

CUARTA SECCION
PODER EJECUTIVO
SECRETARIA DE SALUD

NORMA Oficial Mexicana NOM-131-SSA1-2012, Productos y servicios. Fórmulas para lactantes, de continuación y para necesidades especiales de nutrición. Alimentos y bebidas no alcohólicas para lactantes y niños de corta edad. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Etiquetado y métodos de prueba (Continúa en la Quinta Sección)

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

MIKEL ANDONI ARRIOLA PEÑALOSA, Comisionado Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en lo dispuesto por el artículo 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 4 de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo; 3 fracción XXII, 17 Bis fracción III, 115 fracciones IV y VI, 194 fracción I, 195, 199, 210, 212, 215 fracciones I, II, III y IV y 216 de la Ley General de Salud; 3 fracción XI, 38 fracción II, 40 fracciones I, XI y XII, 41, 43, 47 fracción IV, 51 y 52 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 28 y 33 del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 1 fracción XII, 25, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150 y 151 del Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios; 2 inciso C fracción X y 36 del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud; 3 fracciones I incisos c, d y I, y II, 10 fracciones IV y VIII del Reglamento de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, y

CONSIDERANDO

Que en cumplimiento a lo previsto en el artículo 46 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, el Subcomité de Productos y Servicios presentó el 27 de abril de 2011 al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, el anteproyecto de la presente Norma Oficial Mexicana.

Que con fecha del 13 de febrero de 2012, en cumplimiento del acuerdo del Comité y de lo previsto en el artículo 47 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, se publicó en el Diario Oficial de la Federación el proyecto de la presente Norma Oficial Mexicana, a efecto de que dentro de los siguientes sesenta días naturales posteriores a dicha publicación, los interesados presentaran sus comentarios al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario.

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

Que en atención a las anteriores consideraciones, contando con la aprobación del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, tengo a bien expedir y ordenar la publicación en el Diario Oficial de la Federación la siguiente:

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-131-SSA1-2012, PRODUCTOS Y SERVICIOS. FORMULAS PARA LACTANTES, DE CONTINUACION Y PARA NECESIDADES ESPECIALES DE NUTRICION. ALIMENTOS Y BEBIDAS NO ALCOHOLICAS PARA LACTANTES Y NIÑOS DE CORTA EDAD. DISPOSICIONES Y ESPECIFICACIONES SANITARIAS Y NUTRIMENTALES. ETIQUETADO Y METODOS DE PRUEBA

PREFACIO

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

Secretaría de Salud.

Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.

Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva.

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

Instituto Nacional de Pediatría.

Instituto Nacional de Perinatología.

Procuraduría Federal del Consumidor.

Sistema para el Desarrollo Integral de la Familia del Distrito Federal.

Instituto Politécnico Nacional.

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

Escuela de Dietética y Nutrición del ISSSTE.

Asociación Mexicana de Productos Infantiles A.C.

PBM Products México, S. de R.L. de C.V.

Vázquez Tercero y Asociados, S.C.

Asociación Pro Lactancia Materna.

Cámara Nacional de Industriales de la Leche (CANILEC).

Abbott Laboratories de México, S.A. de C.V.

Bayer de México, S.A. de C.V.

Danone de México, S.A. de C.V.

Mead Johnson. Nutricionales de México, S. de R.L. de C.V.

Nestlé México, S.A. de C.V.

Wyeth, S. de R.L. de C.V.

Cámara Nacional de la Industria de la Transformación (CANACINTRA)/Rama 61.

Confederación de Cámaras Industriales de los Estados Unidos Mexicanos (CONCAMIN).

INDICE

1. Objetivo y campo de aplicación
2. Referencias
3. Definiciones
4. Símbolos y abreviaturas
5. Clasificación
6. Disposiciones sanitarias generales
7. Disposiciones sanitarias para fórmulas
8. Disposiciones sanitarias para alimentos y bebidas no alcohólicas para lactantes y niños de corta edad
9. Muestreo y métodos de prueba
10. Etiquetado
11. Envase y embalaje
12. Concordancia con normas internacionales
13. Bibliografía
14. Observancia de la norma
15. Vigencia
16. Apéndices Normativos
 - "A" Sustancias nutritivas
 - "B" Métodos de prueba

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta norma establece las disposiciones y especificaciones sanitarias, nutrimentales y de etiquetado que deben cumplir:

- las fórmulas para lactantes,

- las fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición,
- las fórmulas de continuación,
- las fórmulas de continuación para necesidades especiales de nutrición, y
- los alimentos y bebidas no alcohólicas para lactantes y niños de corta edad.

Así como los métodos de prueba.

1.2 Esta norma es de observancia obligatoria para las personas físicas y morales que se dedican al proceso y/o importación de los productos objeto de la misma, que van a ser comercializados en el territorio nacional.

2. Referencias

Esta norma se complementa con las siguientes Normas Oficiales Mexicanas, sus modificaciones o las que las sustituyan:

2.1 Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA2-1993, Atención de la mujer durante el embarazo, parto y puerperio y del recién nacido. Criterios y procedimientos para la prestación del servicio.

2.2 Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCFI/SSA1-2010, Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados. Información comercial y sanitaria.

2.3 Norma Oficial Mexicana NOM-086-SSA1-1994, Bienes y servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales.

2.4 Norma Oficial Mexicana NOM-130-SSA1-1995, Bienes y Servicios. Alimentos envasados en recipientes de cierre hermético y sometidos a tratamiento térmico. Disposiciones y especificaciones sanitarias.

2.5 Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios.

3. Definiciones

Para fines de esta norma se entiende por:

3.1 Ablactación o alimentación complementaria, a la incorporación a la dieta del lactante de alimentos distintos a la leche materna o su sucedáneo, realizándose gradual y progresivamente a partir de los 6 meses de edad o de acuerdo con las necesidades específicas de cada lactante.

3.2 Ácidos grasos trans, a todos los isómeros geométricos de ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados que poseen en la configuración trans dobles enlaces carbono-carbono no conjugados.

3.3 Aditivo alimentario (Aditivo), cualquier sustancia que en cuanto tal no se consume normalmente como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos, tenga o no valor nutritivo, y cuya adición al producto con fines tecnológicos en sus fases de producción, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, resulte o pueda preverse razonablemente que resulte (directa o indirectamente) por sí o sus subproductos, en un componente del producto o un elemento que afecte a sus características (incluidas las organolépticas). Esta definición no incluye "contaminantes" o sustancias añadidas al producto para mantener o mejorar las cualidades nutrimentales.

3.4 Agua para uso y consumo humano (agua potable), al agua que no contiene contaminantes objetables, químicos o agentes infecciosos y que no causa efectos nocivos para la salud.

3.5 Alimento, a cualquier sustancia o producto, sólido, semisólido, natural o transformado, que proporciona al organismo elementos para su nutrición.

3.6 Alimentos a base de cereales para lactantes y niños de corta edad, a los productos elaborados principalmente con uno o más cereales molidos, que constituirán al menos el 25 % de la mezcla final en base seca, adicionados o no de otros ingredientes, destinados a complementar la dieta de los lactantes a partir de los seis meses en adelante y para los niños de corta edad como parte de una dieta progresivamente diversificada.

3.7 Alimentos deshidratados, aquellos en los que se ha eliminado agua por medios físicos a fin de evitar su descomposición y son reconstituidos mediante dilución, no incluye los alimentos a base de cereales.

3.8 Alimentos y bebidas no alcohólicas listos para ser consumidos, a los sometidos a tratamiento térmico antes o después de ser envasados en recipientes herméticamente cerrados, los cuales deben ser comercialmente estériles.

3.9 Alimentos y bebidas no alcohólicas para lactantes y niños de corta edad, son los productos industrializados que se utilizan principalmente durante el período normal de ablactación de los lactantes o en la alimentación de los niños de corta edad. Se preparan para ser consumidos directamente o deshidratados para ser reconstituidos.

3.10 Bajo peso al nacer, el que se refiere a un lactante que pesa al nacimiento menos de 2500 g.

3.11 Bebida no alcohólica, cualquier líquido, natural o transformado, que proporcione al organismo elementos para su nutrición.

3.12 Contaminante, a cualquier agente biológico o químico, materia extraña u otras sustancias no añadidas intencionalmente a los alimentos y bebidas, que puedan comprometer la inocuidad o la aptitud de los alimentos.

3.13 Chupón, al objeto de goma o plástico con forma de pezón que se les da a los bebés para que succionen la leche.

3.14 Destete, a la suspensión de la lactancia al pecho.

3.15 Envase, a cualquier recipiente o envoltura en el cual está contenido el producto preenvasado para su venta al consumidor.

3.16 Etiqueta, a cualquier rótulo, marbete, inscripción, imagen u otra materia descriptiva o gráfica, escrita, impresa, estarcida, marcada, grabada en alto o bajo relieve, adherida, sobrepuesta o fijada al envase del producto preenvasado o, cuando no sea posible por las características del producto, al embalaje.

3.17 Fórmula para lactantes, al sucedáneo de la leche materna especialmente fabricado para satisfacer, por sí solo, las necesidades nutrimentales de los lactantes durante sus primeros meses de vida hasta la introducción de la ablactación o alimentación complementaria correspondiente.

3.18 Fórmula de continuación, al alimento destinado a ser utilizado como componente líquido de la dieta de destete del lactante a partir del sexto mes y para niños de corta edad.

3.19 Fórmula de continuación para necesidades especiales de nutrición, al alimento destinado a ser utilizado como componente líquido de la dieta de destete del lactante a partir del sexto mes de vida y para niños de corta edad, en casos de trastornos, enfermedades o condiciones médicas específicas.

3.20 Fórmula para lactantes con necesidades especiales de nutrición, al sucedáneo de la leche materna o de la fórmula para lactantes, especialmente fabricado para satisfacer, por sí solo, las necesidades nutrimentales de los lactantes con trastornos, enfermedades o condiciones médicas específicas durante sus primeros meses de vida hasta la introducción de la ablactación o alimentación complementaria correspondiente. Incluye a los fortificadores de leche materna o humana.

3.21 Fortificador de leche materna o humana, al producto que puede añadirse a la leche de la especie humana para proporcionar nutrimentos adicionales en la alimentación de los lactantes con bajo peso al nacer y recién nacidos pretérmino.

3.22 Inocuo, lo que no hace o causa daño a la salud.

3.23 Información nutrimental, a toda descripción destinada a informar al consumidor sobre las propiedades nutrimentales de un alimento o bebida no alcohólica preenvasado. Comprende dos aspectos:

- La declaración nutrimental obligatoria.
- La declaración nutrimental complementaria.

3.24 Lactantes, a los niños hasta los doce meses de edad.

3.25 Leche materna o humana, a la secreción producida por las glándulas mamarias de la especie humana después del calostro y cuya función es alimentar al lactante. Esta leche contiene los nutrimentos, así como una serie de compuestos bioactivos y componentes celulares que ejercen diferentes efectos biológicos que el lactante requiere para su crecimiento y desarrollo. Representa el único alimento del lactante en los primeros meses de vida.

3.26 Límite, a la cantidad establecida de nutrimentos, aditivos, microorganismos, materia extraña, plaguicidas, biotoxinas, residuos de medicamentos y metales pesados.

3.27 Limpieza, a la acción que tiene por objeto quitar la suciedad.

3.28. Materia extraña, aquella sustancia, resto o desecho orgánico o inorgánico, que se presenta en el producto sea por contaminación o por manejo poco higiénico del mismo durante su elaboración, distribución y comercialización que resultan perjudiciales para la salud.

3.29 Metal pesado o metaloide, aquellos elementos químicos que causan efectos indeseables en el metabolismo, aun en concentraciones bajas. Su toxicidad depende de la dosis en que se ingieren, así como de su acumulación en el organismo.

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

3.31 Niños de corta edad, a los mayores de doce meses y hasta los treinta y seis meses de edad.

3.32 Nivel superior de referencia, al que se aplica a los nutrimentos sobre los que no se dispone de suficiente información para realizar una evaluación de riesgos basada en conocimientos científicos, dichos niveles son valores derivados considerando las necesidades nutrimentales de los lactantes y un historial establecido de uso aparente inocuo. Pueden ajustarse de acuerdo con los progresos científicos y tecnológicos pertinentes. La finalidad de un nivel superior de referencia es proporcionar orientación a los fabricantes y no deben interpretarse como valores deseables.

3.33 Prácticas de higiene, a las medidas necesarias para garantizar la inocuidad de los productos.

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

3.35 Recién nacido pretérmino, al producto de la concepción de 28 semanas a menos de 37 semanas de gestación.

3.36 Sucedáneo de la leche materna o humana, a las fórmulas comercializadas presentadas como sustituto parciales o totales de la leche materna o humana.

4. Símbolos y abreviaturas

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

A	absorbancia
ARA	ácido araquidónico
BPF	Buenas Prácticas de Fabricación
°C	grados Celsius
cm	centímetro
cm ²	centímetro cuadrado
DHA	ácido docosahexaenoico
EPA	ácido eicosapentaenoico
eq	equivalente
g	gramo
h	hora
IDR	Ingesta Diaria Recomendada
IDS	Ingesta Diaria Sugerida
kcal	kilocalorías
kg	kilogramo
kJ	kilojoules
l	litro

L	levógiro
m	masa
mg	miligramo
min	minutos
ml	mililitro
mM	milimolar
mm	milímetro
m/m	masa masa
mOsm	miliosmol
mv	milivolt
M	molar
N	normal
NaCl	cloruro de sodio
N.A.	no aplica
ng	nanogramo
nm	nanómetro
NMP	Número Más Probable
No.	número
NSR	Nivel Superior de Referencia
oz	onza
pH	potencial de hidrógeno
REP	Relación de Eficiencia Proteica
rpm	revoluciones por minuto
T	transmitancia
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
U.I.	Unidad Internacional
µg	microgramo
µm	micrómetro
S.E.	sin especificación
seg	segundos
VNR	Valores Nutrimentales de Referencia
v/v	volumen a volumen
/	por
%	por ciento
=	menor o igual
>	mayor que
<	menor que

Cuando en esta Norma se mencionen los siguientes términos, debe entenderse:

Acuerdo, el "Acuerdo por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias".

CICOPLAFEST, la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas.

Fórmula, las fórmulas reguladas por este ordenamiento.

Productos, los regulados por este ordenamiento, según corresponda.

Reglamento, el Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios.

Secretaría, la Secretaría de Salud.

5. Clasificación

Los productos se clasifican en:

5.1 Fórmulas:

5.1.1 Para lactantes.

5.1.2 Para lactantes con necesidades especiales de nutrición.

5.1.3 De continuación.

5.1.4 De continuación para necesidades especiales de nutrición.

5.2 Alimentos y bebidas no alcohólicas para lactantes y niños de corta edad:

5.2.1 A base de cereales:

5.2.1.1 Cereales que deben ser preparados para el consumo añadiendo leche u otros líquidos nutritivos idóneos (fórmulas).

5.2.1.2 Cereales que deberán utilizarse después de ser cocidos en agua hirviendo u otros líquidos apropiados, incluidas las pastas.

5.2.1.3 Galletas y otros productos de panificación.

5.2.2 Listos para ser consumidos.

5.2.3 Deshidratados.

6. Disposiciones sanitarias generales

Los establecimientos que se dediquen al proceso de los productos objeto de esta norma, deben:

6.1 Cumplir con lo establecido en la NOM-251-SSA1-2009, señalada en el apartado de referencias y para los productos importados lo correspondiente a esta Norma.

6.2 Instrumentar un plan de análisis de peligros y puntos críticos de control de conformidad con lo establecido en el Apéndice Normativo A de la Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, señalada en el apartado de referencias.

6.3 Los productos y materias primas utilizadas en su elaboración deben cumplir con lo establecido en el Reglamento, las materias primas además:

6.3.1 Deben estar limpias y ser inocuas.

6.3.2 No deben exceder los límites máximos residuales de plaguicidas establecidos en el Catálogo Oficial de Plaguicidas de la CICOPLAFEST, ni contener cualquiera de los plaguicidas prohibidos en dicho Catálogo, según corresponda por la naturaleza de la materia prima.

6.3.3 Cumplir con las normas oficiales mexicanas correspondientes.

6.4 Los productos y las materias primas que se utilicen en su elaboración no deben ser tratados con radiaciones ionizantes.

6.5 Todos los procedimientos de elaboración y de desecación de los productos se deben llevar a cabo de manera que la pérdida de nutrimentos en los productos sea mínima, y se garanticen las cantidades de éstos que se declaran en la etiqueta.

6.6 Los productos no deben contener residuos de hormonas, antibióticos y otros contaminantes o sustancias farmacológicamente activas.

6.7 El responsable del producto debe contar con la evidencia documental que demuestre que cumple con las especificaciones establecidas en esta norma, para cada producto que elabore o comercialice.

6.8 En la elaboración de los productos objeto de esta norma se podrán utilizar los aditivos listados en el Acuerdo, bajo las especificaciones establecidas en el mismo.

6.9 El responsable de la fabricación del producto debe disponer de:

6.9.1 Medios tecnológicos y procedimientos de elaboración que permitan la incorporación de los nutrimentos en forma satisfactoria, y

6.9.2 Métodos de medición y control de las concentraciones de los nutrimentos añadidos a los productos.

6.10 Los productos no podrán usar como ingrediente aceites o grasas hidrogenadas comercialmente.

7. Disposiciones sanitarias para fórmulas

7.1 Los responsables del expendio o suministro al público de fórmulas deben cumplir con el Código Internacional de Comercialización de Sucedáneos de la Leche Materna y Resoluciones Posteriores de la Organización Mundial de la Salud.

7.2 En las unidades médicas, no se permite la distribución gratuita ni la promoción de fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición directamente a las madres, queda sujeta la entrega y/o indicación de estas fórmulas a menores de seis meses de edad únicamente bajo prescripción médica y con justificación por escrito en las unidades de atención del parto y en las de consulta externa.

7.3 En las unidades médicas, guarderías o cualquier otro establecimiento similar en donde se preparan o administran fórmulas, los responsables de su preparación deben seguir al pie de la letra las indicaciones sugeridas por el fabricante, en la reconstitución y conservación de la misma.

7.4 Las fórmulas deben ser preparadas a base de leche de vaca o de otros animales o de mezclas de ellos y/o de otros ingredientes que se haya demostrado científicamente que son idóneos para la alimentación del grupo de edad al que van dirigidas y elaboradas de tal manera que eviten su deterioro o contaminación en todas las condiciones normales de manipulación, conservación y distribución.

7.5 Una vez preparada según las instrucciones de uso dadas en la etiqueta, la fórmula estará exenta de grumos o partículas gruesas, para que pueda ser administrada mediante un chupón de goma o de plástico.

7.6 Especificaciones

7.6.1 Microbiológicos

7.6.1.1 Las fórmulas, deben cumplir con los criterios microbiológicos establecidos en la Tabla No. 1.

Tabla No. 1

Fórmulas en polvo

Microorganismos	n	c	m	M	Clase del Plan
<i>Enterobacter sakazakii</i> (especie de <i>Cronobacter</i>) *	30	0	0 UFC/10 g	N.A.	2
<i>Salmonella</i> spp.	60	0	0 UFC/25 g	N.A.	2
Bacterias aerobias mesófilas **	5	2	500 UFC/g	5 000 UFC/g	3
Enterobacteriaceas	10	2	0 UFC/10 g	N.A.	2

n: número de muestras a ser analizadas

c: máximo número admisible de unidades de muestras defectuosas en un plan de dos clases, o de unidades de muestras marginalmente aceptables en un plan de tres clases

m: un límite microbiológico que separa la buena calidad de la calidad defectuosa en un plan de dos clases o la buena calidad de la calidad marginalmente aceptable en un plan de 3 clases

M: un límite microbiológico que separa, en un plan de tres clases, la calidad marginalmente aceptable de la defectuosa

*Solo aplica para fórmula para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición en polvo y cuando se detecte presencia de Enterobacterias

**No aplica para aquellos productos que contienen probióticos en su formulación

7.6.1.2 Las fórmulas líquidas sujetas a tratamiento térmico y envasadas en recipientes de cierre hermético, además de cumplir con lo establecido en este ordenamiento, deben cumplir con la NOM-130-SSA1-1995, señalada en el apartado de referencias.

7.6.2 Físicoquímicos

7.6.2.1 Metales pesados o metaloides

Tabla No. 2

Especificaciones	Límite máximo (mg/kg)
Arsénico (As)	0,10
Mercurio (Hg)	0,05
Plomo (Pb)	0,02*

* Límite establecido para producto listo para ser consumido

7.6.2.2 Materia extraña. Las fórmulas deben estar exentas de materia extraña.

7.6.3 Nutrimientales

7.6.3.1 Contenido energético

7.6.3.1.1 Las fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición deben proporcionar no menos de 60 kcal (o 250 kJ) y no más de 70 kcal (o 295 kJ) por 100 ml del producto listo para ser consumido, comercializado tal cual o reconstituido según las instrucciones del fabricante.

7.6.3.1.2 Las fórmulas de continuación y fórmulas de continuación para necesidades especiales de nutrición deben proporcionar no menos de 60 kcal (o 250 kJ) y no más de 85 kcal (o 355 kJ) por 100 ml del producto listo para ser consumido, comercializado tal cual o reconstituido según las instrucciones del fabricante.

7.6.3.2 Vitaminas y nutrimentos inorgánicos (minerales)

7.6.3.2.1 Las vitaminas y nutrimentos inorgánicos (minerales) que se adicionen a las fórmulas debe hacerse bajo las formas que se señalan en el Apéndice Normativo A.

7.6.3.2.2 Las fórmulas deben contener las siguientes vitaminas dentro de los límites que se señalan a continuación:

Tabla No. 3

Vitaminas	Fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición			Fórmulas de continuación y fórmulas de continuación para necesidades especiales de nutrición	
	Mínimo/100 kcal	Máximo/100 kcal	NSR/ 100 kcal	Mínimo/100 kcal	Máximo/100 kcal
Vitamina A	200 U.I. o 60 µg expresados en retinol	600 U.I. o 180 µg expresados en retinol	-	250 U.I. o 75 µg expresados en retinol	750 U.I. o 225 µg expresados en retinol
Vitamina D	1 µg o 40 U.I.	2,5 µg o 100 U.I.	-	40 U.I. o 1 µg	120 U.I. o 3 µg
Vitamina C (Ac. ascórbico)	10 mg	S.E.	70 mg ⁽¹⁾	8 mg	S.E.
Tiamina (B₁)	60 µg	S.E.	300 µg	40 µg	S.E.
Riboflavina (B₂)	80 µg	S.E.	500 µg	60 µg	S.E.
Niacina (B₃)	300 µg	S.E.	1500 µg	250 µg	S.E.
Piridoxina (B₆)	35 µg ⁽²⁾	S.E.	175 µg	45 µg ⁽²⁾	S.E.
Acido fólico (B₉)	10 µg	S.E.	50 µg	4 µg	S.E.
Acido pantoténico (B₅)	400 µg	S.E.	2000 µg	300 µg	S.E.
Cianocobalamina (B₁₂)	0,1 µg	S.E.	1,5 µg	0,15 µg	S.E.
Vitamina K₁	4 µg	S.E.	27 µg	4 µg	S.E.
Biotina (H)	1,5 µg	S.E.	10 µg	1,5 µg	S.E.
Vitamina E (alfa tocoferol)	0,5 mg de alfa tocoferol/g de ácidos grasos poliinsaturados ⁽³⁾	S.E.	5	0,7 U.I./g de ácido linoleico o por gramo de ácidos grasos poliinsaturados	S.E.

				expresados en ácido linoleico pero en ningún caso menos de 0,7 U.I. por 100 kcal utilizables	
--	--	--	--	--	--

(1) En el caso de productos en polvo debería procurarse conseguir NSR más bajos.

(2) Las fórmulas que contengan más de 1,8 g de proteínas por cada 100 kcal, deben incrementar el contenido de piridoxina en al menos 15 µg de piridoxina por cada gramo de proteína arriba de dicho valor, en la fórmula lista para ser consumida de acuerdo con las instrucciones descritas en la etiqueta.

(3) Aplicando los siguientes factores de equivalencia para adaptar el contenido mínimo de vitamina E al número de dobles enlaces de ácidos grasos en el preparado: 0,5 mg de alfa tocoferol/1g de ácido linoleico; 0,75 mg de alfa tocoferol/1g de ácido alfa linoléico; 1 mg de alfa tocoferol/1g de ARA; 1,25 mg de alfa tocoferol/1g de EPA; 1,5 mg alfa tocoferol/1g de DHA.

7.6.3.2.3 Las fórmulas deben contener los siguientes nutrimentos inorgánicos (minerales) dentro de los límites que se señalan a continuación:

Tabla No. 4

Nutrimentos inorgánicos (minerales)	Fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición			Fórmulas de continuación y fórmulas de continuación para necesidades especiales de nutrición	
	Mínimo/100 kcal	Máximo/100 Kcal	NSR/100 kcal	Mínimo/100 kcal	Máximo/100 kcal
Sodio (Na)	20 mg	60 mg	-	20 mg	85 mg
Potasio (K)	60 mg	180 mg	-	80 mg	S.E.
Cloro (Cl)	50 mg	160 mg	-	55 mg	S.E.
Calcio (Ca)	50 mg ⁽¹⁾	S.E.	140 mg ⁽¹⁾	90 mg	S.E.
Fósforo (P)	25 mg ⁽¹⁾	S.E.	100 mg ⁽¹⁾	60 mg	S.E.
Magnesio (Mg)	5 mg	S.E.	15 mg	6 mg	S.E.
Hierro (Fe)	0,45 mg	S.E.	S.E.	1 mg	2 mg
Yodo (I)	10 µg	S.E.	60 µg	5 µg	S.E.
Cobre (Cu)	35 µg ⁽²⁾	S.E.	120 µg ⁽²⁾	-	-
Cinc (Zn)	0,5 mg	S.E.	1,5 mg	0,5 mg	S.E.
Manganeso (Mn)	1,0 µg	S.E.	100 µg	-	-
Selenio (Se)	1 µg	S.E.	9 µg	-	-

(1) La relación Ca:P no será menor de 1,1 ni mayor de 2,1.

(2) En los lugares con suministro hídrico con elevado contenido de cobre es necesario ajustar estos niveles.

7.6.3.2.4 No debe añadirse fluoruro a las fórmulas para lactantes. En todo caso, su nivel no deberá ser superior a 100 µg/100 kcal (24 µg/100 kJ) en las fórmulas para lactantes listas para ser consumidas, según las instrucciones del fabricante.

7.6.3.2.5 El contenido de nutrimentos en las fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición no debe superar los NSR a menos que no puedan evitarse niveles de nutrimentos más elevados debido a su contenido alto o variable en los ingredientes de las fórmulas o debido a razones tecnológicas. Cuando un tipo o forma de producto ha contenido normalmente niveles inferiores a los NSR los fabricantes no deben aumentar los niveles de nutrimentos a fin de aproximarse a los NSR.

7.6.3.2.6 Las fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición y las fórmulas de continuación para necesidades especiales de nutrición, se ajustarán a las disposiciones establecidas en los numerales 7.6.3.1, 7.6.3.2, 7.6.3.3, 7.6.3.4 y 7.6.3.5, excepto en determinadas especificaciones sobre la composición, que deberá modificarse para satisfacer los requerimientos nutrimentales especiales

consecuentes al trastorno, condiciones médicas específicas o afección para cuyo tratamiento dietético se haya formulado, etiquetado y presentado cada tipo de fórmula.

7.6.3.2.7 Además de los requisitos estipulados en el numeral 7.6.3.2.5, las fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición destinadas a recién nacidos pretérmino deben cumplir con las especificaciones nutrimentales señaladas en las Tablas No. 3 y 4 a excepción de las siguientes vitaminas:

Tabla No. 5

Vitamina	Límite mínimo /100 kcal	Límite máximo /100 kcal
Vitamina A	204 µgER ⁽¹⁾ o 700 U.I.	380 µgER ⁽¹⁾ o 1254 U.I.
Vitamina D	1,8 µg calciferol o 75 U.I.	6,75 µg calciferol o 270 U.I.
Vitamina E	2mg α-TE ⁽²⁾ o 3 U.I.	8 mg α-TE ⁽²⁾ o 12 U.I.

(1) ER equivalentes de retinol

(2) α-TE Alfa tocoferoles

7.6.3.2.8 Las fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición podrán adicionar además:

Tabla No. 6

Nutrimento	Fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición		
	Mínimo/100 kcal	Máximo/100 kcal	NSR/100 kcal
Colina	7 mg	S.E.	50 mg
Mioinositol	4 mg	S.E.	40 mg
L-carnitina	1,2 mg	S.E.	-
Taurina	-	12 mg	-
DHA*	-	S.E.	0,5 % de los ácidos grasos
Nucleótidos	1,9 mg	16 mg	-

* si se añade ácido docosahexaenoico (DHA), el contenido de ácido araquidónico debe ser al menos el mismo que el de DHA y el contenido de ácido eicosapentaenoico (EPA) no debe exceder el contenido de DHA.

7.6.3.2.9 Además, las fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición podrán adicionar los nutrimentos siguientes en los límites señalados:

Tabla No. 7

Nutrimento	Fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición		
	Mínimo/100 kcal	Máximo/100 kcal	NSR/100 kcal
Cromo (Cr)	1,5 µg	S.E.	10 µg
Molibdeno (Mo)	1,5 µg	S.E.	10 µg

7.6.3.3 Proteínas

7.6.3.3.1 Las fórmulas de acuerdo con su fuente de proteína se sujetarán a los siguientes límites:

Tabla No. 8

Fuente de proteína	Fórmulas para lactantes		Fórmulas de continuación	
	Mín g/100 kcal	Máx g/100 kcal	Mín g/100 kcal	Máx g/100 kcal

	utilizables	utilizables	utilizables	utilizables
a) Leche de vaca	1,8	3	3,0	5,5
b) Hidrolizados de proteína	2,25	3	2,25	S.E.
c) Aislados de proteína de soya sola o mezclada con proteínas de leche de vaca.	2,25	3	2,25	S.E.

7.6.3.3.2 La Relación de Eficiencia Proteica (REP) de las proteínas no debe ser inferior al 85% de la calidad de la caseína.

7.6.3.3.3 Para mejorar la calidad nutritiva de las proteínas, podrán añadirse aminoácidos indispensables, únicamente en las cantidades estrictamente necesarias, los cuales deben ser en su forma natural L, de acuerdo a lo que se indica en la Tabla A3. del Apéndice Normativo A.

7.6.3.4 Ácidos grasos y lípidos o grasas

7.6.3.4.1 El contenido de lípidos o grasas y ácidos grasos en las fórmulas deben cumplir con lo establecido en la Tabla No. 9.

Tabla No. 9

Nutrimento	Fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición		Fórmulas de continuación y fórmulas de continuación para necesidades especiales de nutrición	
	Mínimo/100 kcal	Máximo/100 kcal	Mínimo/100 kcal	Máximo/100 kcal
Grasas	4,4 g	6 g	3 g	6 g
Acido linoléico	300 mg	1400 mg NSR	300 mg	S.E.
Acido alfa-linolénico	50 mg	S.E.	50 mg	S.E.

La proporción de ácido linoleico/alfa-linolénico mínimo 5:1, máximo 15:1.

7.6.3.4.2 El contenido de ácidos grasos trans no será superior al 3% del contenido total de ácidos grasos en las fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición.

7.6.3.5 Hidratos de carbono

7.6.3.5.1 El contenido mínimo de hidratos de carbono totales en fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición debe ser de 9 g/100 kcal y máximo de 14 g/100 kcal.

7.6.3.5.2 La lactosa y polímeros de glucosa deben ser los hidratos de carbono preferidos para las fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición a base de proteínas de la leche de vaca y de proteínas hidrolizadas.

7.6.3.5.3 En las fórmulas para lactantes y en las fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición, sólo podrán añadirse almidones naturalmente exentos de gluten precocidos y/o gelatinizados hasta un máximo de 30% del contenido total de hidratos de carbono y hasta un máximo de 2 g/100 ml.

7.6.3.5.4 En las fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición debe evitarse el uso de sacarosa, así como la adición de fructosa como ingrediente, salvo cuando sea necesario por justificación tecnológica.

7.6.3.5.5 En las fórmulas de continuación y las fórmulas de continuación para necesidades especiales de nutrición el contenido de hidratos de carbono debe ajustarse al contenido energético indicado en el numeral 7.6.3.1.2. El producto debe contener hidratos de carbono nutrimentalmente asimilables que sean adecuados para la alimentación de los lactantes mayores de seis meses de edad y los niños de corta edad.

7.6.3.6 Nutrientes o ingredientes opcionales

7.6.3.6.1 En las fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición podrán añadirse otros nutrientes/ingredientes normalmente presentes en la leche materna o humana en cantidad suficiente con la finalidad de lograr el efecto nutrimental o fisiológico de ésta, sobre la base de las

cantidades presentes en la leche materna y para asegurarse que sea adecuado como fuente única de la nutrición del lactante. Su idoneidad e inocuidad debe estar demostrada científicamente.

7.6.3.6.2 En las fórmulas de continuación y fórmulas de continuación para necesidades especiales de nutrición, además de las vitaminas y minerales señalados, pueden añadirse otros nutrimentos/ingredientes, cuando sean necesarios para asegurar que el producto sea adecuado para formar parte de un plan de alimentación mixta, destinado a ser utilizado después del sexto mes de edad.

7.6.3.6.3 Se debe contar con evidencia científica que demuestre la utilidad de los nutrimentos/ingredientes opcionales que se utilicen y estar a disposición de la Secretaría cuando ésta lo solicite.

7.6.3.6.4 Para las fórmulas de continuación y las fórmulas de continuación para necesidades especiales de nutrición las concentraciones de sodio y potasio que derivan de los ingredientes vitamínicos y minerales deben ajustarse a los límites establecidos para el sodio y el potasio en la Tabla No. 4.

7.6.3.6.5 Sólo se podrán utilizar cultivos que produzcan ácido láctico L(+), para el caso de las fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición y las fórmulas de continuación para necesidades especiales de nutrición se podrán utilizar siempre y cuando se haya comprobado que son inocuos y adecuados para estas poblaciones vulnerables, el sustento debe estar a disposición de la Secretaría cuando ésta lo solicite.

8. Disposiciones sanitarias para alimentos y bebidas no alcohólicas para lactantes y niños de corta edad

8.1 Los productos que se modifiquen en su composición, deben cumplir con lo establecido en la NOM-086-SSA1-1994, señalada en el apartado de referencias.

8.2 Los ingredientes como carne de aves, bovino o pescado deben someterse a operaciones que aseguren la eliminación de trozos de hueso y espinas.

8.3 Para los productos a base de cereales podrán utilizarse todos los cereales molidos aptos para el consumo humano.

8.4 Las leguminosas deben ser sometidas a tratamiento térmico para eliminar, en la medida de lo posible, los factores antinutricios presentes normalmente, tales como las lectinas (hemaglutininas), así como los inhibidores de la tripsina y quimotripsina.

8.5 No se permite el uso de las habas (*Vicia faba L.*) como ingrediente en estos productos, debido al peligro de favismo.

8.6 Los cereales, leguminosas y semillas oleaginosas deben tratarse previamente para disponer de materias primas limpias y de buena calidad. Dentro de los tratamientos se pueden considerar los siguientes:

8.6.1 Limpieza o lavado: para eliminar la suciedad, granos dañados, granos extraños y semillas nocivas, insectos y excrementos de insectos y cualquier material adherido.

8.6.2 Descascarado: en caso de ser necesario, para: leguminosas, semillas oleaginosas y determinados cereales, tales como avena, cebada, sorgo y mijo. Estos deben ser descascarados lo más completamente posible para reducir el contenido de fibra cruda a niveles aceptables y para eliminar los taninos y otras sustancias fenólicas que puedan reducir la digestibilidad de las proteínas.

8.7 Los productos comercialmente estériles deben cumplir con lo establecido en las disposiciones sanitarias de la NOM-130-SSA1-1995, señalada en el apartado de referencias.

8.8 El cacao se podrá adicionar únicamente en aquellos productos que se destinen a niños mayores de nueve meses de edad, en una cantidad que no exceda de 5% m/m en base seca.

8.9 Especificaciones

8.9.1 Microbiológicas

8.9.1.1 Deben estar exentos de microorganismos patógenos.

8.9.1.2 Los alimentos a base de cereales, deben cumplir con lo siguiente:

Tabla No. 10

Alimentos a base de cereales para lactantes (6 a 12 meses de edad) para consumirse directamente, incluye las galletas y los bizcochos

Microorganismos	n	c	m	M	Clase del Plan
Bacterias aerobias mesófilas	5	2	1 000 UFC	10 000 UFC	3
Enterobacteriaceas	5	1	< 0,3 NMP	9,3 NMP	3
Salmonella spp.	60	0	0 UFC/25 g	N.A.	2

n: número de muestras a ser analizadas

c: máximo número admisible de unidades de muestras defectuosas en un plan de dos clases, o de unidades de muestras marginalmente aceptables en un plan de tres clases

m: un límite microbiológico que separa la buena calidad de la calidad defectuosa en un plan de dos clases o la buena calidad de la calidad marginalmente aceptable en un plan de 3 clases

M: un límite microbiológico que separa, en un plan de tres clases, la calidad marginalmente aceptable de la defectuosa

Tabla No. 11

Alimentos a base de cereales para niños de corta edad (mayores de 12 a 36 meses de edad) para consumirse directamente

Microorganismos	n	c	m	M	Clase del Plan
Bacterias aerobias mesófilas	5	2	3 000 UFC	30 000 UFC	3
Enterobacteriaceas	5	1	2,9 NMP	21 NMP	3
Salmonella spp.	60	0	0 UFC /25 g	N.A.	2

n: número de muestras a ser analizadas

c: máximo número admisible de unidades de muestras defectuosas en un plan de dos clases, o de unidades de muestras marginalmente aceptables en un plan de tres clases

m: un límite microbiológico que separa la buena calidad de la calidad defectuosa en un plan de dos clases o la buena calidad de la calidad marginalmente aceptable en un plan de 3 clases

M: un límite microbiológico que separa, en un plan de tres clases, la calidad marginalmente aceptable de la defectuosa

Tabla No. 12

Alimentos a base de cereales para lactantes y niños de corta edad (6 a 36 meses de edad) que llevan tratamiento térmico antes de su consumo

Microorganismos	n	c	m	M	Clase del Plan
Bacterias aerobias mesófilas	5	3	10 000 UFC	100 000 UFC	3
Enterobacteriaceas	5	2	100 UFC	1 000 UFC	3
Salmonella spp.	10	0	0 UFC /25 g	N.A.	2

n: número de muestras a ser analizadas

c: máximo número admisible de unidades de muestras defectuosas en un plan de dos clases, o de unidades de muestras marginalmente aceptables en un plan de tres clases

m: un límite microbiológico que separa la buena calidad de la calidad defectuosa en un plan de dos clases o la buena calidad de la calidad marginalmente aceptable en un plan de 3 clases

M: un límite microbiológico que separa, en un plan de tres clases, la calidad marginalmente aceptable de la defectuosa

8.9.1.3 Los productos deshidratados deben cumplir con lo siguiente:

Tabla No. 13
Alimentos deshidratados

Microorganismos	Límite máximo
Bacterias aerobias mesófilas	2 500 UFC/g o 100 000 UFC/g*
Salmonella spp	0 UFC/25 g
Coliformes totales	20 NMP/g

* Si deben ser sometidos a tratamiento térmico antes de su consumo.

8.9.2 Contaminantes

8.9.2.1 Los productos para lactantes y niños de corta edad deben cumplir con las especificaciones de metales pesados y materia extraña perjudicial a la salud establecidas en el punto 7.6.2 para fórmulas, excepto en el límite de plomo, el cual debe ser 0,20 ppm.

8.9.2.2 Los alimentos a base de cereales no deben exceder de 20 µg aflatoxinas/kg de producto.

8.9.3 Nutrimientales

8.9.3.1 El contenido energético de los productos elaborados a base de cereales no debe ser inferior a 0,8 kcal/g.

8.9.3.2 Contenido de sodio

8.9.3.2.1 Para los alimentos a base de cereales el contenido de sodio en el cereal seco y harinas de cereal no debe exceder los 100 mg/100 kcal del producto, calculado en relación con el producto preparado listo para ser consumido con base en las instrucciones de empleo.

8.9.3.2.2 Los demás alimentos para lactantes y niños de corta edad no deben exceder de 200 mg/100 g o de 200 mg/100 kcal de producto, calculado en relación con el producto preparado listo para ser consumido de conformidad con las instrucciones de empleo, ni agregar sal (NaCl) a los productos de fruta y a los postres a base de fruta.

8.9.3.3 Contenido de vitaminas

8.9.3.3.1 En los alimentos a base de cereales la cantidad de vitamina B₁ (tiamina) no deberá ser inferior a 50 µg/100 kcal.

8.9.3.4 Contenido de proteínas

8.9.3.4.1 Podrán añadirse aminoácidos indispensables (isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina, arginina e histidina) en sus formas L, sólo en las cantidades necesarias para mejorar la calidad de la proteína presente, de acuerdo con lo que se establece en la Tabla A3. del Apéndice Normativo A.

8.9.3.5 Contenido de hidratos de carbono

8.9.3.5.1 Se podrán añadir los siguientes hidratos de carbono: lactosa, maltosa, sacarosa, glucosa, fructosa, miel y jugo de frutas, maltodextrina, jarabe de glucosa, jarabe de glucosa deshidratada y sus combinaciones, almidón pre tostado, almidón gelatinizado; los dos últimos deben ser sin gluten.

8.9.3.5.2 La cantidad total de hidratos de carbono en néctares no debe exceder de 14 g/100 g del producto listo para ser consumido y en las papillas preparadas con fruta y/o cereal y/o yogurt y postres no debe ser superior a 20 g/100 g del producto listo para ser consumido.

8.9.3.5.3 Para los alimentos a base de cereales, excepto las pastas, la cantidad de azúcares añadidos no podrá ser superior a 7,5 g/100 kcal cuando se agregue como sacarosa, glucosa, jarabes de glucosa o miel, si se añade como fructosa no podrá ser superior a 3,75 g/100 kcal.

8.9.3.6 Contenido de lípidos

8.9.3.6.1 Los cereales que deben ser preparados para el consumo añadiendo leche u otros líquidos idóneos (fórmulas) y las galletas y otros productos de panificación, no deben exceder un contenido máximo de 3,3 g/100 kcal de lípidos.

8.9.3.7 Ingredientes facultativos

8.9.3.7.1 Sólo podrán utilizarse cultivos productores de ácido láctico.

9. Muestreo y métodos de prueba

9.1 El procedimiento de muestreo para los productos objeto de esta Norma se sujeta a lo que establece la Ley General de Salud.

9.2 Para la verificación de las especificaciones sanitarias y nutrimentales que se establecen en esta Norma se deben aplicar los métodos de prueba señalados en el Apéndice Normativo B.

10. Etiquetado

10.1 La etiqueta de los productos debe cumplir con lo establecido en el Reglamento y en la NOM-051-SCFI/SSA1-2010 señalada en el apartado de referencias, en lo que no se oponga con la presente norma.

10.2 Deben ostentar fecha de caducidad, a excepción de los alimentos y bebidas no alcohólicas para niños de corta edad comercialmente estériles que podrán declarar fecha de consumo preferente.

10.3 Fórmulas

10.3.1 Deben denominarse conforme con la clasificación señalada en el numeral 5.1, según corresponda.

10.3.2 No se deben utilizar términos como "**humanizado**", "**maternizada**" o similares.

10.3.3 Las fórmulas que no contengan leche ni algún derivado lácteo deben incluir en la denominación el término "**no láctea**".

10.3.4 Las fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición que contengan como mínimo 1 mg de hierro por 100 kcal utilizables, podrán ostentar dentro de la denominación "**con hierro**".

10.3.5 Las fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición y las fórmulas de continuación para necesidades especiales de nutrición, deben indicar en términos descriptivos adecuados como parte de la denominación, la característica esencial de la fórmula, pero no el trastorno, la enfermedad o la condición médica específica a la que están destinadas, ejemplos: "**proteína hidrolizada**", "**libre de lactosa**". La única condición médica específica que puede ser incluida es el uso de los términos "**pretérmino**" o "**de bajo peso al nacer**".

10.3.6 Para el caso de las fórmulas que contengan nutrimentos o ingredientes opcionales, diferentes de los establecidos en las Tablas No. 3, No. 4, No. 6 y No. 7 se permite incluir dentro de la denominación la presencia de éstos, siempre y cuando cumplan con los numerales 7.6.3.6.1, 7.6.3.6.3, 7.6.3.6.5 y 10.3.8.2. Por ejemplo "**con probióticos**", "**con prebióticos**", "**con luteína**".

10.3.7 En la etiqueta figurará la lista completa de ingredientes, por orden decreciente de proporciones, salvo las vitaminas y/o nutrimentos inorgánicos (minerales), que se podrán indicar como grupos separados.

10.3.8 Información nutrimental, debe declararse el valor nutritivo del producto, como sigue:

10.3.8.1 La cantidad en gramos de proteínas, hidratos de carbono y grasas o lípidos por 100 kcal, indicando la cantidad de producto equivalente a 100 kcal del producto listo para ser consumido.

10.3.8.2 La cantidad total en las unidades correspondientes de vitaminas y nutrimentos inorgánicos (minerales), colina y de cualquier otro nutrimento declarado en la lista de ingredientes por 100 kcal.

10.3.8.3 Adicionalmente se podrá declarar el contenido de nutrimentos por 100 g o por 100 ml del producto listo para ser consumido que se haya preparado de acuerdo con las indicaciones señaladas en la etiqueta.

10.3.8.4 En las fórmulas para lactantes líquidas, además, se debe declarar el contenido energético y la cantidad en gramos de proteínas, hidratos de carbono, grasas y demás nutrimentos por presentación (envase).

10.3.8.5 Las fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición y las fórmulas de continuación para necesidades especiales de nutrición, deben declarar la cantidad total de los nutrimentos específicos a los que se debe la característica esencial que hace que la fórmula se destine a esa necesidad especial por 100 kcal y opcionalmente por 100 g o 100 ml del producto comercializado tal cual.

10.3.9 No podrán incluir ningún tipo de declaración de propiedades nutrimentales ni saludables.

10.3.10 Instrucciones para su almacenamiento, conservación, uso, preparación y consumo.

10.3.10.1 Las fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición deben incluir instrucciones en forma escrita y gráfica, sobre la manera de prepararla y utilizarla de modo que no induzca a desistir de la lactancia materna. Asimismo, deben incluirse instrucciones sobre la conservación del producto, antes y después de abrir el envase y una vez preparado el producto, y una declaración que indique que el almacenamiento prolongado y temperaturas excesivas deben evitarse. En el caso de fórmulas líquidas las instrucciones gráficas podrán incluirse en el envase colectivo únicamente.

10.3.10.2 Las fórmulas de continuación y fórmulas de continuación para necesidades especiales de nutrición deben contener instrucciones sobre la preparación en forma escrita y gráfica, uso, su almacenamiento y conservación antes y después de abrir el envase y en su caso una vez preparado el producto, incluyendo una declaración que indique que el almacenamiento prolongado y temperaturas excesivas deben evitarse.

10.3.10.3 Las fórmulas deben ostentar una leyenda que indique que deben ser preparadas con agua hervida por cinco minutos y enfriada hasta que quede tibia. En caso de no contar con ésta se podrá utilizar agua purificada a temperatura ambiente.

10.3.10.4 Con la finalidad de evitar el riesgo de causar graves quemaduras, en las fórmulas se debe incluir una leyenda indicando que no se debe calentar usando horno de microondas.

10.3.11 No deben ostentar imágenes o textos que sugieran a las fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición como idénticas y superiores a la leche materna o humana, conforme con las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud para la comercialización de sucedáneos de la leche materna.

10.3.12 Se debe indicar cerca de la denominación, el intervalo de edad al que está dirigida la fórmula, sin que esto sea parte de la misma.

10.3.13 Opcionalmente puede ser incluida en cualquier parte de la etiqueta la presentación de las fórmulas, siendo ésta líquida o en polvo, sin que esto sea parte de la denominación de las mismas.

10.3.14 Deben ostentar la leyenda "Aviso Importante" o su equivalente. Posteriormente lo siguiente:

10.3.14.1 Una leyenda donde se afirme la superioridad de la lactancia materna, por ejemplo: "**La leche materna es el mejor alimento para el bebé**", "**La leche materna contiene hormonas, enzimas activas y otros compuestos que no pueden ser duplicados en ninguna fórmula para lactantes**", y señalar en las fórmulas para lactantes, "**El uso de este producto debe hacerse bajo orientación médica**" y en el caso de las fórmulas de continuación, "**El uso de este producto debe hacerse bajo orientación de un profesional de la salud (médico o nutriólogo)**" o leyendas equivalentes, con un tamaño de letra que sea fácilmente visible, con negritas y en un fondo contrastante.

10.3.15 Las fórmulas para lactantes y fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición deben contener una declaración referente a que los lactantes, además del consumo de la fórmula, también deben ser ablactados a partir de una edad que sea apropiada para su crecimiento específico y necesidades de desarrollo según la orientación del profesional de salud (médico o nutriólogo) y en cualquier caso a partir de los seis meses de edad.

10.3.16 Las fórmulas de continuación y fórmulas de continuación para necesidades especiales de nutrición deben contener una declaración que indique que son parte de la ablactación o alimentación complementaria y no deben ser introducidas antes del sexto mes de vida.

10.3.17 Una leyenda sobre las consecuencias de una preparación y uso inadecuado del producto, tal como "**La salud de su hijo depende de que siga cuidadosamente las instrucciones para la preparación y uso**" o alguna equivalente.

10.3.18 Las fórmulas para lactantes con necesidades especiales de nutrición y las fórmulas de continuación para necesidades especiales de nutrición deben incluir una declaración destacada y en negritas que diga "**UTILÍCESE BAJO SUPERVISION MEDICA**" separada de toda información escrita, impresa o gráfica.

10.3.19 Los fortificadores de leche materna o humana deben incluir una declaración destacada y en negritas que diga "**EXCLUSIVAMENTE PARA USO HOSPITALARIO**".

10.4 Alimentos y bebidas no alcohólicas para lactantes y niños de corta edad.

10.4.1 La denominación debe indicar el grupo de edad al que va dirigido el producto, ejemplo "**cereal seco para lactantes (y/o para niños de corta edad)**", "**galletas para lactantes (y/o para niños de corta edad)**".

10.4.2 La sal yodada, debe declararse como tal en la lista de ingredientes.

10.4.3 Cuando la declaración de fibra dietética, vitaminas y nutrimentos inorgánicos (minerales) se haga en porcentaje de los VNR se deben considerar los valores que corresponda al grupo de edad al que va dirigido el producto, conforme con la Tabla No. 14.

Tabla No. 14

Valores Nutrimientales de Referencia para la Población Mexicana por segmento

Nutrimiento/unidad de medida	Edad		
	0 a 6 meses	7 a 12 meses	1 a 3 años
Fibra g	s.i.	s.i.	14** (1)
Vitamina A µgER	s.i.	s.i.	300**
Vitamina D µg (como colecalciferol)	5**	5**	5**
Vitamina E mg (equivalente de tocoferol)	4**	5**	6*
Vitamina K ₁ µg	2**	2,5**	30**
Tiamina (B ₁) mg	0,2**	0,3**	0,4*
Riboflavina (B ₂) mg	0,3**	0,4**	0,4*
Piridoxina (B ₆) mg	0,1**	0,3**	0,4*
Niacina mg	2**	4**	6*
Vitamina B ₁₂ µg (cobalamina)	0,3**	0,5**	0,8*
Acido fólico µg (folacina)	76**	96**	168**
Vitamina C mg (ácido ascórbico)	40*	50*	15*
Acido pantoténico mg	1,7**	1,8**	2**
Calcio mg	210**	270**	500**
Cobre µg	220**	220**	340*
Cromo µg	0,2**	5,5**	11**

Fósforo mg	100**	275**	460*
Flúor mg	0,01**	0,45**	0,6**
Hierro mg	s.i.	16**	13**
Yodo µg	110**	130**	65*
Magnesio mg	36**	90**	80*
Selenio µg	14**	21**	20*
Zinc mg	s.i.	3,8**	4*

(1) Corresponde al intervalo de edad de 2 a 3 años

* Corresponden a IDR

** Corresponden a IDS

s.i. sin información suficiente para establecer una IDS

10.4.4 Las instrucciones para su preparación y uso, así como sobre su almacenamiento y conservación antes y después de que se haya abierto el envase debe figurar en la etiqueta.

10.4.5 Se debe indicar cerca de la denominación, el intervalo de edad al que está dirigido el producto. Para los productos destinados a la ablactación o alimentación complementaria, la edad de inicio no deberá ser inferior a los seis meses de edad para ningún producto; asimismo, la etiqueta debe contener la indicación de que la decisión sobre el momento preciso en que se comenzará la ablactación incluida cualquier excepción con respecto al límite de los seis meses de edad debe adoptarse en consulta con un profesional de la salud (médico o nutriólogo), basándose en las necesidades específicas de crecimiento y desarrollo del lactante.

10.4.6 Cuando el producto contenga remolacha o espinacas, se debe indicar en la etiqueta "**Para niños de más de doce semanas de edad**".

10.4.7 Cuando el producto esté compuesto de ingredientes y aditivos exentos de gluten podrá incluirse en la etiqueta la declaración "**exento de gluten**".

10.4.8 En los cereales que deben ser preparados para el consumo añadiendo leche u otros líquidos nutritivos idóneos debe indicarse la leyenda "**Utilícese leche o fórmula pero no agua**" para prepararlo o una indicación equivalente.

10.4.9 En los cereales que deben ser preparados para el consumo añadiendo leche u otros líquidos nutritivos idóneos debe incluirse una leyenda que indique que dichos ingredientes añadidos deben ser recomendados por un profesional de la salud (médico o nutriólogo).

11. Envase y embalaje

11.1 Envase

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

11.2 Embalaje

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

12. Concordancia con normas internacionales

Esta Norma es parcialmente equivalente con las siguientes normas:

12.1 Codex Alimentarius. Norma para preparados para lactantes y preparados para usos medicinales especiales destinados a los lactantes. CODEX STAN 72-1981. Rev. 2007. Enmienda 2011.

12.2 Codex Alimentarius. Norma del Codex para Alimentos envasados para lactantes y niños. CODEX STAN 73-1981. Enmienda 1989.

12.3 Codex Alimentarius. Norma del Codex para alimentos elaborados a base de cereales para lactantes y niños pequeños. CODEX STAN 74-1981. Rev. 2006.

12.4 Codex Alimentarius. Norma del Codex para preparados complementarios. CODEX STAN 156-1987. Enmienda 2011.

12.5 Codex Alimentarius. Listas de referencia de compuestos de nutrientes para su utilización en alimentos para fines dietéticos especiales destinados a los lactantes y niños pequeños. CAC/GL 10 -1979. Enmienda 2009.

12.6 World Health Organization. International Code of Marketing of Breast-milk Substitutes. Ginebra: WHO, 1981.

13. Bibliografía

13.1 Secretaría de Economía. Ley Federal sobre Metrología y Normalización. México, 2009.

13.2 Secretaría de Salud. Ley General de Salud. México, 2012.

13.3 Secretaría de Economía. Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización. México, 1999.

13.4 Secretaría de Salud. Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios. México, 1999

13.5 Secretaría de Salud. Reglamento de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. México, 2004.

13.6 Norma Oficial Mexicana NOM-Z-013/02. 1981. Guía para la Redacción, Estructuración y Presentación de las Normas Oficiales Mexicanas.

13.7 Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI-2002. Sistema General de Unidades de Medida.

13.8 Norma Oficial Mexicana NOM-031-SSA2-1999. Para la atención a la salud del niño.

13.9 Codex Alimentarius. Norma general para el etiquetado y declaración de propiedades de alimentos preenvasados para regímenes especiales. CODEX STAN 146-1985. Enmienda 2009.

13.10 Codex Alimentarius. Directrices sobre etiquetado nutricional. CAC/GL 2-1985. Enmienda 2010.

13.11 Codex Alimentarius. Código de prácticas de higiene para los preparados en polvo para lactantes y niños pequeños. CAC/RCP 66-2008.

13.12 Codex Alimentarius. Directrices generales sobre declaraciones de propiedades. CAC/GL 1-1979. Enmienda 2009.

13.13 Codex Alimentarius. Directrices para el uso de declaraciones nutricionales y saludables. CAC/GL 23-1997. Enmienda 2011.

13.14 Directiva 2006/141/CE de la Comisión del 22 de diciembre de 2006 relativa a los Preparados para lactantes y preparados de continuación y por lo que se modifica la Directiva 1999/21/CE.

13.15 Directiva 2006/125/CE de la Comisión de 5 de diciembre de 2006 relativa a los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad.

13.16 FDA/DEA/ONDCP. Code of Federal Regulations. 21CFR107. USA, 2011.

13.17 Agostoni, C., Braegger, C. Breast-feeding: A Commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2009; 49: 112-125.

13.18 Agostoni, C., Buonocore, G. Enteral Nutrient Supply for Preterm Infants: Commentary From the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Committee on Nutrition. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2010; 50 (1):1-9.

13.19 Bourges R.H., Casanueva E., Rosado J.L. (ed). Recomendaciones de ingestión de nutrimentos para la población mexicana. Bases Fisiológicas. I. México. Editorial Médica Panamericana, 2005.

13.20 Bourges R.H., Casanueva E., Rosado J.L. (ed). Recomendaciones de ingestión de nutrimentos para la población mexicana. Bases Fisiológicas. II. Energía, proteínas, lípidos, hidratos de carbono y fibra. México. Editorial Médica Panamericana, 2008.

13.21 Canadian Food Inspection Agency and Health Canada. Letter to industry: Requirements Related to Nutrition Information and Nutrition and Health Claims for Infant Formula. Canadá: 2007.

13.22 European Commission. Report of the Scientific Committee on Food on the Revision of Essential Requirements of Infant Formulae and Follow-on Formulae. SCF/CS/NUT/IF/65. 2003.

13.23 Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Enterobacter sakazakii and Salmonella in powdered infant formula. Meeting Report. Microbiological Risk Assessment. Series 10. Roma: FAO/WHO, 2010.

13.24 García, A.J. Papel de los cereales en la alimentación de ablactación, nutrición del lactante y preescolar. Acta Pediatr Mex, 1998; 19(S): 17-21.

13.25 Makihiro S., Norifumi S., Taku N., Tadahi I., Ichiro N. Profile of Nucleotides and Nucleosides of Human Milk. Received November 5. 1994.

13.26 Koletzco B, Baker S, Cleghorn G, Neto UF, Gopalan S, Hernell O, Hock QS, Jirapinyo P, Lonnerdal B, Pencharz p, Pzyrembel H, Ramírez-Mayans J, Shamir R, Turck D, Yamashiro Y, Zong-Yi D. Global standard for the composition of infant formula: recomendations of an ESPGHAN coordinated international expert group. J Pediatr Gastroenterol, 2001; 5:584-599.

13.27 Real Decreto 867/2008, de 23 de mayo, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria específica de los preparados para lactantes y de los preparados para lactantes y de los preparados de continuación. España.

13.28 Sisk M.P., Lovelady A.Ch., Dillard, G.R., Gruber J.K. Lactation counseling for mothers of very low birth weight infants: effect on maternal anxiety and infant intake of human milk. Pediatric, 2006; 117(1): e67-e75.

13.29 Udaeta-Mora E., Toussaint-Martínez.G. Uso de una fórmula para prematuros adicionada con ácidos poliinsaturados de cadena larga: aceptabilidad y tolerancia. Gac Med Mex, 2005; 141(1): 1-5.

14. Observancia de la norma

La vigilancia en el cumplimiento de la presente Norma corresponde a la Secretaría de Salud y a los Gobiernos de las Entidades Federativas en el ámbito de sus respectivas competencias.

15. Vigencia

15.1 La presente norma entrará en vigor a los ciento veinte días naturales posteriores al de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

15.2 El numeral 6.8 entrará en vigor el mismo día en que entre en vigor el Acuerdo por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios.

15.3 El cumplimiento del Apartado 10 de Etiquetado, será aplicable a los productos elaborados a partir de la fecha de entrada en vigor de la presente norma.

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 16 de agosto de 2012.- El Comisionado Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, **Mikel Andoni Arriola Peñalosa**.- Rúbrica.

Apéndice Normativo A.

Sustancias nutritivas

Tabla A1. Sales Minerales

Nutrimento	Fuente
Calcio	Carbonato de calcio
	Cloruro de calcio
	Citrato de calcio
	Fosfato cálcico monobásico
	Fosfato cálcico dibásico
	Fosfato cálcico tribásico
	Glicerofosfato cálcico
	Gluconato cálcico
	Hidróxido de cálcico
	L-Lactato de calcio
	Oxido cálcico
Sulfato cálcico	
Fósforo	Acido fosfórico
	Fosfato cálcico monobásico
	Fosfato cálcico dibásico
	Fosfato cálcico tribásico

	<p>Fosfato magnésico dibásico</p> <p>Fosfato magnésico tribásico</p> <p>Fosfato potásico monobásico</p> <p>Fosfato potásico dibásico</p> <p>Fosfato sódico dibásico</p> <p>Ortofosfato férrico</p> <p>Glicerofosfato magnésico</p> <p>Fosfato diácido de sodio (fosfato sódico monobásico)</p> <p>Fosfato Trisódico (Fosfato sódico tribásico)</p> <p>Glicerofosfato potásico</p> <p>Glicerofosfato de manganeso (II)</p>
Hierro	<p>Bisglicinato ferroso</p> <p>Carbonato ferroso estabilizado con sacarosa</p> <p>Citrato ferroso</p> <p>Citrato ferroamónico</p> <p>Citrato férrico</p> <p>Difosfato férrico (pirofosfato férrico)</p> <p>Fumarato ferroso</p> <p>Gluconato ferroso</p> <p>Hierro reducido de hidrógeno</p> <p>Hierro electrolítico</p> <p>Hierro carbonilo</p> <p>Lactato ferroso</p> <p>Ortofosfato férrico</p> <p>Sacarato férrico</p> <p>Succinato ferroso</p> <p>Sulfato ferroso</p> <p>Difosfato férrico de sodio</p>
Magnesio	<p>Acetato magnésico</p> <p>Carbonato de magnesio</p> <p>Carbonato ácido de magnesio</p> <p>Cloruro magnésico</p> <p>Oxido magnésico</p> <p>Fosfato magnésico dibásico</p> <p>Fosfato magnésico tribásico</p> <p>Gluconato magnésico</p> <p>Glicerofosfato magnésico</p>

	Hidróxido magnésico Lactato magnésico Sales magnésicas de ácido cítrico Sulfato magnésico
Sodio	Bicarbonato de sodio Carbonato de sodio Cloruro sódico Citrato sódico Gluconato sódico L- Lactato de sodio Fosfato sódico monobásico Fosfato sódico dibásico Fosfato sódico tribásico Sulfato sódico Hidróxido de sodio
Potasio	Bicarbonato potásico Carbonato de potasio Cloruro potásico Citrato potásico Glicerofosfato potásico Gluconato potásico Fosfato potásico monobásico Fosfato potásico dibásico Fosfato potásico tribásico L- Lactato de potasio Hidróxido de potasio
Cobre	Gluconato de cobre Carbonato cúprico Citrato cúprico Sulfato cúprico
Yodo	Yoduro potásico Yoduro sódico Yodato potásico Yodato sódico
Zinc	Acetato de zinc Carbonato de zinc Cloruro de zinc Gluconato de zinc

	Lactato de zinc Oxido de zinc Sulfato de zinc
Manganeso	Carbonato de manganeso II Cloruro de manganeso II Citrato de manganeso II Glicerofosfato de manganeso II Gluconato de manganeso II Sulfato de manganeso II
Selenio	Selenato sódico Selenito sódico Selenito sódico hidrógeno
Cromo	Sulfato de cromo III Cloruro de cromo III
Molibdeno	Molibdato de sodio Molibdato de amonio
Flúor	Fluoruro de sodio Fluoruro de potasio Fluoruro de calcio

Tabla A2. Vitaminas

Vitamina	Fuente
Vitamina A	Todo trans retinol Acetato de retinilo Palmitato de retinilo
Provitamina A	Beta caroteno
Vitamina D ₂	Ergocalciferol
Vitamina D ₃	Colecalciferol
Vitamina E	d-alfa tocoferol dl-alfa tocoferol d-alfa tocoferil acetato dl-alfa tocoferil acetato Succinato ácido d-alfa tocoferil Succinato ácido dl-alfa tocoferil Succinato de dl-alfa tocoferil polietileno glicol 1000
Tiamina (Vitamina B ₁)	Hidrocloruro de tiamina cloruro Tiamina mononitrato
Riboflavina (Vitamina B ₂)	Riboflavina Riboflavina 5'-fosfato sódico

Niacina	Nicotinamida Acido nicotínico
Vitamina B ₆	Hidrocloruro de piridoxina Piridoxal 5- fosfato
Biotina (vitamina H)	D-biotina
Acido fólico	Acido N-pterilo-L-glutámico L-metilfolato cálcico
Acido pantoténico	D-Pantotenato cálcico D-Pantenol DL-Pantenol D-pantotenato sódico
Vitamina B ₁₂	Cianocobalamina Hidroxocobalamina
Vitamina K ₁	Fitomenadiona (2-metil-3-fitol-1,4-naftoquinona/filoquinona/fitonadiona)
Vitamina C	Acido L-ascórbico L-Ascorbato sódico L-Ascorbato cálcico Acido 6- palmitil-L-ascórbico (palmitato de ascorbilo) L-Ascorbato potásico

Tabla A3. Aminoácidos y otros nutrimentos nitrogenados

L-ácido glutámico
L-glutamina
L-alanina
L-arginina-L aspartato
L- cistina
Diclorhidrato de L-cistina
L-arginina
Clorhidrato de L-arginina
L-ácido aspártico
L-citrulina
L-ornitina
Monoclorhidrato de L-ornitina
N-acetil –L-cisteína
N-acetil –L-metionina
Acetato de L-lisina
L-aspartato de L-lisina
L-glutamato dihidrato de L-lisina
L-aspartato de magnesio
L-glutamato de calcio
L-glutamato de potasio
Citidina 5-monofosfato
L-histidina
Clorhidrato de L-histidina
Glicina

L-isoleucina
Clorhidrato de L-isoleucina
L-leucina
Clorhidrato de L-leucina
L-lisina
Monoclorhidrato de L-lisina
L-cisteína
Clorhidrato de L-cisteína
L-metionina
L-fenilalanina
L-prolina
L-serina
L-treonina
L-triptófano
L-tirosina
L-valina
L-carnitina
Clorhidrato de L-carnitina
Tartrato de L-carnitina
Adenosina 5'-monofosfato
Uridina 5'-monofosfato y su sal disódica
Guanosina 5'-monofosfato y su sal disódica
Inosina 5'-monofosfato y su sal disódica
Bitartrato de colina
Citrato de colina
Colina
Cloruro de colina
Hidrógeno tartrato de colina
Mioinositol
Taurina

APENDICE NORMATIVO B

METODOS MICROBIOLÓGICOS

B.1 PREPARACION Y DILUCION DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANALISIS MICROBIOLÓGICO

B.1.1 Fundamento

Se basa en la preparación de diluciones primarias, para obtener una distribución lo más uniforme posible de los microorganismos presentes en la porción de muestra.

B.1.2 Reactivos y materiales

B.1.2.1 Reactivos

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico. Cuando se indique agua debe entenderse como agua destilada.

B.1.2.1.1 Preparación de reactivos

B.1.2.1.1.1 Solución de hidróxido de sodio 1 N

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Hidróxido de sodio	4 g
Agua	100 ml

Preparación: Disolver el hidróxido de sodio y llevar a 100 ml con agua.

B.1.2.1.1.2 Soluciones diluyentes

B.1.2.1.1.2.1 Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada).**FORMULA**

Ingredientes	Cantidad
Fosfato de sodio monobásico	34 g
Agua	1000 ml

Preparación: Disolver el fosfato en 500 ml de agua y ajustar el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio 1 N. Llevar a un litro con agua. Esterilizar durante 15 min a $121 \pm 1^\circ\text{C}$. Conservar en refrigeración (solución concentrada). Tomar 1,25 ml de la solución concentrada y llevar a un litro con agua (solución de trabajo). Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml según se requiera. Esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min. Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deberán ser iguales a los iniciales.

B.1.2.1.1.2.2 Agua peptonada**FORMULA**

Ingredientes	Cantidad
Peptona	1 g
Cloruro de sodio	8,5 g
Agua	1000 ml

Preparación: Disolver los componentes en un litro de agua. Ajustar el pH a $7,2 \pm 0,2$ con hidróxido de sodio 1 N. Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml o en cualquier volumen múltiplo de nueve según se requiera. Esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min. Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deberán ser iguales a los iniciales. Si este diluyente no es usado inmediatamente, almacenar en lugar oscuro a una temperatura entre 0 a 5°C por un tiempo no mayor de un mes, en condiciones tales que no alteren su volumen o composición.

B.1.2.2 Materiales

- Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 ml (o si es necesario de 1 ml y 2 ml), con tapón de algodón. Las pipetas pueden ser graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total.
- Frascos de vidrio de 250 ml con tapón de rosca.
- Tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca.
- Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc.
- Todo el material e instrumentos que tengan contacto con las muestras bajo estudio deberán esterilizarse mediante:
- Horno, durante 2 h a 170 a 175°C o 1 h a 180°C o Autoclave, durante 15 min como mínimo a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.
- El material de vidrio puede sustituirse por material desechable que cumpla con las especificaciones deseadas. No debe usarse material de vidrio dañado por esterilización repetida y éste debe ser químicamente inerte.

B.1.3 Aparatos e instrumentos

- Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de 170°C .
- Autoclave con termómetro y manómetro, calibrada con termómetro de máximas y mínimas.
- Baño de agua con control de temperatura y circulación mecánica, provista con termómetro calibrado con divisiones de $0,1^\circ\text{C}$ y que mantenga la temperatura a $45 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

- Licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato o bien un homogeneizador peristáltico (Stomacher).
- Vasos para licuadora con tapa esterilizables o bolsas estériles para homogeneizador peristáltico.
- Balanza granataria con sensibilidad de 0,1 g.

B.1.4 Procedimiento

B.1.4.1 Preparación de la dilución primaria.

B.1.4.1.1 A partir de muestras líquidas:

Para muestras líquidas no viscosas (agua, leche, refrescos, etc.) en las cuales la distribución de microorganismos es homogénea o fácilmente homogeneizable por medios mecánicos (agitación, etc.).

Para muestras congeladas de un alimento originalmente líquido o licuable, fundir por completo en baño de agua de 40 a 45°C un tiempo máximo de 15 min y homogeneizar agitando vigorosamente.

Para la parte líquida de una muestra heterogénea la cual sea considerada suficientemente representativa de la muestra total (Por ejemplo la fase acuosa de grasas animales y vegetales).

B.1.4.1.1.1 Agitar la muestra manualmente con 25 movimientos de arriba a abajo en un arco de 30 cm efectuados en un tiempo de 7 seg. Tomar 1 ml de la muestra y diluir con 9 ml del diluyente el cual debe encontrarse a una temperatura similar a ésta, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente.

B.1.4.1.1.2 Siempre que la cantidad de muestra lo permita, tomar alícuotas mayores, por ejemplo volúmenes de 10 u 11 ml, diluidos con 90 o 99 ml, de la misma forma que se describió anteriormente.

B.1.4.1.2 A partir de muestras sólidas o semisólidas.

Las muestras sólidas y semisólidas congeladas, deben descongelarse en refrigeración de 4 a 8°C durante 18 h y no más de 24 h antes de proceder a su análisis.

B.1.4.1.2.1 Pesar una cantidad de 10 u 11 g de la muestra por analizar en un recipiente o bolsa plástica estériles de tamaño adecuado.

B.1.4.1.2.2 Adicionar un volumen de 90 a 99 ml del diluyente llevado a una temperatura similar a la de la muestra.

B.1.4.1.2.3 Operar la licuadora o el homogeneizador peristáltico de 1 a 2 min hasta obtener una suspensión completa y homogénea según se indique en la técnica correspondiente para cada alimento. Aun en los equipos más lentos, este tiempo no debe exceder de 2,5 min.

B.1.4.1.2.4 Permitir que las partículas grandes se sedimenten, y transferir la cantidad deseada tomando de las capas superiores de la suspensión.

Cuando la dilución primaria es muy viscosa o pegajosa, adicionar más diluyente, lo cual debe tomarse en cuenta para las operaciones subsecuentes o expresión de resultados.

El homogeneizador peristáltico (Stomacher) puede no ser adecuado para algunos productos (por ejemplo, aquellos con partículas agudas o constituyentes que no se dispersen fácilmente). Debe ser utilizado sólo cuando exista evidencia (publicada o por ensayos comparativos) de que los resultados obtenidos no difieren significativamente con aquellos obtenidos con licuadora.

B.1.4.2 Preparación de las diluciones decimales adicionales.

B.1.4.2.1 Transferir 1 ml o un múltiplo, por ejemplo, 10 u 11 ml de la dilución primaria 1 + 9 (10^{-1}), en otro recipiente conteniendo nueve veces el volumen del diluyente estéril a la temperatura apropiada, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente.

B.1.4.2.2 Mezclar cuidadosamente cada botella de diluyente siempre de la misma manera que se describe en (B.1.4.1.1.1).

B.1.4.2.3 La selección de las diluciones que se vayan a preparar y de aquellas que se van a inocular, dependen del número esperado de microorganismos en la muestra, con base a los resultados de análisis previos y de la información que se obtenga del personal de inspección que la haya colectado. En ausencia total de información, trabajar con las diluciones de la primera a la sexta.

B.1.4.2.4 Utilizar pipetas diferentes para cada dilución inoculando simultáneamente las cajas que se hayan seleccionado. El volumen que se transfiera nunca debe ser menor al 10% de la capacidad total de la pipeta.

B.1.4.2.5 Si la pipeta es terminal y se transfiere un volumen de líquido equivalente a su capacidad total, escurrir aplicando la punta de la pipeta una sola vez en un área de la caja Petri sin líquido.

B.1.4.2.6 Mientras se afora el líquido de la pipeta, la punta de ésta debe apoyarse en el interior del cuello del frasco y mantenerla en posición vertical, para lo cual este último debe inclinarse lo necesario.

En estudios donde se busca la presencia o ausencia de una determinada especie de microorganismos en 0,1 ml o 0,1 g, no es necesario preparar diluciones mayores.

El criterio para seleccionar las diluciones a preparar de acuerdo con el número de microorganismos esperado es:

Para la técnica del número más probable utilizar tres tubos: donde sea posible demostrar el microorganismo en 10 ml de la dilución más alta.

Para la técnica de cuenta en placa, considerar aquellas en las que se puedan contar de 25 a 250 colonias en un mínimo de una de tres diluciones en el método de cuenta de bacterias aerobias en placa. En el caso de otros grupos microbianos, considerar el número especificado de colonias en la Norma Oficial Mexicana correspondiente.

B.1.4.3 Duración del procedimiento.

En general, las diluciones de la muestra deben ser preparadas inmediatamente antes del análisis y éstas deben ser usadas para inocular el medio de cultivo dentro de los 20 min posteriores a su preparación.

B.2 DETERMINACION DE BACTERIAS COLIFORMES. TECNICA DEL NUMERO MAS PROBABLE

B.2.1 Fundamento

El método se basa en que las bacterias coliformes, fermentan la lactosa incubadas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 a 48 h, resultando una producción de ácidos y gas el cual se manifiesta en las campanas de fermentación.

B.2.2 Reactivos y materiales

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico. Cuando se indique agua debe entenderse como agua destilada con pH cercano a la neutralidad.

B.2.2.1 Reactivos

B.2.2.1.1 Soluciones diluyentes

B.2.2.1.1.1 Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Fosfato monopotásico	34 g
Agua	1000 ml

Preparación: Disolver el fosfato en 500 ml de agua y ajustar el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio 1 N. Llevar a un litro con agua. Esterilizar durante 15 min a $121 \pm 1^\circ\text{C}$. Conservar en refrigeración (solución concentrada). Tomar 1,25 ml de la solución concentrada y llevar a un litro con agua. Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml según se requiera. Esterilizar durante 15 min a $121 \pm 1^\circ\text{C}$. Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

B.2.2.1.1.2. Agua peptonada**FORMULA**

Ingredientes	Cantidad
Peptona	1 g
Cloruro de sodio	8,5 g
Agua	1000 ml

Preparación: Disolver los componentes en un litro de agua. Ajustar el pH a 7,0 con hidróxido de sodio 1 N. Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml o en cualquier volumen múltiplo de nueve según se requiera. Esterilizar durante 15 min a $121 \pm 1^\circ\text{C}$. Después de la esterilización los volúmenes finales de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales. Si este diluyente no es usado inmediatamente, almacenar en lugar obscuro a una temperatura entre 0 a 5°C por un tiempo no mayor de un mes, en condiciones tales que no alteren su volumen o composición.

B.2.2.1.2 Medios de cultivo.

Caldo lactosado (medio de enriquecimiento para agua potable y hielo).

Caldo lauril sulfato triptosa (medio de enriquecimiento selectivo).

Caldo lactosa bilis verde brillante (medio de confirmación).

En el caso del análisis de agua potable y hielo puede utilizarse caldo lactosado o caldo lauril sulfato triptosa con púrpura de bromocresol (concentración 0,01 g/l de medio), como alternativa al uso de campanas de fermentación. Los tubos positivos se manifiestan por el vire del indicador a color amarillo.

B.2.2.1.2.1 Caldo lactosado

Ingrediente	Medio de concentración 1,5	Medio de concentración sencilla
Extracto de carne	4,5 g	3 g
Peptona de gelatina	7,5 g	5 g
Lactosa	7,5 g	5 g
Agua destilada	1000 ml	1000 ml

Disolver los ingredientes en 1 l de agua, calentando si es necesario o el medio completo deshidratado, siguiendo las instrucciones del fabricante. Ajustar el pH final de tal manera que después de la esterilización éste sea de $6,9 \pm 0,2$ a 25°C . Distribuir en volúmenes de 10 ml en tubos con dimensiones de 16 x 160 mm el medio de concentración sencilla y de 20 ml en tubos de 20 x 200 mm el medio de concentración 1,5, cada tubo debe tener campana de fermentación. Esterilizar en autoclave por 15 min a $121 \pm 1^\circ\text{C}$. Enfriar rápidamente para evitar una exposición excesiva al calor. El aspecto del caldo es claro y de color beige. Se puede utilizar una concentración doble del medio de cultivo, en cuyo caso se emplearán 10 ml del caldo preparado, cuando se agreguen 10 ml de la muestra.

B.2.2.1.2.2 Caldo lauril sulfato triptosa.

Ingrediente	Medio de concentración 1,5	Medio de concentración sencilla
Triptosa	30 g	20 g
Lactosa	7,5 g	5 g
Fosfato dipotásico	4,125 g	2,75 g
Fosfato monopotásico	4,125 g	2,75 g

Cloruro de sodio	7,5 g	5 g
Lauril sulfato de sodio	0,15 g	0,1 g
Agua destilada	1000 ml	1000 ml

Disolver los componentes en 1 l de agua, calentando si es necesario o el medio de cultivo completo deshidratado, siguiendo las instrucciones del fabricante. Ajustar el pH de tal manera que después de la esterilización éste sea de $6,8 \pm 0,2$ a 25°C . Distribuir en volúmenes de 10 ml en tubos con dimensiones de 16 x 160 mm el medio de concentración sencilla y de 20 ml en tubos de 20 x 200 mm el medio de concentración 1,5, cada tubo debe tener campana de fermentación. Esterilizar en autoclave por 15 min a $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Se recomienda almacenar el medio una vez preparado. Las campanas de fermentación no deben contener burbujas de aire después de la esterilización. Se puede utilizar una concentración doble del medio de cultivo, en cuyo caso se emplearán 10 ml de caldo preparado, cuando se agreguen 10 ml de muestra.

B.2.2.1.2.3 Lactosa bilis verde brillante

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Peptona	10 g
Lactosa	10 g
Sales biliares	20 g
Verde brillante	0,0133 g
Agua	1000 ml

Preparación: Disolver los componentes o el medio completo deshidratado en agua, calentar si es necesario. Ajustar el pH, de tal manera que después de la esterilización éste sea de 7,2 a 25°C . Distribuir el medio en cantidades de 10 ml en tubos de 16 x 160 mm conteniendo campana de fermentación. Esterilizar en autoclave por 15 min a $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Las campanas de fermentación no deben contener burbujas de aire después de la esterilización.

B.2.2.2 Materiales

- Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 ml (o si es necesario de 11 y 2 ml), con tapón de algodón. Las pipetas pueden ser graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total.
- Frascos de vidrio de 250 ml con tapón de rosca.
- Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc.
- Tubos de cultivo 20 x 200 mm y de 16 x 160 mm con tapones metálicos o de rosca.
- Campanas de fermentación (tubos de Durham).
- Pipetas bacteriológicas graduadas de 10 y 1 ml
- Gradillas.
- Asa de platino o nicromel de aproximadamente 3 mm de diámetro
- Todo el material que tenga contacto con las muestras bajo estudio debe esterilizarse mediante:
- Horno, durante 2 h a $170-175^{\circ}\text{C}$ o 1 h a 180°C o autoclave, durante 15 min como mínimo a $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

- El material de vidrio puede sustituirse por material desechable que cumpla con las especificaciones deseadas. No debe usarse material de vidrio dañado por las esterilizaciones repetidas y éste debe ser químicamente inerte.

B.2.3 Aparatos e instrumentos

- Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de 170°C.
- Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de $\pm 1^\circ\text{C}$, provista con termómetro calibrado.
- Termómetro de máximas y mínimas.
- Autoclave que alcance una temperatura mínima de $121 \pm 1^\circ\text{C}$.
- Potenciómetro con una escala mínima de 0,1 unidades de pH a 25°C.

B.2.4 Preparación de la muestra

Las muestras deben prepararse y diluirse, siempre que sea posible, de acuerdo con el Método de Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

B.2.5 Procedimiento

B.2.5.1 Para alimentos.

Preparar suficiente número de diluciones para asegurar que todos los tubos correspondientes a la última dilución rindan un resultado negativo.

B.2.5.1.1 Prueba presuntiva

B.2.5.1.1.1 Inoculación. Tomar tres tubos de medio de enriquecimiento de mayor concentración. Usar una pipeta estéril para transferir a cada tubo 10 ml de la muestra si es líquida o 10 ml de la dilución primaria inicial, en el caso de otros productos.

B.2.5.1.1.1.1 Tomar tres tubos de concentración sencilla del medio selectivo de enriquecimiento. Usar una pipeta estéril para transferir a cada uno de estos tubos 1 ml de la muestra si es líquida o 1 ml de la dilución primaria en el caso de otros productos.

B.2.5.1.1.1.2 Para las diluciones subsecuentes, continuar como se indica en el párrafo anterior, usando una pipeta diferente para cada dilución. Mezclar suavemente el inóculo con el medio.

B.2.5.2.1.2 Incubación. Incubar los tubos a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 h y observar si hay formación de gas, en caso contrario prolongar la incubación hasta 48 ± 2 h.

B.2.5.1.2 Prueba confirmativa

De cada tubo que muestre formación de gas, tomar una asada y sembrar en un número igual de tubos con medio de confirmación. Incubar a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 h o si la formación de gas no se observa en este tiempo, prolongar la incubación por 48 ± 2 h.

En esta Norma Oficial Mexicana se considera una combinación de tres tubos por cada dilución de la serie. Para algunos productos y siempre que se requiera una mayor precisión en los resultados, será necesario inocular una serie de cinco o diez tubos.

B.2.6 Expresión de los resultados

Tomar la serie de tubos de la prueba confirmativa que dé formación de gas después del periodo de incubación requerido y buscar el NMP en los cuadros correspondientes.

El Cuadro 3 muestra algunos ejemplos que se pueden presentar.

Ejemplos:

Ejemplo 1. Cuando sólo una dilución muestra tres tubos positivos, elegir ésta y las diluciones mayores posteriores.

Ejemplo 2. Cuando más de una dilución muestra tres tubos positivos y la última da menos de tres, elegir esta última y las dos diluciones anteriores más bajas.

Ejemplo 3. Cuando en ninguna dilución hay tres tubos positivos y éstos se encuentran en más de tres diluciones, seleccionar las dos diluciones mayores positivas y la siguiente.

Ejemplos 4 y 5. Cuando los tubos positivos sólo se encuentran en la muestra sin diluir (10 ml o 1 g) y en la primera dilución (1 ml o 10⁻¹), seleccionar las tres primeras diluciones para el cálculo del número más probable.

En cada caso se obtiene un número de tres cifras, lo cual es representado en los cuadros 4 al 7, según corresponda. En la columna que indica el número de tubos positivos se busca el índice del NMP.

La técnica de NMP puede admitir gran cantidad de variaciones. Los resultados obtenidos con esta técnica deben ser utilizados con precaución. Los límites de confianza están representados en los cuadros 4 al 7. Por ejemplo, para una muestra sólida con un NMP de 70 coliformes por gramo, los límites de confianza en el 95% de los casos variarán de 10 a 230 coliformes por gramo (ejemplo 3 del Cuadro 3) y en un producto con 24 de NMP de coliformes por gramo, los límites de confianza son de 3,6 a 130 coliformes por gramo (ejemplo 2 Cuadro 3).

CUADRO 3

Ejemplos de la selección de resultados positivos para el cálculo del NMP

E	Número de tubos positivos obtenidos de tres							NMP	
J	Tubos incubados, para las siguientes cantidades de muestra inoculada por tubo								
E	Producto								
M	Líquido	(ml)	10	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	Producto	Otros
P	Otros Productos	(g)	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	Líquido	Otros
L	Mayor dilución = menor concentración								
O									

							ml ⁻¹		g ⁻¹		
1			3	<u>3</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	0	15	(5)	150	(6)
2			3	<u>3</u>	<u>3</u>	0		24	(5)	240	(6)
3			2	2	<u>1</u>	<u>1</u>	0	7	(6)	70	(7)
4			<u>3</u>	<u>3</u>	<u>0</u>	0	0	2,4	(4)	24	(5)
5			<u>2</u>	<u>2</u>	<u>0</u>	1	0	0,21	(4)	2,1	(5)

CUADRO 4

Índice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos. (Diluciones 10, 1 y 0,1 g)

		3 TUBOS POR DILUCION		5 TUBOS POR DILUCION		
Combinación de positivos	Índice del NMP por g	95% Límites de confianza		Índice del NMP por g	95% Límites de confianza	
		bajo	alto		bajo	alto
0-0-0	< 0,03	<0,005	<0,09	<0,02	<0,005	<0,07
0-0-1	0,03	<0,005	<0,09	0,02	<0,005	0,07
0-1-0	0,03	<0,005	0,13	0,02	<0,005	0,07
0-2-0	---	---	---	0,04	<0,005	0,11
1-0-0	0,04	<0,005	0,20	0,02	<0,005	0,07

1-0-1	0,07	0,01	0,21	0,04	<0,005	0,11
1-1-0	0,07	0,01	0,23	0,04	<0,005	0,11
1-1-1	0,11	0,03	0,36	0,06	<0,005	0,15
1-2-0	0,11	0,03	0,36	0,06	<0,005	0,15
2-0-0	0,09	0,01	0,36	0,05	<0,005	0,13
2-0-1	0,14	0,03	0,37	0,07	0,01	0,17
2-1-0	0,15	0,03	0,44	0,07	0,01	0,17
2-1-1	0,20	0,07	0,89	0,09	0,02	0,21
2-2-0	0,21	0,04	0,47	0,09	0,02	0,21
2-2-1	0,28	0,10	1,50	---	---	---
2-3-0	---	---	---	0,12	0,03	0,28
3-0-0	0,23	0,04	1,20	0,08	0,01	0,19
3-0-1	0,39	0,07	1,3	0,11	0,02	0,25
3-0-2	0,64	0,15	3,80	---	---	---
3-1-0	0,43	0,07	2,1	0,11	0,02	0,25
3-1-1	0,75	0,14	2,3	0,14	0,04	0,34
3-1-2	1,20	0,30	3,8	---	---	---
3-2-0	0,93	0,15	3,80	0,14	0,04	0,34
3-2-1	1,50	0,30	4,40	0,17	0,05	0,46
3-2-2	2,10	0,35	4,70	--	--	--
3-3-0	2,40	0,36	13,0	--	--	--
3-3-1	4,60	0,71	24	--	--	--
3-3-2	11,0	1,50	48	--	--	--
3-3-3	>11.0	>1,50	>48	--	--	--
4-0-0	--	---	---	0,13	0,03	0,31
4-0-1	--	---	---	0,17	0,05	0,46
4-1-0	--	---	---	0,17	0,05	0,46
4-1-1	--	--	---	0,21	0,07	0,63
4-1-2	--	--	---	0,26	0,09	0,78
4-2-0	--	--	---	0,22	0,07	0,67
4-2-1	--	---	---	0,26	0,09	0,78
4-3-0	--	---	---	0,27	0,09	0,80
4-3-1	--	---	---	0,33	0,11	0,93
4-4-0	--	---	---	0,34	0,12	0,93

5-0-0	--	---	---	0,23	0,07	0,70
5-0-1	--	---	---	0,31	0,11	0,89
5-0-2	--	---	---	0,43	0,15	1,14
5-1-0	--	---	---	0,33	0,11	0,93
5-1-1	--	---	----	0,46	0,16	1,2
5-1-2	--	---	---	0,63	0,21	1,5
5-2-0	--	---	---	0,49	0,17	1,3
5-2-1	--	---	---	0,70	0,23	1,70
5-2-2	--	---	---	0,94	0,28	2,2
5-3-0	--	---	---	0,79	0,25	1,9
5-3-1	--	---	---	1,10	0,31	2,5
5-3-2	--	---	---	1,4	0,37	3,4
5-3-3	--	---	---	1,80	0,44	5,0
5-4-0	--	---	---	1,30	0,35	3,0
5-4-1	--	---	---	1,70	0,43	4,9
5-4-2	--	---	---	2,20	0,57	7,0
5-4-3	--	---	---	2,80	0,90	8,5
5-4-4	--	---	---	3,50	1,20	10
5-5-0	---	---	---	2,40	0,68	7,5
5-5-1	---	---	---	3,50	1,60	10
5-5-2	---	---	---	5,40	1,80	14,0
5-5-3	----	---	---	9,20	3,0	32
5-5-4	---	---	---	16,09	6,40	58,0
5-5-5	----	---	---	---	---	---

CUADRO 5

Índice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos. (Diluciones 1, 0,1 y 0,01 g)

		3 TUBOS POR DILUCION		5 TUBOS POR DILUCION		
Combinación de positivos	Índice del NMP por g	95% Límites de confianza		Índice del NMP por g	95% Límites de confianza	
		bajo	alto		bajo	alto
0-0-0	<0,3	<0,05	<0,9	<0,2	<0,05	<0,7
0-0-1	0,3	<0,05	<0,9	0,2	<0,05	0,7
0-1-0	0,3	<0,05	1,3	0,2	<0,05	0,7
0-2-0	---	---	---	0,4	<0,05	0,11

1-0-0	0,4	<0,05	2	0,2	<0,05	0,7
1-0-1	0,7	0,1	2	0,4	<0,05	1,1
1-1-0	0,7	0,1	2,3	0,4	<0,05	1,1
1-1-1	1,1	0,3	3,6	0,6	<0,05	1,5
1-2-0	1,1	0,3	3,6	0,6	<0,05	1,5
2-0-0	0,9	0,1	3,6	0,5	<0,05	1,3
2-0-1	1,4	0,3	3,7	0,7	0,1	1,7
2-1-0	1,5	0,3	4,4	0,7	0,1	1,7
2-1-1	2	0,7	8,9	0,9	0,2	2,1
2-2-0	2,1	0,4	4,7	0,9	0,2	2,1
2-2-1	2,8	1,0	15,0	---	---	---
2-3-0	---	---	---	1,2	0,3	2,8
3-0-0	2,3	0,4	12	0,8	0,1	1,9
3-0-1	3,9	0,7	13,0	1,1	0,2	2,5
3-0-2	6,4	1,5	38,0	--	--	--
3-1-0	4,3	0,7	21,0	1,1	0,2	2,5
3-1-1	7,5	1,4	23,0	1,4	0,4	3,4
3-1-2	12	3,0	38,0	--	--	--
3-2-0	9,3	1,5	38,0	1,4	0,4	3,4
3-2-1	15,0	3,0	44,0	1,7	0,5	4,6
3-2-2	21,0	3,5	47,0	--	--	--
3-3-0	24,0	3,6	130,0	--	--	--
3-3-1	46,0	7,1	240,0	--	--	--
3-3-2	110	15,0	480,0	--	--	--
3-3-3	>110	>15,0	>480,0	--	--	--
4-0-0	--	---	---	1,3	0,3	3,1
4-0-1	--	---	---	1,7	0,5	4,6
4-1-0	--	---	---	1,7	0,5	4,6
4-1-1	--	---	---	2,1	0,7	6,3
4-1-2	--	---	---	2,6	0,9	7,8
4-2-0	--	---	---	2,2	0,7	6,7
4-2-1	--	---	---	2,6	0,9	7,8
4-3-0	--	---	---	2,7	0,9	8,0
4-3-1	--	---	---	3,3	1,1	9,3

4-4-0	--	---	---	3,4	1,2	3,0
5-0-0	--	---	---	2,3	0,7	7,0
5-0-1	--	---	---	3,1	1,1	8,9
5-0-2	--	---	---	4,3	1,5	11,4
5-1-0	--	---	---	3,3	1,1	9,3
5-1-1	--	---	---	4,6	1,6	12
5-1-2	--	---	---	6,3	2,1	15,0
5-2-0	--	---	---	4,9	1,7	13,0
5-2-1	--	---	---	7,0	2,3	17,0
5-2-2	--	---	---	9,4	2,8	22
5-3-0	--	---	---	7,9	2,5	19,0
5-3-1	--	---	---	11,0	3,1	25,0
5-3-2	--	---	---	14,0	3,7	34,0
5-3-3	--	---	---	18,0	4,4	50,0
5-4-0	--	---	---	13,0	3,5	30,0
5-4-1	--	---	---	17,0	4,3	49,0
5-4-2	--	---	---	22	5,7	70,0
5-4-3	--	---	---	28,0	9,0	85,0
5-4-4	--	---	---	35,0	12	100,0
5-5-0	--	---	---	24,0	6,8	75,0
5-5-1	--	---	---	35,0	12	100,0
5-5-2	--	---	---	54,0	18,0	140,0
5-5-3	--	---	---	92	30,0	320,0
5-5-4	--	---	---	161,0	64,0	580,0
5-5-5	--	---	---	>161,0	>64,0	>580,0

CUADRO 6

Indice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos. (Diluciones 0,1, 0,001 y 0,0001 g)

		3 TUBOS POR DILUCION		5 TUBOS POR DILUCION		
Combinación de positivos	Indice del NMP por g	95% Límites de confianza		Indice del NMP por g	95% Límites de confianza	
		bajo	Alto		bajo	alto
0-0-0	<3	<0,5	<9	<2	<0,5	<7
0-0-1	3	<0,5	<9	2	<0,5	7
0-1-0	3	<0,5	13	2	<0,5	7

0-2-0	---	---	---	4	<0,5	11
1-0-0	4	<0,5	20	2	<0,5	7
1-0-1	7	1	21	4	<0,5	11
1-1-0	7	1	23	4	<0,5	11
1-1-1	11	3	36	6	<0,5	15
1-2-0	11	3	36	6	<0,5	15
2-0-0	9	1	36	5	<0,5	13
2-0-1	14	3	37	7	1,0	17
2-1-0	15	3	44	7	1,0	17
2-1-1	20	7	89	9	2	21
2-2-0	21	4	47	9	2	21
2-2-1	28	10	150	---	---	---
2-3-0	---	---	---	12	3	28
3-0-0	23	4	120	8	1	19
3-0-1	39	7	13,0	11	2	25
3-0-2	64	15	380	--	--	--
3-1-0	43	7	210	11	2	25
3-1-1	75	14	230	14	4	34
3-1-2	120	30	380	--	--	--
3-2-0	93	15	380	14	4	34
3-2-1	150	30	440	17	5	46
3-2-2	210	35	470	--	--	--
3-3-0	240	36	130,0	--	--	--
3-3-1	460	71	240,0	--	--	--
3-3-2	1100	150	480,0	--	--	--
3-3-3	>1100	>150	>480,0	--	--	--
4-0-0	--	---	---	13	3	31
4-0-1	--	---	---	17	5	46
4-1-0	--	---	---	17	5	46
4-1-1	--	---	---	21	7	63
4-1-2	--	---	---	26	9	78
4-2-0	--	---	---	22	7	67
4-2-1	--	---	---	26	9	78
4-3-0	--	---	---	27	9	80

4-3-1	--	---	---	33	11	93
4-4-0	--	---	---	34	12	93
5-0-0	--	---	---	23	7	7
5-0-1	--	---	---	31	11	89
5-0-2	--	---	---	43	15	114
5-1-0	--	---	---	33	11	93
5-1-1	--	---	---	46	16	120
5-1-2	--	---	---	63	21	150
5-2-0	--	---	---	49	17	130
5-2-1	--	---	---	70	23	170
5-2-2	--	---	---	94	28	220
5-3-0	--	---	---	79	25	190
5-3-1	--	---	---	110	31	250
5-3-2	--	---	---	140	37	340
5-3-3	--	---	---	180	44	500
5-4-0	--	---	---	130	35	300
5-4-1	--	---	---	170	43	490
5-4-2	--	---	---	220	57	700
5-4-3	--	---	---	280	90	850
5-4-4	--	---	---	350	120	1000
5-5-0	--	---	---	240	68	750
5-5-1	--	---	---	350	120	1000
5-5-2	--	---	---	540	180	1400
5-5-3	--	---	---	920	300	3200
5-5-4	--	---	---	1600	640	5800
5-5-5	--	---	---	>1600	>640	>5800

CUADRO 7

Índice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos. (Diluciones 0,01, 0,001 y 0,0001 g)

		3 TUBOS POR DILUCION		5 TUBOS POR DILUCION		
Combinación de positivos	Índice del NMP por g	95% Límites de confianza		Índice del NMP por g	95% Límites de confianza	
		bajo	Alto		bajo	alto
0-0-0	<30	<5	<90	<20	<5	<70
0-0-1	30	<5	<90	20	<5	70

0-1-0	30	<5	130	20	<5	70
0-2-0	---	---	---	40	<5	110
1-0-0	40	<5	200	20	<5	70
1-0-1	70	10	210	40	<5	110
1-1-0	70	10	230	40	<5	110
1-1-1	110	30	360	60	<5	150
1-2-0	110	30	360	60	<5	150
2-0-0	90	10	360	50	<5	130
2-0-1	140	30	370	70	10	170
2-1-0	150	30	440	70	10	170
2-1-1	200	70	890	90	20	210
2-2-0	210	40	470	90	20	210
2-2-1	280	100	1500	---	---	---
2-3-0	---	---	---	120	30	280
3-0-0	230	40	1200	80	10	190
3-0-1	390	70	1300	110	20	250
3-0-2	640	150	3800	--	--	--
3-1-0	430	70	2100	110	20	250
3-1-1	750	140	2300	140	40	340
3-1-2	1200	300	3800	--	--	--
3-2-0	930	150	3800	140	40	340
3-2-1	1500	300	4400	170	50	460
3-2-2	2100	350	4700	--	--	--
3-3-0	2400	360	13000	--	--	--
3-3-1	4600	710	24000	--	--	--
3-3-2	11000	1500	48000	--	--	--
3-3-3	>11000	>1500	>48000	--	--	--
4-0-0	--	---	---	130	30	310
4-0-1	--	---	---	170	50	460
4-1-0	--	---	---	170	50	460
4-1-1	--	---	---	210	70	630
4-1-2	--	---	---	260	90	780
4-2-0	--	---	---	220	70	670
4-2-1	--	---	---	260	90	780

4-3-0	--	---	---	270	90	800
4-3-1	--	---	---	330	110	930
4-4-0	--	---	---	340	120	930
5-0-0	--	---	---	230	70	700
5-0-1	--	---	---	310	110	890
5-0-2	--	---	---	430	150	1140
5-1-0	--	---	---	330	110	930
5-1-1	--	---	---	460	160	1200
5-1-2	--	---	---	630	210	1500
5-2-0	--	---	---	490	170	1300
5-2-1	--	---	---	700	230	1700
5-2-2	--	---	---	940	280	2200
5-3-0	--	---	---	790	250	1900
5-3-1	--	---	---	1100	310	2500
5-3-2	--	---	---	1400	370	3400
5-3-3	--	---	---	1800	440	5000
5-4-0	--	---	---	1300	350	3000
5-4-1	--	---	---	1700	430	4900
5-4-2	--	---	---	2200	570	7000
5-4-3	--	---	---	2800	900	8500
5-4-4	--	---	---	3500	1200	10000
5-5-0	--	---	---	2400	680	7500
5-5-1	--	---	---	3500	1200	10000
5-5-2	--	---	---	5400	1800	14000
5-5-3	--	---	---	9200	3000	32000
5-5-4	--	---	---	16000	6400	58000
5-5-5	--	---	---	>16000	>6400	>58000

B.2.7 Informe de la prueba

Para el informe de resultados multiplicar el valor obtenido en tablas por el factor de concentración de muestra correspondiente y reportar como "número más probable (NMP) de coliformes por gramo o mililitro de muestra".

En caso de muestras de agua informar NMP/100 ml.

B.3 DETERMINACION DE MICROORGANISMOS COLIFORMES TOTALES EN PLACA**B.3.1 Fundamento**

El método permite determinar el número de microorganismos coliformes presentes en una muestra, utilizando un medio selectivo (agar rojo violeta bilis) en el que se desarrollan bacterias a 35°C en aproximadamente 24 h, dando como resultado la producción de gas y ácidos orgánicos, los cuales viran el indicador de pH y precipitan las sales biliares.

B.3.2 Reactivos y materiales

B.3.2.1 Reactivos

Los reactivos que a continuación se mencionan, deben ser grado analítico y cuando se indique agua debe entenderse como agua destilada.

B.3.2.1.1 Soluciones diluyentes

B.3.2.1.1.1 Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Fosfato monopotásico	34 g
Agua	1000 ml

Preparación: Disolver el fosfato en 500 ml de agua y ajustar el pH a $7,2 \pm 0,2$ con solución de hidróxido de sodio 1 N. Llevar con agua a un litro. Esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min. Conservar en refrigeración (solución concentrada). Tomar 1,25 ml de la solución concentrada y llevar a un litro con agua (solución de trabajo). Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml según se requiera. Esterilizar durante 15 min a $121 \pm 1^\circ\text{C}$. Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

B.3.2.1.1.2 Agua peptonada

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Peptona	1 g
NaCl	8,5 g
Agua	1000 ml

Preparación: Disolver los componentes en un litro de agua. Ajustar el pH a $7 \pm 0,2$ con hidróxido de sodio 1 N. Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml o en cualquier volumen múltiplo de nueve según se requiera. Esterilizar durante 15 min a $121 \pm 1^\circ\text{C}$. Después de la esterilización, los volúmenes finales de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales. Si este diluyente no es usado inmediatamente, almacenar en lugar oscuro a una temperatura entre 0 a 5°C por un tiempo no mayor de un mes, en condiciones tales que no alteren su volumen o composición.

B.3.2.1.2 Medio de Cultivo

Agar-rojo- violeta-bilis-lactosa (RVBA)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Peptona	7 g
Extracto de levadura	3 g
Lactosa	10 g

Sales biliares	1,5 g
Cloruro de sodio	5 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal violeta	0,002 g
Agar	15 g
Agua	1000 ml

Preparación: Mezclar los componentes en el agua y dejar reposar durante algunos minutos. Mezclar perfectamente y ajustar el pH a $7,4 \pm 0,2$ con ácido clorhídrico 0,1 N o con hidróxido de sodio 0,1 N a 25°C, de forma que después del calentamiento se mantenga en este valor. Calentar con agitación constante y hervir durante 2 min. Enfriar inmediatamente el medio en un baño de agua hasta que llegue a 45°C. Evitar el sobrecalentamiento del medio. No debe esterilizarse en autoclave. Usar el medio dentro de las tres primeras horas después de su preparación. En el caso de utilizar medio de cultivo deshidratado, seguir las instrucciones del fabricante.

B.3.2.2 Materiales

- Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 ml (o si es necesario de 11 y 2 ml), con tapón de algodón. Las pipetas pueden ser graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total.
- Frascos de vidrio de 250 ml con tapón de rosca.
- Tubos de 16 X 150 mm con tapón de rosca.
- Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc.
- Cajas Petri.
- Todo el material e instrumentos que tengan contacto con las muestras bajo estudio debe esterilizarse mediante:
- Horno, durante 2 h a 170-175°C, o 1 h a 180°C; o en autoclave, durante 15 min como mínimo a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.
- El material de vidrio puede sustituirse por material desechable que cumpla con las especificaciones deseadas. No debe usarse material de vidrio dañado por las esterilizaciones repetidas y éste debe ser químicamente inerte.

B.3.3 Aparatos e instrumentos

- Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de 170°C.
- Autoclave con termómetro y manómetro, calibrada con termómetro de máximas y mínimas.
- Baño de agua con control de temperatura y circulación mecánica, provista con termómetro calibrado o verificado y que mantenga la temperatura entre 45 a 48°C o equivalente.
- Vasos para licuadora con tapa esterilizables o bolsas estériles para homogeneizador peristáltico.
- Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de $\pm 1^\circ\text{C}$, provista con termómetro calibrado.
- Contador de colonias de campo oscuro, placa de cristal cuadrículada y lente amplificador o equivalente.
- Registrador mecánico o electrónico.
- Microscopio óptico.
- Potenciómetro con una escala mínima de 0,1 unidades de pH a 25°C.

B.3.4 Preparación de la muestra

La preparación de la muestra debe ser de acuerdo con lo establecido en el método B.1 PREPARACION Y DILUCION DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANALISIS MICROBIOLÓGICO.

B.3.5 Procedimiento

B.3.5.1 Colocar en cajas Petri por duplicado 1 ml de la muestra líquida directa o de la dilución primaria, utilizando para tal propósito una pipeta estéril.

B.3.5.2 Repetir el procedimiento tantas veces como diluciones decimales se requiera sembrar, utilizando una pipeta estéril diferente para cada dilución.

B.3.5.3 Verter de 15 a 20 ml del medio RVBA fundido y mantenido entre 45 a 48°C en baño de agua. En el caso de utilizar cajas de Petri de plástico se vierte de 10 a 15 ml del medio. El tiempo transcurrido entre la preparación de la dilución primaria y el momento en que se vierte el medio de cultivo, no debe exceder de 20 min.

B.3.5.4 Mezclar cuidadosamente el inóculo con el medio con seis movimientos de derecha a izquierda, seis movimientos en el sentido de las manecillas del reloj, seis movimientos en el sentido contrario al de las manecillas del reloj y seis de atrás para adelante, sobre una superficie lisa y nivelada. Permitir que la mezcla solidifique dejando las cajas Petri reposar sobre una superficie horizontal fría.

B.3.5.5 Preparar una caja control con 15 ml de medio para verificar la esterilidad.

B.3.5.6 Después de que está el medio completamente solidificado en la caja, verter aproximadamente 4 ml del medio RVBA mantenido entre 45 a 48°C en la superficie del medio inoculado. Dejar que solidifique.

B.3.5.7 Invertir las placas y colocarlas en la incubadora a $35 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 18 a 24 h y en productos lácteos a $32 \pm 1^\circ\text{C}$.

B.3.5.8 Después del periodo especificado para la incubación, contar las colonias con el contador de colonias.

B.3.5.9 Seleccionar las placas que contengan entre 15 y 150 colonias. Las colonias típicas son de color rojo oscuro, generalmente se encuentran rodeadas de un halo de precipitación debido a las sales biliares, el cual es de color rojo claro o rosa, la morfología colonial es semejante a lentes biconvexos con un diámetro de 0,5 a 2 mm.

B.3.6 Expresión de los resultados

B.3.6.1 Cálculo del método

B.3.6.1.1 Placas que contienen entre 15 y 150 colonias características.

Separar las placas que contienen el número antes mencionado de colonias características en dos diluciones consecutivas. Contar las colonias presentes. Calcular el número de coliformes por mililitro o por gramo de producto, multiplicando el número de colonias por el inverso de la dilución correspondiente, tomando los criterios del método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa.

B.3.6.1.2 Placas que contienen menos de 15 colonias características.

Si cada una de las placas tiene menos de 15 colonias características, reportar el número obtenido seguido de la dilución correspondiente.

B.3.6.1.3 Placas con colonias no características.

Si en las placas no hay colonias características, reportar el resultado como: menos de un coliforme por 1/d por gramo, en donde d es el factor de dilución.

B.3.7 Informe de la prueba

Informar: UFC/g o ml en placa de agar rojo violeta bilis, incubados a 35°C durante 24 ± 2 h.

En caso de emplear diluciones y no observar crecimiento, informar utilizando como referencia la dilución más baja utilizada, por ejemplo dilución 10^{-1} .

En caso de no observar crecimiento en la muestra sin diluir se informa: "no desarrollo de coliformes por ml".

B.4 DETERMINACION DE *Salmonella* EN ALIMENTOS

B.4.1 Fundamento

La presente técnica para la detección de *Salmonella* en alimentos, describe un esquema general que consiste de 5 pasos básicos:

B.4.1.1 Preenriquecimiento, es el paso donde la muestra es enriquecida en un medio nutritivo no selectivo, que permite restaurar las células de *Salmonella* dañadas a una condición fisiológica estable.

B.4.1.2 Enriquecimiento selectivo, empleado con el propósito de incrementar las poblaciones de *Salmonella* e inhibir otros organismos presentes en la muestra.

B.4.1.3 Selección en medios sólidos, en este paso se utilizan medios selectivos que restringen el crecimiento de otros géneros diferentes a *Salmonella* y permite el reconocimiento visual de colonias sospechosas.

B.4.1.4 Identificación bioquímica, este paso permite la identificación genérica de los cultivos de *Salmonella* y la eliminación de cultivos presuntivos.

B.4.1.5 Serotipificación, es una técnica serológica que permite la identificación específica de un cultivo.

B.4.2 Reactivos y materiales

En caso de disponerse de fórmulas comerciales deshidratadas, se deben seguir las instrucciones impresas en la etiqueta respectiva para su preparación.

Las sustancias químicas usadas para preparar los medios de cultivo y los reactivos deben ser grado analítico.

B.4.2.1 Reactivos

B.4.2.1.1 Medios de pre-enriquecimiento

B.4.2.1.1.1 Agua peptonada

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Peptona	10 g
Cloruro sódico	5 g
Fosfato sódico dibásico	3,5 g
Fosfato potásico monobásico	1,5 g
Agua	1000 ml

Preparación: Disolver los componentes en el agua, calentando si es necesario. Ajustar el pH, si es necesario, después de la esterilización a $7 \pm 0,2$. Distribuir en recipientes de vidrio esterilizables con la capacidad necesaria para obtener las porciones necesarias para la prueba. Esterilizar por 15 min a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

B.4.2.1.1.2 Caldo lactosado

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Lactosa	5 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: $6,9 \pm 0,2$

Preparación: Disolver los ingredientes en agua, calentando a 65°C . Distribuir en porciones de 225 ml, en frascos de 500 ml. Esterilizar durante 15 min a $121 \pm 1^\circ\text{C}$

B.4.2.1.2 Caldo de enriquecimiento

B.4.2.1.2.1 Caldo selenito-cistina

FORMULA

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

Triptona o polipeptona	5 g
Lactosa	4 g
Fosfato disódico	10 g
Selenito ácido de sodio	4 g
L-cistina	0,01 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: 7,0 ± 0,2 a 25°C

Preparación: Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada estéril y distribuir en volúmenes de 10 y 225 ml en recipientes estériles, según se requiera. El caldo así preparado es transparente. De preferencia usarlo el mismo día de su preparación. Si se desea conservar el medio por varios días, puede exponerse al calor en autoclave por 5 min a 110 ± 1°C, tomando entonces un color salmón.

B.4.2.1.2.2 Caldo tetrationato

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Proteosa peptona o tristona	5 g
Sales biliares	1 g
Carbonato de calcio	10 g
Tiosulfato de sodio pentahidratado	30 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: 7,0 ± 0,1

Preparación: Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada estéril. Distribuir, agitando constantemente, en porciones de 10 y 225 ml, en recipientes estériles. Guardar en refrigeración. Antes de usar el medio, agregar 2 ml de una solución yodo-yoduro y 1 ml de solución de verde brillante al 0,1% por cada 100 ml de caldo. El medio una vez adicionado de yodo no debe calentarse y debe usarse el mismo día de su preparación.

B.4.2.1.2.3 Vassiliadis-Rappaport

Solución A

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Tristona	5 g
Cloruro de sodio	8 g
Fosfato de potasio dihidrogenado	1,6 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación: Disolver los componentes en el agua por calentamiento cercano a 70°C.

Solución B

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Cloruro de magnesio hexahidratado	400 g

Agua destilada 1000 ml

Preparación: Disolver el cloruro de magnesio en el agua. Como esta sal es muy higroscópica es conveniente disolver el contenido entero de cloruro de magnesio desde un recipiente recientemente abierto de tal modo que la concentración de la solución sea de 0,4 g/ml. Conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente

Solución C

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Oxalato de verde de malaquita	0,4 g
Agua destilada	100 ml

Preparación: Disolver el oxalato de verde de malaquita en el agua. Conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

Medio completo

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Solución A	1 000 ml
Solución B	100 ml
Solución C	10 ml

Preparación: Adicionar 1 000 ml de la solución A, 100 ml de la solución B y 10 ml de la solución C. Ajustar el pH si es necesario, de tal manera que después de la esterilización sea de $5,2 \pm 0,2$. Distribuir antes de usar dentro de tubos en cantidades de 10 ml. Almacenar en refrigeración.

B.4.2.1.2.4 Caldo de Soya Tripticasa

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Tripticasa o triptosa	17 g
Fitona	3 g
Glucosa	2,5 g
Cloruro de sodio	2,5 g
Agua destilada	1000 ml

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

Preparación: Disolver los ingredientes en 1 l de agua destilada, calentando lentamente hasta su disolución completa. Distribuir porciones de 225 ml dentro de matraces de 500 ml y esterilizar en autoclave durante 15 min a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

B.4.2.1.2.5 Leche descremada reconstituida

Suspender 100 g de leche descremada en polvo en un litro de agua destilada. Agitar circularmente hasta disolución. Distribuir en volúmenes de 225 ml en matraces Erlenmeyer de 500 ml. Esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 min. El volumen final debe corregirse para mantener 225 ml.

B.4.2.1.2.6 Caldo soya tripticasa estéril adicionado con sulfito de potasio.

Adicionar al caldo soya tripticasa 5 g de sulfito de potasio por cada 1000 ml de medio, quedando una concentración final de sulfito de potasio del 0,5%. Adicionar el sulfito de potasio antes de esterilizar en autoclave en la forma habitual.

B.4.2.1.3 Medios de aislamiento**B.4.2.1.3.1 Agar verde brillante (VB)****FORMULA**

Ingredientes	Cantidad
Extracto de levadura	3 g
Polipeptona (Proteosa peptona No. 3)	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Lactosa	10 g
Sacarosa	10 g
Rojo de fenol	0,08 g
Agar	20 g
Verde brillante	0,0125 g
Agua destilada	1000 ml
pH final: 6,9 ± 0,2	

Preparación: Suspender los ingredientes en un litro de agua destilada y calentar a ebullición, hasta disolución completa. Ajustar el pH. Esterilizar en autoclave por 15 min a 121 ± 1°C. El sobrecalentamiento del medio disminuye su selectividad. Enfriar el medio a 50°C y distribuirlo en cajas de petri estériles. El aspecto del medio es oscuro, de color marrón.

B.4.2.1.3.2 Agar con sulfito de bismuto**FORMULA**

Ingredientes	Cantidad
Extracto de carne de res	5 g
Mezcla de peptonas	10 g
Glucosa	5 g
Fosfato disódico (anhidro)	5 g
Sulfato ferroso (anhidro)	0,300 g
Sulfito de bismuto	8 g
Verde brillante	0,025 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml
pH final: 7,6 ± 0,2	

Preparación: Suspender los ingredientes en un litro de agua. Calentar hasta su disolución completa, agitando frecuentemente. Ajustar el pH. Enfriar a 45°C y verter en cajas de petri estériles, distribuyendo de manera homogénea el precipitado propio del medio. El aspecto de las placas es opaco, de color verde pálido y deben usarse el mismo día de su preparación. Si la coloración es parda, no deben utilizarse. El medio no debe esterilizarse en autoclave; el sobrecalentamiento afecta su selectividad.

B.4.2.1.3.3 Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)**FORMULA**

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

Xilosa	3,75 g
L-lisina	5 g
Lactosa	7,5 g
Sacarosa	7,5 g
Cloruro de sodio	5 g
Extracto de levadura	3 g
Rojo de fenol	0,08 g
Agar	15 g
Desoxicolato de sodio	2,5 g
Citrato férrico-amónico	0,8 g
Tiosulfato de sodio	6,8 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: 6,9 ± 0,2

Preparación: Suspender los ingredientes en un litro de agua destilada, y calentar en baño de agua a 55°C, agitando frecuentemente, hasta disolución completa. Ajustar el pH. Enfriar a 50°C y verter en cajas de petri estériles. No se esterilice. El sobrecalentamiento produce una precipitación; la reactividad del medio puede ser satisfactoria, pero las colonias suelen ser muy pequeñas. El aspecto del medio es claro y de color rojo brillante.

B.4.2.1.3.4 Agar para Salmonella y Shigella (SS)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Extracto de carne	5 g
Polipeptona *	5 g
Lactosa	10 g
Sales biliares	8,5 g
Citrato de sodio dihidratado	8,5 g
Tiosulfato de sodio pentahidratado	8,5 g
Citrato férrico	1 g
Agar	13,5 g
Rojo neutro	0,025 g
Verde brillante	0,33 mg
Agua destilada	1000 ml

pH final: 7,0 ± 0,2

* La polipeptona se puede sustituir por 2,5 g de peptona de caseína y 2,5 g de peptona de carne.

Preparación: Suspender los ingredientes en 1 l de agua destilada estéril y calentar a ebullición hasta disolución completa. Ajustar el pH. No esterilizar en autoclave. Enfriar a 50°C y distribuir en cajas de petri estériles en condiciones asépticas. El aspecto del medio fundido es claro y de color rosado.

B.4.2.1.3.5 Agar entérico Hektoen

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Proteosa peptona	12 g
Extracto de levadura	3g
Lactosa	12 g
Sacarosa	12 g
Salicina	2 g
Sales biliares	9 g
Cloruro de sodio	5 g
Tiosulfato de sodio	5 g
Citrato amónico férrico	1,5 g
Azul de bromotimol	0,064 g
Fuscina ácida	0,1 g
Agar	13,5 g
Agua	1000 ml

pH final: 7,5 ± 0,2

Preparación: Suspender los ingredientes en agua destilada, hervir con agitación hasta completa disolución del agar. No sobrecalentar. Dejar enfriar a 55-60°C y distribuir en cajas de petri estériles en condiciones asépticas.

B.4.2.1.4 Medios para pruebas bioquímicas

B.4.2.1.4.1 Agar de tres azúcares y hierro (TSI)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Peptona de carne *	1 g
Peptona de caseína *	1 g
Cloruro de sodio	0,5 g
Lactosa	1 g
Sacarosa	1 g
Glucosa	0,1 g
Agar	1,3 g
Rojo de fenol	2,5 mg
Sulfato ferroso amónico-Pentahidratado	20 mg
Tiosulfato de sodio	20 mg
Agua destilada	100 ml

pH final: 7,3 ± 0,2

* Estas peptonas se pueden sustituir por 2 g de polipeptona.

Preparación: Suspender los ingredientes en 100 ml de agua destilada. Calentar a ebullición, agitando ocasionalmente, hasta disolución completa. Enfriar a 60°C y ajustar el pH. Distribuir en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar a 121 ± 1°C durante 15 min. Inclinar los tubos de manera que el medio de cultivo en el fondo alcance una altura de 3 cm y una profundidad de 4 cm. El medio es de color rojo.

B.4.2.1.4.2 Agar de hierro y lisina (LIA)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Peptona de gelatina	0,5 g
Extracto de levadura	0,3 g
Glucosa	0,1 g
L-lisina	1 g
Citrato férrico-amónico	50 mg
Tiosulfato de sodio anhidro	4 mg
Púrpura de bromocresol	2 mg
Agar	1,5 g
Agua destilada	100 ml

pH final: 6,7 ± 0,2

Preparación: Suspender los ingredientes en el agua destilada y mezclar bien, calentar hasta ebullición con agitación frecuente hasta conseguir la disolución completa. Ajustar el pH. Distribuir en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm, con tapón de rosca. Esterilizar en autoclave a 121 ± 1°C durante 12 min. Dejar que los tubos se enfríen en posición inclinada, de tal modo que se obtengan columnas de medio de 4 cm y una superficie inclinada de 2 cm.

El medio ya preparado es de color púrpura.

B.4.2.1.4.3 Agar nutritivo**FORMULA**

Ingredientes	Cantidad
Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: 6,8 ± 0,2

Preparación: Suspender los ingredientes en agua. Dejar reposar de 5 a 10 min. Calentar a ebullición hasta disolución completa. Distribuir en tubos de 13 x 100 mm, en cantidades de 1/3 de su volumen. Esterilizar a 121 ± 1°C por 15 min. Inclinan los tubos antes que el agar solidifique.

B.4.2.1.4.4 Medio de SIM (para Sulfuro, Indol y Movilidad)**FORMULA**

Ingredientes	Cantidad
Extracto de carne	3 g
Peptona	30 g
Hierro peatonizado	0,2 g
Tiosulfato de sodio	0,025 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: 7,3 ± 0,2

Preparación: Suspender los ingredientes en el agua destilada, calentar a ebullición agitando frecuentemente hasta lograr una disolución completa. Enfríar a 50°C y ajustar el pH. Distribuir el medio en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar en autoclave a 121 ± 1°C durante 15 min. Se dejan enfriar los tubos en posición vertical.

B.4.2.1.4.5 Agar citrato de Simmons

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Fosfato de amonio	1 g
Fosfato dipotásico	1 g
Cloruro de sodio	5 g
Citrato de sodio	2 g
Sulfato de magnesio	0,20 g
Azul de bromotimol	0,08 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: 6,8 ± 0,2

Preparación: Suspender los ingredientes en el agua destilada, calentar a ebullición agitando frecuentemente hasta lograr una disolución completa. Ajustar el pH. Distribuir el medio en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar en autoclave a 121 ± 1°C durante 15 min. Dejar enfriar los tubos en posición inclinada.

B.4.2.1.4.6 Caldo MR-VP (Rojo de metilo-Voges Proskauer)**FORMULA**

Ingredientes	Cantidad
Peptona	7 g
Dextrosa	5 g
Difosfato de potasio	5 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: 6,9 ± 0,2

Preparación: Suspender los ingredientes en el agua destilada, calentar a ebullición agitando frecuentemente hasta lograr una disolución completa. Ajustar el pH. Distribuir el medio en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar en autoclave a 121 ± 1°C durante 15 min.

B.4.2.1.4.7 Caldo manitol**FORMULA**

Ingredientes	Cantidad
Extracto de carne	1 g
Proteosa peptona	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Rojo de fenol	0,018 g
Manitol	10 g
Agua	1000 ml

pH final: 7,4 ± 0,2

Preparación: Suspender 26 g del medio deshidratado en un litro de agua, mezclar y ajustar el pH. Distribuir en volúmenes de 2 a 3 ml en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar a 121 ± 1°C durante 15 min.

B.4.2.1.4.8 Caldo malonato

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Extracto de levadura	1 g
Sulfato de amonio	2 g
Fosfato dipotásico	0,6 g
Fosfato monopotásico	0,4 g
Cloruro de sodio	2 g
Malonato	3 g
Glucosa	0,25 g
Azul de bromotimol	0,025 g
Agua	1000 ml

pH final: $6,7 \pm 0,2$

Preparación: Suspender los ingredientes en agua, mezclar y ajustar el pH. Distribuir en tubos de 13 x 100 mm en cantidades de 3 ml. Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 min.

B.4.2.1.4.9 Caldo Urea**FORMULA**

Ingredientes	Cantidad
Urea	20 g
Extracto de levadura	0,1 g
Fosfato monopotásico	9,1 g
Fosfato disódico	9,5 g
Rojo de fenol	0,01 g
Agua	1000 ml

pH final: $6,8 \pm 0,2$

Preparación: Disolver los ingredientes en agua destilada. NO CALENTAR. Esterilizar por filtración a través de membrana $0,45 \mu\text{m}$ o en autoclave de 5 a 8 lb de presión durante 15 min. Distribuir asépticamente de 1,5 a 3 ml en tubos estériles de 13 x 100 mm.

B.4.2.1.4.10 Caldo de urea rápido**FORMULA**

Ingredientes	Cantidad
Urea	20 g
Extracto de levadura	0,1 g
Fosfato monopotásico	0,091 g
Fosfato disódico	0,095 g
Rojo de fenol	0,01 g
Agua	1000 ml

pH final: $6,8 \pm 0,2$

Preparación: Disolver los ingredientes en agua destilada. NO CALENTAR. Esterilizar por filtración a través de membrana $0,45 \mu\text{m}$. Distribuir asépticamente de 1,5 a 3 ml en tubos estériles de 13 x 100 mm.

B.4.2.1.4.11 Caldo infusión cerebro corazón

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Infusión cerebro corazón	200 g
Infusión de corazón de res	250 g
Proteosa peptona	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato disódico dodecahidratado	2,5 g
Dextrosa	2 g
Agua destilada	1000 ml
pH final: 7,4 ± 0,2	

Preparación: Disolver los ingredientes en agua destilada, calentar suavemente. Distribuir y esterilizar a 121 ± 1°C durante 15 min.

B.4.2.1.5 Soluciones**B.4.2.1.5.1 Solución verde brillante al 0,1% (1:1000)****FORMULA**

Ingredientes	Cantidad
Verde brillante	0,1 g
Agua destilada estéril	100 ml

Preparación: Disolver 0,1 g de verde brillante en el agua destilada estéril hasta completar 100 ml.

B.4.2.1.5.2 Solución de yodo-yoduro**FORMULA**

Ingredientes	Cantidad
Cristales de yodo	6 g
Yoduro de potasio	6 g
Agua destilada	100 ml

Preparación: Disolver los cristales y el yoduro de potasio en el agua destilada hasta completar 100 ml. Conservar en frasco ámbar.

B.4.2.1.5.3 Solución salina al 0,85%**FORMULA**

Ingredientes	Cantidad
Cloruro de sodio	0,85 g
Agua destilada	100 ml

Preparación: Disolver el cloruro de sodio en el agua y esterilizar a 121 ± 1°C durante 15 min.

B.4.2.1.5.4 Solución salina formalizada**FORMULA**

Ingredientes	Cantidad
Solución de formaldehído (36-38%)	6 ml
Cloruro de sodio	8,5 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación: Disolver 8,5 g de cloruro de sodio en 1 l de agua destilada. Esterilizar a 121 ± 1°C durante 15 min. Enfriar a temperatura ambiente. Adicionar 6 ml de la solución de formaldehído. No esterilizar después de la adición de formaldehído.

B.4.2.1.5.5 Reactivo de Kovac

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
p-dimetil-aminobenzaldehido	5 g
Alcohol amílico	75 ml
Acido clorhídrico concentrado	25 ml

Preparación: Disolver el p-dimetil-aminobenzaldehído en el alcohol amílico y después agregar el ácido clorhídrico lentamente. Conservar en frasco ámbar en refrigeración.

B.4.2.1.5.6 Solución de alfa-naftol al 5%**FORMULA**

Ingredientes	Cantidad
Alfa-naftol	5 g
Alcohol	100 ml

Preparación: Disolver 5 g de alfa-naftol en alcohol hasta completar 100 ml.

B.4.2.1.5.7 Solución de rojo de metilo**FORMULA**

Ingredientes	Cantidad
Rojo de metilo	0,1 g
Alcohol etílico	300 ml
Agua destilada c.b.p	500 ml

Preparación: Disolver el rojo de metilo en el alcohol etílico y adicionar el agua hasta completar 500 ml.

B.4.2.1.5.8 Solución de hidróxido de potasio al 40%**FORMULA**

Ingredientes	Cantidad
Hidróxido de potasio	40 g
Agua destilada	100 ml

Preparación: Disolver 40 g de hidróxido de potasio en el agua hasta completar 100 ml.

B.4.2.1.5.9 Solución de gelatinasa al 5%**FORMULA**

Ingredientes	Cantidad
Gelatinasa	5 g
Agua	100 ml

Preparación: Disolver 5 g de gelatinasa en 100 ml de agua destilada. NO CALENTAR.

B.4.2.1.6 Antisueros

- Antisuero polivalente somático (O)
- Antisuero polivalente flagelar (H)
- Antisuero Vi

B.4.2.2 Material

- Matraces Erlenmeyer de 500 ml
- Recipientes de boca ancha, de capacidad apropiada para contener las muestras simples y compuestas
- Angulos de vidrio
- Cucharas, bisturís, cuchillos y pinzas
- Tubos de ensaye de 16 x 150 mm y de 20 x 100 mm
- Tubos para serología de 10 x 75 mm o de 13 x 100 mm
- Pipetas bacteriológicas de 10 y 5 ml, graduadas en 0,1 ml y protegidas con tapón de algodón.
- Pipetas de 1 ml, con graduaciones de 0,01 ml
- Cajas de Petri estériles de vidrio o desechables
- Rejillas para tubos de ensaye
- Asa de platino o nicromel de aproximadamente 3 mm de diámetro
- Papel pH (intervalo de 6-8) con graduaciones máximas de 0,4 unidades de pH para cambios de color

Todo el material que tenga contacto con las muestras bajo estudio debe esterilizarse mediante:

horno, durante 2 h, a 170-175°C o autoclave, durante 15 min como mínimo, a $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

B.4.3 Equipo

- Horno para esterilizar que alcance los 180°C
- Incubadora con termostato para evitar variaciones mayores de $\pm 0,1^\circ\text{C}$ y termómetro.
- Autoclave con termómetro o manómetro, probado con termómetro de máximas.
- Baño maría con termostato y termómetro.
- Balanza granataria con sensibilidad de 0,1 g
- Licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato, con vasos esterilizables (vidrio o aluminio).
- Mecheros Bunsen o Fisher
- Potenciómetro

B.4.4 Procedimiento

B.4.4.1 Preparación de los alimentos para el aislamiento de *Salmonella*

Los siguientes métodos se basan en el análisis de 25 g de la muestra analítica en una proporción de 1:9 de muestra/ caldo. Esta cantidad puede variarse siempre que se mantenga la misma proporción. Se recomienda una muestra de 25 g o más.

B.4.4.1.1 Procedimiento general para la preparación de muestras

Pesar asépticamente 25 g de la muestra en un vaso estéril de licuadora o en bolsa estéril para trabajar en homogeneizador peristáltico (stomacher). Adicionar 225 ml del medio de preenriquecimiento estéril (generalmente caldo lactosado, a menos que se indique otro) y licuar si es necesario durante un min. Transferir asépticamente la mezcla homogeneizada a un recipiente estéril de boca ancha con tapón de rosca y dejar reposar por 60 min a temperatura ambiente con la tapa bien enroscada. Mezclar bien y determinar el pH aproximado con papel pH. Ajustar, si es necesario, a un pH $6,8 \pm 0,2$ con hidróxido de sodio 1 N o ácido clorhídrico 1 N estériles. Mezclar y cubrir el recipiente enroscando suavemente la tapa.

Incubar 18 ± 2 h a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Continuar como se indica en B.4.4.2.1.

B.4.4.1.2 Procedimiento específico para la preparación

B.4.4.1.2.1 Productos que contienen huevo en su formulación (pastas para sopa, rollos chinos, etc.); ensaladas preparadas (jamón, huevos, pollo, atún, pavo); frutas frescas, congeladas o secas; crustáceos (camarones, cangrejos, jaibas, langostinos, langostas) y pescado.

Preferentemente no descongelar la muestra antes de su análisis, si esto es necesario, utilizar caldo lactosado como medio de preenriquecimiento, licuar dos min. Continuar después de la incubación como en B.4.4.2.1.

B.4.4.1.2.2 Carnes, sustitutos de carnes, derivados cárnicos, sustancias de origen animal, productos glandulares y harinas (pescado, carne y hueso).

B.4.4.1.2.2.1 Productos procesados térmicamente y productos secos. Se sigue el procedimiento señalado en B.4.4.1.1 hasta la homogenización. Si la muestra es en polvo o molida, el licuado puede omitirse. Después de reposar, mezclar bien y ajustar el pH como se indica en el procedimiento general. Para emulsionar las grasas, agregar los detergentes en las mismas proporciones y con las mismas recomendaciones que para el coco. La cantidad de los mismos dependerá en gran medida de la composición del alimento. Los detergentes no serán necesarios en los productos glandulares en polvo. Incubar las muestras como se indica en B.4.4.1.1.

B.4.4.1.2.2.2 Productos crudos o altamente contaminados. Pesar porciones de 25 g de producto en dos vasos para licuadora. Si la muestra es en polvo o molida, el licuado puede omitirse y el producto puede pesarse directamente en matraces Erlenmeyer estériles de 500 ml. Adicionar 225 ml de caldo selenito cistina o 225 ml de caldo tetrionato (sin verde brillante) a cada muestra analítica. Licuar por dos min y pasar asépticamente a matraces Erlenmeyer de 500 ml. Dejar reposar y ajustar el pH como se indica en B.4.4.1.1.

Adicionar 2,25 ml de solución de verde brillante 0,1% y 4,5 ml de solución yodo-yoduro a la muestra que se enriquecerá con caldo tetrionato. Homogenizar e incubar. Continuar como se indica en B.4.4.2.1.

B.4.4.2 Aislamiento de *Salmonella*

B.4.4.2.1 Cerrar firmemente el tapón de rosca de los matraces con los cultivos de preenriquecimiento y agitar suavemente, transferir respectivamente 1 ml de la mezcla a un tubo que contenga 10 ml de caldo tetrionato y a otro con 10 ml de caldo selenito cistina. Como alternativa, en sustitución del caldo tetrionato puede emplearse el medio Vassiliadis-Rappaport.

B.4.4.2.2 Incubar de 18 a 24 h a 35°C o, para alimentos fuertemente contaminados a 42°C por el mismo periodo. Estriar los productos que fueron directamente enriquecidos en medios selectivos.

B.4.4.2.3 Mezclar el tubo con caldo selenito cistina y estriar en agar xilosa lisina desoxicolato (XLD), agar verde brillante (VB) y una tercera caja con cualquiera de los medios selectivos adicionales (agar entérico Hektoen, agar Sulfito de Bismuto o Agar SS).

Efectuar el mismo procedimiento para el caldo tetrionato.

Incubar las placas 24 ± 2 h a 35°C.

B.4.4.2.4 Examinar las placas para investigar la presencia de colonias típicas de *Salmonella*, de acuerdo con las siguientes características:

Agar XLD: colonias rosas o rojas que pueden ser transparentes con o sin centro negro. En algunos casos las colonias pueden aparecer completamente negras.

Agar VB: colonias rojas o rosas que pueden ser transparentes rodeadas por medio enrojecido; las bacterias fermentadoras de la lactosa dan colonias amarillas.

Agar entérico Hektoen: colonias verdes o azulverdes con o sin centro negro. En algunos casos las colonias pueden aparecer completamente negras.

Agar Sulfito de Bismuto: las colonias típicas de *Salmonella* pueden ser café, grises o negras; con o sin brillo metálico. Generalmente el medio circundante (halo) es café, tornándose posteriormente negro. Algunas cepas producen colonias verdes sin la formación del halo oscuro. Si las placas no muestran colonias típicas o no se observa crecimiento, incubar 24 h adicionales.

Agar SS: colonias translúcidas, ocasionalmente opacas. Algunas colonias dan centro negro. Las colonias fermentadoras de la lactosa son rojas.

B.4.4.3 Identificación bioquímica

B.4.4.3.1 Seleccionar al menos dos colonias típicas de cada medio selectivo, que se encuentren bien aisladas.

Tocar levemente el centro de cada colonia e inocular dos tubos, uno con agar triple azúcar hierro (TSI) y otro con agar hierro lisina (LIA), por estría en la superficie inclinada y por punción en el fondo.

Incubar por 24 ± 2 h a 35°C .

Almacenar en refrigeración de 5 a 8°C las placas con medios selectivos por sí es necesario retomar más colonias.

B.4.4.3.2 Observar el crecimiento en los tubos y considerar presuntivamente positivas para *Salmonella* las colonias que den las siguientes reacciones:

B.4.4.3.2.1 Agar TSI, en el fondo del tubo se observa vire del indicador debido a la fermentación de la glucosa; en la superficie del medio se observa un color rojo más intenso que el medio original debido a la no fermentación de la lactosa ni de la sacarosa. En la mayoría de los casos se observa coloración negra a lo largo de la punción debido a la producción de ácido sulfhídrico.

B.4.4.3.2.2 Agar LIA, se observa intensificación del color púrpura en todo el tubo por la descarboxilación de la lisina. Considerar negativos aquellos cultivos que produzcan claramente color amarillo en el fondo del agar. La mayoría de las cepas de *Salmonella* producen ácido sulfhídrico en este medio con ennegrecimiento a lo largo de la punción.

B.4.4.3.2.3 Retener todos los cultivos que muestren las reacciones características de *Salmonella* en los medios TSI y LIA para las pruebas adicionales, indicadas en B.4.4.3.3.

B.4.4.3.3 Los cultivos con TSI que no parecen de *Salmonella* pero que presentan reacciones en LIA típicos, deben trabajarse como cultivos presuntivos positivos, ya que en estos casos, el medio LIA permitirá detectar *S. arizonae* y cepas atípicas de *Salmonella* que utilicen lactosa o sacarosa. Descartar solamente los cultivos que muestren reacciones atípicas en ambos medios.

B.4.4.3.4 Continuar el análisis a partir de los tubos de TSI con reacciones típicas. Si el cultivo presenta reacciones atípicas en este medio, tomar colonias adicionales de las placas de donde se obtuvo el cultivo atípico anterior y sembrar las pruebas bioquímicas nuevamente.

B.4.4.3.5 Continuar la identificación bioquímica y serológica a partir de los cultivos recuperados de TSI. Se recomienda trabajar seis cultivos por cada 25 g de unidad analítica seleccionando colonias procedentes de ambos medios de enriquecimiento.

B.4.4.3.6 Prueba de ureasa

B.4.4.3.6.1 Prueba de ureasa (convencional). Con una asa estéril, tomar crecimiento del cultivo presumiblemente positivo de cada tubo de medio TSI e inocular tubos de caldo urea. Utilizar un control de medio para comparar el vire púrpura de las reacciones positivas con el color del medio original. Incubar 24 ± 2 h a 35°C .

B.4.4.3.6.2 Prueba de ureasa (rápida). Tomar dos asadas de crecimiento del cultivo presumiblemente positivo de cada tubo de medio TSI e inocular tubos de caldo urea (rápida). Incubar 2 h a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ en baño de agua.

Descartar todos los cultivos que den ureasa positiva. Retener los cultivos que den la prueba negativa (sin cambio de color del medio).

B.4.4.4 Identificación serológica

B.4.4.4.1 Ensayo de los antígenos somáticos de *Salmonella* (Antisuero polivalente O).

B.4.4.4.1.1 Colocar con una asa dos gotas separadas de solución salina estéril sobre un portaobjetos o en dos secciones de una placa para aglutinación. Suspender en cada una de las gotas, una porción del cultivo desarrollado en TSI.

B.4.4.4.1.2 Agregar a una de ellas una gota del antisuero polivalente somático (O) y mezclar con el canto del asa o empleando aplicadores de madera.

B.4.4.4.1.3 Agitar inclinando la lámina hacia atrás y hacia adelante durante aproximadamente un min. Observar bajo buena iluminación sobre un fondo oscuro.

B.4.4.4.1.4 Considerar cualquier grado de aglutinación como positiva.

La prueba positiva resulta cuando se presenta aglutinación en la gota con el cultivo y el antisuero y no aglutinación en la gota que contiene el cultivo y la solución salina.

Si se observa aglutinación en ambas gotas, la prueba no es definitiva y se debe continuar con las pruebas bioquímicas complementarias.

B.4.4.4.2 Cuando la aglutinación es positiva con el suero polivalente O, puede determinarse el subgrupo empleando antisueros para los diferentes subgrupos (los grupos B, C, D y E, suelen ser los más frecuentes).

B.4.4.4.2.1 Si la aglutinación con el antisuero O es negativa, utilizar antisuero Vi y efectuar la prueba. Si hay aglutinación con Vi calentar el cultivo a ebullición y repetir la aglutinación con el antisuero polivalente O.

B.4.4.4.2.2 Si no se cuenta con los sueros grupo-específicos, solicitar la tipificación de la cepa al Laboratorio de Enterobacterias del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia de la Secretaría de Salud o esta Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.

B.4.4.4.3 Si se requiere, practicar el ensayo de los antígenos flagelares de *Salmonella* (Antisuero polivalente H).

B.4.4.4.3.1 Inocular el crecimiento del tubo de TSI en agar infusión de cerebro corazón e incubar de 4 a 6 h a 35 °C hasta que se observe crecimiento (para ensayo en el mismo día), o bien, en caldo soya tripticaseína e incubar por 24 ± 2 h a 35°C (para ensayo al día siguiente). Adicionar 2,5 ml de solución salina formalizada a 5 ml del cultivo en caldo o al cultivo en agar cerebro corazón (BHI).

B.4.4.4.3.2 Colocar 0,5 ml del antisuero polivalente flagelar (H) preparado en un tubo para serología (13 x 100 mm aproximadamente). Adicionar 0,5 ml del cultivo formalizado. Preparar un control de solución salina mezclando 0,5 ml de solución salina formalizada con 0,5 ml del antígeno formalizado. Incubar las mezclas en baño de agua a 48-50°C. Observar a intervalos de 15 min por espacio de 1 h. Una prueba positiva es cuando se observa aglutinación en la mezcla de prueba pero no en el control. Debe interpretarse como negativa una prueba en la que ninguna de las mezclas muestre aglutinación. Cuando ambas mezclas se aglutinan, se considera la prueba inespecífica.

B.4.4.5 Pruebas bioquímicas complementarias

Cuando las pruebas serológicas o bioquímicas iniciales, dan resultados atípicos o no concluyentes, realizar las pruebas que se describen a continuación:

B.4.4.5.1 Inocular los cultivos positivos provenientes de TSI y LIA en: medio SIM, agar citrato de Simmons, caldo manitol y caldo RM-VP. Usar caldo malonato para confirmar la presencia de la especie *S. arizonae*.

B.4.4.5.2 Interpretar los cambios en los medios inoculados conforme con lo siguiente:

B.4.4.5.2.1 Agar citrato Simmons

Inocular por estría el tubo.

Incubar 96 ± 2 h a 35 ± 2°C.

- Prueba positiva: crecimiento acompañado de un cambio de color de verde a azul.
- Prueba negativa: ausencia de crecimiento y sin cambio de color.

B.4.4.5.2.2 Medio SIM

Inocular por punción.

Incubar 24 h a 35 ± 2°C.

Movilidad:

- Prueba positiva: crecimiento a lo largo de la punción y en el seno del medio de cultivo.
- Prueba negativa: crecimiento a lo largo de la punción exclusivamente.

Producción de ácido sulfhídrico:

- Prueba positiva: desarrollo de un color negro a lo largo de la punción que puede extenderse a todo el medio.
- Prueba negativa: ausencia de color negro.

Producción de indol:

Adicionar al tubo con medio SIM que presente crecimiento, de 0,2 a 0,3 ml de reactivo de Kovac.

- Prueba positiva: desarrollo de un anillo de color rojo.
- Prueba negativa: sin cambio de color.

B.4.4.5.2.3 Caldo RM-VP

Inocular un tubo con el medio.

Incubar 48 ± 2 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ para la prueba de VP y 96 h para la prueba RM.

B.4.4.5.2.3.1 Prueba de Voges-Proskauer (VP)

Transferir a un tubo un ml del cultivo de 48 h.

Adicionar 0,6 ml de solución de alfa naftol.

Adicionar 0,2 ml de solución de hidróxido de potasio 40%.

Adicionar algunos cristales de creatinina (opcional).

Interpretar los resultados después de incubar 2 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ o 4 h a temperatura ambiente:

- Prueba positiva: desarrollo de color rojo ladrillo.
- Prueba negativa: sin cambio de color.

Reincubar el resto del medio RM-VP 48 h más a $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

B.4.4.5.2.3.2 Prueba de rojo de metilo (RM)

Adicionar al medio de cultivo de 96 h de incubación de dos a tres gotas de solución de rojo de metilo.

Interpretar los resultados inmediatamente:

- Prueba positiva: desarrollo de color rojo.
- Prueba negativa: desarrollo de color amarillo.

B.4.4.5.2.4 Caldo malonato

Inocular un tubo conteniendo el medio.

Incubar 40 ± 2 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

- Prueba positiva: desarrollo de color azul.
- Prueba negativa: sin cambio de color.

B.4.4.5.2.5 Caldo manitol

Inocular un tubo conteniendo el medio.

Incubar 24 ± 2 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

- Prueba positiva: desarrollo de color amarillo.
- Prueba negativa: sin cambio de color.

B.4.4.5.3 Consultar los resultados obtenidos en el cuadro 2 para la identificación de los géneros de las bacterias investigadas.

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

B.4.5 Cálculo y expresión de resultados

B.4.5.1 Interpretación de reacciones bioquímicas y serológicas.

CUADRO 1

REACCIONES BIOQUIMICAS	REACCIONES SEROLOGICAS	INTERPRETACION
Típica	Antígeno O, Vi o H positivo	Cepas consideradas como <i>Salmonella</i>
Típica	Todas las reacciones negativas	
Típica	No probada	Puede ser <i>Salmonella</i>
Reacciones atípicas	Antígeno O, Vi o H positivo	
Reacciones atípicas	Todas las reacciones negativas	No debe ser considerada <i>Salmonella</i>

B.4.5.2 Reacciones bioquímicas y serológicas de *Salmonella***CUADRO 2**

PRUEBA O SUSTRATO	POSITIVO	NEGATIVO	REACCION
Glucosa (TSI)	amarillo	rojo	+
Lisina descarboxilasa(LIA)	púrpura	amarillo	+
H ₂ S (TSI y LIA)	negro	no negro	+
Ureasa	rojo-púrpura	no hay cambio de color	-
Caldo de lisina descarboxilasa	púrpura	amarillo	+
Caldo dulcitol rojo de fenol	³ amarillo o gas	no hay ³ cambio de color, ni gas	+ ^b
Caldo KCN	crecimiento	no hay crecimiento	-
Caldo malonato	azul	no hay cambio de color	-
Prueba de indol	superficie color violeta	superficie color amarillo	-
Prueba del antígeno flagelar	aglutinación	no hay aglutinación	+
Prueba del antígeno somático	aglutinación	no hay aglutinación	+
Caldo lactosa rojo fenol	amarillo o gas	no hay cambio de color, ni gas	-
Caldo sacarosa rojo fenol	amarillo o gas	no hay cambio de color, ni gas	-
Prueba Voges-Proskauer	de rosa a rojo	no hay cambio de color	-
Prueba rojo de metilo	rojo difuso	amarillo difuso	+
Citrato de Simmons	crecimiento color azul	no hay crecimiento no hay cambio de color	v

^a +, 90 % o más positivos en 1 ó 2 días; -, 90 % o más negativas en 1 ó 2 días; v, variable.

^b La mayoría de los cultivos *S. arizonae* son negativos.

^c La mayoría de los cultivos *S. arizonae* son positivos.

B.4.5.3 Informe de Resultados

Informar: presencia o ausencia de *Salmonella* en _____ g o _____ ml de muestra.

B.5 METODO PARA LA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA**B.5.1 Fundamento**

El fundamento de la técnica consiste en contar las colonias, que se desarrollan en el medio de elección después de un cierto tiempo y temperatura de incubación, presuponiendo que cada colonia proviene de un microorganismo de la muestra bajo estudio. El método admite numerosas fuentes de variación, algunas de ellas controlables, pero sujetas a la influencia de varios factores.

B.5.2 Reactivos y materiales**B.5.2.1 Reactivos**

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

Cuando se indique agua, debe entenderse agua destilada, con pH cercano a la neutralidad.

Medio de Cultivo.

Agar Tripton-Extracto de Levadura (agar para cuenta estándar)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Extracto de levadura	2,5 g
Triptona	5 g
Dextrosa	1 g
Agar	15 g
Agua	1 l

Preparación: Suspender los componentes del medio deshidratado en un litro de agua. Hervir hasta total disolución.

Distribuir en recipientes de vidrio esterilizables de capacidad no mayor de 500 ml, cantidades de aproximadamente la mitad del volumen del mismo. Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 15 min. El pH final del medio debe ser $7 \pm 0,2$ a 25°C .

Si el medio de cultivo es utilizado inmediatamente, enfriar a $45 \pm 1^\circ\text{C}$ en baño de agua y mantenerlo a esta temperatura hasta antes de su uso. El medio no debe fundirse más de una vez.

En caso de medios deshidratados seguir las instrucciones del fabricante.

El medio de cultivo anterior es el de uso más generalizado. Para algunos alimentos en particular se requerirá de un medio de cultivo especial que se debe indicar al describir la técnica para ese alimento.

B.5.2.2 Materiales

Todo el material que tenga contacto con las muestras o los microorganismos debe estar estéril.

Se requieren los materiales mencionados en B.1.2.2.

B.5.3 Aparatos e instrumentos

Se requiere, además de los mencionados en B.1.3, los siguientes:

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

Contador de colonias de campo obscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadrículada y lente amplificador.

Registrador mecánico o electrónico.

Microscopio óptico.

Baño de agua con o sin circulación mecánica, provista con termómetro calibrado con divisiones de hasta 1°C y que mantenga la temperatura a $45 \pm 1^\circ\text{C}$.

B.5.4 Preparación de la muestra

Para la preparación de la muestra, seguir el método señalado en B.1 PREPARACION Y DILUCION DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANALISIS MICROBIOLÓGICO.

B.5.5 Procedimiento

B.5.5.1 Distribuir las cajas estériles en la mesa de trabajo de manera que la inoculación; la adición de medio de cultivo y homogenización, se puedan realizar cómoda y libremente. Marcar las cajas en sus tapas con los datos pertinentes previamente a su inoculación y correr por duplicado.

B.5.5.2 Después de inocular las diluciones de las muestras preparadas según el método señalado en B.1 PREPARACION Y DILUCION DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANALISIS MICROBIOLÓGICO, en las cajas Petri agregar de 12 a 15 ml del medio preparado, mezclarlo mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio; cuidar que el medio no moje la cubierta de las cajas. Dejar solidificar.

B.5.5.3 Incluir una caja sin inóculo por cada lote de medio y diluyente preparado como testigo de esterilidad.

B.5.5.4 El tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra se incorpora al diluyente hasta que finalmente se adiciona el medio de cultivo a las cajas, no debe exceder de 20 min.

B.5.5.5 Incubar las cajas en posición invertida (la tapa hacia abajo) por el tiempo y la temperatura que se requieran, según el tipo de alimento y microorganismo de que se trate, véase el Cuadro 1.

CUADRO 1

Grupo Bacteriano	Temperatura	Tiempo de Incubación
Termofílicos aerobios	$55 \pm 2^\circ\text{C}$	48 ± 2 h
Mesofílicos aerobios*	$35 \pm 2^\circ\text{C}$	48 ± 2 h
Psicrotróficos	$20 \pm 2^\circ\text{C}$	3 - 5 días
Psicrofílicos	$5 \pm 2^\circ\text{C}$	7 - 10 días

* En el análisis de agua potable y agua purificada se debe incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 h.

B.5.5.6 En la lectura seleccionar aquellas placas donde aparezcan entre 25 a 250 UFC, para disminuir el error en la cuenta.

B.5.5.7 Contar todas las colonias desarrolladas en las placas seleccionadas (excepto las de mohos y levaduras), incluyendo las colonias puntiformes. Hacer uso del microscopio para resolver los casos en los que no se pueden distinguir las colonias de las pequeñas partículas de alimento.

B.5.6 Expresión de resultados

B.5.6.1 Cálculo del método

B.5.6.1.1 Después de la incubación, contar las placas que se encuentren en el intervalo de 25 a 250 colonias, usando el contador de colonias y el registrador. Las placas de al menos una de tres diluciones deben estar en el intervalo de 25 a 250. Cuando sólo una dilución está en el intervalo apropiado, véase el Cuadro 2, ejemplo 1. Calcular la cuenta promedio por gramo o mililitro de dicha dilución y reportar.

B.5.6.1.2 Cuando dos diluciones están en el intervalo apropiado, determinar la cuenta promedio dada por cada dilución antes de promediar la cuenta de las dos diluciones para obtener la cuenta en placa por gramo o mililitro, véase el Cuadro 2, ejemplo 2.

B.5.6.1.3 Con el fin de uniformar los criterios para el reporte de las cuentas en ensayos donde las placas presenten situaciones no contempladas en los ejemplos anteriores, se presentan las siguientes guías:

B.5.6.1.3.1 Placas con menos de 25 colonias.- Cuando las placas corridas para la menor dilución muestran cuentas de menos de 25 colonias, contar el número de colonias presentes en dicha dilución, promediar el número de colonias y multiplicar por el factor de dilución para obtener el valor estimado de cuenta en placa.

Aclarar en su informe esta situación agregando la leyenda "valor estimado", véase el Cuadro 2, ejemplo 3.

B.5.6.1.3.2 Placas con más de 250 colonias.- Cuando el número de colonias por placa exceda de 250, contar las colonias en aquellas porciones de la placa que sean representativas de la distribución de colonias. Contar por ejemplo, una cuarta parte o una mitad del área de la caja y multiplicar el valor obtenido por 4 ó 2, respectivamente. Si solamente pueden contarse algunos cuadros, considerar que el fondo de una caja Petri de 100 mm de diámetro contiene 65 cuadros de la cuadrícula del contador. Aclarar en el informe esta situación agregando la leyenda "valor estimado", véase el Cuadro 2, ejemplo 4.

B.5.6.1.3.3 Colonias extendidas.- Las colonias extendidas pueden presentarse en las siguientes formas:

B.5.6.1.3.3.1 Cadenas de colonias no separadas claramente entre sí, que parecen ser causadas por la desintegración de un cúmulo de bacterias.

B.5.6.1.3.3.2 Colonias que se desarrollan en película entre el agar y el fondo de la caja.

B.5.6.1.3.3.3 Colonias que se desarrollan en película en la orilla de la caja sobre la superficie del agar.

B.5.6.1.3.3.4 Colonias de crecimiento extendido y en algunas ocasiones acompañadas de inhibición del crecimiento, que en conjunto exceden el 50% de la caja o represión del crecimiento que por sí mismo excede el 25% de la superficie de la caja.

B.5.6.1.3.5 Cuando es necesario contar en cajas que contienen colonias extendidas que no están incluidas en B.5.6.1.3.3.4, contar cualquiera de los tipos B.5.6.1.3.3.1, B.5.6.1.3.3.2 o B.5.6.1.3.3.3, como provenientes de una sola fuente. En el caso de las colonias del tipo B.5.6.1.3.3.1, si la caja contiene una sola cadena, contar como una sola colonia, si la caja contiene varias cadenas que parecen originarse de fuentes separadas, contar cada cadena como colonia individual. No contar cada colonia de la cadena individualmente. Las colonias del tipo B.5.6.1.3.3.2 y B.5.6.1.3.3.3 generalmente se observan como crecimiento diferenciable de otras colonias y se cuentan como tales. Los crecimientos tipo B.5.6.1.3.3.4, reportarlos como crecimiento extendido. En caso de que una dilución se encuentre dentro del rango y otra dilución presente colonias de crecimiento extendido, reportar la dilución en la que se pueden contar las colonias, véase el Cuadro 2, ejemplo 5.

B.5.6.1.4 Placas sin colonias.- Cuando las placas de todas las diluciones no muestran colonias, reportar la cuenta en placa como menor que una vez el valor de la dilución más baja usada, véase el Cuadro 2, ejemplo 6.

B.5.6.1.5 Placas corridas por duplicado, una con crecimiento dentro del intervalo adecuado y otra con más de 250 colonias.- Cuando una placa tiene entre 25 y 250 colonias y su duplicado más de 250 colonias, contar ambas placas incluyendo la que está fuera del intervalo para determinar la cuenta en placa, véase el Cuadro 2, ejemplo 7.

B.5.6.1.6 Placas corridas por duplicado, una placa de cada dilución dentro del intervalo de 25 a 250 colonias.-

Cuando una placa dentro de diferentes diluciones contiene el número de colonias especificadas en el intervalo, contar el número de colonias de las cuatro placas para calcular la cuenta en placa, véase el Cuadro 2, ejemplo 8.

B.5.6.1.7 Placas corridas por duplicado, ambas placas de una dilución dentro del intervalo de 25 a 250 y sólo una de la otra dilución dentro del mismo. Contar las cuatro cajas incluyendo aquélla con menos de 25 o más de 250 colonias, para calcular la cuenta en placa, véase el Cuadro 2, ejemplo 9.

B.5.6.1.8 Después de contabilizar las colonias en las placas seleccionadas, multiplicar por la inversa de la dilución para obtener el número de UFC por mililitro o gramo de la muestra. Redondear la cifra obtenida en la cuenta de manera que sólo aparezcan dos dígitos significativos al inicio de esta cifra. Para redondear, elevar el segundo dígito al número inmediato superior cuando el tercer dígito de la derecha sea cinco o mayor (por ejemplo: 128 redondear a 130). Si el tercer dígito es cuatro o menos, reemplazar el tercer dígito con cero y el segundo dígito mantenerlo igual (Por ejemplo: 2417 a 2400):

B.5.7 Informe de la prueba

Reportar como: Unidades formadoras de colonias, ___ UFC/g o ml, de bacterias aerobias en placa en agar triptona extracto de levadura o agar para cuenta estándar, incubadas _____ horas a _____ °C.

CUADRO 2

Cálculo de los valores de la cuenta en placa (Ensayos por duplicado)				
Ejemplo número	Colonias contadas			UFC/g o ml
	1: 100	1: 1000	1: 10000	
1	> 250a	178	16	180000
	> 250	190	17	
2	> 250	220	25	250000
		238	28	
3	18	2	0	1600b
	14	0	0	
4	> 250	> 250	512	500000b
5	> 250	> 250	495	290000
	> 250	240	34	
	> 250	235	crecimiento extendido	
6	0	0	0	< 100c
7	> 250	240	24	250000
	> 250	268	19	
8	> 250	216	23	280000
	> 250	262	42	
9	> 250	215	20	230000
	> 250	235	26	
	> 250	275	32	270000
	> 250	225	26	

a Cuenta por arriba de 250 colonias.

b Debe aclararse "valor estimado" por encontrarse los valores fuera del intervalo de 25 a 250.

c Debe informarse de acuerdo con la menor dilución ensayada y contada, en este caso 1:100.

B.6 DETERMINACION DE LA ESTIMACION DE LA DENSIDAD MICROBIANA POR LA TECNICA DEL NUMERO MAS PROBABLE. DETERMINACION DE BACTERIAS COLIFORMES, COLIFORMES FECALES Y *Escherichia coli* POR LA TECNICA DE DILUCIONES EN TUBO MULTIPLE

Este método es aplicable a cualquier grupo bacteriano de interés sanitario, especialmente en productos que se encuentran en bajas concentraciones de microorganismos (10 por g o ml). Ejemplo: Leche, agua, alimentos; que por su consistencia pueden interferir con la exactitud de la cuenta de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

B.6.1 Fundamento

Se basa en la dilución de la muestra en tubos múltiples, de tal forma que todos los tubos de la menor dilución sean positivos y todos los tubos de la dilución más alta sean negativos. El resultado positivo se demuestra por la presencia de gas o crecimiento microbiano.

Para obtener el Número Más Probable (NMP) en los resultados se aplica la teoría de la probabilidad, lo cual tiene como condición lo siguiente:

- Una distribución aleatoria de las bacterias que existen en la muestra.
- Las bacterias se encuentran como entidades no agrupadas.
- Los microorganismos presentes en la muestra crecerán en el medio, cuando son incubados y se mantengan en las condiciones adecuadas para su desarrollo.

Si se espera una cuenta microbiana alta, la muestra deberá diluirse para dar cumplimiento a las condiciones. La forma más común de realizar esta prueba es mediante diluciones decimales y usando un inóculo en series de 3, 5 o 10 tubos en serie. A medida que el número de tubos inoculados para cada dilución aumentan se reducen los límites de confianza.

B.6.2 Equipo, materiales y reactivos.

No aplica.

B.6.3 Procedimientos

B.6.3.1 Uso de tablas de NMP con 95% de límite de confianza

Las tablas 1-3 presentan la estimación estadística de los valores del NMP que corresponden al 95% de límite de confianza cuando se utilizan 3, 5 y 10 tubos. Otras combinaciones de resultados positivos y negativos no encontrados en estas tablas, tienen muy baja probabilidad de que se presenten. Si los resultados no están incluidos en las tablas, se deberá repetir la prueba a partir de la muestra original. Si no es posible, el NMP se puede obtener (para las combinaciones de 3 y 5 tubos) de las tablas 4 y 5; también se puede aplicar una ecuación (véase punto B.2) para obtener el NMP aproximado.

El intervalo del 95% de confianza se interpreta como sigue: si el analista supone que el número real de microorganismos cae dentro de los límites, entonces se asume que será correcto el 95% de las veces. El valor del NMP tabulado representa un intervalo y no un valor absoluto.

Cuando se preparan más de 3 diluciones de una muestra, el NMP deberá determinarse a partir de tres diluciones consecutivas (usando tablas 1-3). Primero, para todas las diluciones que tengan todos los tubos positivos, seleccionar la dilución mayor. Después usar las 2 siguientes diluciones mayores (A y B en las tablas 6 y 7). Cuando en ninguna de las diluciones probadas hubiera crecimiento en todos los tubos, seleccionar (si es posible) las primeras tres diluciones consecutivas (volumen de muestra) para que la dilución media contenga resultados positivos (C de tablas 6 y 7).

Con frecuencia es necesario el NMP desde el inicio con volúmenes diferentes de los enlistados en las tablas 1-5. Si el volumen de muestra es mayor que 0,01 g multiplicar el NMP enlistado en la tabla por 10. El resultado de una determinación de 5 tubos que dé 3 tubos positivos en 0,01 g; 2 tubos positivos en 0,001 g y 1 tubo positivo en 0,0001 g (3-2-1) leer en la tabla No. 2 como 17 y multiplicar por 10 para así obtener 170 como el NMP actual por gramo de muestra. De igual forma si la cantidad más grande utilizada para la tabla de referencia es 1 g en lugar de 0,1 g, dividir el NMP derivado de la tabla entre 10. Por ejemplo el resultado de la determinación del NMP en 3 tubos para *Salmonella* spp que dé 3 tubos positivos en 1 g; 1 tubo positivo en 0,1 g y ningún positivo en 0,01 g (3-1-0) leer en la tabla No. 1 como 43 y dividir entre 10, lo que da 4,3 como el NMP presuntivo por gramo de muestra.

Un método alternativo para obtener el número más probable es usando la siguiente fórmula:

$$NMP / g = (NMP/g \text{ de la tabla} - 100) \times \text{factor de dilución del tubo de en medio}$$

Para calcular el NMP/100 g multiplicar por 100.

B.6.3.2 Cálculo aproximado del NMP y 95% de límite de confianza

Debido a la inherente complejidad para calcular los límites de confianza del NMP lo más común es el uso de tablas. Generalmente estas tablas están limitadas al uso de 3, 5 y 10 tubos por dilución, incluso usando un método aceptado, pueden presentarse datos irregulares o accidentes de laboratorio que causan pérdida de 1 o más tubos de dilución. En este caso una serie de diluciones de por ejemplo: 5,4,4 puede dar una lectura de 5-2-0. Para estos casos se puede aplicar una fórmula sencilla, la cual no corresponde exactamente con los resultados obtenidos teóricamente; sin embargo, las desviaciones generalmente son pequeñas, esta fórmula no debe ser aplicada para fines de regulación. La fórmula no restringe el número de tubos o las diluciones y puede aplicarse para todo tipo de pruebas. El cálculo aproximado está dado por la siguiente ecuación:

$$NMP / g = \frac{P}{(N \times T)^{1/2}}$$

En donde:

P = número de tubos positivos

N = cantidad total de muestra (g) en todos los tubos negativos

T = cantidad total de muestra (g) en todos los tubos.

Por ejemplo, considerando que se tuvieron serie de diluciones al doble:

MUESTRA (G)	No. DE TUBOS	No. DE TUBOS POSITIVOS
8	5	5
4	5	4
2	5	2
1	5	0
0,5	5	1
0,25	5	0

El número de tubos positivos es:

$$P = (5 + 4 + 2 + 1) = 12$$

$$N = (8 \times 0) + (4 \times 1) + (2 \times 3) + (1 \times 5) + (0,5 \times 4) + (0,25 \times 5) = 18,25$$

$$T = 5 \times (8 + 4 + 2 + 1 + 0,5 + 0,25) = 78,75$$

$$NMP / g = \frac{12}{(18,25 \times 78,75)^{1/2}} = 0,32 / g \text{ o } 32 / 100 g$$

Los límites de confianza del 95% estimados, pueden obtenerse del antilogaritmo de base 10 con la siguiente ecuación:

$$\text{Límite de confianza del 95\% estimado} = \log NMP / g \pm 1,08 \times \left(\frac{\log a}{n} \right)^{1/2}$$

En donde:

a = radio de dilución

n = n es el número de tubos por dilución. Esta expresión asume que el radio de dilución es diferente de 1:10 (por ejemplo 1:2). Para diluciones de 1:10, la cantidad por restar o sumar deberá ser de $1,14(n)^{1/2}$ para la mejor estimación. Si el número de tubos por dilución (n_i) es desigual (por ejemplo: un accidente de laboratorio) para la dilución k reemplazar n por la expresión n_H (media armónica) por el número de tubos por dilución (n_i).

La media armónica se define como:

$$n_H = \frac{k}{\frac{1}{n_i}}$$

En donde:

k = número de diluciones. Por ejemplo: Suponiendo que el resultado de 3 diluciones en n_i fuera 5-4-4.

Por lo tanto:

$$n_H = \frac{3}{\frac{1}{5} + \frac{1}{4} + \frac{1}{4}} = 4,3,$$

Para el ejemplo anterior el NMP con $n = 5$ y un límite de confianza aproximado de 95% será el siguiente:

$$\text{Límite de confianza del 95\% estimado} = \log 0.32/\text{g} \pm 1.08 \times \left(\frac{\log 2}{5}\right)^{1/2} = -0,495 \pm 0,265$$

Entonces el límite inferior es el antilogaritmo (-0,76) = 0,17/g o 17/100 g y el límite superior es el antilogaritmo (-0,23) = 0,59/g o 59/100 g. Cuando se compara con las tablas el NMP podría ser 0,31/g con límites de confianza de 0,16/g y 0,57/g.

Tabla No. 1

Selección del NMP con un límite de confianza de 95% para la prueba de fermentación utilizando 3 tubos: con porciones de 0,1, 0,01 y 0,001 g (ml) de muestra

No. de tubos positivos			NMP/g (ml) ^a	95% de límite de confianza		No. de tubos positivos			NMP/g (ml) ^a	95% de límite de confianza	
0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior	0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior
0	0	0	<3,0	-	9,5	2	2	0	21	4,5	42
0	0	1	3,0	0,15	9,6	2	2	1	28	8,7	94
0	1	0	3,0	0,15	11	2	2	2	35	8,7	94
0	1	1	6,1	1,2	18	2	3	0	29	8,7	94
0	2	0	6,2	1,2	18	2	3	1	36	8,7	94
0	3	0	9,4	3,6	38	3	0	0	23	4,6	94
1	0	0	3,6	0,17	18	3	0	1	38	8,7	110
1	0	1	7,2	1,3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3,6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7,4	1,3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3,6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3,6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4,5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4,5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9,2	1,4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3,6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4,5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3,7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4,5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8,7	94	3	3	3	>1100	420	-

^a Multiplicar todos los valores de NMP/g (ml) por 100 para expresarlos como NMP/100 g (ml),

Tabla No. 2

Selección del NMP con un límite de confianza de 95% para la prueba de fermentación utilizando 5 tubos: con porciones de 0,1, 0,01 y 0,001 g (ml) de muestra^a

No. de tubos positivos			NMP/g (ml) ^a	95% de límite de confianza		No. de tubos positivos			NMP/g (ml) ^a	95% de límite de confianza	
0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior	0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior
0	0	0	<1,8	–	6,8	4	0	2	21	6,8	40
0	0	1	1,8	0,09	6,8	4	0	3	25	9,8	70
0	1	0	1,8	0,09	6,9	4	1	0	17	6	40
0	1	1	3,6	0,7	10	4	1	1	21	6,8	42
0	2	0	3,7	0,7	10	4	1	2	26	9,8	70
0	2	1	5,5	1,8	15	4	1	3	31	10	70
0	3	0	5,6	1,8	15	4	2	0	22	6,8	50
1	0	0	2	0,1	10	4	2	1	26	9,8	70
1	0	1	4	0,7	10	4	2	2	32	10	70
1	0	2	6	1,8	15	4	2	3	38	14	100
1	1	0	4	0,7	12	4	3	0	27	9,9	70
1	1	1	6,1	1,8	15	4	3	1	33	10	70
1	1	2	8,1	3,4	22	4	3	2	39	14	100
1	2	0	6,1	1,8	15	4	4	0	34	14	100
1	2	1	8,2	3,4	22	4	4	1	40	14	100
1	3	0	8,3	3,4	22	4	4	2	47	15	120
1	3	1	10	3,5	22	4	5	0	41	14	100
1	4	0	11	3,5	22	4	5	1	48	15	120
2	0	0	4,5	0,79	15	5	0	0	23	6,8	70
2	0	1	6,8	1,8	15	5	0	1	31	10	70
2	0	2	9,1	3,4	22	5	0	2	43	14	100
2	1	0	6,8	1,8	17	5	0	3	58	22	150
2	1	1	9,2	3,4	22	5	1	0	33	10	100
2	1	2	12	4,1	26	5	1	1	46	14	120
2	2	0	9,3	3,4	22	5	1	2	63	22	150
2	2	1	12	4,1	26	5	1	3	84	34	220
2	2	2	14	5,9	36	5	2	0	49	15	150
2	3	0	12	4,1	26	5	2	1	70	22	170
2	3	1	14	5,9	36	5	2	2	94	34	230
2	4	0	15	5,9	36	5	2	3	120	36	250
3	0	0	7,8	2,1	22	5	2	4	150	58	400
3	0	1	11	3,5	23	5	3	0	79	22	220
3	0	2	13	5,6	35	5	3	1	110	34	250
3	1	0	11	3,5	26	5	3	2	140	52	400
3	1	1	14	5,6	36	5	3	3	180	70	400
3	1	2	17	6	36	5	3	4	210	70	400
3	2	0	14	5,7	36	5	4	0	130	36	400
3	2	1	17	6,8	40	5	4	1	170	58	400
3	2	2	20	6,8	40	5	4	2	220	70	440
3	3	0	17	6,8	40	5	4	3	280	100	710
3	3	1	21	6,8	40	5	4	4	350	100	710
3	3	2	24	9,8	70	5	4	5	430	150	1,100
3	4	0	21	6,8	40	5	5	0	240	70	710
3	4	1	24	9,8	70	5	5	1	350	100	1100
3	5	0	25	9,8	70	5	5	2	540	150	1700
4	0	0	13	4,1	35	5	5	3	920	220	2600
4	0	1	17	5,9	36	5	5	4	1600	400	4600
						5	5	5	>1600	700	–

^a Multiplicar todos los valores de NMP/g (ml) por 100 para expresarlos como NMP/100 g (ml),

Tabla No. 3

Selección del NMP con un límite de confianza de 95% para la prueba de fermentación utilizando 10 tubos: con porciones de 0,1, 0,01 y 0,001 g (ml) de muestra^a

No. de tubos positivos			NMP/g (ml) ^a	95% de límite de confianza		No. de tubos positivos			NMP/g (ml) ^a	95% de límite de confianza	
0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior	0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior
0	0	0	<,90	–	3,1	8	2	0	17	7,7	34
0	0	1	0,9	0,04	3,1	8	2	1	19	9	34
0	0	2	1,8	0,33	5,1	8	2	2	21	10	39
0	1	0	0,9	0,04	3,6	8	2	3	23	11	44
0	1	1	1,8	0,33	5,1	8	3	0	19	9	34
0	2	0	1,8	0,33	5,1	8	3	1	21	10	39
0	2	1	2,7	0,8	7,2	8	3	2	24	11	44
0	3	0	2,7	0,8	7,2	8	3	3	26	12	50
1	0	0	0,94	0,05	5,1	8	4	0	22	10	39
1	0	1	1,9	0,33	5,1	8	4	1	24	11	44
1	0	2	2,8	0,8	7,2	8	4	2	26	12	50
1	1	0	1,9	0,33	5,7	8	4	3	29	14	58
1	1	1	2,9	0,8	7,2	8	5	0	24	11	44
1	1	2	3,8	1,4	9	8	5	1	27	12	50
1	2	0	2,9	0,8	7,2	8	5	2	29	14	58
1	2	1	3,8	1,4	9	8	5	3	32	15	62
1	3	0	3,8	1,4	9	8	6	0	27	12	50
1	3	1	4,8	2,1	11	8	6	1	30	14	58
1	4	0	4,8	2,1	11	8	6	2	33	15	62
2	0	0	2	0,37	7,2	8	7	0	30	14	58
2	0	1	3	0,81	7,3	8	7	1	33	17	73
2	0	2	4	1,4	9	8	7	2	36	17	74
2	1	0	3	0,82	7,8	8	8	0	34	17	73
2	1	1	4	1,4	9	8	8	1	37	17	74
2	1	2	5	2,1	11	9	0	0	17	7,5	31
2	2	0	4	1,4	9,1	9	0	1	19	9	34
2	2	1	5	2,1	11	9	0	2	22	10	39
2	2	2	6,1	3	14	9	0	3	24	11	44
2	3	0	5,1	2,1	11	9	1	0	19	9	39
2	3	1	6,1	3	14	9	1	1	22	10	40
2	4	0	6,1	3	14	9	1	2	25	11	44
2	4	1	7,2	3,1	15	9	1	3	28	14	58
2	5	0	7,2	3,1	15	9	1	4	31	14	58

3	0	0	3,2	0,9	9	9	2	0	22	10	44
3	0	1	4,2	1,4	9,1	9	2	1	25	11	46
3	0	2	5,3	2,1	11	9	2	2	28	14	58
3	1	0	4,2	1,4	10	9	2	3	32	14	58
3	1	1	5,3	2,1	11	9	2	4	35	17	73
3	1	2	6,4	3	14	9	3	0	25	12	50
3	2	0	5,3	2,1	12	9	3	1	29	14	58
3	2	1	6,4	3	14	9	3	2	32	15	62
3	2	2	7,5	3,1	15	9	3	3	36	17	74
3	3	0	6,5	3	14	9	3	4	40	20	91
3	3	1	7,6	3,1	15	9	4	0	29	14	58
3	3	2	8,7	3,6	17	9	4	1	33	15	62
3	4	0	7,6	3,1	15	9	4	2	37	17	74
3	4	1	8,7	3,6	17	9	4	3	41	20	91
3	5	0	8,8	3,6	17	9	4	4	45	20	91
4	0	0	4,5	1,6	11	9	5	0	33	17	73
4	0	1	5,6	2,2	12	9	5	1	37	17	74
4	0	2	6,8	3	14	9	5	2	42	20	91
4	1	0	5,6	2,2	12	9	5	3	46	20	91
4	1	1	6,8	3	14	9	5	4	51	25	120
4	1	2	8	3,6	17	9	6	0	38	17	74
4	2	0	6,8	3	15	9	6	1	43	20	91
4	2	1	8	3,6	17	9	6	2	47	21	100
4	2	2	9,2	3,7	17	9	6	3	53	25	120
4	3	0	8,1	3,6	17	9	7	0	44	20	91
4	3	1	9,3	4,5	18	9	7	1	49	21	100
4	3	2	10	5	20	9	7	2	54	25	120
4	4	0	9,3	4,5	18	9	7	3	60	26	120
4	4	1	11	5	20	9	8	0	50	25	120
4	5	0	11	5	20	9	8	1	55	25	120
4	5	1	12	5,6	22	9	8	2	61	26	120
4	6	0	12	5,6	22	9	8	3	68	30	140
5	0	0	6	2,5	14	9	9	0	57	25	120
5	0	1	7,2	3,1	15	9	9	1	63	30	140
5	0	2	8,5	3,6	17	9	9	2	70	30	140
5	0	3	9,8	4,5	18	10	0	0	23	11	44
5	1	0	7,3	3,1	15	10	0	1	27	12	50
5	1	1	8,5	3,6	17	10	0	2	31	14	58

5	1	2	9,8	4,5	18	10	0	3	37	17	73
5	1	3	11	5	21	10	1	0	27	12	57
5	2	0	8,6	3,6	17	10	1	1	32	14	61
5	2	1	9,9	4,5	18	10	1	2	38	17	74
5	2	2	11	5	21	10	1	3	44	20	91
5	3	0	10	4,5	18	10	1	4	52	25	120
5	3	1	11	5	21	10	2	0	33	15	73
5	3	2	13	5,6	23	10	2	1	39	17	79
5	4	0	11	5	21	10	2	2	46	20	91
5	4	1	13	5,6	23	10	2	3	54	25	120
5	4	2	14	7	26	10	2	4	63	30	140
5	5	0	13	6,3	25	10	3	0	40	17	91
5	5	1	14	7	26	10	3	1	47	20	100
5	6	0	14	7	26	10	3	2	56	25	120
6	0	0	7,8	3,1	17	10	3	3	66	30	140
6	0	1	9,2	3,6	17	10	3	4	77	34	150
6	0	2	11	5	20	10	3	5	89	39	180
6	0	3	12	5,6	22	10	4	0	49	21	120
6	1	0	9,2	3,7	18	10	4	1	59	25	120
6	1	1	11	5	21	10	4	2	70	30	150
6	1	2	12	5,6	22	10	4	3	82	38	180
6	1	3	14	7	26	10	4	4	94	44	180
6	2	0	11	5	21	10	4	5	110	50	210
6	2	1	12	5,6	22	10	5	0	62	26	140
6	2	2	14	7	26	10	5	1	74	30	150
6	2	3	15	7,4	30	10	5	2	87	38	180
6	3	0	12	5,6	23	10	5	3	100	44	180
6	3	1	14	7	26	10	5	4	110	50	210
6	3	2	15	7,4	30	10	5	5	130	57	220
6	4	0	14	7	26	10	5	6	140	70	280
6	4	1	15	7,4	30	10	6	0	79	34	180
6	4	2	17	9	34	10	6	1	94	39	180
6	5	0	16	7,4	30	10	6	2	110	50	210
6	5	1	17	9	34	10	6	3	120	57	220
6	5	2	19	9	34	10	6	4	140	70	280
6	6	0	17	9	34	10	6	5	160	74	280
6	6	1	19	9	34	10	6	6	180	91	350
6	7	0	19	9	34	10	7	0	100	44	210

7	0	0	10	4,5	20	10	7	1	120	50	220
7	0	1	12	5	21	10	7	2	140	61	280
7	0	2	13	6,3	25	10	7	3	150	73	280
7	0	3	15	7,2	28	10	7	4	170	91	350
7	1	0	12	5	22	10	7	5	190	91	350
7	1	1	13	6,3	25	10	7	6	220	100	380
7	1	2	15	7,2	28	10	7	7	240	110	480
7	1	3	17	7,7	31	10	8	0	130	60	250
7	2	0	13	6,4	26	10	8	1	150	70	280
7	2	1	15	7,2	28	10	8	2	170	80	350
7	2	2	17	7,7	31	10	8	3	200	90	350
7	2	3	19	9	34	10	8	4	220	100	380
7	3	0	15	7,2	30	10	8	5	250	120	480
7	3	1	17	9	34	10	8	6	280	120	480
7	3	2	19	9	34	10	8	7	310	150	620
7	3	3	21	10	39	10	8	8	350	150	620
7	4	0	17	9	34	10	9	0	170	74	310
7	4	1	19	9	34	10	9	1	200	91	380
7	4	2	21	10	39	10	9	2	230	100	480
7	4	3	23	11	44	10	9	3	260	120	480
7	5	0	19	9	34	10	9	4	300	140	620
7	5	1	21	10	39	10	9	5	350	150	630
7	5	2	23	11	44	10	9	6	400	180	820
7	6	0	21	10	39	10	9	7	460	210	970
7	6	1	23	11	44	10	9	8	530	210	970
7	6	2	25	12	46	10	9	9	610	280	1300
7	7	0	23	11	44	10	10	0	240	110	480
7	7	1	26	12	50	10	10	1	290	120	620
8	0	0	13	5,6	25	10	10	2	350	150	820
8	0	1	15	7	26	10	10	3	430	180	970
8	0	2	17	7,5	30	10	10	4	540	210	1300
8	0	3	19	9	34	10	10	5	700	280	1500
8	1	0	15	7,1	28	10	10	6	920	350	1900
8	1	1	17	7,7	31	10	10	7	1200	480	2400
8	1	2	19	9	34	10	10	8	1600	620	3400
8	1	3	21	10	39	10	10	9	2300	810	5300
						10	10	10	>2300	1300	-

^a Multiplicar todos los valores de NMP/g (ml) por 100 para expresarlos como NMP/100 g (ml),

Tabla No. 4

Número más probable (NMP) para 1 g de muestra cuando se usan 3 tubos con porciones de 0,1, 0,01 y 0,001 g (ml)

Tubos Positivos				Tubos Positivos				Tubos Positivos				Tubos Positivos			
0,1	0,01	0,001	NMP	0,1	0,01	0,001	NMP	0,1	0,01	0,001	NMP	0,1	0,01	0,001	NMP
0	0	0	3	1	0	0	3,6	2	0	0	9,1	3	0	0	23
0	0	1	3	1	0	1	7,2	2	0	1	14	3	0	1	39
0	0	2	6	1	0	2	11	2	0	2	20	3	0	2	64
0	0	3	9	1	0	3	15	2	0	3	26	3	0	3	95
0	1	0	3	1	1	0	7,3	2	1	0	15	3	1	0	43
0	1	1	6,1	1	1	1	11	2	1	1	20	3	1	1	75
0	1	2	9,2	1	1	2	15	2	1	2	27	3	1	2	120
0	1	3	12	1	1	3	19	2	1	3	34	3	1	3	160
0	2	0	6,2	1	2	0	11	2	2	0	21	3	2	0	93
0	2	1	9,3	1	2	1	15	2	2	1	28	3	2	1	150
0	2	2	12	1	2	2	20	2	2	2	35	3	2	2	210
0	2	3	16	1	2	3	24	2	2	3	42	3	2	3	290
0	3	0	9,4	1	3	0	16	2	3	0	29	3	3	0	240
0	3	1	13	1	3	1	20	2	3	1	36	3	3	1	460
0	3	2	16	1	3	2	24	2	3	2	44	3	3	2	1100
0	3	3	19	1	3	3	29	2	3	3	53	3	3	3	>1100

Tabla No. 5

Número más probable (NMP) para 100 ml de muestra cuando se usan 5 porciones en cada una de 3 diluciones con series geométricas

No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos							
10	1	0,1		10	1	0,1		10	1	0,1		10	1	0,1		10	1	0,1					
ml	ml	ml	NMP	ml	ml	ml	NMP	ml	ml	ml	NMP	ml	ml	ml	NMP	ml	ml	ml	NMP				
0	0	0		1	0	0	2	2	0	0	4,5	3	0	0	7,8	4	0	0	13	5	0	0	23
0	0	1	1,8	1	0	1	4	2	0	1	6,8	3	0	1	11	4	0	1	17	5	0	1	31
0	0	2	3,6	1	0	2	6	2	0	2	9,1	3	0	2	13	4	0	2	21	5	0	2	43
0	0	3	5,4	1	0	3	8	2	0	3	12	3	0	3	16	4	0	3	25	5	0	3	58
0	0	4	7,2	1	0	4	10	2	0	4	14	3	0	4	20	4	0	4	30	5	0	4	76
0	0	5	9,0	1	0	5	12	2	0	5	16	3	0	5	23	4	0	5	36	5	0	5	95
0	1	0	1,8	1	1	0	4	2	1	0	6,8	3	1	0	11	4	1	0	17	5	1	0	33
0	1	1	3,6	1	1	1	6,1	2	1	1	9,2	3	1	1	14	4	1	1	21	5	1	1	46
0	1	2	5,5	1	1	2	8,1	2	1	2	12	3	1	2	17	4	1	2	26	5	1	2	64
0	1	3	7,3	1	1	3	10	2	1	3	14	3	1	3	20	4	1	3	31	5	1	3	84

0	1	4	9,1	1	1	4	12	2	1	4	17	3	1	4	23	4	1	4	35	5	1	4	110
0	1	5	11	1	1	5	14	2	1	5	19	3	1	5	27	4	1	5	42	5	1	5	130
0	2	0	3,7	1	2	0	6,1	2	2	0	9,3	3	2	0	14	4	2	0	22	5	2	0	49
0	2	1	5,5	1	2	1	8,2	2	2	1	12	3	2	1	17	4	2	1	26	5	2	1	70
0	2	2	7,4	1	2	2	10	2	2	2	14	3	2	2	20	4	2	2	32	5	2	2	95
0	2	3	9,2	1	2	3	12	2	2	3	17	3	2	3	24	4	2	3	38	5	2	3	120
0	2	4	11	1	2	4	15	2	2	4	19	3	2	4	27	4	2	4	44	5	2	4	150
0	2	5	13	1	2	5	17	2	2	5	22	3	2	5	31	4	2	5	50	5	2	5	180
0	3	0	5,6	1	3	0	8,3	2	3	0	12	3	3	0	17	4	3	0	27	5	3	0	79
0	3	1	7,4	1	3	1	10	2	3	1	14	3	3	1	21	4	3	1	33	5	3	1	110
0	3	2	9,3	1	3	2	13	2	3	2	17	3	3	2	24	4	3	2	39	5	3	2	140
0	3	3	11	1	3	3	15	2	3	3	20	3	3	3	28	4	3	3	45	5	3	3	180
0	3	4	13	1	3	4	17	2	3	4	22	3	3	4	31	4	3	4	52	5	3	4	210
0	3	5	15	1	3	5	19	2	3	5	25	3	3	5	35	4	3	5	59	5	3	5	250
0	4	0	7,5	1	4	0	11	2	4	0	15	3	4	0	21	4	4	0	34	5	4	0	130
0	4	1	9,4	1	4	1	13	2	4	1	17	3	4	1	24	4	4	1	40	5	4	1	170
0	4	2	11	1	4	2	15	2	4	2	20	3	4	2	28	4	4	2	47	5	4	2	220
0	4	3	13	1	4	3	17	2	4	3	23	3	4	3	32	4	4	3	54	5	4	3	280
0	4	4	15	1	4	4	19	2	4	4	25	3	4	4	36	4	4	4	62	5	4	4	350
0	4	5	17	1	4	5	22	2	4	5	28	3	4	5	40	4	4	5	69	5	4	5	430
0	5	0	9,4	1	5	0	13	2	5	0	17	3	5	0	25	4	5	0	41	5	5	0	240
0	5	1	11	1	5	1	15	2	5	1	20	3	5	1	29	4	5	1	48	5	5	1	350
0	5	2	13	1	5	2	17	2	5	2	23	3	5	2	32	4	5	2	56	5	5	2	540
0	5	3	15	1	5	3	19	2	5	3	26	3	5	3	37	4	5	3	64	5	5	3	920
0	5	4	17	1	5	4	22	2	5	4	29	3	5	4	41	4	5	4	72	5	5	4	1600
0	5	5	19	1	5	5	24	2	5	5	32	3	5	5	45	4	5	5	81				

Tabla No. 6

Ejemplos para determinar el NMP estimado en series de tres tubos con 1 g (ml) de muestra por tubo

Ejemplo	Cantidad de muestra (g o ml) ^a					Valores positivos reportados	NMP estimado/g o ml ^b
	0,10	0,001	0,001	0,0001	0,00001		
A	3/3	3/3	2/3	0/3	0/3	3-2-0	930
B	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3	3-2-0	9300
C	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0-1-0	30
D	3/3	3/3	2/3	1/3	1/3	3-2-2	2100
E	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3-3-3	110000

^a Numerador/denominador = número de tubos positivos/número de tubos inoculados.^b Multiplicar todos los valores de NMP/g (ml) por 100 para expresarlos como NMP/100 g (ml).

Tabla No. 7

Ejemplos para determinar el NMP estimado en series de 5 tubos con 1 g (ml) de muestra por tubo

Ejemplo	Cantidad de muestra (g o ml) ^a					Valores positivos reportados	NMP estimado/g o ml ^b
	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,00001		
A	5/5	5/5	2/5	0/5	0/5	5-2-0	490
B	5/5	5/5	5/5	2/5	0/5	5-2-0	4900
C	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0-1-0	20
D	5/5	5/5	3/5	1/5	1/5	5-2-2	1400
E	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5-5-5	160000

^a Numerador/denominador = número de tubos positivos/número de tubos inoculados.

^b Multiplicar todos los valores de NMP/g (ml) por 100 para expresarlos como NMP/100 g (ml).

B.6.3.3 Determinación de bacterias coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli* por la técnica de diluciones en tubo múltiple

B.6.3.3.1 Fundamento

Este método se basa en la propiedad de los microorganismos coliformes para producir gas a partir de glucosa y fermentación de lactosa dentro de las 48 h de incubación a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ (coliformes) y $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ (coliformes fecales y *E. coli*).

B.6.3.3.2 Equipo y materiales

- Además de los mencionados en el método Preparación y dilución de muestras de alimentos para análisis microbiológico, lo siguiente:
- Baño de agua con agitación continua cubierto y con termostato que evite variaciones mayores a $0,2^\circ\text{C}$.
- Termómetro calibrado y verificado 1/10
- Tubos de cultivo de 20 x 200 y de 16 x 160 mm con tapón de rosca
- Campanas de fermentación (tubos de Durham)
- Gradillas
- Asas bacteriológicas de 3 mm de diámetro
- Lámpara de luz ultravioleta de longitud amplia 4 watts.
- Lentes protectores.
- Medios de cultivo: En caso de disponerse de fórmulas comerciales deshidratadas, se debe demostrar que cumplen con lo indicado en este método de prueba, para su preparación deben seguir las instrucciones impresas en la etiqueta respectiva. Cuando se mencione agua debe entenderse que se trata de "agua destilada" los reactivos a emplear en el método de esta norma deben ser grado analítico.

Caldo lauril

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Bacto triptosa	20 g
Bacto lactosa	5 g
Fosfato potásico, dibásico	2,75 g
Fosfato potásico, monobásico	2,75 g
Cloruro de sodio	5 g
Lauril sulfato de sodio	0,1 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: $6,8 \pm 0,2$ a 25°C .

Preparación: Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada. Ajustar el pH. Distribuir en tubos de ensayo con campanas de Durham. Adicionar 10 ml de medio para cada tubo. Esterilizar en autoclave durante 15 min a 121°C. Antes de abrir el autoclave, dejar bajar la temperatura a 75°C para que no queden burbujas en las campanas de Durham.

Preparación de caldo lauril triptosa

INOCULO (ml)	CANTIDAD DE MEDIO POR TUBO (ml)	VOLUMEN DE MEDIO MAS INOCULO (ml)	CALDO LAURIL TRIPTOSA REQUERIDO g/l
1	10 o más	11 o más	35,6
10	10	20	71,2
10	20	30	53,4
20	10	30	106,8
100	50	150	106,8
100	35	135	137,1
100	20	120	213,6

Caldo EC (*E. coli*.)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Bacto triptosa	20 g
Bacto lactosa	5 g
Bacto sales biliares No. 3	1,5 g
Fosfato dipotásico	4 g
Fosfato monopotásico	1,5 g
Cloruro de sodio	5 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: 6,9 ± 0,2 a 25°C.

Preparación: Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada y calentar ligeramente para que se disuelva por completo. Ajustar el pH. Distribuir en tubos de ensayo con campanas de Durham. Adicionar 10 ml de medio para cada tubo. Esterilizar en autoclave durante 15 min a 121°C. Antes de abrir el autoclave, dejar bajar la temperatura a 75°C para evitar que queden burbujas en las campanas de Durham.

Caldo lactosa bilis verde brillante (medio de confirmación)

Lactosa bilis verde brillante

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Peptona	10 g
Lactosa	10 g
Sales biliares	20 g
Verde brillante	0,0133 g
Agua	1 l

Preparación: Disolver los componentes o el medio completo deshidratado en agua, calentar si es necesario. Ajustar el pH, de tal manera que después de la esterilización éste sea de 7,2 a 25 °C. Distribuir el medio en cantidades de 10 ml en tubos de 16 x 160 mm conteniendo campana de fermentación. Esterilizar en autoclave por 15 min a 121 ± 1 °C. Las campanas de fermentación no deben contener burbujas de aire después de la esterilización.

Agar McConkey

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Proteasa peptona o polipeptona	3 g
Peptona o gelizante	17 g
Lactosa	10 g
Sales biliares No. 3	1,5 g
Cloruro de sodio	5 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal violeta	0,001 g
Agar	13,5 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: 7,1 ± 0,2 a 25°C

Preparación: Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada. Calentar hasta ebullición para disolver por completo. Ajustar el pH. Esterilizar a 121°C durante 15 min. Enfriar a 50-60°C y vaciar en cajas Petri.

Agar eosina azul de metileno de Levin (EMB-L)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Peptona	10 g
Lactosa	10 g
K ₂ HPO ₄	2 g
Eosina Y	0,4 g
Azul de metileno	0,065 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: 7,1 ± 0,2

Preparación: Disolver la peptona, el fosfato y el agar en un litro de agua. Calentar hasta ebullición para la disolución completa. Distribuir en porciones de 100 o 200 ml y esterilizar a no más de 121°C por 15 min. Fundir antes de su uso y adicionar a cada porción de 100 ml.

- a) 5 ml de solución de lactosa al 20%.
- b) 2 ml de solución acuosa de eosina al 2%.
- c) 4,3 ml de solución acuosa de azul de metileno al 0,15%.

Cuando se use el producto deshidratado, disolver todos los ingredientes de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Caldo triptona al 1% (triptofano)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Triptona o tripticasa	10 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: 6,9 ± 0,2

Preparación: Disolver los ingredientes. Distribuir en porciones de 5 ml en tubos de ensaye de 16 x 125 o 16 x 150 mm. Esterilizar a 121°C por 15 min.

Caldo MR-VP

Medio 1

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Peptona tamponada	7 g
Glucosa	5 g
K ₂ HPO ₄	5 g
Agua destilada	1000 ml
pH final: 6,9 ± 0,2	

Preparación: Disolver los ingredientes con calentamiento suave si es necesario. Distribuir en volúmenes de 10 ml en tubos de ensaye de 16x150 mm. Esterilizar a 121°C por 15 min.

Caldo citrato de Koser

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
NaNH ₄ HPO ₄ •4H ₂ O	1,5 g
KH ₂ PO ₄ (monobásico)	1 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	0,2 g
Citrato de sodio •2H ₂ O	3 g
Agua destilada	1000 ml
pH final: 6,7 ± 0,2.	

Preparación: Distribuir preferentemente en tubos de ensaye con tapa de rosca. Esterilizar a 121°C por 15 min. Esta formulación se recomienda en los Métodos de Análisis Oficial de AOAC y en los Métodos Estándares para el Análisis de Agua y Aguas de Desecho (APHA). Este difiere de la composición del medio deshidratado disponible comercialmente y es recomendable su uso.

- Reactivos

Reactivo de Kovacs

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
p-dimetilaminobenzaldehído	5 g
Alcohol amílico (normal)	75 ml
HCl concentrado	25 ml

Preparación: Disolver el p-Dimetilaminobenzaldehído en alcohol amílico normal. Adicionar lentamente el HCl. Almacenar a 4°C.

Para la prueba de indol

1. Adicionar 0,2-0,3 ml del reactivo a 5 ml del cultivo de bacteria en caldo triptona.

Se considera una prueba positiva cuando desarrolla un color rojo en la superficie del tubo.

Reactivo de Voges-Proskauer (VP)

Solución 1

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
alfa-naftol	5 g
Alcohol absoluto	100 g

Solución 2

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Hidróxido de potasio	40 g
Agua destilada	para llevar a 100 ml

Prueba de Voges-Proskauer (VP)

1. Transferir 1 ml del cultivo a probar con 48 h de incubación a un tubo de ensaye.
2. Adicionar 0,6 ml de la solución 1 y 0,2 ml de la solución 2.
3. Agitar después de la adición de cada solución.
4. Para intensificar y acelerar la reacción adicionar unos cuantos cristales de creatina y mezclar.
5. Dejar a temperatura ambiente.
6. Leer resultados después de 4 h de adicionar los reactivos.

El desarrollo de una coloración rosa es una prueba positiva.

Reactivos para la coloración de Gram

Cristal violeta

Solución A

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Cristal violeta (colorante 90%)	2 g
Etanol 95%	20 ml

Solución B

Oxalato de amonio	0,8 g
Agua destilada	80 ml

Indicador rojo de metilo (R44)

1. Mezclar la solución A y B. Almacenar por 24 h.
2. Filtrar a través de un papel filtro áspero.

Iodo de Gram

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Iodo	1g
Ioduro de potasio (KI)	2 g
Agua destilada	300 ml

1. Colocar el KI en un mortero.
2. Adicionar el yodo.
3. Triturar con el pistilo por 5 a 10 seg.
4. Adicionar 1 ml de agua y triturar.
5. Adicionar 5 ml de agua y triturar.
6. Adicionar 10 ml de agua y triturar.
7. Vaciar esta solución en una botella de reactivo.
8. Enjuagar el mortero y el pistilo con la cantidad de agua necesaria para completar 300 ml.

Colorante de contraste (solución concentrada)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Safranina O	2,5 g
Etanol al 95%	100 ml

Solución de trabajo: Adicionar 10 ml de la solución concentrada a 90 ml de agua destilada.

Procedimiento para la tinción de Gram

1. Fijar con calor moderado los frotis de la muestra a teñir.
2. Adicionar la solución de cristal violeta al frotis.
3. Dejar actuar por un minuto.
4. Lavar con agua corriente y escurrir.
5. Aplicar la solución de yodo por un minuto.
6. Lavar con agua corriente y escurrir.
7. Decolorar con etanol al 95% hasta que la coloración azul deje de fluir (aproximadamente 30 seg).
8. Inmediatamente después enjuagar con agua corriente.
9. Escurrir.
10. Aplicar el colorante de contraste (safranina) por 30 seg.
11. Enjuagar, escurrir y secar al aire. Examinar al microscopio.

Medio EC-MUG

Preparar el caldo EC y adicionar 50 mg de 4-metilumbelliferyl-beta-D-glucurónido (MUG) por litro antes de esterilizar (121°C por 15 min). El caldo EC-MUG está comercialmente disponible.

B.6.3.3.3 Procedimiento**B.6.3.3.3.1 Alimentos****B.6.3.3.3.1.1 Prueba presuntiva**

B.6.3.3.3.1.1.1 Preparar la muestra como se indica en el método Preparación y dilución de muestras de alimentos para análisis microbiológico; y de acuerdo con el tipo de producto, utilizar las diluciones apropiadas, según se indica en el procedimiento de la densidad microbiana por la técnica del número más probable.

Utilizar como medio de enriquecimiento caldo lauril triptosa y continuar como en el punto (B.6.3.3.3.1.1.2).

B.6.3.3.3.1.2 Prueba confirmativa. Continuar como en el punto (B.6.3.3.3.1.3).

B.6.3.3.3.1.3 Prueba confirmatoria

Confirmar la presencia de *Escherichia coli* en por lo menos el 10% de las pruebas con resultados positivos a coliformes fecales por cultivo en placas de agar McConkey a partir de los tubos que demostraron la presencia de gas en la prueba confirmativa. Incubar las placas a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 h, observar las colonias típicas fermentadoras de color rojo rodeadas de un halo opaco de precipitación de sales biliares. Seleccionar 1 o más colonias aisladas y pasar a tubos de fermentación con caldo lauril triptosa, continuar como se indica en el punto (B.6.3.3.3.1.1). Hacer tinción de Gram para observación de la morfología de las colonias.

B.6.3.3.3.1.4 Interpretación de resultados

La formación de gas en el tubo de fermentación secundario dentro de las 48 ± 3 h y la demostración de bacilos Gram (-) no esporulados confirma un resultado positivo de la prueba demostrándose la presencia del grupo coliforme.

B.6.3.3.3.1.5 Cálculos

Calcular la densidad microbiana en número más probable conforme con el procedimiento señalado anteriormente, para estimar la población de bacterias coliformes y bacterias coliformes fecales de acuerdo con las diluciones empleadas y expresar en NMP/g o ml para alimentos y NMP/100 ml para agua. En el caso de usar volúmenes de 20 ml de muestras de agua en 5 tubos o 10 ml de muestras de agua en 10 tubos, utilizar las siguientes tablas:

TABLA 1

Índice del NMP con 95% de límite de confianza para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan 5 tubos con 20 ml de muestra de agua o hielo

No. DE TUBOS Positivos	NMP/100 ml	95% DE LIMITE DE CONFIANZA (APROXIMADO)	
		Inferior	Superior
0	1,1	0	3,0
1	1,1	0,05	6,3
2	2,6	0,3	9,6
3	4,6	0,8	14,7
4	8,0	1,7	26,4
5	8,0	4,0	Infinito

TABLA 2

Índice del NMP con 95% de límite de confianza para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan 10 tubos con 10 ml de muestra de agua o hielo

No. de Tubos Positivos	NMP/100 ml	95% de Límite de Confianza (aproximado)	
		Inferior	Superior
0	1,1	0,0	3,0
1	1,1	0,03	5,9
2	2,2	0,26	8,1
3	3,6	0,69	10,6
4	5,1	1,3	13,4
5	6,9	2,1	16,8
6	9,2	3,1	21,1
7	12	4,3	27,1
8	16,1	5,9	36,8
9	23,0	8,1	59,5
10	23,0	13,5	Infinito

B.7 METODO DE PRUEBA PARA EL ANALISIS MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS ENVASADOS HERMETICAMENTE Y/O ESTERILIZADOS COMERCIALMENTE

B.7.1 Fundamento

B.7.1.1 Examen microbiológico de latas no alteradas

Este examen tiene por objeto determinar la presencia de microorganismos viables latentes, que resistieron el tratamiento térmico debidamente aplicado y que en determinadas circunstancias pudieran desarrollarse, produciendo alteraciones en el alimento y representando un riesgo para el consumidor.

Los envasados, aun los bien procesados, pueden contener esporas de bacilos termofílicos, las cuales son muy resistentes al calor, pero no se desarrollan en las condiciones normales de almacenamiento y no producen problemas de descomposición del producto ni representan un peligro para el consumidor.

La prueba de esterilidad comercial, puede efectuarse por la observación y análisis del contenido del producto, su apariencia, color, olor, pH y examen microscópico.

Estas observaciones se hacen después de la incubación de las latas y siempre comparándolas con otras no incubadas.

Si es necesario efectuar el cultivo o si el producto después de incubarse presenta cualquier cambio, ya sea en apariencia, olor, color, pH, o bien presencia de gas o espuma, proceder como se indica en (B.7.1 o B.7.2), dependiendo del pH del alimento.

B.7.1.2 Examen microbiológico de latas alteradas

Este análisis tiene por objeto determinar el origen de la alteración, la cual puede ser causada por microorganismos que sobreviven al tratamiento térmico o por la introducción de éstos después del tratamiento, por defectos de las cerraduras o por golpes que lesionen el envase. Conociendo la naturaleza del alimento y su tratamiento, es posible predecir el tipo de organismo responsable de la alteración.

Numerosas investigaciones han demostrado que el tipo de alteraciones guarda relación con el grado de acidez del alimento procesado, por lo que éstos se dividen en dos grandes grupos:

B.7.1.2.1 Alimentos de baja acidez, con $\text{pH} > 4,6$, entre los que se encuentran productos cárnicos, lácteos, marinos, algunos vegetales, guisados, sopas, etcétera.

B.7.1.2.2 Alimentos ácidos, con $\text{pH} \leq 4,6$, entre los que se encuentran tomates, frutas, jugos de cítricos, encurtidos, entre otros.

B.7.2 Reactivos y materiales

A continuación se presentan las fórmulas y los procedimientos para preparar los medios y reactivos empleados en el análisis microbiológico de los productos envasados herméticamente y sometidos a esterilización comercial. En caso de disponerse de fórmulas comerciales deshidratadas equivalentes, se deben seguir las instrucciones del fabricante.

B.7.2.1 Medios de cultivo y soluciones

B.7.2.1.1 Caldo glucosa púrpura de bromocresol (CGPB)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Glucosa	100 g
Extracto de carne	30 g
Peptona (P. Ej. caseína)	50 g
Púrpura de bromocresol	20 ml
(1	6% en etanol)
Agua destilada	1 0000 ml
pH final = $7,0 \pm 0,2$	

Procedimiento: Disolver los ingredientes en el agua, ajustar el pH y envasar en tubos de 22 x 175 mm, en volúmenes de 12 a 15 ml. Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 min.

7.2.1.2 Caldo de hígado picado o caldo carne cocida (CH o CCC)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Hígado o carne magra de res	500 g
Agua destilada	800 ml
Peptona	10 g
Fosfato dipotásico	1 g
Almidón soluble	1 g
pH final = $7,0 \pm 0,2$	

Procedimiento: Poner el hígado o la carne picada en agua, calentar a ebullición y dejar a fuego lento durante una hora. Enfriar, retirar la capa de grasa, ajustar el pH y hervir otros 10 min. Filtrar a través de gasa o manta de cielo, presionando para quitar el exceso de líquido. Enfriar y agregar al caldo la peptona, el fosfato y el almidón soluble. Ajustar el pH y llevar el volumen del caldo a 1 000 ml con agua destilada. Filtrar a través de papel filtro grueso; en este paso el caldo y la carne pueden guardarse en refrigeración, si el medio no puede terminarse el mismo día. Envasar en tubos de 22 x 175 mm volúmenes de 10 a 12 ml de caldo y depositar suficiente hígado o carne picada para que ocupe una altura de 1,25 cm del fondo del tubo. Esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 min.

B.7.2.1.3 Caldo extracto de malta

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Extracto de malta	6 g
Maltosa	1,5 g
Glucosa	6 g
Extracto de levadura	1 g
Agua destilada	1 000 ml

pH final = $4,7 \pm 0,2$

Procedimiento: Disolver los ingredientes con agitación constante. Ajustar el pH a $4,7 \pm 0,2$, envasar en tubos de 22 x 175 mm en volúmenes de 12-15 ml. Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 min. Exponer al calor el menor tiempo posible.

B.7.2.1.4 Caldo ácido

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Proteosa peptona	5 g
Extracto de levadura	5 g
Glucosa	5 g
Fosfato dipotásico	4 g
Agua destilada	1 000 ml

pH final = $5,0 \pm 0,2$

Procedimiento: Disolver los ingredientes en 1 l de agua y envasar en tubos de 22 x 175 mm en volúmenes de 12 a 15 ml. Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 min.

B.7.2.1.5 Agar papa dextrosa o dextrosa Sabouraud

B.7.2.1.5.1 Agar papa dextrosa

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Infusión de papa	200 ml
Glucosa	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 000 ml

pH final = 3,5

Procedimiento: Lavar, pelar y rebanar papas de tamaño mediano (250 g). Hervir durante 30 min en 290 ml de agua destilada. Filtrar varias veces a través de gasa y algodón. En esta infusión, disolver los demás ingredientes. Añadir agua destilada hasta completar el volumen (1000 ml). Calentar a ebullición, hasta la disolución total de los ingredientes. Ajustar el pH a $5,6 \pm 0,2$. Distribuir en volúmenes de 100 ml y esterilizar en autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$. Enfriar a $45-48^\circ\text{C}$ y acidificar a pH 3,5 con solución estéril de ácido tartárico al 10% (aproximadamente 1,4 ml de ácido por cada 100 ml de medio). Una vez que se ha agregado el ácido tartárico, no se vuelve a calentar el medio.

B.7.2.1.5.2 Agar dextrosa Sabouraud

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Polipeptona o neopeptona	10 g
Dextrosa	40 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

pH final = $5,6 \pm 0,2$

Procedimiento: Calentar hasta disolución completa. Esterilizar en autoclave a $118-121^\circ\text{C}$ por 15 min, no exceder de $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

B.7.2.1.6 Agar hígado de ternera

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Infusión de hígado	50 g
Infusión de ternera	500 g
Proteosa peptona	20 g
Neopeptona	1,3 g
Triptona	1,3 g
Glucosa	5 g
Almidón soluble	10 g
Caseína isoeléctrica	5 g
Cloruro de sodio	5 g
Nitrato de sodio	2 g
Grenetina	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

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

Procedimiento: Mezclar los ingredientes con agua destilada y calentar a ebullición hasta su disolución total. Ajustar el pH y esterilizar a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 min.

B.7.2.1.7 Agar nutritivo**FORMULA**

Ingredientes	Cantidad
Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

pH final = 7,3 ± 0,2

Procedimiento: Suspender los ingredientes en agua destilada y disolverlos por ebullición. Ajustar el pH. Distribuirlo en volúmenes adecuados en matraces o botellas y esterilizar a 121 ± 1°C por 15 min.

B.7.2.1.8 Solución estéril de ácido tartárico al 10%

Disolver 10 g de ácido tartárico y llevar a 100 ml con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121 ± 1°C.

B.7.2.1.9 Colorante de azul de metileno

Solución A:

Azul de metileno (pureza no < 90%) 0,3 g

Etanol (95%) 90,0 ml

Solución B:

Solución 0,01% de hidróxido de potasio 100 ml

Mezclar A y B.

B.7.2.1.10 Colorante de cristal violeta

Cristal violeta (pureza no < 90%) 2 g

Etanol (95%) 20,0 ml

Agua destilada 80,0 ml

B.7.2.1.11 Colorante de Gram

Solución A;

Cristal violeta (pureza no < 90%) 2 g

Etanol (95%) 20,0 ml

Solución B:

Oxalato de amonio 0,8 g

Agua destilada 80,0 ml

Mezclar solución A y B, dejar reposar 24 h al abrigo de la luz, filtrar por papel filtro grueso.

B.7.2.1.12 Solución de yodo para Gram

Yodo (cristales) 1 g

Yoduro de potasio 2 g

Agua destilada 300,0 ml

Mezclar el yodo y el yoduro de potasio en un mortero y triturar hasta fino polvo. Agregar 1 ml de agua y mezclar, agregar 5 ml de agua y mezclar, agregar 10 ml de agua y mezclar. Vaciar esta solución a un frasco reactivo, lavar el mortero y el pistilo con suficiente agua hasta completar los 300 ml.

(Continúa en la Quinta Sección)