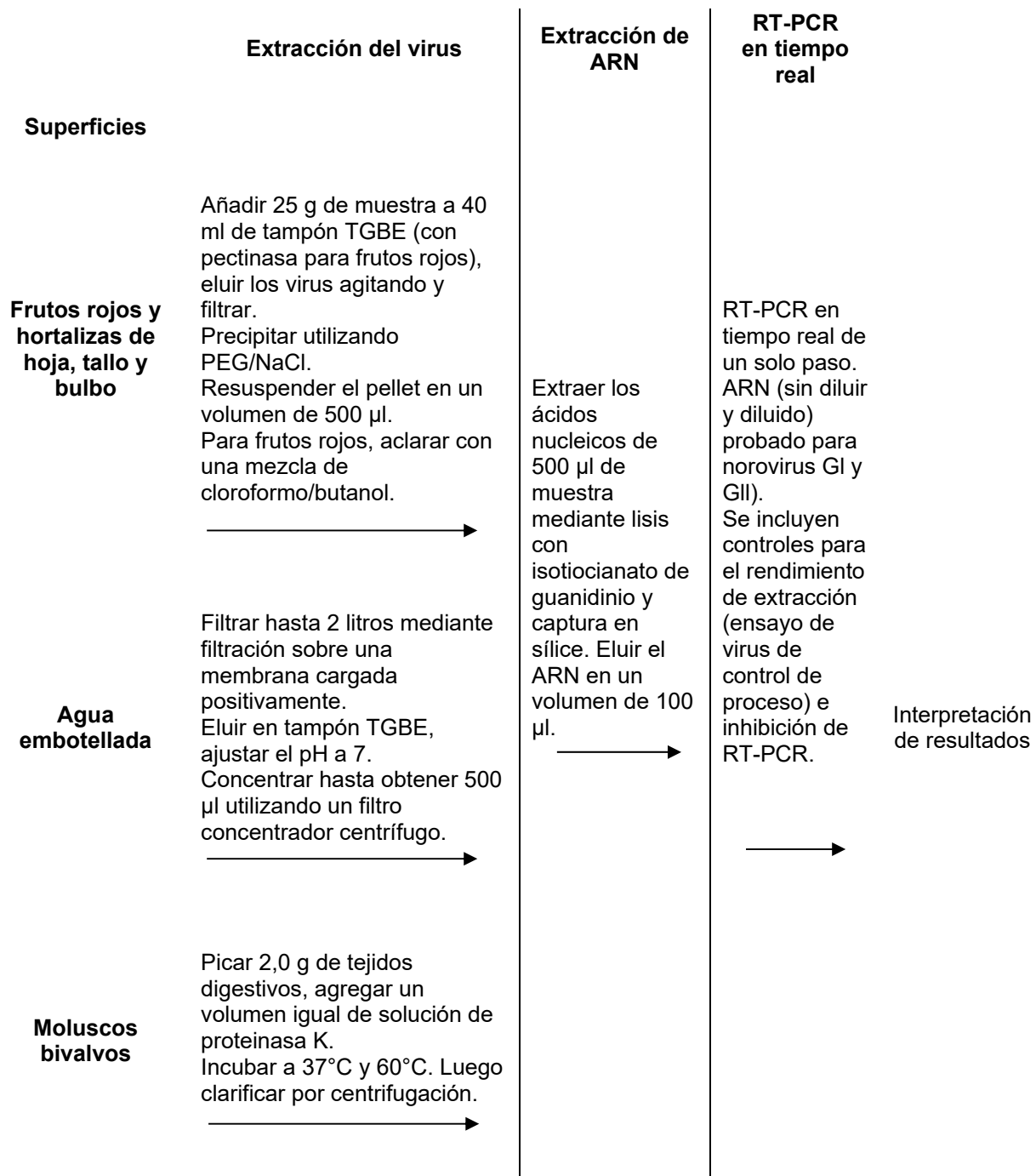
15. BIBLIOGRAFÍA

1. Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR - Part 2: Method for detection ISO 15216-2/2019 durante el trabajo.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Norovirus</i> en alimentos	PNT-MA-13	
		Edición N° 01	Página 18 de 27

ANEXO A

Diagrama de flujo del procedimiento



Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Norovirus</i> en alimentos	PNT-MA-13	
		Edición N° 01	Página 19 de 27

ANEXO B (Informativo)

Composición de la MasterMix para RT-PCR en un paso en tiempo real utilizando el sistema RNA Ultrasense™ en un paso para qRT-PCR de Invitrogen y condiciones de ciclado

Para conocer la composición de las mezclas de reacción de RT-PCR en tiempo real de un paso utilizando el sistema qRT-PCR de un paso RNA Ultrasense™ de Invitrogen, consultar la tabla B.1.

Para los parámetros de ciclado, consultar la tabla B.2.

Tabla B.1.- Mezcla de reacción

Reactivo	Concentración final (en un volumen de reacción de 25 µl)	Volumen por reacción µl
5 x mezcla de reacción UltraSense	1 x	5 ± 0,25
Primer (FW)	0,5 pmol/ µl	según sea necesario
Primer (REV)	0,9 pmol/ µl	según sea necesario
Sonda	0,25 pmol/ µl	según sea necesario
Marcador fluorescente de referencia ROX (50 x)	según sea necesario ^a	según sea necesario
Mezcla de enzima ARN UltraSense	----	1,25 ± 0,1
Agua	----	según sea necesario
Volumen total	----	20 ± 0,5
^a Con los equipos de PCR en tiempo real de Applied Biosystems, el marcador fluorescente de referencia ROX debe utilizarse en una concentración de 1 x; para Stratagene MX3000, ROX puede usarse en una concentración de 0,1 x o no usarse en la mezcla de reacción. Para otros equipos consultar las instrucciones del fabricante. Los equipos de PCR en tiempo real de Applied Biosystems y el Stratagene MX3000 son productos disponibles comercialmente.		

Tabla B.2.- Condiciones de ciclado

Descripción de la etapa		Temperatura y Tiempo	Número de ciclos
RT		55°C durante 1 h	1
Desnaturalización inicial		95°C durante 5 min	1
Amplificación	Desnaturalización	95°C durante 15 segundos	45
	Hibridación- extensión	60°C durante 1 min	
		65°C durante 1 min ^a	
^a Para los equipos de PCR en tiempo real en los que el usuario puede seleccionar el punto de recolección de datos de fluorescencia, este debe establecerse al final de la incubación a 65°C.			

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Norovirus</i> en alimentos	PNT-MA-13	
		Edición N° 01	Página 20 de 27

ANEXO C (Informativo)

Secuencias de primers y sondas para la detección de *Norovirus* GI y GII (Control de proceso)

C.1.- *Norovirus* GI

QNIF4 (FW): CGC TGG ATG CGN TTC CAT

NV1LCR (REV): CCT TAG ACG CCA TCA TCA TTT AC

Cualquiera de las dos sondas que se encuentran a continuación pueden utilizarse con los primers FW y REV para *Norovirus* GI.

NVGG1p (SONDA): TGG ACA GGA GAY CGC RAT CT

Sonda marcada en el extremo 5' con 6-carboxifluoresceína (FAM) y en el extremo 3' por 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA).

TM9 (SONDA): TGG ACA GGA GAT CGC

Sonda marcada en el extremo 5' con 6-carboxifluoresceína (FAM) y en el extremo 3' por el MGBNFQ (*Minor Groove Binder/non-fluorescent quencher*).

Esta combinación de primers amplifica un producto de 86 pb correspondiente a los nucleótidos 5291 a 5376 del virus Norwalk (número de acceso GenBank M87661).

C.2.- *Norovirus* GII

QNIF2 (FW): ATG TTC AGR TGG ATG AGR TTC TCW GA

COG2R (REV): TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA

QNIFs (SONDA): AGC ACG TGG GAG GGC GAT CG

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Norovirus</i> en alimentos	PNT-MA-13	
		Edición N° 01	Página 21 de 27

Sonda marcada en el extremo 5' con 6-carboxifluoresceína (FAM) y en el extremo 3' con 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA).

Esta combinación de primers amplifica un producto de 89 pb correspondiente a los nucleótidos 5012 a 5100 del virus Lordsdale (número de acceso de GenBank X86557).

El área seleccionada para la detección de norovirus diana es la región conservada en el extremo 5' de ORF2. Los alineamientos de todas las secuencias de regiones diana disponibles en GenBank demuestran que estas combinaciones de primers y sondas son adecuadas para la detección de todas las cepas de norovirus GI y GII. Además, la eficacia y sensibilidad de los primers y sondas se verificaron mediante el uso de 18 cepas de referencia de norovirus.

La especificidad de los primers se comprobó con seis virus entéricos humanos diferentes: poliovirus (cepa vacunal de serotipo 1), VHA, virus de la hepatitis E, virus de Aichi, astrovirus y rotavirus. También se probó la especificidad en siete bacterias que podían detectarse en moluscos bivalvos: *Escherichia coli*, *Shewanella putrefaciens*, *Chromobacterium violaceum*, *Aeromonas sobria*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio cholerae*. Ninguno de los virus o bacterias analizados dio resultados positivos.

C.3.- Mengovirus

Mengo 110 (FW): GCG GGT CCT GCC GAA AGT

Mengo 209 (REV): GAA GTA ACA TAT AGA CAG ACG CAC AC

Mengo 147 (SONDA): ATC ACA TTA CTG GCC GAA GC

Sonda marcada en el extremo 5' con 6-carboxifluoresceína (FAM) y en el extremo 3' por el MGBNFQ (*Minor Groove Binder/quencher* no fluorescente).

Esta combinación de primers amplifica un producto de 100 pb correspondiente a los nucleótidos 110 a 209 de la cepa MC0 de mengovirus utilizada para el desarrollo de este procedimiento.

Las secuencias de cebadores no se alinean con otras secuencias disponibles en GenBank.

La especificidad de los cebadores se comprobó con 10 virus entéricos humanos diferentes: virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis E, norovirus GI, norovirus GII, enterovirus humano B (echovirus 1), enterovirus humano B (echovirus 11), enterovirus humano B (echovirus 30), enterovirus humano C (virus Cocksackie-A24), enterovirus humano D (enterovirus 70) y astrovirus humano tipo 2.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Norovirus</i> en alimentos	PNT-MA-13	
		Edición N° 01	Página 22 de 27

ANEXO D (Informativo)

Crecimiento de la cepa MC0 de Mengovirus para su uso como Control de proceso

D.1. GENERALIDADES

El Mengovirus es un virus de la familia Picornaviridae. La cepa de mengovirus MC₀ (CECT 10000)² es un virus recombinante que carece de la secuencia poli(C) en comparación con el mengovirus de tipo salvaje, que tiene propiedades de crecimiento idénticas a las del virus de tipo salvaje pero que tiene un fenotipo avirulento. Esta cepa se utilizó como virus de control de proceso en el método de detección de norovirus y como control de proceso en el desarrollo de este documento.

La cepa MC₀ de mengovirus es un organismo genéticamente modificado (OGM). Para laboratorios donde el uso de OGM está prohibido o es problemático, se debe usar un control de proceso diferente.

D.2. REACTIVOS Y EQUIPOS

D.2.1. El medio de cultivo celular recomendado para células HeLa es el medio esencial mínimo de Eagle que contiene 2 mmol/l de l-glutamina y BSS de Earle, ajustado a 1,5 g/l de hidrogenocarbonato de sodio, 0,1 mmol/l de aminoácidos no esenciales, 1,0 mmol/l de piruvato de sodio, 1 × de solución de estreptomina/penicilina, 100 ml/l (crecimiento) o 20 ml/l (mantenimiento) de suero fetal bovino.

D.2.2. Para la preparación de cultivos celulares y el crecimiento de virus, se requiere un equipo de cultivo celular que incluya una o más incubadoras con niveles controlables de CO₂ y consumibles de cultivo celular (frascos, etc.).

D.3. PROCEDIMIENTO

El Mengovirus debe cultivarse en una atmósfera de (50 ± 10) ml/l de CO₂ (con recipientes abiertos) o en una atmósfera no controlada (recipientes cerrados), en monocapas confluentes del 80% al 90% de células HeLa (ATCC® CCL-2™)² hasta alcanzar al menos un 75% de efecto citopático.

Someter el recipiente de cultivo celular a un solo ciclo de congelación y descongelación, luego centrifugar el contenido a 3000 × g durante (10 ± 1) min.

Conservar el sobrenadante (cultivo celular) para la preparación del material del virus de control de proceso (6.3.1).

² CECT 10000 y ATCC® CCL-2™ son marcas comerciales de productos suministrados respectivamente por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y por la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC).

Esta información se proporciona para orientación de los usuarios de este documento. Se pueden utilizar productos equivalentes si se demuestra que cumplen con los requisitos del procedimiento.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Norovirus</i> en alimentos	PNT-MA-13	
		Edición N° 01	Página 23 de 27

ANEXO E (Informativo)

Extracción de ARN con el sistema NucliSens®3) de BioMérieux

E.1. REACTIVOS

E.1.1. Tampón de lisis NucliSens®3)

E.1.2. Reactivos de extracción magnética NucliSens®3) (incluye solución de sílice magnética, tampones de lavado 1, 2 y 3 y tampón de elución).

E.2. EQUIPO

E.2.1. Gradilla magnética para tubos de 1,5 ml.

E.2.2. Agitador térmico o dispositivo equivalente para agitar tubos de 1,5 ml a $(60 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ y a una velocidad de aproximadamente 1400 oscilaciones/min.

E.3. PROCEDIMIENTO

Añadir $(2 \pm 0,1)$ ml de tampón de lisis NucliSens®3) a un tubo. Agregar (500 ± 10) µl de muestra (moluscos bivalvos) o muestra completa (otras matrices) y agitar brevemente.

Incubar durante (10 ± 1) min a temperatura ambiente.

Agregar $(50 \pm 2,5)$ µl de la solución de sílice magnética bien mezclada a un tubo y agitar brevemente.

Incubar durante (10 ± 1) min a temperatura ambiente.

Centrifugar durante (120 ± 10) s a $1500 \times g$ o permitir que la sílice sedimente utilizando una gradilla magnética. A continuación, retirar con cuidado el sobrenadante, por ejemplo, mediante aspiración.

Agregar (400 ± 10) µl de tampón de lavado 1 y volver a suspender el precipitado pipeteando o agitando con vórtex, teniendo cuidado de evitar la formación de espuma.

Transferir la suspensión a un tubo limpio de 1,5 ml. Cerrar el tubo y lavar la sílice durante (30 ± 2) s mientras se mezcla con un vórtex. Después del lavado, dejar que la sílice se asiente utilizando la gradilla magnética. Retirar el sobrenadante por aspiración, por ejemplo.

Agregar (400 ± 10) µl de tampón de lavado 1. Cerrar el tubo y lavar la sílice durante (30 ± 2) s mientras se mezcla con un vórtex, permitir que la sílice se asiente usando la gradilla magnética y luego retirar el sobrenadante.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Norovirus</i> en alimentos	PNT-MA-13	
		Edición N° 01	Página 24 de 27

Agregar (500 ± 10) μ l de tampón de lavado 2. Cerrar el tubo y lavar la sílice durante (30 ± 2) s mientras se mezcla con un vórtex, permitir que la sílice se asiente usando la gradilla magnética y luego retirar el sobrenadante. Repetir la operación.

Agregar (500 ± 10) μ l de tampón de lavado 3 (las muestras no deben dejarse en el tampón de lavado 3 más tiempo del necesario). Cerrar el tubo y lavar la sílice durante (15 ± 1) s, dejar que la sílice sedimente utilizando la gradilla magnética y luego retirar el sobrenadante.

Añadir (100 ± 5) μ l de tampón de elución. Cerrar el tubo y transferirlo al agitador térmico o dispositivo equivalente, luego incubar durante ($5,0 \pm 0,5$) min a 60°C con agitación de 1400 oscilaciones/min.

Colocar el tubo en la gradilla magnética y permitir que la sílice se asiente, luego transferir el eluato a un tubo limpio.

También se pueden utilizar plataformas automatizadas para la extracción de ARN utilizando reactivos de extracción magnética NucliSens®³).

³) BioMerieux NucliSens® es el nombre comercial de un producto suministrado por BioMerieux. Esta información se proporciona para orientación de los usuarios de este documento. Se pueden utilizar productos equivalentes si se demuestra que conducen a los mismos resultados.

ANEXO F (Informativo)

Soluciones madre de Control Externo de ARN (CE ARN)

F.1. GENERAL

Debe prestarse especial atención a la separación de las áreas de trabajo utilizadas para la producción de soluciones madre de CE de ARN y aquellas utilizadas para la extracción de muestras.

En el desarrollo de este procedimiento, se utilizaron plásmidos linealizados que portaban copias de los genes diana para la producción de CE de ARN.

Para los norovirus GI y GII, los plásmidos de control se construyeron por separado mediante la inserción de la secuencia de ADN diana en el vector pGEM-3Zf(+) en un sitio de restricción *Sma*I de modo que, en cada caso, la secuencia diana se encuentra más abajo de la secuencia promotora de la polimerasa de ARN T7. Para los tres plásmidos, se introdujeron sitios de restricción *Bam*HI únicos en los insertos de la secuencia diana insertando o reemplazando las secuencias de tipo salvaje, para actuar como medida de control de la contaminación. Cuando se sospecha la contaminación de las muestras por CE ARN, la presencia del sitio *Bam*HI puede comprobarse mediante la digestión de los productos de la PCR con la enzima de restricción *Bam*HI o mediante la secuenciación de los productos de PCR.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Norovirus</i> en alimentos	PNT-MA-13	
		Edición N° 01	Página 25 de 27

Las secuencias diana completas de los insertos de estos plásmidos son las siguientes:

Norovirus GI

1 CGCTGGATGC GCTTCCATGA CCTCGGATTG TGGACAGGAG ATCGCGATCT TCTGCGGATC 61
CGAATTCGTA AATGATGATG GCGTCTAAGG

Norovirus GII

1 ATGTTTCAGAT GGATGAGATT CTCAGATCTG AGCACGTGGG AGGGCGATCG CAATCTGGCT 61
CGGATCCCCA GCTTTGTGAA TGAAGATGGC GTCGA

F.2. REACTIVOS Y EQUIPOS

F.2.1. Enzimas de restricción para linealización y tampones asociados.

F.2.2. Reactivos de purificación de productos de PCR.

F.2.3. Reactivos de transcripción de ARN *in vitro* (ARN polimerasa, nucleótidos trifosfatos (NTPs), tampones, etc.).

F.2.4. DNasa libre de RNasa.

F.2.5. Reactivos de purificación de ARN.

F.2.6. Reactivos y equipos para electroforesis en gel de ADN.

F.2.7. Reactivos y equipos para RT-PCR en tiempo real de un solo paso utilizando sondas de hidrólisis.

F.2.8. Incubadora, capaz de operar a $(37 \pm 2)^{\circ}\text{C}$.

F.2.9. Bloque térmico o equivalente para la incubación de tubos de 1,5 ml a $(95 \pm 2)^{\circ}\text{C}$.

F.3. LINEALIZACIÓN DEL ADN PLASMÍDICO

Agregar 1 μg de ADN de plásmido purificado a una mezcla de reacción que contenga una enzima de restricción adecuada (para permitir la linealización del plásmido en un punto ligeramente más abajo de la secuencia objetivo⁴) y tampones de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Incubar a 37°C durante (120 ± 5) min.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Norovirus</i> en alimentos	PNT-MA-13	
		Edición N° 01	Página 26 de 27

Purificar el ADN de la mezcla de reacción utilizando reactivos de purificación de productos de PCR, eluir en $(50 \pm 2,5)$ μ l de tampón de elución.

Comprobar la linealización mediante electroforesis en gel (comparar una alícuota de plásmido linealizado purificado con una alícuota de plásmido no linealizado).

F.4. TRANSCRIPCIÓN DE ARN IN VITRO

Agregar 1 μ g de ADN de plásmido linealizado purificado a una reacción de transcripción de ARN *in vitro*, preparada según las recomendaciones del fabricante de la enzima ARN polimerasa5).

Incubar a 37°C durante (120 ± 5) min.

Agregar DNasa libre de RNasa e incubar a 37 °C durante (15 ± 1) min.

Purificar el ARN utilizando reactivos de purificación de ARN, eluyendo en (100 ± 5) μ l de agua calidad biología molecular.

F.5. COMPROBACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN DEL ADN

Preparar una MasterMix de RT-PCR en tiempo real, dividirla por la mitad y desactivar la enzima RT en una parte de la mezcla calentándola a 95°C durante $(5.0 \pm 0,5)$ mín.

Someter el CE de ARN o una dilución apropiada de esta solución a RT-PCR en tiempo real usando las mezclas de reacción no tratadas y tratadas térmicamente en paralelo.

Si en la solución madre del CE de ARN analizado con la MasterMix tratada térmicamente, los niveles detectables son $> 0,1\%$ que los presentes en una MasterMix no tratada (si la diferencia entre los valores de Cq del CE de ARN analizado con la MasterMix tratada y sin tratar es <10), la solución madre está contaminada con ADN y debe tratarse de nuevo con DNasa (ver F.4.). Si los niveles son $< 0,1\%$, almacenar a una temperatura $\leq -15^\circ\text{C}$ hasta que se utilice para la preparación del CE de ARN (6.3).

F.6. CUANTIFICACIÓN DEL CE DE ARN

Determinar por espectrofotometría la absorbancia a 260 nm de la solución madre del CE de ARN tratada con DNasa (ver F.4.).

Multiplicar el resultado de la medición de absorbancia por 4×10^{-8} (y por el factor de dilución utilizado si se mide la solución madre del CE de ARN diluida) para obtener la concentración de ARN en gramos por microlitro.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Norovirus</i> en alimentos	PNT-MA-13	
		Edición N° 01	Página 27 de 27

Dividir este número por la masa en gramos de una sola molécula del CE de ARN para calcular la concentración de ARN en número de copias por microlitro.

La masa de una molécula de ARN individual se puede calcular multiplicando la longitud del ARN en los ribonucleótidos por 320,5 (masa molecular relativa de un ribonucleótido promedio) y dividiendo por la constante de Avogadro ($6,02 \times 10^{23}$). Por ejemplo, una molécula de ARN de 200 ribonucleótidos tiene una masa de $1,06 \times 10^{-19}$ g.⁶⁾

⁴⁾ Para los plásmidos de norovirus GI y GII utilizados en la elaboración de este procedimiento, la enzima de restricción adecuada es *Xba*I.

⁵⁾ Para los plásmidos de norovirus GI y GII utilizados en la preparación de este procedimiento, la enzima ARN polimerasa adecuada para la transcripción in vitro de ARN es T7.

⁶⁾ Para los CE de ARN utilizados en el desarrollo de este procedimiento, las longitudes y masas respectivas son las siguientes: Norovirus GI: 126 ribonucleótidos, $6,73 \times 10^{-20}$ g; Norovirus GII: 131 ribonucleótidos, $7,00 \times 10^{-20}$ g.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga (STEC)	PNT-MA-14	
		Edición N° 01	Página 1 de 13

PNT-MA-14

Investigación de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC)

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2022	Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga (STEC)	PNT-MA-14	
		Edición N° 01	Página 2 de 13

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo del presente documento es estandarizar la metodología para la investigación de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (serogrupos O157, O111, O26, O103 y O145) y unificar criterios de aplicación para el procesamiento de muestras de alimentos.

2. FUNDAMENTO

Este documento basado en la norma ISO 13136/2012, especifica un método horizontal, para la detección de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) y la determinación de los serogrupos O157, O111, O26, O103 y O145, en una cantidad de masa o volumen determinados. Este método, utiliza la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (real time PCR), para la detección de patógenos transmitidos por alimentos.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Microbiology of the food and animal feed – Real-time polymerase chain reaction (PCR) – based method for the detection of food-borne pathogens - Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups. ISO 13136/2012.
- Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — Requirements for amplification and detection for qualitative methods. ISO 20838/2006.
- Doyle MP, Diez Gonzalez F, Hill C. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. 5th edition. American Society for Microbiology. 2019.
- Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs.

4. MUESTRAS

Consultar el PNT-MA-01a (Toma de muestras de alimentos, conservación y transporte) y PNT-MA-01b (Preparación de muestras para análisis microbiológico de alimentos) de este procedimiento SEIMC n° 78.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, SOLUCIONES Y MATERIALES DE REFERENCIA

5.1. MEDIOS DE CULTIVO

- Caldo triptona soja modificado (mTSB) + 16 mg/l novobiocina (N)
- Caldo triptona soja modificado (mTSB) + 12 mg/l acriflavina (A) ----> para análisis de leche o productos lácteos
- Agua de peptona tamponada (APB)
- Agar triptona bilis X glucurónico (TBX) u otro medio similar
- Agar nutritivo
- Medio triptona/triptófano
- Solución salina. Se ajustará a la composición:

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga (STEC)	PNT-MA-14	
		Edición N° 01	Página 3 de 13

5.2. REACTIVOS Y SOLUCIONES

- Reactivo para la extracción de ácidos nucleicos
- *Kits* comerciales para la detección por PCR Real Time de genes *stx1/stx2/eae* y serogrupos
- Reactivos para PCR en caso de no utilizar un kit comercial:
 1. Master Mix
 2. Primers y sondas (ver ANEXO III)
- Buffer de lavado
- Romer Labs RapidChek CONFIRM STEC (O111, O103, O145 y O26) o similar – *Kit* de separación inmunomagnética (IMS) con perlas paramagnéticas recubiertas con anticuerpos Anti O111, O103, O145 y O26
- Partículas Inmunomagnéticas Anti-*Escherichia coli* O157
- Agua calidad biología molecular, libre de RNasa, DNasa
- Reactivo de Kovac's para Indol
- Test Kit de aglutinación en látex específicos para STEC no O157 serogrupos O111, O26, O103 y O145.
- Antiseros para *Escherichia coli* O157
- *Kit* de identificación de Enterobacterias (API 20E, Tarjetas GN para VITEK 2 o similar)

Nota: los medios de cultivo y *kits* descritos anteriormente se pueden sustituir por medios o *kits* comerciales de otras marcas. En estos casos seguir las instrucciones del fabricante.

5.3. MATERIALES DE REFERENCIA

Utilizar cepas de referencia como control positivo con los medios de pre-enriquecimiento.

Los cultivos de control deben iniciarse en forma paralela y analizarse de la misma manera que las muestras.

Incluir:

- Un control positivo inoculado con un pool de las cepas de STEC que contengan los genes *stx1*, *stx2* y *eae*
- Un control negativo inoculado con *E. coli*
- Un control de esterilidad sin inocular

En ausencia de muestras positivas, los cultivos de control pueden terminarse en el mismo punto donde finaliza la marcha analítica.

En caso de realizarse la etapa de aislamiento mediante IMS, el control que se continuará utilizando como positivo, será aquel serogrupo que haya dado positivo en la muestra.

Algunos *kits* comerciales incluyen controles positivos y negativos. Realizar la técnica según indicación del fabricante. En caso de requerir confirmar presuntos positivos para genes de virulencia y serogrupo, correr en paralelo los controles que se iniciaron desde el pre-enriquecimiento.

6. APARATOS Y MATERIALES

- Pinzas estériles
- Pipetas Pasteur estériles.
- Tijeras y/o bisturíes estériles

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga (STEC)	PNT-MA-14	
		Edición N° 01	Página 4 de 13

- Asas de siembra estériles
- Asas de inoculación estériles.
- Diseminadores "palos de hockey" estériles
- Vórtex
- Bolsas de Stomacher con filtro
- Tubos de vidrio (8 mm de diámetro y 160 mm de longitud)
- Tubos de lisis con tapa
- Pipetas graduadas estériles con capacidad nominal de 1ml y 10 ml
- Placas de Petri de diámetro aproximado 90 mm
- Homogeneizador tipo Stomacher
- Balanza granataria sensibilidad $\pm 0,1$ g
- Equipo de esterilización húmeda (autoclave)
- Equipo de esterilización seca
- Cabina de flujo laminar
- Incubadora capaz de operar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Baño de agua termostático o bloque calefactor capaz de alcanzar una temperatura de 100°C
- Baño de agua termostático capaz de operar entre $44^{\circ}\text{C} - 47^{\circ}\text{C}$
- Peachímetro que tenga una exactitud de calibración de $\pm 0,1$ unidad de pH a $20^{\circ}\text{C} - 25^{\circ}\text{C}$
- Cabina de seguridad biológica clase II
- Equipo de PCR en tiempo real
- VITEK 2 o similar
- Refrigerador capaz de operar a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$
- Freezer capaz de operar a $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$
- Micropipetas con capacidad 10 μl , 50 μl , 100 μl , 200 μl y 1000 μl
- Tips con filtro
- Tubos eppendorf capacidad 1,5 ml
- Separador magnético con rack magnético
- Agitador por rotación con soporte para tubos eppendorf

7. PROCESAMIENTO

Nota: ver esquema en Anexo I y Anexo II

7.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

7.1.1. Muestra para analizar y pre-enriquecimiento

Nota: desinfectar el paquete de la muestra antes de la apertura. Las muestras se procesarán en una cabina de flujo laminar.

- Para matrices que contengan una alta carga de microbiota acompañante:

Para matrices sólidas, transferir asépticamente la porción de muestra a analizar (X g) a una bolsa de Stomacher (con filtro preferentemente). Agregar (9X ml) del caldo mTSB + novobiocina o acriflavina, dependiendo de la matriz. Mezclar bien.

Para matrices líquidas, utilizando una pipeta estéril, transferir la porción de muestra a analizar (X ml) a una bolsa

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga (STEC)	PNT-MA-14	
		Edición N° 01	Página 5 de 13

de Stomacher. Agregar (9X ml) del caldo mTSB + novobiocina o acriflavina, dependiendo de la matriz. Mezclar bien.

• Para matrices que contengan bacterias estresadas:

Dejar que las muestras congeladas se descongelen a temperatura ambiente. Luego transferir la porción de muestra a analizar (X g o X ml) a una bolsa de stomacher. Agregar (9X ml) del APB. Mezclar bien.

Incubar las muestras y los controles a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18-24 h.

7.2. EJECUCIÓN DEL ENSAYO

7.2.1. Extracción de ácidos nucleicos

Utilizar un procedimiento apropiado para la extracción de ácidos nucleicos de bacterias Gram-negativas dependiendo del sistema de detección que se va a utilizar. También se pueden utilizar *kits* comerciales, en ese caso seguir las instrucciones del fabricante.

7.2.2. Amplificación (para PCR en tiempo real)

El método de amplificación por PCR descrito se basa en la PCR en tiempo real.

Las condiciones de reacción y los ciclos térmicos deben optimizarse para cada par de primers y/o sistema. En caso de ser necesario, utilizar un control interno de amplificación (IAC).

Si se utilizan *kits* comerciales, seguir las instrucciones del fabricante.

7.2.3. Detección de productos de PCR

La detección de los genes buscados se realiza según el sistema de detección adoptado. Una vez generada la emisión de luz, esta es capturada por el equipo durante la amplificación.

7.2.4. Interpretación de los resultados de la PCR en tiempo real

Los resultados obtenidos por PCR son interpretados por el *software* vinculado al equipo. Durante la amplificación, el *software* monitoriza la amplificación por PCR de la nucleasa 5' analizando las emisiones de fluorescencia del fluorocromo excitado para cada muestra. El equipo determina un umbral de fluorescencia emitida por el fluorocromo excitado en los primeros ciclos. Esta determinación del umbral está configurada por *default*. Al finalizar el proceso, se considera una reacción positiva si su curva de emisión excede el umbral.

Verificar las curvas de emisión en caso de obtener resultados ambiguos. Las muestras positivas dan una curva con un claro aumento de la fluorescencia, a partir de una serie de ciclos correspondientes al umbral del proceso.

En caso de que los controles arrojen resultados inesperados, se debe repetir el procedimiento.

Secuencias del método:

1) Detección de los genes que codifican para *stx1/2* y el gen *eae*.

2.a) A continuación se analizan las muestras positivas para los genes *stx* y *eae* para detección de genes

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga (STEC)	PNT-MA-14	
		Edición N° 01	Página 6 de 13

que codifican para los serogrupos que se encuentran dentro del alcance de esta metodología.

2.b) Las muestras positivas, solamente para los genes que codifican *stx*, se someten a un aislamiento de cepas.

Para mejorar el aislamiento de STEC, puede utilizarse un método de enriquecimiento específico del serogrupo (por ejemplo: IMS). Esto se realiza a partir de muestras positivas para uno de los serogrupos que se encuentran dentro del alcance de esta metodología.

7.3. SEPARACIÓN INMUNOMAGNÉTICA (IMS)

Se realiza el aislamiento de las cepas STEC para confirmar que los resultados positivos, obtenidos por PCR, se deben a la presencia de bacterias vivas.

Si alguna de las muestras da como resultado positivo para la detección de alguno de los genes asociados a uno de los serogrupos de interés, entonces se deberá realizar la separación inmunomagnética (IMS) del serogrupo en cuestión, para poder llegar al aislamiento de la bacteria que dio origen a esa señal en el ensayo de PCR.

Las instrucciones para realizar la IMS que se detallan en este procedimiento son como guía general. Deberán seguirse las indicaciones del fabricante de las partículas inmunomagnéticas anti-*Escherichia coli* O157, O111, O26, O103 y O145.

7.4. AISLAMIENTO EN AGARES SELECTIVOS E IDENTIFICACIÓN DE COLONIAS

7.4.1. Siembra en placa

Utilizando una micropipeta, transferir 50 µl de las partículas magnéticas re-suspendidas a una placa, previamente secada, de agar TBX, o equivalente. Estriar las partículas utilizando un diseminador “palo de hockey”, para poder obtener colonias bien aisladas sobre el agar.

Incubar el TBX a 37°C durante 18-24 h, o si se utiliza otro medio sólido selectivo según las indicaciones del fabricante.

7.4.2. Reconocimiento de colonias típicas

En el agar TBX, las colonias típicas de *E. coli* se ven de color azul verdoso.

Examinar el otro agar selectivo para el aislamiento de colonias de *E. coli* siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.5. CONFIRMACIÓN

7.5.1. Selección de colonias para la confirmación

Picar hasta 50 colonias con morfología característica de *E. coli*.

Pasar cada una de esas colonias a un agar nutritivo (pequeñas estrías) y a un tubo eppendorf que contenga agua calidad biología molecular, a modo de juntar grupos (*pools*) de 10 colonias cada uno.

Realizar una PCR para la detección de los genes *stx* y *eae*. Esto se puede hacer tanto del pool como de las colonias aisladas en placa.

Si una colonia es positiva para la presencia de genes identificados en el screening, continuar entonces con

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga (STEC)	PNT-MA-14	
		Edición N° 01	Página 7 de 7

una segunda PCR para la identificación de los genes pertenecientes a los serogrupos.

Si un *pool* es positivo, incubar el agar nutritivo. Una vez incubado, se deben probar por separado cada una de las colonias que conformaran el *pool*.

7.5.2. Confirmación bioquímica: formación de indol

Si se dispone de MALDI-TOF realizar la identificación de las colonias con este sistema y pasar a la confirmación serológica (7.5.3.)

Para la detección de la formación de indol, inocular una colonia pura, proveniente del agar nutritivo, en un tubo que contenga medio triptona/triptófano. Incubar a 37°C durante 24 h.

Agregar 1 ml del reactivo de Kovac's y dejar a temperatura ambiente durante 10 minutos.

La formación de un color rojo indica reacción positiva. Un color amarillo/amarronado indica reacción negativa.

Nota: para la identificación bioquímica se puede utilizar un *kit* de identificación de enterobacterias comercial, que debe ser utilizado según las instrucciones del fabricante (Ejemplo: Api 20E, VITEK 2).

7.5.3. Confirmación serológica

Solamente se deberán examinar con los antisueros correspondientes, aquellas colonias que hayan dado positiva la reacción del indol o que se hayan identificado como *E. coli* mediante MALDI-TOF.

Eliminación de cepas auto-aglutinantes:

En un portaobjetos colocar una gota de solución salina. Utilizando un asa tomar parte de una colonia, proveniente del agar nutritivo, y dispersarla en la solución hasta obtener una suspensión turbia y homogénea. Mover el portaobjetos suavemente durante 30 a 60 segundos. Observar la suspensión, preferentemente contra un fondo oscuro.

Si en la suspensión se ve la aparición de grumos, esto indica que la bacteria auto-aglutina y la confirmación serológica no podrá ser realizada.

Reacción con los antisueros *E. coli* correspondientes:

Utilizando una colonia pura del agar nutritivo, tomar con un asa parte de la misma, suspenderla en una gota de solución salina y agregar una pequeña gota del antisuero para *E. coli*.

Si hay aglutinación dentro del minuto, entonces se considera que la reacción es positiva.

7.5.4. Confirmación de aislamientos por PCR

Se utilizarán los protocolos de PCR para confirmar la presencia de genes de virulencia como así también de los serogrupos correspondientes en las colonias aisladas.

Nota: enviar los aislamientos a un laboratorio de referencia para ampliar su caracterización (opcional).

8. INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Se informarán los resultados obtenidos para cada muestra, que luego serán validados por el facultativo responsable.

a) Muestras negativas para el gen *stx*:

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga (STEC)	PNT-MA-14	
		Edición N° 01	Página 9 de 13

STEC NO DETECTADO en X g o X ml (ISO 13136/2012)

Nota: en ausencia de genes *stx*, el procedimiento se detiene sin proceder a la determinación del gen *eae*, que codifica la intimina, o de los genes asociados con los serogrupos en el alcance de este método.

Si NO se logra el aislamiento de cepas a partir de muestras positivas para el gen *stx*:

b) Muestras positivas para el gen *stx*:

DETECCIÓN PRESUNTIVA DE STEC en X g o X ml (ISO 13136/2012)

c) Muestras positivas para los genes *stx* y *eae*:

DETECCIÓN PRESUNTIVA DE STEC CAUSANTE DE LA LESIÓN DE UNIÓN Y BORRAMIENTO en X g o X ml (ISO 13136/2012)

d) Muestras positivas para genes *stx* y *eae*, así como para genes asociados con uno de los serogrupos:

DETECCIÓN PRESUNTIVA DE STEC DEL SEROGRUPO XX CAUSANTE DE LA LESIÓN DE UNIÓN Y BORRAMIENTO en X g o X ml (ISO 13136/2012)

Si se logran el aislamiento y la confirmación a partir de muestras positivas en el screening del gen *stx*:

e) Cepas aisladas de *E. coli* positivas para el gen *stx*:

PRESENCIA DE STEC en X g o X ml (ISO 13136/2012)

f) Cepas aisladas de *E. coli* positivas para los genes *stx* y *eae*:

PRESENCIA DE STEC CAUSANTE DE LA LESIÓN DE UNIÓN Y BORRAMIENTO en X g o X ml (ISO 13136/2012)

g) Cepas aisladas de *E. coli* positivas para genes *stx* y *eae*, así como para genes asociados con uno de los serogrupos:

PRESENCIA DE STEC DEL SEROGRUPO XX CAUSANTE DE LA LESIÓN DE UNIÓN Y BORRAMIENTO en X g o X ml (ISO 13136/2012)

En el momento de realizar la interpretación de los resultados, tener en cuenta el Reglamento de la Comisión N°2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios ANEXO I – Capítulo 1 “Criterios de seguridad alimentaria”, en donde la tolerancia para la detección de *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) O157, O26, O111, O103 y O145 es 0 “cero”, es decir que dependiendo de la matriz las muestras se informarán como Presencia o Ausencia en X g.

Los equipos empleados en las actividades analíticas deben someterse a actividades periódicas de mantenimiento y de calibración o verificación de acuerdo a un plan establecido (ISO 7218).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga (STEC)	PNT-MA-14	
		Edición N° 01	Página 10 de 13

9. RESPONSABILIDADES

El procesamiento de las muestras y todas las actividades de laboratorio, así como sus correspondientes registros, se realiza por técnicos superiores o por técnicos de grado medio de laboratorio, debidamente cualificados.

La supervisión/validación la realiza el facultativo responsable y aplica a todas las actividades analíticas y no analíticas: revisión de procedimientos, controles de calidad y emisión e interpretación de resultados.

Los auxiliares técnicos que intervienen son responsables de llevar a cabo las actividades concernientes a la preparación de la muestra y la preparación de los materiales y medios de cultivo necesarios y de llevar los registros correspondientes.

10. IDENTIFICACIÓN DE FUENTES DE INCERTIDUMBRE

Origen	Fuentes de incertidumbre	Forma de control
Instrumental	Incertidumbre asociada a las pesadas	Calibración anual y Verificación diaria de las balanzas.
Temperatura	Incubadoras	Termómetros calibrados.
Medios de cultivo y reactivos	Calidad y homogeneidad de los medios de cultivo y reactivos	Método ecométrico. Utilización de cultivos de referencia.
Humanas	Experiencia y pericia del personal en la interpretación de los resultados	Pruebas intralaboratorio. Pruebas de proficiencia internacionales.

11. MEDIDAS DE SEGURIDAD Y CONDICIONES AMBIENTALES

Las *E. coli* productoras de toxina Shiga (STEC), son microorganismos patógenos para el ser humano a partir de una pequeña dosis. La ingestión de 100 UFC puede causar la muerte. Por tal motivo, el personal del laboratorio deberá estar familiarizado con la manipulación de patógenos Clase II, siendo importante durante el proceso y ensayo, la aplicación de prácticas de bioseguridad acordes con los niveles evaluados de riesgo.

12. ANEXOS

Anexo	Título	N° de páginas
ANEXO I	Diagrama de flujo del procedimiento de <i>screening</i>	1
ANEXO II	Diagrama de flujo del procedimiento de aislamiento y confirmación de STEC	1
ANEXO III	Secuencias de primers y sondas	1

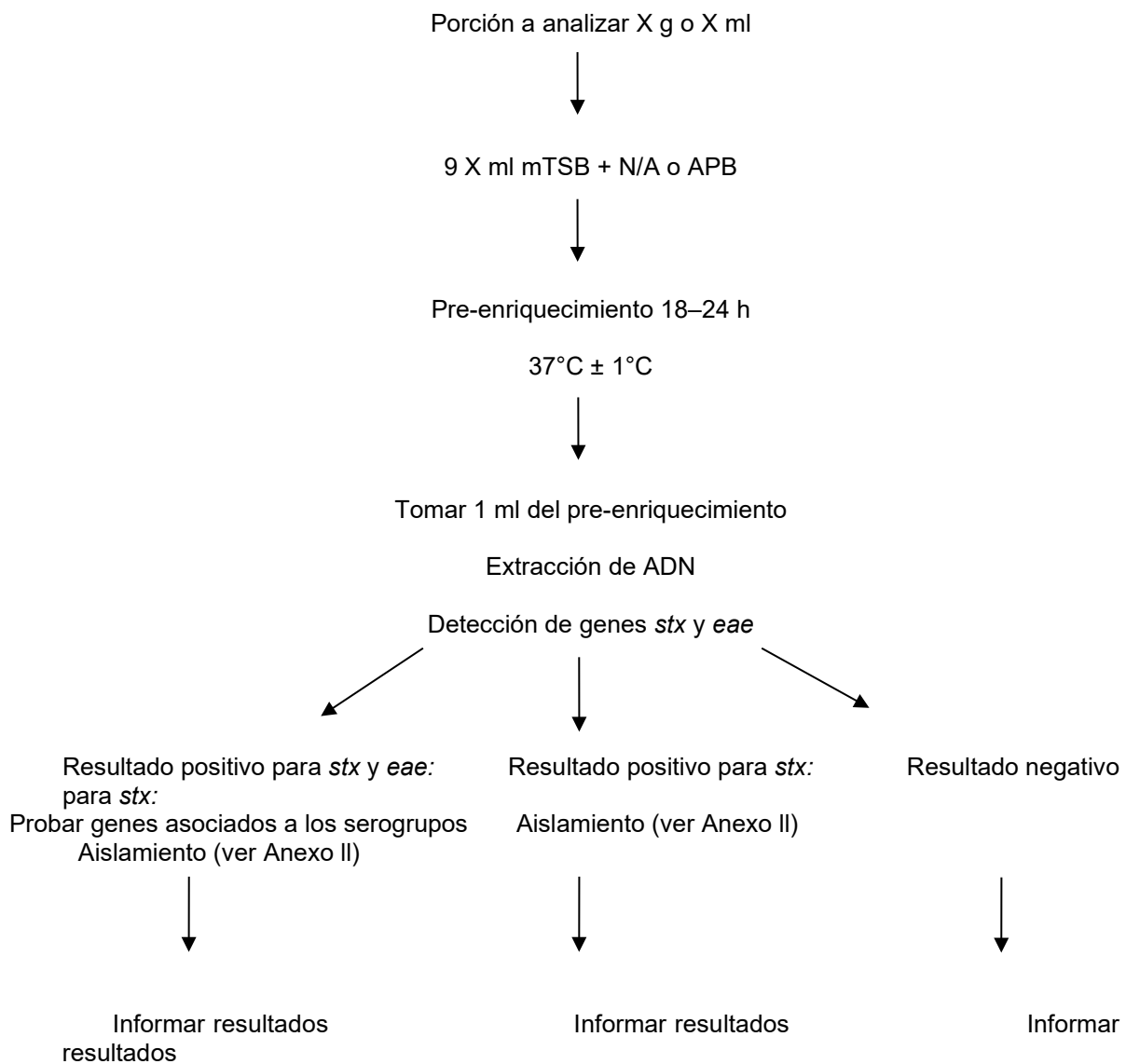
11. BIBLIOGRAFÍA

1. Microbiology of the food and animal feed – Real-time polymerase chain reaction (PCR) – based method for the detection of food-borne pathogens - Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups. ISO 13136/2012.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga (STEC)	PNT-MA-14	
		Edición N° 01	Página 11 de 13

ANEXO I

Diagrama de flujo del procedimiento de *screening*



Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga (STEC)	PNT-MA-14	
		Edición N° 01	Página 12 de 13

ANEXO II

Diagrama de flujo del procedimiento de aislamiento y confirmación de STEC

Si las muestras fueron positivas para uno de los genes asociados a los serogrupos que se encuentran dentro del alcance de este método, se llevará a cabo una separación inmunomagnética (IMS) para facilitar el aislamiento.

Estriar el caldo de pre-enriquecimiento o IMS en los medios sólidos selectivos
Incubar durante 18-24 h a 37°C ± 1°C



Picar hasta 50 colonias que tengan morfología de *E. coli*. Con cada una de ellas, hacer pequeñas estrías sobre un agar nutritivo (AN) y pasar a H₂O (*pools* de 10 colonias cada uno).
Realizar la detección por PCR de los genes *stx* y *eae* de las colonias aisladas o de los *pools*.



Si una colonia es positiva para la presencia de los genes identificados en el *screening*, entonces pasar al paso siguiente. Si un *pool* es positivo, incubar el AN. Luego probar las colonias individuales como se había hecho con el *pool*.



Identificar bioquímicamente colonias positivas para *E. coli*. Chequear el serogrupo si la muestra había dado positivo para alguno de los serogrupos específicos detectados por PCR.
(Ejemplo: por PCR o aglutinación)



Enviar el aislamiento a un laboratorio de referencia para ampliar su caracterización (opcional)



Informe de resultados

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Investigación de <i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga (STEC)	PNT-MA-14	
		Edición N° 01	Página 13 de 13

ANEXO III

Secuencias de primers y sondas

El protocolo de PCR en tiempo real aquí descrito está basado en el uso de los siguientes primers y sondas, que deberían ser considerados como reactivos de referencia. Sin embargo, se pueden utilizar otros métodos con diferentes primers y sondas siempre que sean equivalentes a los indicados en las tablas 1 y 2.

Primers y sondas

Las tablas 1 y 2 proveen las secuencias de primers y sondas para:

- La detección de genes *stx* y *eae* por PCR en tiempo real
- La detección de genes asociados a serogrupos por PCR en tiempo real

En las tablas 1 y 2, la química de los fluoróforos (reportero y *quencher*) no está indicada, ya que depende de los equipos de PCR en tiempo real de los que disponga cada laboratorio.

Tabla 1. Secuencias de primers y sondas utilizados para la detección de genes *stx* y *eae*

Gen diana	Forward primer, reverse primer y sondas (5' - 3') ^a	Tamaño del amplicón bp	Localización dentro de la secuencia	N° de acceso GenBank
<i>stx1</i>	TTT GTY ACT GTS ACA GCW GAA GCY TTA CG CCC CAG TTC ARW GTR AGR TCM ACR TC Probe-CTG GAT GAT CTC AGT GGG CGT TCT TAT GTAA	131	878 a 906 983 a 1008 941 a 971	M16625
<i>stx2^b</i>	TTT GTY ACT GTS ACA GCW GAA GCY TTA CG CCC CAG TTC ARW GTR AGR TCM ACR TC Probe-TCG TCA GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC	128	785 a 813 887 a 912 838 a 864	X07865
<i>eae</i>	CAT TGA TCA GGA TTT TTC TGG TGA TA CTC ATG CGG AAA TAG CCG TTA Probe-ATA GTC TCG CCA GTA TTC GCC ACC AAT ACC	102	899 a 924 1000 a 979 966 a 936	Z11541

^a En la secuencia Y es (C,T), S es (C,G), W es (A,T), R es (A,G), M es (A,C).
^b Esta combinación de primer/sonda reconoce todas las variantes de *stx2* excepto *stx2f*.

Tabla 2. Secuencias de primers y sondas, utilizados para la amplificación de serogrupos específicos

Gen diana (serogrupo)	Forward primer, reverse primer y sondas (5' - 3')	Tamaño del amplicón bp	Localización dentro de la secuencia	N° de acceso GenBank
<i>rfbE</i> (O157)	TTT CAC ACT TAT TGG ATG GTC TCAA CGA TGA GTT TAT CTG CAA GGT GAT Probe-AGG ACC GCA GAG GAA AGA GAG GAA TTA AGG	88	348 a 372 412 a 435 381 a 410	AF163329
<i>wbdl</i> (O111)	CGA GGC AAC ACA TTA TAT AGT GCT TT TTT TTG AAT AGT TAT GAA CAT CTT GTT TAGC Probe-TTG AAT CTC CCA GAT GAT CAA CAT CGT GAA	146	3464 a 3489 3579 a 3609 3519 a 3548	AF078736
<i>wzx</i> (O26)	CGC GAC GGC AGA GAA AATT AGC AGG CTT TTA TAT TCT CCA ACT TT Probe-CCC CGT TAA ATC AAT ACT ATT TCA CGA GGT TGA	135	5648 a 5666 5757 a 5782 5692 a 5724	AF529080
<i>ihp1</i> (O145)	CGA TAA TAT TTA CCC CAC CAG TAC AG GCC GCC GCA ATG CTT Probe-CCG CCA TTC AGA ATG CAC ACA ATA TCG	132	1383 a 1408 1500 a 1514 1472 a 1498	AF531429
<i>wzx</i> (O103)	CAA GGT GAT TAC GAA AAT GCA TGT GAA AAA AGC ACC CCC GTA CTT AT Probe-CAT AGC CTG TTG TTT TAT	99	4299 a 4323 4397 a 4375 4356 a 4373	AY532664