

SEGUNDA SECCION
PODER EJECUTIVO
SECRETARIA DE SALUD

PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-218-SSA1-2009, Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias.

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

MIGUEL ANGEL TOSCANO VELASCO, 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; 4o. de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo; 3o. fracción XXIV, 13 apartado A, fracciones I y II, 17 bis fracciones II y III, 17 Bis 2, 115 fracciones IV y VI, 194 fracción I, 195, 199, 210, 212, 215 fracciones II, III, 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 I 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 VI, 4, 8, 14, 15, 25, 30, 101, 102, 105, 106, 107, 108, 200, 201, 202, 203, 204, 206, 211 y 214 del Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios; 2o. inciso C fracción X del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud; 3o. fracción I incisos d y l, y fracción II, 10 fracciones IV y VIII del Reglamento de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, tengo a bien ordenar la publicación en el Diario Oficial de la Federación del Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-218-SSA1-2009, Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias.

El presente Proyecto se publica a efecto de que los interesados, dentro de los siguientes sesenta días naturales, contados a partir de la fecha de su publicación, presenten sus comentarios por escrito y con el sustento técnico suficiente ante el Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, sito en Monterrey número 33, planta baja, colonia Roma, código postal 06700, México, D.F., teléfono 50805200, extensión 1333, correo electrónico rfs@cofepris.gob.mx.

Durante el plazo mencionado, los documentos que sirvieron de base para la elaboración del Proyecto así como la Manifestación de Impacto Regulatorio (MIR), estarán a disposición del público para su consulta en el domicilio del Comité.

INDICE

- Introducción
 - 1. Objetivo y campo de aplicación.
 - 2. Referencias.
 - 3. Definiciones.
 - 4. Símbolos y abreviaturas.
 - 5. Disposiciones generales.
 - 6. Bebidas saborizadas no alcohólicas y bebidas adicionadas con cafeína.
 - 7. Congelados de bebidas saborizadas no alcohólicas.
 - 8. Productos concentrados para preparar bebidas saborizadas no alcohólicas.
 - 9. Muestreo.
 - 10. Métodos de prueba.
 - 11. Etiquetado.
 - 12. Envase y embalaje.
 - 13. Concordancia con normas internacionales y mexicanas.
 - 14. Bibliografía.
 - 15. Observancia de la norma.
- Apéndice Normativo A. Listado de Aditivos
Apéndice Normativo B. Métodos de prueba

PREFACIO

En la elaboración de la presente norma participaron las siguientes Organismos e Instituciones:

Secretaría de Salud

Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios

Secretaría de Salud del Estado de Michoacán

Secretaría de Salud del Estado de Nuevo León

Secretaría de Economía

Procuraduría Federal del Consumidor

Dirección General de Investigación

Instituto Politécnico Nacional

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

Confederación de Cámaras Industriales de los Estados Unidos Mexicanos

Cámara Nacional de la Industria de la Transformación

Cámara Nacional de la Industria de Conservas Alimenticias

Asociación Nacional de Productores de Refrescos y Aguas Carbonatadas, A.C.

Asociación Nacional de Fabricantes de Productos Aromáticos, A.C.

Bebidas Sanas, S.A. de C.V.

Bebidas Energizantes en México A.C.

Cadbury Bebidas, S.A. de C.V.

Café Internacional de Córdoba, S.A. de C.V.

Centro de Capacitación de Calidad Sanitaria S.A. de C.V.

Centro de Control Total de Calidades S.A. de C.V.

Coca Cola de México S.A. de C.V.

Concentrados Sandy's S.A. de C.V.

DULCO S.A. de C.V.

Embotelladora AGA de México S.A. de C.V.

GAF Distribuciones Industriales S.A. de C.V.

Grupo JUMEX

Helados Siberia S.A. de C.V.

Innovadora de Esencias, Aromas y sabores S.A. de C.V.

Jarabes el Manantial S.A. de C.V.

Jugos del Valle S.A. de C.V.

KRAFT Foods de México S. de R.L. de C.V.

Manantiales Peñafiel S.A. de C.V.

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

Nestle México S.A. de C.V.

OMNILIFE, S.A. de C.V.

Paletterías la Michoacana S.A. de C.V.

Parmalat de México S.A. de C.V.

Pepsi-Cola Mexicana S.A. de C.V.

Procesadora de Frutas La Cima S.A. de C.V.

Procter & Gamble México S. de R.L. de C.V.

Productora Nacional de Concentrados, S.A. de C.V.

SABORMEX S.A. de C.V.

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

Santa Clara Productos Lácteos S.A. de C.V.

SAROMA S.A. de C.V.

Super Sopas S.A. de C.V.

UNILEVER de México S.A. de C.V.

Introducción

Las bebidas saborizadas (refrescos, aguas, bebidas para deportistas), sus congelados y polvos para prepararlas, y bebidas adicionadas con cafeína, son altamente consumidos en México, de hecho somos el segundo lugar mundial en consumo de refrescos, lo que implica una mayor exposición de la población mexicana a los diversos peligros asociados a estos productos (microorganismos, aditivos, sustancias químicas específicas) por lo cual se debe ejercer un control sanitario adecuado que minimice los efectos de estos agentes en la población, ya sea estableciendo límites o indicando la información que debe cumplir el etiquetado de estos productos para que el consumidor pueda tomar una decisión responsable.

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta norma establece las disposiciones y especificaciones sanitarias que deben cumplir las bebidas saborizadas no alcohólicas (incluye las aguas frescas, y para deportistas), sus congelados, los productos concentrados para prepararlas y las bebidas adicionadas con cafeína.

1.2 Esta norma no aplica a productos que cuenten con una regulación sanitaria particular, los cuales deben ajustarse a las especificaciones sanitarias que para cada uno de ellos determine la Secretaría de Salud.

1.3 Esta norma es de observancia obligatoria en el Territorio Nacional para las personas físicas o morales que se dedican a su proceso o importación.

2. Referencias

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

2.1 Norma Oficial Mexicana NOM-003-SSA1-2006. Salud ambiental. Requisitos sanitarios que debe satisfacer el etiquetado de pinturas, tintas, barnices, lacas y esmaltes

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

2.3 Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCFI/SSA1-2010, Especificaciones Generales de Etiquetado para Alimentos y Bebidas no alcohólicas preenvasados-información comercial y sanitaria

2.4 Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994 Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización

2.5 Norma Oficial Mexicana NOM-130-SSA1-1995 Bienes y servicios. Alimentos envasados en recipientes de cierre hermético y sometido a tratamiento térmico. Disposiciones y especificaciones sanitarias.

2.6 Norma Oficial Mexicana NOM-201-SSA1-2002 Productos y servicios. Agua y hielo para consumo humano, envasados y a granel. Especificaciones sanitarias.

2.7 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 Aditivo, Cualquier sustancia permitida que, sin tener propiedades nutritivas, se incluya en la formulación de los productos y que actúe como estabilizante, conservador o modificador de sus características organolépticas, para favorecer ya sea su estabilidad, conservación, apariencia o aceptabilidad.

3.2 Aguas preparadas o frescas, a las bebidas saborizadas no alcohólicas comercializadas a granel, que se elaboran a partir de agua para consumo humano, derivados vegetales o productos concentrados para prepararlas, con o sin azúcares e ingredientes opcionales.

3.3 Bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición, a las que se les disminuyen, eliminan o adicionan uno o más nutrimentos, tales como hidratos de carbono, proteínas, lípidos, vitaminas, minerales o fibras dietéticas.

3.4 Bebidas para deportistas, a las bebidas saborizadas no alcohólicas que son elaboradas por la disolución de sales minerales, edulcorantes u otros ingredientes con el fin de reponer el agua, energía y electrolitos perdidos por el cuerpo humano durante el ejercicio.

3.5 Bebidas saborizadas no alcohólicas, a los productos elaborados por la disolución en agua para uso y consumo humano, de edulcorantes e ingredientes opcionales, adicionados o no de aditivos, que pueden estar o no carbonatadas. Incluye las aguas frescas y para deportistas.

3.6 Bebidas adicionadas con cafeína, a las bebidas no alcohólicas que son elaboradas por la disolución en agua para consumo humano, de ingredientes opcionales, con un contenido mayor de 20 mg de cafeína por 100 mL de producto.

3.7 Bitácora o registro, al documento o información electrónica controlada que provee evidencia objetiva y auditable de las actividades ejecutadas o resultados obtenidos durante el proceso del producto y su análisis, con la finalidad de asegurar la rastreabilidad del mismo.

3.8 Buenas prácticas de fabricación (BPF) en el caso de los aditivos se refiere a la cantidad mínima indispensable para lograr el efecto deseado.

3.9 Coadyuvante de elaboración, a la sustancia o materia, excluidos aparatos, utensilios y los aditivos, que no se utiliza como ingrediente alimenticio por sí misma, y que se emplea intencionalmente en la elaboración de materias primas, alimentos o sus ingredientes, para lograr alguna finalidad tecnológica durante el tratamiento o la elaboración, que puede dar lugar a la presencia no intencionada, pero inevitable de residuos o derivados en el producto final.

3.10 Concentrado, al producto para preparar bebidas no alcohólicas, que se elabora a partir de derivados vegetales o saborizantes naturales, idénticos a los naturales o sintético artificiales, adicionado o no de otros aditivos para alimentos y de ingredientes opcionales.

3.11 Concentrado de manufactura, al producto para preparar bebidas no alcohólicas, que se elabora a partir de derivados vegetales o saborizantes naturales, idénticos a los naturales o sintéticos artificiales, adicionado o no de otros aditivos para alimentos y de ingredientes opcionales y, que no está destinado para su venta al consumidor.

3.12 Congelado de bebidas no alcohólicas, al producto elaborado con agua para uso y consumo humano, edulcorantes e ingredientes opcionales, adicionados o no de aditivos para alimentos con o sin incorporación de aire y que puede ser moldeado, envasado o empalillado, entre otros.

3.13 Consumidor, persona física o moral que adquiere o disfruta como destinatario final productos alimenticios y bebidas no alcohólicas preenvasados

3.14 Derivados vegetales, a las materias primas comestibles e inocuas obtenidas de las diferentes partes de las plantas. Los saborizantes de origen natural son considerados aditivos.

3.15 Embalaje, material que envuelve, contiene y protege los productos preenvasados, para efectos de su almacenamiento y transporte.

3.16 Envase múltiple o colectivo, cualquier recipiente o envoltura en el que se encuentran contenidos dos o más variedades iguales o diferentes de productos preenvasados, destinados para su venta al consumidor en dicha presentación.

3.17 Envase primario, recipiente o envoltura que contiene y está en contacto directo con el producto, conservando su integridad física, química y sanitaria. El envase primario puede estar contenido en un envase secundario.

3.18 Envase secundario, al que contiene al envase primario de manera individual.

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

3.20 Ingrediente compuesto, a la mezcla previamente elaborada de sustancias y productos, que constituye un producto terminado y que se emplea para la fabricación de otro distinto.

3.21 Ingredientes opcionales, a los que se pueden adicionar al producto, tales como vegetales y sus derivados, leche y sus derivados u otros productos aptos para consumo humano.

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

3.23 Límite máximo, a la cantidad establecida de aditivos, microorganismos, parásitos, materia extraña, plaguicidas, radionúclidos, biotoxinas, residuos de medicamentos, metales pesados y metaloides, entre otros, que no se deben exceder en un alimento, bebida o materia prima.

3.24 Lote, a la cantidad de un producto, elaborado en un mismo ciclo, integrado por unidades homogéneas e identificado con un código específico.

3.25 Materia extraña, al material orgánico o inorgánico que se presenta en el producto por contaminación.

3.26 Metal pesado y metaloide, a los elementos químicos que tienen un peso atómico entre 63 y 200 y una gravedad específica mayor de 4,0; que por su naturaleza presenta una gran reactividad y que dependiendo de la concentración, la forma química o su acumulación en el organismo pueden ocasionar efectos indeseables en el metabolismo.

3.27 Método de prueba, al procedimiento analítico utilizado para la determinación de parámetros o características de un producto, proceso o servicio.

3.28 Prácticas de Higiene, las medidas necesarias para garantizar la inocuidad de los productos.

3.29 Plaguicida, a la sustancia o mezcla de sustancias que se destina a controlar cualquier plaga, incluidos los vectores que transmiten las enfermedades humanas y de animales, las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran en el proceso de los productos.

3.30 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.

3.31 Productos concentrados para preparar bebidas no alcohólicas, a los productos obtenidos por la mezcla de algunos de los siguientes: azúcares, ingredientes opcionales y aditivos, que requieren diluirse o disolverse para su consumo.

3.32 Producto a granel, al producto que debe pesarse, medirse o contarse en presencia del consumidor por no encontrarse preenvasado al momento de su venta.

3.33 Producto preenvasado, los alimentos y bebidas no alcohólicas, que son colocados en un envase de cualquier naturaleza, en ausencia del consumidor, y la cantidad de producto contenido en él no puede ser alterada, a menos que el envase sea abierto o modificado perceptiblemente.

3.34 Tratamiento térmico, al método físico que consiste en someter a una fuente de calor suficiente por un tiempo apropiado al producto, antes o después de ser envasado con el fin de lograr una estabilidad biológica y que garantice la eliminación de microorganismos patógenos.

4. Símbolos y abreviaturas

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

BPF	buenas prácticas de fabricación
cm	centímetro
g	gramo
kg	kilogramo
L	litro
M	masa
µg	microgramos
mg	miligramo
mL	mililitro
n.a.	no aplica
nm	nanómetro
NMP	número más probable
/	por
%	por ciento
UFC	unidades formadoras de colonia
UV	ultravioleta
pH	potencial de hidrógeno
v	volumen
K	Kelvin
°C	grado Celsius
<	menor
PEPS	primeras entradas, primeras salidas
v/v	relación volumen-volumen

Cuando en la presente norma se mencione al:

- **Acuerdo de aditivos**, debe entenderse que se trata del Acuerdo por el que se determinan las sustancias permitidas como aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, vigente.
- **Acuerdo de plantas**, debe entenderse que se trata del Acuerdo por el que se determinan las plantas prohibidas o permitidas para tés, infusiones y aceites vegetales comestibles, vigente.
- **Reglamento**, debe entenderse que se trata del Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios
- **Secretaría**, debe entenderse que se trata de la Secretaría de Salud.

5. Disposiciones generales

5.1 En el proceso de los productos objeto de esta norma, además de cumplir con lo establecido en el Reglamento, deberán ajustarse a las siguientes disposiciones:

5.1.1 Los establecimientos que se dediquen al proceso e importación de los productos objeto de esta norma, deben aplicar las prácticas de higiene y sanidad establecidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios, citada en el apartado de referencias

5.1.2 Control documental del proceso. Se debe contar con bitácoras o registros que garanticen los requisitos establecidos en la Tabla 1, el diseño y la frecuencia de los registros quedan bajo la responsabilidad del fabricante y deben:

5.1.2.1. Conservarse por lo menos durante una y media veces la vida de anaquel del producto terminado y estar a disposición de la autoridad sanitaria cuando así lo requiera.

5.1.2.2. Contar con fecha e información que permita la identificación del encargado de elaborar los registros.

5.1.2.3. Cuando se elaboren por medios electrónicos deben contar con respaldos que aseguren la veracidad de la información y un procedimiento para la prevención de acceso y correcciones no controladas.

Tabla 1. Información mínima de las bitácoras o registros de las diferentes etapas del proceso y de las buenas prácticas de fabricación.

REGISTRO DE:	INFORMACION
Materias primas.	Proveedor u origen. Cuando aplique, condiciones de almacenamiento y conservación. Rotación, conforme al tipo de proceso. Informe del resultado de su análisis, en el que se incluya: Nombre, clave o código de la materia prima. Lote. Parámetro sanitario analizado. Fecha de análisis. Responsable.
Producto terminado.	Condiciones de almacenamiento y conservación. Cuando aplique, identificación de la cámara, refrigerador o congelador. Informe del resultado de su análisis, en el que se incluya: Nombre clave o código del producto terminado. Lote. Parámetro sanitario analizado. Fecha de análisis. Responsable.
Procedimiento y sus registros de la etapa de lavado y desinfección, en su caso.	Sustancias usadas. Concentraciones. Temperaturas y cuando el procedimiento no sea continuo, tiempo de contacto.
Proceso.	Contar con diagramas de bloque del proceso de elaboración que indique los puntos críticos del proceso. Control del tratamiento térmico, cuando aplique <ul style="list-style-type: none"> • Registro de temperaturas.

5.1.3 Personal

5.1.3.1 El personal debe estar capacitado para cumplir con prácticas de higiene y sanidad, e identificar su papel y responsabilidad en la protección de las materias primas y productos terminados con relación a su contaminación o deterioro y la repercusión de su consumo en la salud de la población. De esta capacitación debe existir evidencia documental.

5.1.4 Instalaciones físicas

5.1.4.1 El área de lavado de los envases debe ser específica, localizarse dentro del establecimiento y contar con pisos, paredes y techos. En caso de que no exista comunicación directa entre esta área y la de llenado, se deben tomar las medidas necesarias para evitar la recontaminación de los envases.

5.1.4.2 El lavado de los útiles de limpieza debe realizarse por separado.

5.1.5 Materia prima

5.1.5.1 La materia prima empleada en la elaboración de los productos objeto de esta norma, debe cumplir con lo establecido en el Reglamento y en las Normas Oficiales Mexicanas correspondientes.

5.1.5.2 El agua que se utilice en el proceso de los productos debe ser para uso y consumo humano, conforme a lo establecido en la NOM-127-SSA1-1994 o NOM-201-SSA1-2002, citadas en el apartado de referencias y en caso de ser necesario, se debe contar con un sistema de potabilización adicional que garantice su inocuidad. El mantenimiento del mismo es responsabilidad del particular, de acuerdo con las especificaciones emitidas por el fabricante.

5.1.5.3 La materia prima de origen vegetal fresca o congelada, se debe lavar con agua para uso y consumo humano, y desinfectar con sustancias inocuas para su uso en alimentos, de conformidad con lo siguiente:

5.1.5.3.1 El agua debe cambiarse con una frecuencia suficiente para prevenir la acumulación de materia orgánica y evitar la contaminación cruzada.

5.1.5.3.2 Debe realizarse el secado o drenaje para eliminar el agua después del lavado.

5.1.5.3.3 De acuerdo con el desinfectante que se emplee, se debe cumplir estrictamente con las instrucciones señaladas por el fabricante en la etiqueta y en la hoja o ficha técnica.

5.1.5.3.4 Deben monitorearse y controlarse los niveles de desinfectante para garantizar que se mantienen en concentraciones eficaces.

5.1.5.4 En todas las materias primas que requieren fecha de caducidad debe revisarse ésta, y rechazar aquellas que se encuentren vencidas.

5.2 Disposiciones para establecimientos que elaboran productos a granel.

5.2.1 En los establecimientos en donde se expenden productos objeto de esta norma y otros productos, sus áreas o secciones para el almacenamiento y exhibición deben ser específicas y delimitadas

5.2.2 Se debe contar como mínimo con una tarja conectada al sistema de agua potable para el lavado de materia prima, enseres y utensilios para el proceso, misma que debe lavarse previo a cada uso.

5.3 Especificaciones generales

5.3.1 Los productos sujetos a tratamiento térmico envasados 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.

5.3.2 Contenido de alcohol

5.3.2.1 El contenido de alcohol etílico en los productos objeto de esta norma no debe exceder del 1,99% v/v, en el producto terminado. Cuando el primero se encuentre en el producto terminado por efectos de transferencia, no debe exceder el 0,5% en volumen a 20°C.

5.3.3 Metales pesados y metaloides

5.3.3.1 El fabricante de los productos objeto de esta norma, debe establecer mecanismos de control que permitan determinar la presencia y cantidad de metales pesados y metaloides en las materias primas, en el producto en proceso de elaboración o en el producto terminado. La información generada debe estar a disposición de la Secretaría cuando ésta así lo requiera.

5.3.4 Especificaciones nutrimentales

5.3.4.1 Los productos objeto de esta norma que contengan leche, frutas, cereales, o cualquier otra fuente de proteínas, vitaminas o minerales (cuando no sean por su formulación), pueden adicionar únicamente los nutrimentos listados en la NOM-086-SSA1-1994 citada en el apartado de referencias

5.3.4.2 Los productos restantes, no pueden ser adicionados de vitaminas liposolubles.

5.3.5 Los productos objeto de esta norma que empleen como materia prima derivados vegetales, deben sujetarse a lo establecido en el Acuerdo de plantas.

5.3.6 Los obsequios o promociones que se proporcionen con los productos objeto de esta norma deben ser inocuos, no ceder sustancias tóxicas al producto y, en su caso, cumplir con los ordenamientos jurídicos aplicables.

5.3.8 Aditivos

5.3.8.1 En la elaboración de los productos objeto de esta norma, únicamente se permite el empleo de los aditivos listados en el Apéndice normativo A.

5.3.8.2 Los límites establecidos para cada aditivo sólo son aplicables al uso de dichas sustancias como tales, sin considerar su empleo como nutrimentos, para proveer de vitaminas y minerales.

5.3.8.3 Si se utiliza una mezcla de colorantes artificiales, ésta no debe exceder de 300 mg/kg tomando en cuenta el límite máximo de cada colorante.

5.3.8.4 El límite máximo de la mezcla de emulsificantes, sin incluir a los almidones modificados, es de 10 g/kg, tomando en cuenta el límite máximo correspondiente a cada sustancia.

5.3.8.5 En la elaboración de los productos objeto de este apartado se permite el empleo de:

Saborizantes naturales, sintéticos artificiales y sintéticos idénticos a los naturales, señalados en el Acuerdo de aditivos conforme a las BPF.

5.3.8.6 En la elaboración de aguas frescas y congelados a granel pueden emplearse los colorantes listados en los límites señalados en el Apéndice normativo A, de los cuales debe monitorearse y registrarse la concentración en el producto terminado. La presencia de otros aditivos se deberá únicamente al principio de transferencia, cuando se elaboren a partir de concentrados, jarabes o bebidas no alcohólicas preenvasadas.

5.3.9 Las bebidas de quina no deberán contener más de 0,001% de quinina o 0,01% de bisulfato de quinina o de clorhidrato de quinina.

5.3.10 Especificaciones físicas

5.3.10.1 El límite máximo de materia extraña debe ser:

Tabla 2. Materia extraña

Materia extraña	Con derivados vegetales		Sin derivados vegetales	
	Bebidas, congelados, jarabes y concentrados	Polvos	Bebidas, congelados, jarabes y concentrados	Polvos
Pelo	1/100 g	1/50 g	1/250 mL	1/50 g
Fragmentos de Insectos	20/100 g	20/50 g	exento	10/50 g
Fibras	5/100 g	5/50 g	5/100 mL	5/50 g
Otros	exentos	exentos	exentos	exentos

6. Bebidas saborizadas no alcohólicas y bebidas adicionadas con cafeína

6.1 Clasificación

Las bebidas saborizadas no alcohólicas por su presentación se clasifican en:

6.1.1 Preenvasadas, y

6.1.2 A granel

6.2 Disposiciones sanitarias

6.2.1 Además de lo señalado en el punto 5.1, las empresas productoras de bebidas saborizadas no alcohólicas preenvasadas y las bebidas adicionadas con cafeína deben cumplir con lo siguiente:

6.2.1.1 Cuando se utilicen envases retornables, éstos deben ser sometidos a un proceso de desinfección interna y de lavado externo con soluciones desinfectantes, enjuagados con agua apta para consumo humano y escurridos de manera que no queden residuos de los desinfectantes.

6.2.1.2 Para el caso de envases no retornables vacíos, éstos deben almacenarse en condiciones higiénicas, protegidos de polvo y de materia extraña. Previo a su llenado, deben ser sometidos a un proceso que garantice la inocuidad del producto terminado.

6.2.1.3 Los tapones, tapas o corcholatas deben ser nuevos y de materiales no tóxicos.

6.2.1.4 Los tapones, tapas o corcholatas deben ser mantenidos desde su producción, transporte y manejo en condiciones higiénicas libres de polvo y de materia extraña. En caso de que no sea así, deben desinfectarse con soluciones que no modifiquen, reaccionen o alteren las características de éstos, evitando la contaminación por arrastre.

6.3 Especificaciones Microbiológicas

6.3.1 Las bebidas saborizadas no alcohólicas y las bebidas adicionadas con cafeína no deben sobrepasar los siguientes límites:

Tabla 3. Especificaciones microbiológicas

Microorganismos	Bebidas no Alcohólicas Preenvasadas	Bebidas no alcohólicas a granel		
		Sin derivados vegetales	Con derivados vegetales	
			Con tratamiento térmico	Sin tratamiento térmico
Mesófilos aerobios UFC/g o mL	50	n.a.	n.a.	n.a.
Coliformes totales NMP/mL o g	10	10	50	n.a.
Coliformes fecales NMP/mL o g	n.a.	n.a.	n.a.	< 3
<i>Salmonella</i> sp en 25 mL o g	ausente *	ausente	ausente	ausente
<i>E. coli</i> NMP/g o mL	n.a.	n.a.	n.a.	< 3 **
<i>V. cholerae</i> O1 en 50 g o mL	ausente *	ausente *	ausente *	ausente *
Enterotoxina estafilocócica	negativa*	negativa*	negativa*	negativa*

* Sólo en casos de contingencia sanitaria.

** Confirmar la presencia de *E. coli* por el método del NMP cuando el parámetro de coliformes fecales esté fuera de las especificaciones.

6.4 Las bebidas adicionadas con cafeína no deben contener más de 33mg de cafeína/100mL de producto.

6.5 Las bebidas para deportistas deben contener, por lo menos sodio e hidratos de carbono, en las siguientes concentraciones:

6.5.1 Sodio entre 230 y 575 mg/L

6.5.2 Hidratos de carbono máximo 80 g/L

7. Productos congelados

7.1 Clasificación

Los productos objeto de este capítulo se clasifican en:

7.1.1 Preenvasados y

7.1.2 A granel

7.2 Disposiciones sanitarias

7.2.1 Además de lo señalado en el punto 5.1 las empresas productoras de congelados de bebidas saborizadas no alcohólicas deben cumplir con lo siguiente:

7.2.1.1 En todo momento se debe evitar que la salmuera entre en contacto con el producto terminado.

7.2.1.2 El agua que se utilice durante el desmolde de los productos debe ser para uso y consumo humano.

7.2.1.3 No se permite colocar hielo en contacto directo con el producto terminado, a menos que éste se encuentre preenvasado, de tal forma que evite su contaminación.

7.2.1.4 La cámara de congelación y congeladores o neveras deben mantenerse a una temperatura de -12°C o menos, con termómetro visible o dispositivos de registro de temperaturas funcionando y en buen estado; permitir el flujo de aire entre los productos.

7.2.1.5 Los congelados de bebidas saborizadas no alcohólicas adicionadas con cafeína deben de cumplir con los límites establecidos en el numeral 6.4

7.3 Especificaciones Microbiológicas

7.3.1 Los congelados de bebidas saborizadas no alcohólicas no deben sobrepasar los siguientes límites:

Tabla 4. Especificaciones microbiológicas para los congelados de las bebidas saborizadas no alcohólicas

Microorganismos	Congelados de bebidas saborizadas no alcohólicas preenvasados	Congelados de bebidas saborizadas no alcohólicas a granel		
		Sin derivados vegetales	Con derivados vegetales	
			Con tratamiento térmico	Sin tratamiento térmico
Coliformes totales NMP/mL o g	10	10	50	n.a.
Coliformes fecales NMP/mL o g	n.a.	n.a.	n.a.	<3
<i>Salmonella</i> sp./25 mL o g	ausente*	ausente	ausente	ausente
<i>E. coli</i> NMP/mL o g	n.a.	n.a.	n.a.	<3 **
<i>V. cholerae</i> O1/50 mL o g	ausente *	ausente *	ausente *	ausente *
Enterotoxina estafilocócica	negativa ***	negativa ***	negativa ***	negativa ***

* Sólo en casos de contingencia sanitaria.

**Confirmar la presencia de *E. Coli* por el método de NMP cuando el parámetro de coliformes fecales esté fuera de especificaciones.

***Sólo en productos adicionados con leche y sus derivados y en casos de contingencia sanitaria.

8. Productos concentrados para preparar bebidas saborizadas no alcohólicas

8.1 Clasificación

Los productos objeto de este capítulo, por su proceso se clasifican en:

8.1.1 Jarabes o Concentrados

8.1.1.1 Con tratamiento térmico

8.1.1.2 Sin tratamiento térmico

8.1.2 Concentrados de manufactura, y

8.1.3 Polvos

8.2 Disposiciones sanitarias

8.2.1 Además de lo señalado en el punto 5.1 las empresas productoras de concentrados para preparar bebidas saborizadas no alcohólicas deben cumplir con lo siguiente:

8.2.1.1 Las empresas productoras de concentrados de manufactura para el control documental del proceso deben aplicar lo señalado en la siguiente tabla:

Tabla 5. Contenido mínimo de las bitácoras o registros de las diferentes etapas del proceso y de las buenas prácticas de fabricación

Tipo de registro	Datos
Análisis del agua de proceso, cuando aplique	Resultados Fecha de análisis Laboratorio responsable
Análisis de materia prima	Certificado de calidad
Análisis del producto terminado	Certificado de calidad
Almacenamiento del producto terminado	Temperaturas de conservación del producto, cuando aplique. Identificación de la cámara o refrigerador Fecha Responsable Sistema PEPS
Almacenamiento de Materias primas	Temperaturas de conservación, cuando aplique. Fecha Responsable Sistema PEPS
Control de tratamiento térmico, cuando aplique	Registro de temperaturas Fecha Responsable

8.2.1.2 Las características y especificaciones sanitarias de los concentrados de manufactura, utilizados como materia prima para la elaboración de bebidas saborizadas no alcohólicas deben garantizar la inocuidad de estas últimas, a fin de cumplir con las especificaciones sanitarias establecidas en esta norma y demás disposiciones aplicables.

8.2.1.3 Los concentrados de manufactura utilizados como materia prima, deben contar con un certificado de calidad que incluya, entre otros, los siguientes datos: nombre o clave o código del producto, identificación del responsable de proceso, número de lote, leyendas de conservación y la declaración de ingredientes misma información que debe ser declarada en la etiqueta, a excepción de los ingredientes. Cuando se requiera utilizar una clave o código para referirse al nombre del producto o a los ingredientes, la persona física o moral, licenciataria o causahabiente, propietaria de la marca debe contar con la documentación que respalde la identificación de los mismos, la cual debe estar a disposición de la Secretaría cuando ésta lo requiera.

8.3 Especificaciones Físicas y Químicas

8.3.1 Los polvos para preparar bebidas saborizadas no alcohólicas no deben exceder de 5% de humedad.

8.3.2 El límite máximo de dióxido de azufre (SO₂) en concentrados y jarabes de uva es de 10 mg/kg.

8.4 Especificaciones Microbiológicas

8.4.1 Los jarabes o concentrados para preparar bebidas saborizadas no alcohólicas no deben pasar de los siguientes límites:

Tabla 6. Especificaciones microbiológicas en jarabes y concentrados para preparar bebidas saborizadas no alcohólicas.

Microorganismo	Con tratamiento térmico	Sin tratamiento térmico.	
		Sin derivados vegetales	Con derivados vegetales
Coliformes totales UFC/ g o mL	<10	10	n.a.
Coliformes fecales NMP/ g o mL	n.a.	n.a.	<3
<i>Salmonella</i> sp. / 25 g o mL	ausente*	ausente*	ausente
<i>E. coli</i> NMP/mL o g	n.a.	n.a.	<3**
Enterotoxina estafilocócica	negativa *	negativa *	negativa *

* En caso de contingencia sanitaria.

** Confirmar la presencia de *E. coli* por el método de NMP cuando el parámetro de coliformes fecales esté fuera de especificaciones.

8.4.2 Los polvos para preparar bebidas saborizadas no alcohólicas no deben pasar de los siguientes límites:

Tabla 7. Especificaciones microbiológicas en polvos para preparar bebidas saborizadas no alcohólicas.

Microorganismos	Límite máximo
Mesofílicos aerobios UFC/g	5000*
Coliformes totales NMP/g	< 10
<i>Escherichia coli</i> NMP/g	< 3 **
<i>Salmonella</i> sp. en 25 g	ausente**

*Para aquellos que contengan cacao o leche el límite máximo es de 7000 UFC/g

**En aquellos productos que contengan cacao, huevo o leche (incluyendo sus derivados)

9. Muestreo

El procedimiento de muestreo para los productos objeto de esta norma, debe sujetarse a lo que establece la Ley General de Salud y otras disposiciones jurídicas aplicables.

10. Métodos de prueba

Para la verificación oficial de las especificaciones sanitarias que se establecen en esta norma, se deben aplicar los métodos de prueba establecidos en el Apéndice normativo B.

11. Etiquetado

Las etiquetas o envases de los productos preenvasados objeto de esta norma, además de cumplir con lo establecido en el Reglamento y en la NOM-051-SCFI-1994, señalada en el apartado de referencias, deben cumplir con lo siguiente:

11.1 Requisitos generales

11.1.1 Los productos que hayan sido modificados en su composición, deben cumplir con la NOM-086-SSA1-1994, señalada en el apartado de referencias.

11.1.2 Cuando en las etiquetas se declaren u ostenten de forma escrita, gráfica o descriptiva, que los productos, su aplicación, ingredientes o cualquier otra característica, están recomendados, respaldados o aceptados por centros de investigación, asociaciones, entre otros, estas Instituciones deben contar con reconocimiento nacional o internacional por su experiencia y estar calificados para dar opinión sobre la información declarada. Se deberá contar con el sustento técnico respectivo, el que estará a disposición de la Secretaría en el momento que lo solicite. Dichas declaraciones deben sujetarse a lo siguiente:

11.1.2.1 La leyenda debe describir claramente la característica referida, estar precedida por el símbolo o nombre del organismo y figurar con caracteres claros y fácilmente legibles.

11.1.3 El nombre o la denominación del producto preenvasado debe corresponder con la establecida en los ordenamientos legales específicos. Cuando se trate de productos con modificaciones en su composición referentes a menor contenido de sodio, grasa, grasa saturada, colesterol, calorías o adiccionados deben ostentar las denominaciones establecidas en la NOM-086-SSA1-1994, señalada en el apartado de referencias.

11.1.4 En el caso de que el producto haya sido objeto de tratamiento térmico, para asegurar la inocuidad del producto, esta condición debe señalarse en cualquier parte de la etiqueta. Si el producto ha sido sujeto a otro tipo de tratamiento se puede indicar el nombre de éste.

11.2 Lista de ingredientes

11.2.1 En los productos con cafeína debe declararse en la lista de ingredientes la cafeína, el o los ingredientes base o la mezcla de éstos, seguido del contenido exacto de cafeína expresado en mg/100 mL, que debe corresponder al total ya sea por el saborizante, el o los ingredientes base o la mezcla de éstos.

11.3 Identificación del responsable del producto

11.3.1 Cuando en un establecimiento diferente al de la persona física o moral, al licenciario o causahabiente, propietario de la marca, participe en el proceso de los productos, debe figurar en la etiqueta la leyenda "HECHO PARA..." o alguna equivalente, seguido del nombre o domicilio (calle, número, colonia, código postal, ciudad y estado) del responsable del producto, asimismo el lote debe permitir la identificación del o los establecimientos que intervienen en el proceso.

11.4 Instrucciones de uso

11.4.1 Cuando por el tipo de producto se requieran instrucciones de uso, éstas deben indicarse en la etiqueta.

11.4.2 Para los productos objeto de esta norma que por diseño del envase requieran instrucciones de uso o consumo especiales, deben incluir una descripción escrita o gráfica de las instrucciones de empleo o preparación.

11.4.3 Los productos destinados a ser reconstituídos deben incluir una descripción escrita o gráfica de las instrucciones de empleo o preparación.

11.4.4 Los jarabes o concentrados, cuando aplique, deben ostentar la leyenda: "Agítese antes de su consumo" o cualquier otra equivalente.

11.5 Leyendas de conservación.

11.5.1 Cuando sea necesario, se debe incluir la leyenda relativa a la conservación del producto.

11.5.2 Para los congelados de bebidas no alcohólicas preenvasados: "Manténgase en congelación" o "Consérvese en congelación" o cualquier otra equivalente.

11.5.3 Para los polvos: "Consérvese en un lugar fresco y seco" o cualquier otra equivalente.

11.5.4 Para los jarabes o concentrados: "Refrigérese después de abrirse" o "Manténgase en congelación" o cualquier otra equivalente.

11.6 Etiquetado nutrimental.

11.6.1 Las bebidas para deportistas deben contener la información nutrimental, de conformidad con lo que se establece en la NOM-051-SCFI-1994, señalada en el apartado de referencias y adicionalmente deben incluir los electrolitos y minerales que aporten.

11.6.2 Quedan exceptuados de incluir la información nutrimental los concentrados de manufactura.

11.7 Leyendas precautorias

11.7.1 En productos que contienen quinina debe indicarse la presencia de la misma, ya sea que se utilice la palabra "quinina" en la denominación del producto o empleando una leyenda por separado, las cuales deben escribirse con caracteres mayores a la de los ingredientes.

11.7.2 En productos que contienen alcohol etílico en cantidades superiores al 0,50% en volumen, en el producto terminado, deben incluir en la superficie principal de exhibición de la etiqueta, las siguientes leyendas: "Este producto contiene ___ % de alcohol" y "No recomendable para niños". En el espacio en blanco citar la cantidad correspondiente.

11.7.3 En congelados, cuando corresponda, deben incluirse la(s) leyenda(s) que se refieran al siguiente aspecto:

- Que para protección de la salud, deben lavarse las manos y el envase del producto antes de consumirlo.

11.7.4 Las bebidas adicionadas con cafeína, deben incluir las siguientes leyendas: “No consumir más de _____ unidades al día” (en el espacio en blanco indicar la cantidad correspondiente, dependiendo de la concentración de cafeína, en ningún caso la ingesta máxima recomendada de bebidas adicionadas con cafeína debe exceder de 165 mg de cafeína por día), “No se recomienda su consumo por: niños menores de 12 años, ni para personas sensibles a la cafeína” y “No mezclar o consumir junto con bebidas alcohólicas”.

11.8 Especificaciones para productos a granel

11.8.1 Durante el expendio de las aguas frescas y congelados a granel y en caso de que contengan alcohol etílico, deben indicar mediante carteles, la leyenda precautoria indicada en el punto 11.7.2 en un lugar visible o en el listado de precios y sabores.

11.8.2 Durante el expendio de las aguas frescas y congelados a granel y en caso de que contengan cafeína o quinina, deben indicar por cualquier medio que el producto contiene dichos ingredientes.

12. Envase y embalaje

12.1 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 las características físicas, químicas y sensoriales de este último.

12.2 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.

12.3 Debe garantizarse la inocuidad de las tintas empleadas en la etiqueta cuando por las características del producto y el envase primario, se presente el riesgo de ingerirlas; según lo que establece la NOM-003-SSA1-2006, señalada en el apartado de referencias.

13. Concordancia con normas internacionales y mexicanas

Esta norma no es equivalente con ninguna norma internacional y es parcialmente equivalente a las siguientes normas mexicanas:

13.1 NMX-F-466-1984, Alimentos-Bebidas no alcohólicas-Naranjadas. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Dirección General de Normas.

13.2 NMX-F-439-1983, Alimentos-Bebidas no alcohólicas-Bebidas y refrescos Clasificación y definiciones. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Dirección General de Normas.

14. Bibliografía

14.1 Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

14.2 Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

14.3 Ley General de Salud.

14.4 Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.

14.5 Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios.

14.6 Acuerdo por el que se determinan las sustancias permitidas como aditivos y coadyuvantes.

14.7 Codex Alimentarius Commission. 1998. Report of the thirtieth session of the Codex Committee on Food Additives and Contaminants. Edited by Codex Alimentarius Commission.

14.8 Codex Alimentarius Commission. 1995. Azúcares, productos de cacao y el chocolate y productos diversos. Volumen 11. 2a. Edición. Pág. 94.

14.9 Codex Alimentarius Commission. 2001. Informe de la 33a. Reunión del Comité del Codex sobre aditivos alimentarios y contaminantes de los alimentos. La Haya, Países Bajos.

14.10 FAO/WHO (1998). Summary of evaluations performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). ILSI Press.

14.11 Food and Agriculture Organization of the United Nations. International Programme on Chemist Safety. World Health Organization. Summary of Evaluations Performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). 1994. ILSI Press.

14.12 Food Fortification (FAO). Food and Agriculture Organization of the United Nations Technology and Quality Control. Food and Nutrition Paper.

14.13 OMS.1995. Evaluación de ciertos aditivos alimentarios y contaminantes de los alimentos. 44a. Informe del Comité Mixto FAO/OMS de expertos en Aditivos Alimentarios.

- 14.14** CICOPLAFEST. Catálogo Oficial de Plaguicidas.
- 14.15** ANZFA. 1999. Electrolyte Drinks. Internet.
- 14.16** ANZFA. 1999. Caffeine in non-alcoholic beverages. Internet.
- 14.17** ANZFA. 1999. Caffeine in soft drinks. Internet. 116 DIARIO OFICIAL Viernes 22 de agosto de 2003
- 14.18** Code of Federal Regulations (CFR). Food and Drugs "Alimentos". Revised as of April 1, 1992. partes 100 to 169. pp. 318-333.
- 14.19** Código Alimentario Argentino. Tomo III. Aditivos.
- 14.20** Directiva 92/2/CE. 1995. Diario Oficial de la Comunidad Europea.
- 14.21** Directiva 95/2/EC on food additives others than color and sweeteners. Parte D. Anexo IV. 1999-2001. European Union Legislation on Foodstuffs. pp. 732.
- 14.22** Millo Lorenzo. Legislación Alimentaria Española (Aditivos). Ed. Revista de Derecho Privado. Editoriales de Derecho Reunidas.
- 14.23** Reglamentaciones Técnico Sanitarias del Sector Alimenticio. Madrid Vicente A. Tomo II. AMV. Ediciones. pp. 527-544
- 14.24** AOAC Official Methods of Analysis. 1990. Quinine in Drugs. pp. 592.
- 14.25** AOAC International. Official Methods of Analysis. 1995. Método Oficial 62.13.
- 14.26** AOAC. International 16th Ed. 5th Rev. 1999 (925.45B) 44.1.03B.
- 14.27** Alonso Salazar Torres. Bebidas del Nuevo Milenio. Revista de Tecnología de Alimentos, Industria y Mercado.
- 14.28** APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 18th Edition. 1992.
- 14.29** Applegate, L. 2000. Everything you need to know about hydrating in the heat. 1-4.
- 14.30** Barone, J.J., and H., Roberts. 1984. "Human Consumption of Caffeine" In: Caffeine. Perspectives from Recent Research's. Ed. by Dews, P.B. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 59-63.
- 14.31** Barone, J.J. and H.R. Roberts. 1996. Caffeine Consumption. Food Chemistry and Toxicology, Vol. 34, pp.119-129.
- 14.32** Barr, S.I. and Costill, D.L. 1989. Water: Can the endurance athlete get too much of a good thing? In: J. Am Diet Assoc. 89: pp. 1629-1632.
- 14.33** Barr, S.I.; Costill, D.L. and Fink W.J. 1991. Fluid replacement during prolonged exercise: effects of water, saline, or no fluid. Med. Sci. Sports Exerc. 23 (7): 811-7. Internet.
- 14.34** Bowes Planter, A. 1989. Caffeine. Bowes and Church s Food values of portions commonly used. pp. 261-2 Internet.
- 14.35** Burke-LM. 1997. Nutrition for post-exercise recovery. Aust-J-Sci-Med-Sport. 29 (1): 3-10. Internet.
- 14.36** Center for Science in the Public Interest. 1997. Label Caffeine Content of Foods, Scientists Tell FDA. Internet.
- 14.37** Cruz Ma. Guadalupe. 1991. Dieta especial para deportistas. Cuadernos de nutrición. Vol. I, número 6.
- 14.38** Convertino, V.A.; Armstron, L.E.; Coyle, E.F.; Mack, G.W.; Sawka, M.N., Senay, L.C. Jr and Sherman, W.M. 1996. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and Fluid replacement. 28(1): i-vii. Internet.
- 14.39** Costill, D. Water and Electrolyte Balance in Exercise In: Nutrition and Food Science. Present Knowledge and Utilization. Vol. 2. Edited by Santos, W., Lopes, N., Barbosa, J.J., Chaves, D. and Valente, J.C. Plenum Press. pp. 677-682.
- 14.40** Couturier-EG; Laman-DM; VAN-Duijn-MA; VAN-Duijn-H. 1997. Influence of caffeine and caffeine withdrawal on headache and cerebral food flow velocities. 17 (3): 188-90. Internet.
- 14.41** Curtis-KM; Savitz-DA and Arbuckle-TE.1997. Effects of cigarette smoking, caffeine consumption, and alcohol intake on fecundability. Am -J-Epidemiol. 146(1): 32-41. Internet.
- 14.42** D'ius-PB. 1997. Caffeine and children. Environ Health Perspective. Vol. 1:39-41. Internet. Viernes 22 de agosto de 2003 DIARIO OFICIAL 117
- 14.43** Erickson, M.A., Schwarzkopf, R.J. and Mc kenzie, R.D. 1987. Effects of caffeine, fructose, and glucose ingestion on muscle glycogen utilization during exercise. Med. Sci. Sports Exerc. pp. 579-583.
- 14.44** Fennema, O. R. Food Chemistry. 2 Ed. Department of Food Science. INC. Marcel Dekker. 591-92.

- 14.45** Forman-J; Aizer-A and Young-CR. 1997. Myocardial infarction resulting from caffeine overdose in an anorectic woman. *Ann. Emerg-Med.* 29(1): 178-80.
- 14.46** Francis, A.J. and Harmer, P.W. 1993. "Zumos de frutas y bebidas refrescantes". En: *Manual de Industrias de los alimentos*. Editado por: Ranken, M.D. Editorial Acribia. Zaragoza, España. pp. 281-291.
- 14.47** Frazier, W.C. and Westhoff, D.C. (1993) *Microbiología de los Alimentos*. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España. 4a. Edición. pp. 316.
- 14.48** Gisolfi, C.V. and Duchman, S.M. 1992. Guidelines for optimal replacement beverages for different athletic events. In: *Med. Sci. Sports and Exercise*. pp. 679-687.
- 14.49** Guyton, A.C. and Hall, J.E. *Fisiología y Fisiopatología*. En *Fisiología del Deporte*. 6 Ed. McGraw-Hill Interamericana. pp. 678-692.
- 14.50** Hackman, R.M. 1998. The next generation of Sports Drinks. *Nutrition Sci. News*. pp. 1-6. Internet.
- 14.51** Hamada-E; Nakajima-T; Hata-Y et.al. 1997. Effect of caffeine on mucus secretion and agonistdependent Ca²⁺ mobilization in human gastric mucus secreting cells. 1356 (2): 198-206.
- 14.52** Hargreaves, H. and Briggs, A. 1988. Effect of carbohydrate ingestion on exercise metabolism. *American Physiological Society*. pp. 1553-1555.
- 14.53** Higley, N. 1989. "The role of caffeine in soft drinks". In: *Sixth International Caffeine Workshop Proceedings*. International Life Sciences Institute. pp. 1-7.
- 14.54** Howard, R. 1986. *Sanidad alimentaria*. John Wiley and Sons, Inc. pp. 201-218.
- 14.55** Igo, R.S. *Dictionary of Food Ingredients*. 23, 64.
- 14.56** ILSI. 1989. *Sixth International Caffeine Workshop*.
- 14.57** Iturbide, A.G. 1993. "Bebidas carbonatadas" *Diplomado en Verificación Sanitaria Módulo VI. Sistemas de Control de Calidad en la Industria*. Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios.
- 14.58** Kinsey, Smith. *Líquidos y Electrolitos*. Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V. pp. 206-208.
- 14.59** Labell, F. 1992. Sports beverages muscle healthy 10% annual growth. *Food Processing*. pp. 36-40.
- 14.60** Lewis, R.J. 1989. *Food Additives Handbook*. Van Nostrand Reinhold.
- 14.61** Luft, F. C.1990. "Sodio, cloro y potasio" citado en: *Conocimientos actuales sobre nutrición*. 6a. Ed. ILSI- North America. pp. 268-270.
- 14.62** Maughan, R.J. 1991. Fluid and electrolyte loss and replacement in exercise. *J. Sports Sci.* 117-142. Internet.
- 14.63** Maughan, R.J. 1991. Fluid and electrolyte loss and replacement in exercise. In: *Ergogenics: The Enhancement of Sport and Exercise Performance* (eds. D.R. Lamb and H.H. Williams). Benchmark Press, Carmel. pp. 147-178.
- 14.64** Maughan, R.J. 1998. The Sports drink as a functional food: formulations for successful performance. In: *Proceedings of the Nutrition Society*, 57, pp.15-23.
- 14.65** Maughan, R.J. and Leiper, J.B. 1995. Sodium intake and post-exercise rehydration in man. *J. Appl. Physiol.* 71(4): 311-9.
- 14.66** Maughan, R.J., Owen, J.H, Shirreffs, S.M and Leiper, J.B. 1994. Post-exercise rehydration in man: effects of electrolyte addition to ingested fluids. *J. Appl. Physiol.* 69 (3): 209-15. Internet.
- 14.67** Milosevic-A.1997. Sports drink hazard to teeth. *Br-J-Sports-Med.* 31 (1): 28-30. Internet. 118 *Diario Oficial* Viernes 22 de agosto de 2003
- 14.68** Ministerio de Salud y Consumo "Dirección General de Salud Pública". *Compendio de Datos Toxicológicos y de Identidad y Pureza de los Aditivos Alimentarios*.
- 14.69** Nilo, J.L. *Elementos de dietética en las actividades deportivas*. Cap. 31. *Medicina del deporte*. 2a. edición científica La Prensa Médica Mexicana. pp. 370-401.
- 14.70** Okerman, H.W. *Food Science Sourcebook*. 2 ed. Part. 1 pp. 124.
- 14.71** Othmen-Kirk.1984. Carbonated beverages. *Encyclopedia of Chemical Technology*. 3 Ed. pp. 710-712

14.72 Page J.W. and Sullivan, R.J. 1998. Sports Drink. pp. 1-19.

14.73 Pearson. 1996. Bebidas y chocolate. 2 ed. En Composición y análisis de Alimentos pp.391.

14.74 Peters-RC; Veersteeg-E; Bretschneider-F; Brans -RJ; Went-A.1997. Caffeine reduces the efficacy of electroreceptor cell synapses: an electrophysiological single-unit in vivo study. 78(4):1229-38.

14.75 Profeco. Bebidas para deportistas. Revista de Nutrición.

14.76 Rosenstein Ster Emilio. Dr. 1998. "Diccionario de Especialidades para la Industria Alimentaria". Publicado por Ediciones PLM, S.A. de C.V. 8 ava ed.

14.77 Shirreffs, S.M.; Taylor, A.J.; Leiper, J.B. and Maughan, R.J. 1996. Post-exercise rehydration in man: effects of volume consumed and drink sodium content. Med Sci. Sports Exerc. 28 (10): 1260-71.

14.78 Shirreffs, S.M. and Maughan, R.J. 1998. AJP-Renal Physiology. Volume repletion after exerciseinduced volume depletion in humans: replacement of water and sodium losses. Vol. 274, (5) pp. 868-875. Internet.

14.79 Shum-S; Seale-C et Al. 1997. Acute caffeine ingestion fatalities: managements issues. 39 (4): 228-30.

14.80 Wemple-R.D.; Lamb-D.R.; McKeever-K.H. 1997. Caffeine vs caffeine-free sports drinks: effects on urine production at rest and during prolonged exercise. Int-J-Sports-Med.18 (1): 40-6.

14.81 Winick, M. 1994. Ejercicios. En Enciclopedia Columbia de Nutrición pp. 168-181.

15. Vigencia

La presente norma oficial mexicana entrará en vigor a los 60 días naturales posteriores a su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

16. Observancia de la norma

16.1 La vigilancia en el cumplimiento de la presente norma corresponde a la Secretaría de Salud y a los gobiernos de las entidades federativas, en sus respectivos ámbitos de competencia.

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 22 de octubre de 2010.- El Comisionado Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, **Miguel Angel Toscano Velasco**.- Rúbrica.

Apéndice normativo A. Listado de aditivos

Aditivo	Productos	Límite máximo en el producto listo para consumo mg/L
Aceite vegetal bromado ¹	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	15
Acetato isobutirato de sacarosa	Bebidas y congelados	500
Acido acético glacial	Bebidas y congelados	BPF
Acido algínico	Bebidas y congelados	BPF
Acido ascórbico (expresado como ácido ascórbico)	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	BPF
Acido benzoico ³ (expresado como ácido benzoico)	Bebidas, congelados, jarabes y concentrados	600
Acido cítrico	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	BPF
Acido D-L-tartárico	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	BPF
Acido eritórbico (expresado como ácido eritórbico)	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	BPF

Acido fosfórico	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	700
Acido fumárico	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	BPF
Acido L (+) – tartárico	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	2000
Acido láctico	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	BPF
Acido D,L- málico	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	BPF
Acido sórbico ³ (expresado como ácido sórbico)	Bebidas, congelados, jarabes y concentrados	1000
Acido tánico	Bebidas, congelados y polvos, jarabes y concentrados	300
Adipato acetilado de dialmidón	Bebidas y congelados	BPF
Agar	Bebidas y congelados	BPF
Alginato de amonio	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	BPF
Alginato de calcio	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	BPF
Alginato de potasio	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	BPF
Alginato de propilenglicol	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	500
Alginato de sodio	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	BPF
Almidón acetilado	Bebidas, congelados, jarabes y concentrados	BPF
Almidón hidroxipropilado Hidroxipropil de almidón	Bebidas, congelados, jarabes y concentrados	BPF
Almidón oxidado	Bebidas, congelados, jarabes y concentrados	BPF
Aluminosilicato de potasio	Polvos	BPF
Aluminosilicato de sodio	Polvos	BPF
Amarillo ocazo FCF y sus lacas Amarillo alimentos 3 y sus lacas No. C.I. 15895	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	100
Antocianinas	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	2000
Ascorbato de calcio (expresado como ácido ascórbico)	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	BPF
Ascorbato de potasio (expresado como ácido ascórbico)	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	BPF
Ascorbato de sodio (expresado como ácido ascórbico)	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	BPF
Azorrubina y sus lacas Rojo alimentos 3 y sus lacas Carmoisina No. C.I. 14720	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	100

Azul brillante FCF y sus lacas Azul alimentos 2 y sus lacas No. C.I. 42090	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	100
Benzoato de potasio ³ (expresado como ácido benzoico)	Bebidas, congelados, jarabes y concentrados	600
Benzoato de sodio ³ (expresado como ácido benzoico)	Bebidas, congelados, jarabes y concentrados	600
Beta-apo-8'-carotenal Anaranjado alimentos 6 No. C.I. 40820	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	100
Butilhidroxianisol ²	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	1000
Butilhidroxitolueno ²	Bebidas y congelados	1000
Cantaxantina Anaranjado alimentos 8 No. C.I. 40850	Congelados	100
Carbonato de amonio	Polvos	BPF
Carbonato hidrogenado de amonio	Polvos	BPF
Carbonato de calcio	Polvos	BPF
Carbonato de magnesio	Bebidas, congelados y polvos	BPF
Carbonato de potasio	Bebidas, congelados y polvos	BPF
Carbonato de sodio	Bebidas, congelados y polvos	BPF
Carbonato hidrogenado de sodio	Bebidas, congelados y polvos	BPF
Carboximetilcelulosa de sodio	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	BPF
Carotenos naturales Anaranjado alimentos 5 No. C.I. 75130	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	BPF
Carragenina	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	BPF
Celulosa microcristalina	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	BPF
Citrato de isopropilo ²	Bebidas y congelados	100
Citrato tripotásico	Bebidas, congelados y polvos	BPF
Citrato trisódico	Bebidas, congelados y polvos	BPF
Clorofilas Verde natural 3 No. C.I. 75810	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	BPF
Cloruro de magnesio	Bebidas y congelados	BPF
Cloruro de potasio	Bebidas y congelados	BPF
Color caramelo Clase I y II	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	BPF
Color caramelo Clase III y IV	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	800
Curcumina No. C.I. 75300	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	BPF
d-alfa- tocoferol concentrado	Bebidas y congelados	20
Dialmidón glicerol acetilado	Bebidas y congelados	BPF

Diocil sulfosuccinato de sodio	Bebidas, congelados y polvos	10
Dióxido de silicón amorfo	Polvos	BPF
dl-alfa-tocoferol	Bebidas, congelados y polvos	20
Dióxido de titanio Pigmento blanco 6 No. C.I. 77891	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	BPF
Eritorbato de sodio (expresado como ácido eritórbito)	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	BPF
Eritrosina Rojo alimentos 14 No. C.I. 45430	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	100
Estearato de polioxietileno (40)	Bebidas y congelados	500
Estearoil 2 lactilato de calcio	Bebidas, congelados, polvos	2000
Estearoil 2 lactilato de sodio	Bebidas, congelados, polvos	2000
Ester de glicerol de madera rosina	Bebidas, congelados y polvos	150
Ester de glicerol de goma rosina	Bebidas, congelados y polvos	150
Esteres de glicerol de ácidos grasos y ácido diacetil tartárico	Bebidas, congelados, jarabes y concentrados	1000
Esteres de poliglicerol de ácidos grasos	Bebidas y congelados	300
Esteres de poliglicerol del ácido ricinoléico interésterificado	Bebidas y congelados	300
Esteres de propilenglicol de ácidos grasos	Bebidas y congelados	150
Esteres de ácidos grasos y sacarosa	Bebidas y congelados	1000
Etilendiamino tetracetato disódico	Bebidas y congelados	33
Etilendiamino tetracetato cálcico disódico	Bebidas y congelados	33
Etilendiamino tetracetato tetrasódico	Bebidas y congelados	33
Extracto de annato (Extracto de semillas de <i>Bixa orellana</i>) Anaranjado natural 4 No. C.I. 75120	Bebidas, congelados y polvos.	50
Extracto de cempazuchitl (<i>Tagetes erecta</i> L.)	Jarabes y concentrados	BPF
Extracto de cochinilla Extracto de <i>Coccus cacti</i> L No. C.I. 75470	Bebidas, congelados y polvos	BPF
Extracto de tegumento de uva	Bebidas y congelados	2000
Fosfato de dialmidón acetilado	Bebidas, congelados, jarabes y concentrados	BPF
Fosfato de dialmidón	Bebidas y congelados, jarabes y concentrados	BPF
Fosfato de hidroxipropil dialmidón	Bebidas, congelados, jarabes y concentrados	BPF

Fosfato fosfatado de dialmidón	Bebidas, congelados, jarabes y concentrados	BPF
Fosfato de monoalmidón	Bebidas, congelados, jarabes y concentrados	BPF
Fosfato dihidrogenado de calcio	Bebidas, congelados	500
Fosfato dihidrogenado de sodio	Bebidas, congelados	500
Fosfato hidrogenado disódico	Bebidas y congelados	500
Fosfato tricálcico	Bebidas, congelados y polvos	700
Fosfato tripotásico	Bebidas y congelados	700
Fosfato trisódico	Bebidas y congelados	700
Galato de propilo ²	Bebidas y congelados	100
Glucono delta lactona	Polvos	BPF
Goma arábica	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	BPF
Goma damar	Bebidas, congelados, y polvos	BPF
Goma de algarrobo	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	BPF
Goma ghatti	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	BPF
Goma guar	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	BPF
Goma tragacanto	Bebidas, congelados, jarabes y concentrados	BPF
Goma xantana	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	BPF
Hidróxido de magnesio	Bebidas y congelados	BPF
p-hidroxibenzoato de metilo	Bebidas y congelados	1000
Indigotina y sus lacas Azul alimentos 1 y sus lacas No. C.I. 73015	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	100
L (+) Tartrato de potasio	Bebidas y congelados	300
L (+) Tartrato de sodio	Bebidas y congelados	300
Lactato de calcio	Bebidas y congelados	BPF
Lactato de sodio	Bebidas y congelados	BPF
Lecitina	Bebidas, congelados y polvos	BPF
Metil celulosa	Bebidas y congelados	BPF
Monoestearato de glicerilo	Bebidas, congelados y polvos	BPF
Monoestearato de sorbitán	Bebidas, congelados y polvos	500
Monoestearato de sorbitán polioxietilenado (20)	Bebidas y congelados	500
Monolaurato de sorbitán polioxietilenado (20)	Bebidas y congelados	100

Monooleato de sorbitán polioxietileno (20)	Bebidas y congelados	500
Oleoresina de paprika	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	BPF
Oxistearina	Bebidas y congelados	BPF
Pectinas ³	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	BPF
Polidimetilsiloxano	Bebidas, congelados, jarabes y concentrados	10
Polifosfato de potasio	Bebidas, congelados, y polvos	1000
Polifosfato de sodio	Bebidas, congelados, y polvos	1000
Ponceau 4R Rojo alimentos 7 No. C.I. 16255	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	50
p- hidroxibenzoato de propilo	Bebidas, congelados	1000
Propionato de sodio	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	BPF
Resina de guayaco	Bebidas, congelados	1000
Riboflavina	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	50
Riboflavina- 5'- fosfato de sodio	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	50
Rojo allura AC y sus lacas Rojo alimentos 17 y sus lacas No. C.I. 16035	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	300
Rojo betabel	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	BPF
Silicato de calcio	Polvos	BPF
Sorbato de potasio ³ (expresado como ácido sórbico)	Bebidas, congelados, jarabes y concentrados	1000
Sorbato de sodio ³ (expresado como ácido sórbico)	Bebidas, congelados, jarabes y concentrados	1000
Tartracina y sus lacas Amarillo alimentos 4 y sus lacas No. C.I. 19140	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	100
Tocoferoles concentrados (mezcla)	Bebidas, congelados y polvos	BPF
Triestearato de sorbitán polioxietileno (20)	Congelados	500
Verde rápido FCF y sus lacas Verde alimentos 3 y sus lacas No. C.I. 42053	Bebidas, congelados, polvos, jarabes y concentrados	100

¹ Índice de yodo = 16,0; Ácidos grasos libres (como ácido oleico) = 2,5%

² Cantidad máxima referida al peso total de los aceites esenciales.

³ La mezcla no debe exceder de 600 mg/L tomando en cuenta el límite máximo de cada aditivo.

APENDICE NORMATIVO B.**METODOS DE PRUEBA****B 1. DETERMINACION DE CAFEINA EN BEBIDAS NO ALCOHOLICAS.****B 1.1 Principio del método.**

La cafeína es extraída de la muestra con cloroformo y determinada espectrométricamente a una longitud de onda de 276 nm.

B 1.2 Equipo.

B 1.2.1 Espectrómetro de UV-Visible disponible para utilizarse a 276 nm.

B 1.2.2 Balanza analítica con una precisión de 0,1 mg.

B 1.3 Materiales.

B 1.3.1 Matraces volumétricos de 100 mL.

B 1.3.2 Probetas de 100 mL.

B 1.3.3 Vasos de precipitados de 250 mL.

B 1.3.4 Embudos de separación de 125 mL.

B 1.3.5 Pipetas graduadas de 1 y 10 mL.

B 1.4 Reactivos.

Todos los reactivos deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y por agua se entiende agua destilada.

B 1.4.1 Sulfito de sodio anhidro (Na_2SO_3)

B 1.4.2 Tiocianato de potasio (KSCN).

B 1.4.3 Acido fosfórico (H_3PO_4).

B 1.4.4 Hidróxido de sodio (NaOH).

B 1.4.5 Cloroformo (CHCl_3).

B 1.4.6 Cafeína ($\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$)

B 1.4.7 Permanganato de potasio (KMnO_4).

B 1.4.8 Solución reductora.

Disolver 5 g de Na_2SO_3 y 5 g de KSCN en agua y llevar a un volumen de 100 mL.

B 1.4.9 Solución diluida de ácido fosfórico.

Diluir 15 mL de H_3PO_4 con 85 mL de agua.

B 1.4.10 Solución de hidróxido de sodio.

Disolver 25 g de NaOH en 75 mL de agua.

B 1.4.11 Solución patrón de cafeína de 1 mg/mL.

Disolver exactamente 100 mg de cafeína en cloroformo y llevar a un volumen de 100 mL con el mismo solvente.

B 1.4.12 Solución de permanganato de potasio al 1,5%.

Pesar 1,5 g de KMnO_4 y disolver en 100 mL de agua.

B 1.5 Procedimiento.

B 1.5.1 Preparación de la curva patrón.

B 1.5.1.1 Medir los siguientes volúmenes de solución patrón de cafeína, de acuerdo con la Tabla número 1 y llevar a un volumen de 100 mL con cloroformo.

Tabla No. 1

Matraz	mL solución patrón de cafeína	mg cafeína/100 mL
1	0,00	Blanco
2	0,10	0,10
3	0,25	0,25
4	0,50	0,50
5	1,00	1,00
6	1,50	1,50
7	2,00	2,00

B 1.5.1.2 Determinar la absorbancia de cada una de las soluciones patrón a 276 nm.

B 1.5.1.3 Elaborar una gráfica de la lectura de absorbancia para cada una de las soluciones patrón en función de su concentración (en mg/100mL). Ajustar la curva mediante regresión lineal (método de mínimos cuadrados). Lo anterior, puede llevarse a cabo en equipos que se programan directamente en los cuales sólo es necesario leer los estándares y marcar su concentración teórica.

B 1.5.2 Preparación de la muestra.

B 1.5.2.1 Eliminar el gas de la muestra por agitación o con ultrasonido.

B 1.5.2.2 Medir 10 mL de muestra en un embudo de separación de 125 mL, adicionar 5 mL de solución de permanganato de potasio al 1,5% y mezclar.

B 1.5.2.3 Después de exactamente 5 minutos, añadir 10 mL de la solución reductora y mezclar.

B 1.5.2.4 Adicionar 1 mL de solución diluida de ácido fosfórico, mezclar, añadir 1 mL de solución de hidróxido de sodio y mezclar.

B 1.5.2.5 Extraer con 50 mL de cloroformo durante un minuto. Dejar separar las fases y drenar la fase inferior filtrando a través de papel filtro. Colectar en un matraz volumétrico de 100 mL.

B 1.5.2.6 Añadir de 2-3 mL de cloroformo al embudo de separación y drenar a través del papel.

B 1.5.2.7 Lavar el papel con 2-3 mL de cloroformo. Extraer nuevamente con 40 mL de cloroformo filtrando y lavando el papel filtro como se describió anteriormente y diluir al volumen con cloroformo.

B 1.5.2.8 Determinar la absorbancia a 270 nm.

B 1.6 Cálculos

De la ecuación de la recta obtenida.

$$y = mx + b$$

Donde:

y = Absorbancia obtenida en la muestra ya procesada.

m = Pendiente (coeficiente de absortividad).

x = mg cafeína/100 mL en la muestra.

b = Ordenada al origen.

Despejar "x" y obtener directamente los mg de cafeína/100 mL de bebida.

mg cafeína/100 mL = mg de cafeína/100 mL obtenidos de la curva X $\frac{100}{F.D.}$

10

Donde:

F.D. = Factor de dilución.

B 1.7 Expresión de resultados.

mg cafeína/100 mL.

B 2 DETERMINACION DE MATERIA EXTRAÑA.**B 2.1 Principio del método.**

La materia extraña se separa de la muestra mediante flotación o sedimentación de acuerdo a la naturaleza del producto y posteriormente se filtra para su identificación al microscopio.

B 2.2 Equipo.

B 2.2.1 Balanza granataria con una precisión de 0.1 g.

B 2.2.2 Equipo de filtración al vacío.

B 2.2.3 Microscopio binocular estereoscópico con objetivos que pueden ser de 3, 6, 7 y 10X y oculares apareados de amplio campo visual de 10, 30 y 100X, respectivamente.

B 2.2.4 Lámpara para el microscopio o luz natural equivalente.

B 2.2.5 Parrilla de calentamiento con agitación magnética.

B 2.3 Materiales.

B 2.3.1 Matraz trampa de Wildman, formado por un matraz Erlenmeyer de 1 o 2 L, provisto de una varilla metálica con un tapón de émbolo de hule en un extremo.

B 2.3.2 Embudo de Hirsch o Buchner para filtración al vacío.

B 2.3.3 Caja de Petri.

B 2.3.4 Papel de filtración rápida del número 8 rayado para conteo o rayado a lápiz con líneas paralelas de aproximadamente 5 mm de separación.

B 2.3.5 Aguja de disección.

B 2.3.6 Material de uso común en el laboratorio.

B 2.4 Reactivos.

Todos los reactivos deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y por agua se entiende agua destilada.

B 2.4.1 Heptano (C_7H_{16}).

B 2.4.2 Acido clorhídrico (HCl) de 36,5 a 38,0% de pureza.

B 2.4.3 Aceite mineral. Aceite de parafina, blanco y ligero. Con un peso específico de 0,840-0,860 (24°C).

B 2.4.4 Glicerina ($C_3H_8O_3$)

B 2.4.5 Mezcla de glicerina: etanol 1:3 (v/v).

B 2.4.6 Mezclar un volumen de glicerina con 3 volúmenes de etanol.

B 2.5 Procedimiento.

B 2.5.1 Determinación de materia extraña en bebidas no alcohólicas embotelladas o en lata.

B 2.5.1.1 Homogeneizar bien la muestra y filtrar 250 mL sobre un embudo de succión, preparado con papel filtro para conteo, tratando de verterlo uniformemente.

B 2.5.1.2 Colocar el filtro con residuo en una caja de Petri, y humedecerla con la mezcla de glicerina/etanol (opcional). Examinar al microscopio utilizando una luz suficientemente fuerte para que muestre los detalles en el papel filtro.

B 2.5.1.3 Contar explorando con una aguja de disección sobre toda la superficie del papel, línea por línea, y explorar cada pieza del material, porque algunos fragmentos son irreconocibles a menos que se muevan.

B 2.5.2 Determinación de materia extraña en concentrados, jarabes y aguas frescas preparadas.

B 2.5.2.1 Homogeneizar bien la muestra. En el caso de concentrados y jarabes reconstituir la muestra siguiendo las instrucciones de la etiqueta.

B 2.5.2.2 En un matraz trampa de Wildman medir 250 mL de muestra, adicionar 15 mL de aceite mineral y agregar agitando vigorosamente suficiente cantidad de agua caliente (70°C), hasta que la capa de aceite llegue al cuello del matraz. Dejar reposar 30 minutos.

B 2.5.2.3 Girar suavemente la varilla de metal, para atrapar la capa de aceite, levantándolo e introduciéndolo lo más que se pueda en el cuello del matraz.

B 2.5.2.4 Mantener el émbolo en su lugar y decantar el líquido que está sobre él a un embudo de succión preparado con un filtro para conteo, tratando de verterlo uniformemente.

B 2.5.2.5 Colocar el filtro con residuo en una caja de Petri, y humedecerla con la mezcla de glicerinaetanol (opcional). Examinar al microscopio utilizando una luz suficientemente fuerte para que muestre los detalles en el papel filtro.

B 2.5.2.6 Contar explorando con una aguja de disección sobre toda la superficie del papel, línea por línea, y explorar cada pieza del material, porque algunos fragmentos son irreconocibles a menos que se muevan.

B 2.5.2.7 En caso de que la muestra contenga tejidos de frutas emplear el siguiente procedimiento:

B 2.5.2.7.1 Pesar en un vaso 100 g de la muestra y adicionar 200 mL de agua caliente (Aprox. a 50°C). Transferir al matraz trampa, adicionar 10 mL de ácido clorhídrico y hervir por 3 minutos.

B 2.5.2.7.2 Enfriar a temperatura ambiente, adicionar 25 mL de heptano y agitar perfectamente. Bajar la varilla de metal y el tapón émbolo de hule, añadir el agua necesaria para que la capa de heptano suba al cuello del matraz.

B 2.5.2.7.3 Dejar reposar por 15 minutos. Girar suavemente la varilla de metal, para remover el sedimento fino que se acumuló en la superficie del tapón émbolo.

B 2.5.2.7.4 Atrapar la capa de heptano levantándolo e introduciéndolo lo más que se pueda en el cuello del matraz. Mantener el émbolo en su lugar y decantar el líquido que está sobre él a un embudo de succión preparado con un papel filtro para conteo, tratando de verterlo vigorosamente.

B 2.5.2.7.5 Añadir nuevamente 25 mL de heptano al matraz trampa para hacer una segunda extracción heptano sobre el embudo de succión, lavar la varilla y el cuello del matraz con heptano y verterlo sobre el mismo embudo.

B 2.5.2.7.6 Examinar al microscopio utilizando una luz suficientemente fuerte para que muestre los detalles en el papel filtro. Contar explorando con una aguja de disección sobre toda la superficie del papel, línea por línea, voletear y explorar cada pieza del material, porque algunos fragmentos son irreconocibles a menos que se muevan. No contar material dudoso.

B 2.5.3 Determinación de materia extraña en polvos para preparar bebidas.

B 2.5.3.1 Homogeneizar la muestra. Pesar en un vaso 50 g de muestra y adicionar de 400-500 mL de agua agitar bien hasta que toda la muestra se disuelva y aplicar el mismo procedimiento seguido en B 2.5.1

B 2.6 Expresión de resultados.

Presencia o ausencia de insectos enteros, fragmentos de insectos, pelos de roedor, excretas o cualquier materia extraña encontrada en 50 g, 100 g o 250 mL de producto, según corresponda.

B 3 DETERMINACION DE QUININA EN BEBIDAS CARBONATADAS.

B 3.1 Principio del método.

La quinina es determinada espectrométricamente en medio ácido a una longitud de onda de 347.5 nm.

B 3.2 Equipo.

B 3.2.1 Espectrómetro de UV-Visible disponible para utilizarse a 347.5 nm.

B 3.2.2 Balanza analítica con una precisión de 0.1 mg.

B 3.2.3 Agitador magnético.

B 3.3 Materiales.

B 3.3.1 Matraces volumétricos de 100 mL.

B 3.3.2 Probetas de 100 mL.

B 3.3.3 Vasos de precipitados de 250 mL.

B 3.4 Reactivos.

Todos los reactivos deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y por agua se entiende agua destilada.

B 3.4.1 Quinina ($C_{20}H_{24}N_2O_2$). Secada a 100°C durante 3 horas.

B 3.4.2 Acido clorhídrico concentrado (HCl).

B 3.4.3 Solución de ácido clorhídrico 0,5 N.

B 3.4.4 Solución patrón de quinina de 1 mg/mL. Pesar exactamente 100 mg de quinina en un matraz volumétrico de 100 mL. Adicionar 20 mL de ácido clorhídrico 0,5 N y llevar al volumen con agua. Mezclar.

B 3.5 Procedimiento.

B 3.5.1 Preparación de la curva patrón.

B 3.5.1.1 Medir los siguientes volúmenes de solución patrón de quinina, de acuerdo con la Tabla No. 2, en matraces volumétricos de 100 mL.

Tabla No.2

Matraz	mL solución patrón de quinina	mg quinina/ L
1	0,00	Blanco
2	0,50	5,0
3	1,00	10,0
4	2,00	20,0
5	3,00	30,0
6	4,00	40,0
7	5,00	50,0
8	6,00	60,0

B 3.5.1.2 Adicionar a cada matraz 20 mL de ácido clorhídrico 0.5 N. Llevar al volumen con agua y mezclar.

B 3.5.1.3 Determinar la absorbancia de cada las soluciones patrón a 347,5 nm.

B 3.5.1.4 Elaborar una gráfica de la lectura de absorbancia para cada una de las soluciones estándar en función de su concentración (en mg/L). Ajustar la curva mediante regresión lineal (método de mínimos cuadrados). Lo anterior, puede llevarse a cabo en equipos que se programan directamente, en los cuales sólo es necesario leer los estándares y marcar su concentración teórica.

B 3.5.2 Preparación de la muestra.

B 3.5.2.1 Vaciar el contenido de la botella o lata en un vaso de precipitados. Agitar magnéticamente hasta eliminar el gas.

B 3.5.2.2 Medir 50 mL de la muestra degasificada en un matraz volumétrico de 100 mL y adicionar 20 mL de ácido clorhídrico 0,5 N y llevar al volumen con agua. Mezclar.

B 3.5.2.3 Determinar la absorbancia a 347,5 nm.

B 3.6 Cálculos.

De la ecuación de la recta obtenida.

$$y = mx + b$$

Donde:

y = Absorbancia obtenida en la muestra ya procesada.

m = Pendiente (coeficiente de absortividad).

x = mg quinina/L en la muestra.

b = Ordenada al origen.

Despejar "x" y obtener directamente de la curva los mg de quinina/L.

Para obtener la cantidad de quinina en la muestra aplicar la siguiente ecuación:

$$\text{mg quinina/L} = \text{mg quinina/L obtenidos de la curva estándar} \times 100 \times \text{F.D.} \times 50$$

Donde:

F.D. = Factor de dilución.

B 3.7 Expresión de resultados.

mg quinina / L.

B 4 DETERMINACION DE SULFITOS EN ALIMENTOS. METODO OPTIMIZADO DE MONIER-WILLIAMS.

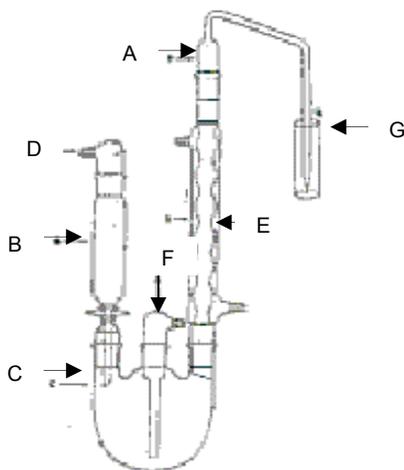
B 4.1 Principio del método.

El método mide sulfitos libres más porciones reproducibles de sulfitos ligados, tales como productos carbonílicos, en alimentos. La muestra es calentada con ácido clorhídrico (HCl) en reflujo para convertir el sulfato a SO_2 (sulfitos). El nitrógeno introducido a la solución arrastra el SO_2 a través del condensador enfriado por agua y pasa a una solución del H_2O_2 al 3% donde el SO_2 se oxida a ácido sulfúrico (H_2SO_4). El contenido de sulfito es directamente relacionado al H_2SO_4 generado, el cual es determinado por titulación con hidróxido de sodio (NaOH) estandarizado.

Aplicable para la determinación de ≥ 10 ppm de sulfitos en alimentos. Aplicable en presencia de otros compuestos volátiles de azufre, no aplicable a cebollas secas, puerros y calabazas.

B 4.2 Equipo.

B 4.2.1 Aparato de Destilación (nota: En este método la presión dentro del aparato está limitada a la presión propia de la solución de H_2O_2 al 3% encima del extremo del burbujeador, mantener la presión baja para evitar la pérdida del SO_2 a través del goteo). Usar una película delgada de vaselina en las superficies que sellan en todas las juntas, excepto en la junta entre el matraz y el embudo de separación. Poner pinza en cada junta para asegurar que sellen completamente.



- A) Adaptador de entrada
- B) Embudo de separación
- C) Matraz de fondo redondo
- D) Entrada de gas
- E) Condensador
- F) Burbujeador
- G) Probeta

B 4.2.2 Ensamblar el aparato según se muestra en la figura siguiente:

B 4.2.3 Bureta de 10 mL con tubo de sobrellenado y conexiones para tubo Ascarita o el equivalente para permitir mantener una atmósfera libre de CO_2 sobre el hidróxido de sodio 0,01N estandarizado.

B 4.3 Reactivos.

Todos los reactivos deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y por agua se entiende agua desionizada.

B 4.3.1 Acido clorhídrico (HCl) acuoso 4N. Para cada análisis, preparar 90 mL de esta solución mezclando 30 mL de HCl y 60 mL de agua desionizada.

B 4.3.2 Indicador de rojo de metilo. Disolver 250 mg de rojo de metilo en 100 mL de etanol.

B 4.3.3 Titulante estandarizado. Hidróxido de sodio (NaOH) 0,010N Estandarizar la solución con estándar de ftalato ácido de potasio.

B 4.3.4 Solución de peróxido de hidrógeno al 3% (H_2O_2). Para cada análisis, diluir 3 mL de H_2O_2 al 30% con 30 mL de agua desionizada. Justo antes de usarse, agregar 3 gotas de indicador de rojo de metilo y titular con hidróxido de sodio (NaOH) 0,010N a un punto final amarillo, si el punto final excedió, descartar la solución.

B 4.3.5 Nitrógeno de alta pureza. Usar un regulador para mantener el flujo de 200 mL/min. Para evitar oxígeno en el nitrógeno se usa una trampa tipo cromatografía de gases.

B 4.4 Preparación de la muestra.

B 4.4.1 Sólidos.

Transferir 50g de alimento o la cantidad que contenga de 500 a 1500 μg de SO_2 , a un procesador de alimentos o licuadora. Agregar 100 mL de etanol-agua (5+95 v/v) y mezclar. Licuar sólo hasta que el alimento pueda pasar por la junta 24/40 del matraz.

B 4.4.2 Líquidos.

Mezclar 50g de muestra, o la cantidad que contenga de 500 a 1500 µg de SO₂ con 100 mL de la mezcla etanol-agua.

Nota: Llevar a cabo la preparación de la muestra y el análisis tan rápido como sea posible para evitar la pérdida de formas lábiles de sulfito.

B 4.5 Preparación del sistema.

B 4.5.1 Usando el aparato ensamblado y el matraz puesto en la manta de calentamiento, agregar 400 mL de agua al matraz.

B 4.5.2 Cerrar la llave del embudo de separación y agregar 90 mL de HCl 4N.

B 4.5.3 Empezar con el flujo de nitrógeno. Iniciar el flujo en el refrigerante.

B 4.5.4 Colocar el recipiente con 30 mL de H₂O₂, el cual ha sido titulado a punto final amarillo con NaOH 0,010N.

B 4.5.5 Después de 15 min, el aparato y el agua estarán completamente desoxigenadas y la porción de muestras debe ser introducida al sistema.

B 4.5.6 Remover el embudo de separación y cuantitativamente transferir la muestra al matraz.

B 4.5.7 Limpiar la junta y rápidamente aplicar grasa de silicón y regresarlo a su lugar.

B 4.5.8 El flujo de nitrógeno a través de la solución de H₂O₂ al 3% se reanuda tan pronto como se coloca el embudo en la junta del matraz. Examinar cada junta para asegurar que esté sellado. Usar un bulbo con válvula para aplicar presión sobre el HCl. Abrir la llave y dejar pasar el HCl al matraz. Continuar sosteniendo la válvula para mantener la suficiente presión sobre la solución de ácido para forzarla a pasar. Cerrar la llave antes de que los últimos 2-3 mL drenen para evitar que el SO₂ escape hacia el embudo de separación.

B 4.5.9 Calentar la manta al calentamiento y regular para calentar lo suficiente, obteniendo de 80 a 90 gotas/min del condensador.

B 4.5.10 Dejar 1 h 45 min y remover el vaso.

B 4.6 Procedimiento

Inmediatamente titular el contenido del vaso o probeta con hidróxido de sodio 0,010N a punto final amarillo y que persista ≥ 20 segundos.

B 4.7 Cálculos.

Calcular el contenido de sulfitos, como sigue:

$$\mu\text{g SO}_2/\text{g} = \frac{32,03 \times \text{VB} \times \text{N} \times 1000}{\text{peso de muestra}}$$

Donde:

32,03 = peso milequivalente del SO₂

VB = Volumen (ML) del NaOH

N = Normalidad del NaOH

1000 = Factor para convertir milequivalentes a microequivalentes

Peso de muestra: cantidad de muestra que se introdujo al matraz

B 5 DETERMINACION DE SULFITOS POR GRAVIMETRIA (OPCIONAL).

B 5.1 Después de la titulación, llevar el contenido del recipiente a un vaso de 400 mL agregar 4 gotas de HCl 1N y un exceso de solución de BaCl₂ al 10% y dejar reposar toda la noche.

B 5.2 Lavar el precipitado por decantación 3 veces con agua caliente a través de un Gooch previamente pesado. Lavar con 20 mL de alcohol etílico y 20 mL de éter y secar a 105°-110°C.

B 5.3 Determinar el blanco de reactivos para la titulación y para el método gravimétrico y considerarlo en el cálculo de los resultados.

B 5.4 Preparación del Aparato de Filtración

B 5.4.1 Unir el receptáculo con un filtro de fibra de vidrio.

B 5.4.2 Colocar lo anterior en el matraz kitasato.

B 5.4.3 Lavar el filtro con 10 mL de agua caliente, desionizada y después con 10 mL de etanol usando vacío.

B 5.4.4 Quitar el filtro y secarlo a 110°C durante 12 horas o más. Transferir a desecador para enfriar a temperatura ambiente. Pesar (Wb).

B 5.4.5 Colocar el filtro en el receptáculo de vidrio.

B 5.5 Precipitado de BaSO₄

B 5.5.1 Pasar el precipitado por el filtro. Lavar con agua para asegurar que todo ha sido filtrado.

B 5.5.2 Pasar 10 mL de etanol a través del precipitado y filtrar con vacío.

B 5.5.3 Remover el filtro y secar en estufa a 110°C durante toda la noche.

B 5.5.4 Transferir a desecador, enfriar y pesar (Wp).

B 5.6 Cálculos.

Calcular el contenido de sulfitos como sigue:

$$\mu\text{g SO}_2/\text{g} = \frac{[(Wp - Wb) \times 274,46]}{\text{g muestra}}$$

Donde:

Wp = Peso de papel filtro con el precipitado de BaSO₄ a peso constante

Wb = Peso de papel filtro preparado y puesto a peso constante

B 5.7 Ensayos de Recuperación.

B 5.7.1 Para familiarizarse y eficientizar el método antes de realizar la rutina, analizar porciones de muestra que contengan cantidades conocidas de sulfitos.

B 5.7.2 Realizar los análisis de manera que se omita cualquier pérdida de sulfitos por oxidación o reacción con los componentes en el alimento.

B 5.7.3 Debido a que los sulfitos son reactivos con el aire y con algunas matrices alimenticias y dado que carecen de estabilidad, se debe fortificar con fuentes estables de sulfitos, no sulfito de sodio o sales similares.

B 5.7.4 El hidroximetil sulfonato de sodio (HMS), el cual es estructuralmente similar a algunas formas combinadas de sulfitos en alimentos, es útil para preparar porciones de prueba fortificada.

B 5.7.5 Para el análisis, transferir 50g de muestra de alimento libre de sulfitos al matraz. Agregar una alícuota de solución de la sal sódica de hidroximetil sulfonato. Analizar inmediatamente.

B 5.7.6 Recuperaciones de > 80% del HMS con matrices alimenticias de 10 ppm son recomendables para asegurar una adecuada exactitud analítica.

B 5.8 Informe de las pruebas.

$\mu\text{g SO}_2/\text{g}$

B 6 DETERMINACION DE SODIO (Na) POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA CON ADITAMENTO DE FLAMA

B 6.1 Fundamento

La muestra se somete a una digestión ácida con ácido nítrico concentrado para que el analito liberado sea cuantificado por espectrofotometría de absorción atómica.

B 6.2 Reactivos

B 6.2.1 Acido nítrico (HNO₃) concentrado grado suprapuro

B 6.2.2 Acido nítrico (HNO₃) concentrado G.R.

B 6.2.3 Estándar certificado de Na de 1000 µg/mL

B 6.2.4 Agua deionizada

B 6.3 Materiales

B 6.3.1 Sistema de reflujo

B 6.3.2 Material común de laboratorio

B 6.3.3 Papel filtro No. 1

B 6.4 Equipo

B 6.4.1 Balanza analítica con una sensibilidad de 0.1 mg

B 6.4.2 Espectrofotómetro de absorción atómica con aditamento de flama**B 6.4.3** Parrilla de calentamiento**B 6.4.4** Lámpara de cátodo hueco de sodio**B 6.5** Preparación de la muestra para ensayo**B 6.5.1** Productos sólidos

Tomar una cantidad representativa de la muestra a analizar. Si es necesario moler el producto mediante un molino o un mortero. Evitar cualquier contaminación durante esta manipulación. Mezclar bien.

B 6.5.2 Productos líquidos

Mezclar bien el producto antes de abrir el recipiente. A continuación transvertir a un recipiente de vidrio o de plástico descontaminado. Guardar en el refrigerador (4°C). Mezclar bien antes del uso.

B 6.5.3 Descontaminación del material

En una cubeta de polietileno (volumen aproximado de 15L) introducir 10L de mezcla ácido nítrico/agua (1:1). En este baño descontaminar durante una noche todos los matraces aforados, tapones, recipientes de polietileno o de polipropileno, así como todo el material de vidrio necesario. Enjuagar con agua destilada. Secar.

B 6.6 Procedimiento

B 6.6.1 Se pesa de 1,0 a 2,0 g de muestra en un matraz de fondo plano de 250 mL con boca esmerilada, se le añaden 10 mL de HNO₃ grado suprapuro y se digieren por calentamiento en un sistema de reflujo durante 2 h o hasta digestión completa.

B 6.6.2 La muestra se enfría y se filtra a través de papel filtro No. 1 y se recibe en un matraz aforado de 100 mL.

B 6.6.3 Se lava tres veces el matraz de la digestión con tres porciones de 10 mL de agua deionizada y los lavados se filtran y se reciben en el matraz aforado, se lleva a volumen con agua deionizada.

B 6.6.4 Ajustar el espectrofotómetro de acuerdo a las recomendaciones del fabricante usando un estándar certificado.

B 6.6.5 Se leen las muestras y se anotan los resultados obtenidos en µg/mL, de acuerdo a lo siguiente:

B 6.6.5.1 Longitud de onda: 589,6 nm

B 6.6.5.2 Llama: aire-acetileno, oxidante

Nota: Se recomienda meter una muestra añadida para valorarla y hacer un blanco de reactivos para cada serie de digestiones.

B 6.6.6 Cálculo

$$\text{mg/kg Na}^+ = \frac{(A-B) \times C}{D}$$

En donde:

A = µg/mL de Na⁺ en la muestra

B = µg/mL de Na⁺ en el blanco

C = mL de aforo de la muestra

D = peso de la muestra en g tomada para el análisis

B 6.6.6.1 Sensibilidad del método: 0,15 µg/mL para 1% de absorción.

B 7 ANALISIS MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTOS OBJETO DE ESTA NORMA

B 7.1 Procedimiento para la preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

B 7.1.1 Fundamento

La dilución primaria tiene por objeto obtener una distribución lo más uniforme posible de los microorganismos contenidos en la muestra destinada para el análisis. La preparación de diluciones decimales adicionales, si son necesarias, tiene como objetivo reducir el número de microorganismos por unidad de volumen, para permitir, después de la incubación, la observación de la prueba en el caso de tubos o matraces y la cuenta de colonias en el caso de placas.

B 7.1.2 Reactivos

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

B 7.1.2.1 Preparación de reactivos**B 7.1.2.1.1 Solución de hidróxido de sodio 1,0 N**

Ingredientes	Cantidades
Hidróxido de sodio	4,0 g
Agua	100 mL

Preparación:

Disolver el hidróxido de sodio y llevar a 100 mL con agua.

B 7.1.2.1.2 Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada).

Ingredientes	Cantidades
Fosfato de sodio monobásico	34,0 g
Agua	1,0 L

Preparación:

Disolver el fosfato en 500 mL de agua y ajustar el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio 1,0 N.

Llevar a un litro con agua.

Esterilizar durante 15 minutos a $121^{\circ} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$.

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 $121^{\circ} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos.

Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deberán ser iguales a los iniciales.

B 7.1.2.1.3 Agua peptonada

Ingredientes	Cantidades
Peptona	1,0 g
Cloruro de sodio	8,5 g
Agua	1,0 L

Preparación:

Disolver los componentes en un litro de agua.

Ajustar el pH a $7 \pm 0,1$ con hidróxido de sodio 1,0 N.

Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 mL o en cualquier volumen múltiplo de nueve según se requiera.

Esterilizar a $121 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos.

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 7.1.3 Materiales

B 7.1.3.1 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.

B 7.1.3.2 Frascos de vidrio de 250 mL con tapón de rosca.

B 7.1.3.3 Tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca.

B 7.1.3.4 Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc.

B 7.1.3.5 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 en autoclave, durante 15 minutos como mínimo a $121 \pm 1,0^\circ\text{C}$.

B 7.1.3.6 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 7.1.4 Aparatos e instrumentos

B 7.1.4.1 Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de 170°C.

B 7.1.4.2 Autoclave con termómetro y manómetro, calibrada con termómetro de máximas y mínimas.

B 7.1.4.3 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 $45 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

B 7.1.4.4 Licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato o bien un homogeneizador peristáltico (Stomacher).

B 7.1.4.5 Vasos para licuadora con tapa esterilizables o bolsas estériles para homogeneizador peristáltico.

B 7.1.4.6 Balanza granataria con sensibilidad de 0,1 g.

B 7.1.5 Procedimiento

B 7.1.5.1 Preparación de la dilución primaria.

B 7.1.5.1.1 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 minutos y homogeneizar agitando vigorosamente.

B 7.1.5.1.2 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 7.1.5.1.2.1 Agitar la muestra manualmente con 25 movimientos de arriba a abajo en un arco de 30 cm efectuados en un tiempo de 7 segundos. 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 7.1.5.1.2.2 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 7.1.5.1.3 A partir de muestras sólidas o semisólidas.

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

B 7.1.5.1.3.1 Pesar una cantidad de 10 u 11 g de la muestra por analizar en un recipiente o bolsa plástica estériles de tamaño adecuado.

B 7.1.5.1.3.2 Adicionar un volumen de 90 a 99 mL del diluyente llevado a una temperatura similar a la de la muestra.

B 7.1.5.1.3.3 Operar la licuadora o el homogeneizador peristáltico de 1 a 2 minutos 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 minutos.

B 7.1.5.1.3.4 Permitir que las partículas grandes se sedimenten, y transferir la cantidad deseada tomando de las capas superiores de la suspensión.

B 7.1.5.1.3.5 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.

B 7.1.5.1.3.6 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 7.1.5.2 Preparación de las diluciones decimales adicionales.

B 7.1.5.2.1 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 7.1.5.2.2 Mezclar cuidadosamente cada botella de diluyente siempre de la misma manera que se describe en el punto B 7.1.5.1.

B 7.1.5.2.3 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 7.1.5.2.4 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 7.1.5.2.5 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 una área de la caja Petri sin líquido.

B 7.1.5.2.6 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.

B 7.1.5.2.7 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.

B 7.1.5.2.8 El criterio para seleccionar las diluciones a preparar de acuerdo con el número de microorganismos esperado es:

B 7.1.5.2.8.1 Para la técnica del número más probable utilizar tres tubos: donde sea posible demostrar el microorganismo en 10 mL de la dilución más alta.

B 7.1.5.2.8.2 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 7.1.6 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 minutos posteriores a su preparación.

B 7.2 Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

B 7.2.1 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 7.2.2 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.

B 7.2.3 Medios de Cultivo.

B 7.2.3.1 Agar Triptona-Extracto de Levadura (agar para cuenta estándar).

Ingredientes	Cantidades
Extracto de levadura	2,5 g
Triptona	5,0 g
Dextrosa	1,0 g
Agar	15,0 g
Agua	1,0 L

Preparación del medio de cultivo.

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 $121 \pm 1,0^\circ\text{C}$, durante 15 minutos. El pH final del medio debe ser $7,0 \pm 0,2$ a 25°C .

Si el medio de cultivo es utilizado inmediatamente, enfriar a $45^\circ\text{C} \pm 1,0^\circ\text{C}$ 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 7.2.4 Materiales

Todo el material que tenga contacto con las muestras o los microorganismos debe estar estéril. Se requieren, los materiales mencionados en el apartado B 7.1

B 7.2.5 Aparatos e instrumentos

Se requiere, además de los mencionados en B.7.1, los siguientes:

B 7.2.5.1 Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de $\pm 1,0^{\circ}\text{C}$, provista con termómetro calibrado.

B 7.2.5.2 Contador de colonias de campo obscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadrículada y lente amplificador.

B 7.2.5.3 Registrador mecánico o electrónico.

B 7.2.5.4 Microscopio óptico.

B 7.2.5.5 Baño de agua con o sin circulación mecánica, provista con termómetro calibrado con divisiones de hasta $1,0^{\circ}\text{C}$ y que mantenga la temperatura a $45 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$.

B 7.2.6 Preparación de la muestra

Para la preparación de la muestra seguir el numeral B 7.1.

B 7.2.7 Procedimiento

B 7.2.7.1 Distribuir las cajas estériles en la mesa de trabajo de manera que la inoculación; la adición de medio de cultivo y homogeneización, 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 7.2.7.2 Después de inocular las diluciones de las muestras preparadas según en B 7.1 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 7.2.7.3 Incluir una caja sin inóculo por cada lote de medio y diluyente preparado como testigo de esterilidad.

B 7.2.7.4 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 minutos.

B 7.2.7.5 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
Psicrotrofícos	$20 \pm 2^{\circ}\text{C}$	3 - 5 días
Psicrofílicos	$5 \pm 2^{\circ}\text{C}$	7 - 10 días

B 7.2.7.6 En la lectura seleccionar aquellas placas donde aparezcan entre 25 a 250 UFC, para disminuir el error en la cuenta.

B 7.2.7.7 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 7.2.8 Cálculos del método.

B 7.2.8.1 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 7.2.8.2 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 7.2.8.3 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 7.2.8.4 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 7.2.8.5 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 o 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 7.2.8.6 Colonias extendidas.- Las colonias extendidas pueden presentarse en las siguientes formas:

B 7.2.8.6.1 Cadenas de colonias no separadas claramente entre sí, que parecen ser causadas por la desintegración de un cúmulo de bacterias.

B 7.2.8.6.2 Colonias que se desarrollan en película entre el agar y el fondo de la caja.

B 7.2.8.6.3 Colonias que se desarrollan en película en la orilla de la caja sobre la superficie del agar.

B 7.2.8.6.4 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 7.2.8.6.5 Cuando es necesario contar en cajas que contienen colonias extendidas que no están incluidas en el numeral B 7.2.8.6.4, contar cualquiera de los demás tipos especificados en el numeral B 7.2.8.6.4, como provenientes de una sola fuente.

B 7.2.8.6.6 En el caso de las colonias de las que se habla en el primer guión, del numeral B 7.2.8.6.1, 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.

B 7.2.8.6.7 Las colonias mencionadas en el primer y tercer guión, generalmente se observan como crecimiento diferenciable de otras colonias y se cuentan como tales. Los crecimientos mencionados en el cuarto apartado, 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 7.2.8.7 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 7.2.8.8 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 7.2.8.9 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 7.2.8.10 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 en placa, véase el cuadro 2, ejemplo 9.

B 7.2.8.11 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 7.2.9 Informe de la prueba

Reportar como: Unidades formadoras de colonias, ___ UFC/g o mL, de bacterias aerobias en placa en agar tripton 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	Colonias contadas			UFC/ g o mL
	1:100	1:1,000	1:10,000	
1	>250	178	16	180,000
	>250	190	17	
2	>250	220	25	250,000
3	18	2	0	1,600
	14	0	0	
4	>250	>250	512	5,000,000
	>250	>250	495	
5	>250	235	Crecimiento extendido	
6	0	0	0	<100
7	>250	240	24	250,000
	>250	268	19	
8	>250	216	23	280,000
	>250	262	42	
9	>250	215	20	23,000
	>250	235	26	
	>250	275	32	270,000
	>250	225	26	

B 7.3 Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.

B 7.3.1 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 7.3.2 Reactivos

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

B 7.3.2.1 Soluciones diluyentes

Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada)

Ingredientes	Cantidades
Fosfato monopotásico	34,0 g
Agua	1,0 l

Preparación

Disolver el fosfato en 500 mL de agua y ajustar el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio 1,0 N.

Llevar con agua a un litro.

Esterilizar a 121± 1,0°C durante 15 minutos. 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 minutos a 121± 1,0°C.

Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

Agua peptonada

Ingredientes	Cantidades
Peptona	1,0
NaCl	8,5 g
Agua	1,0 l

Preparación:

Disolver los componentes en un litro de agua.

Ajustar el pH a 7,0 con hidróxido de sodio 1,0 N.

Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 mL o en cualquier volumen múltiplo de nueve según se requiera.

Esterilizar durante 15 minutos a $121 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$.

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 7.3.2.2 Medio de cultivo

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

Ingredientes	Cantidades
Peptona	7,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Lactosa	10,0 g
Sales biliares	1,5 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal violeta	0,002 g
Agar	15,0 g
agua	1,0 l

Preparación:

Mezclar los componentes en el agua y dejar reposar durante algunos minutos.

Mezclar perfectamente y ajustar el pH a 7,4 con ácido clorhídrico 0,1N o con hidróxido de sodio 0,1N a 25°C , de forma que después del calentamiento se mantenga en este valor.

Calentar con agitación constante y hervir durante 2 minutos.

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 7.3.3 Materiales

B 7.3.3.1 Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 mL (o si es necesario de 11 y 2 mL), con tapón de algodón.

B 7.3.3.2 Las pipetas pueden ser graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total.

B 7.3.3.3 Frascos de vidrio de 250 mL con tapón de rosca.

B 7.3.3.4 Tubos de 16 X 150 mm con tapón de rosca.

B 7.3.3.5 Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc.

B 7.3.3.6 Cajas Petri.

B 7.3.3.7 Todo el material e instrumentos que tengan contacto con las muestras bajo estudio debe esterilizarse mediante:

B 7.3.3.8 Horno, durante 2 h a 170 - 175°C, o 1 h a 180°C; o en autoclave, durante 15 minutos como mínimo a $121 \pm 1,0^\circ\text{C}$.

B 7.3.3.9 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 7.3.4 Aparatos e instrumentos

B 7.3.4.1 Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de 170°C.

B 7.3.4.2 Autoclave con termómetro y manómetro, calibrada con termómetro de máximas y mínimas.

B 7.3.4.3 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 $45 \pm 1,0^\circ\text{C}$.

B 7.3.4.4 Licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato o bien un homogeneizador peristáltico (Stomacher).

B 7.3.4.5 Vasos para licuadora con tapa esterilizables o bolsas estériles para homogeneizador peristáltico.

B 7.3.4.6 Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de $\pm 1,0^\circ\text{C}$, provista con termómetro calibrado.

B 7.3.4.7 Contador de colonias de campo oscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadrículada y lente amplificador.

B 7.3.4.8 Registrador mecánico o electrónico.

B 7.3.4.9 Microscopio óptico.

B 7.3.4.10 Potenciómetro con una escala mínima de 0,1 unidades de pH a 25°C .

B 7.3.5 Preparación de la muestra

La preparación de la muestra debe ser de acuerdo a lo establecido en la sección B 7.1 "Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico."

B 7.3.6 Procedimiento

B 7.3.6.1 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 7.3.6.2 Repetir el procedimiento tantas veces como diluciones decimales se requiera sembrar, utilizando una pipeta estéril diferente para cada dilución.

B 7.3.6.3 Vertir de 15 a 20 mL del medio RVBA fundido y mantenido a $45 \pm 1,0^\circ\text{C}$ 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 minutos.

B 7.3.6.4 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 7.3.6.5 Preparar una caja control con 15 mL de medio para verificar la esterilidad.

B 7.3.6.6 Después de que está el medio completamente solidificado en la caja, verter aproximadamente 4 mL del medio RVBA a $45 \pm 1,0^\circ\text{C}$ en la superficie del medio inoculado. Dejar que solidifique.

B 7.3.6.7 Invertir las placas y colocarlas en la incubadora a 35°C , durante 24 ± 2 horas.

B 7.3.6.8 Después del periodo especificado para la incubación, contar las colonias con el contador de colonias.

B 7.3.6.9 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 2,0 mm.

B 7.3.7 Cálculos del método**B 7.3.7.1 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 punto B 7.2.8.1 "Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa."

B 7.3.7.2 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 7.3.7.3 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 7.3.8 Informe de la prueba

Informar: UFC/g o mL en placa de agar rojo violeta bilis, incubados a 35°C durante 24 ± 2h. 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 7.4 Método para la determinación de *Salmonella* spp. en alimentos.**B 7.4.1 Fundamento**

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

B 7.4.1.1 Preenriquecimiento, es el paso donde la muestra es enriquecida en un medio nutritivo no selectivo, que permite restaurar las células de *Salmonella* spp. dañadas a una condición fisiológica estable.

B 7.4.1.2 Enriquecimiento selectivo, empleado con el propósito de incrementar las poblaciones de *Salmonella* spp. e inhibir otros organismos presentes en la muestra.

B 7.4.1.3 Selección en medios sólidos, en este paso se utilizan medios selectivos que restringen el crecimiento de otros géneros diferentes a *Salmonella* spp. y permite el reconocimiento visual de colonias sospechosas.

B 7.4.1.4 Identificación bioquímica, este paso permite la identificación genérica de los cultivos de *Salmonella* spp. y la eliminación de cultivos sospechosos falsos.

B 7.4.1.5 Serotipificación, es una técnica serológica que permite la identificación específica de un cultivo.

B 7.4.2 Reactivos

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 7.4.2.1 Medios de pre-enriquecimiento**B 7.4.2.1.1 Agua de peptona tamponada**

Ingredientes	Cantidades
Peptona	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Fosfato sódico dibásico	3,5 g
Fosfato potásico monobásico	1,5 g
Agua	1,0 L

Preparación

Disolver los componentes en agua, calentando si es necesario.

Ajustar el pH, si es necesario, después de la esterilización a 7,0.

Distribuir en recipientes de vidrio esterilizables con la capacidad necesaria para obtener las porciones necesarias para la prueba.

Esterilizar por 20 min a 121 ± 1°C.

B 7.4.2.1.2 Caldo lactosado

Ingredientes	Cantidades
Extracto de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Lactosa	5,0 g
Agua destilada	1,0 g
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°C \pm 1°C.

B 7.4.2.2 Medios de enriquecimiento**B 7.4.2.2.1 Caldo selenito-cistina**

Ingredientes	Cantidades
Tristona o polipeptona	5,0 g
Lactosa	4,0 g
Fosfato disódico	10,0 g
Selenito ácido de sodio	4,0 g
L- cistina	0,01 g
Agua destilada	1,0 l
pH final 7,0 \pm 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°C \pm 1°C, tomando entonces un color salmón.

B 7.4.2.2.2 Caldo tetratonato

Ingredientes	Cantidades
Proteosa peptona o triptona	5,0 g
Sales biliares	1,0 g
Carbonato de calcio	10,0 g
Tiosulfato de sodio pentahidratado	30,0
Agua destilada	1,0 l
pH final 7,0 \pm 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 7.4.2.2.3 Vassiliadis-Rappaport

Solución A	
Ingredientes	Cantidades
Tristona	5,0 g
Cloruro de sodio	8,0 g
Fosfato de potasio hidrogenado	1,6 g
Agua destilada	1,0 l

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

Solución B	
Ingredientes	Cantidades
Cloruro de magnesio hexahidratado	400 g
Agua destilada	1,0 l

Disolver el cloruro de magnesio en 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	
Ingredientes	Cantidades
Oxalato de verde de malaquita	0,4 g
Agua destilada	100 mL

Disolver el oxalato de verde de malaquita en agua.

Conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

Medio completo	
Ingredientes	Cantidades
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.

Distribuir antes de usar dentro de tubos en cantidades de 10 mL.

Almacenar en refrigeración.

B 7.4.2.2.4 Caldo de soya tripticasa

Ingredientes	Cantidades
Tripticasa o triptosa	17,0 g
Fitona	3,0 g
Glucosa	2,5 g
Cloruro de sodio	2,5 g
Agua destilada	1,0 g
pH final 7,3 ± 0,2	

Preparación

Disolver los ingredientes en 1 litro 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°C ± 1°C.

B 7.4.2.2.5 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 $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 15 min. El volumen final debe corregirse para mantener 225 mL.

B 7.4.2.2.6 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 7.4.2.3 Medios de aislamiento**B 7.4.2.3.1** Agar verde brillante (VB)

Ingredientes	Cantidades
Extracto de levadura	3,0 g
Polipeptona (proteosa peptona No. 3)	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Lactosa	10,0 g
Sacarosa	10,0 g
Rojo de fenol	0,08 g
Agar	20,0 g
Verde brillante	0,0125 g
Agua destilada	1,0 l
pH final $6,9 \pm 0,2$	

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 $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. 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 7.4.2.3.2 Agar con sulfito de bismuto

Ingredientes	Cantidades
Extracto de carne de res	5,0 g
Mezcla de peptonas	10,0 g
Glucosa	5,0 g
Fosfato disódico (anhidro)	5,0 g
Sulfato ferroso (anhidro)	0,3 g
Sulfito de bismuto	8,0 g
Verde brillante	0,025 g
Agar	20,0 g
Agua destilada	1,0 l
pH final	$7,6 \pm 0,2$

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 7.4.2.3.3 Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)

Ingredientes	Cantidades
Xilosa	3,75 g
L- lisina	5,0 g
lactosa	7,5 g
Sacarosa	7,5 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Rojo de fenol	0,08 g
Agar	15,0 g
Desoxocolato de sodio	2,5 g
Citrato férrico- amónico	0,8 g
Tiosulfato de sodio	6,8 g
Agua destilada	1,0 l
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 7.4.2.3.4 Agar para *Salmonella* y *Shigella* (SS)

Ingredientes	Cantidades
Extracto de carne	5,0 g
Polipeptona	5,0 g
Lactosa	10,0 g
Sales biliares	8,5 g
Citrato de sodio dihidratado	8,5 g
Tiosulfato de sodio pentahidratado	8,5 g
Citrato férrico	1,0 g
Agar	13,5 g
Rojo neutro	0,025 g
Verde brillante	0,33 mg
Agua destilada	1,0 L
pH final 7,0 ± 0,2	

Preparación

Suspender los ingredientes en un litro 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 7.4.2.3.5 Agar entérico Hektoen

Ingredientes	Cantidades
Proteosa peptona	12,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Lactosa	12,0 g
Sacarosa	12,0 g
Salicilina	2,0 g
Sales biliares	9,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Tiosulfato de sodio	5,0 g
Citrato amónico férrico	1,5 g
Azul de bromotimol	0,064 g
Fascina ácida	0,1 g
Agar	13,5 g
Agua	1,0 L
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 7.4.2.4 Medios para pruebas bioquímicas**B 7.4.2.4.1 Agar de tres azúcares y hierro (TSI)**

Ingredientes	Cantidades
Peptona de carne	1,0 g
Paptona de caseína	1,0 g
Cloruro de sodio	0,5 g
Lactosa	1,0 g
Sacarosa	1,0 g
Glucosa	0,1 g
Agar	1,3 g
Rojo de fenol	2,5 mg
Sulfato ferroso amónico pentahidratado	20,0 mg
Tiosulfato de sodio	20,0 mg
Agua destilada	100 mL
pH final 7,3 ± 0,2	

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°C ± 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 7.4.2.4.2 Agar de hierro y lisina (LIA)

Ingredientes	Cantidades
Peptona de gelatina	0,5 g
Extracto de levadura	0,3 g
Glucosa	0,1 g
L-lisina	1,0 g
Citrato férrico amónico	50 mg
Tiosulfato de sodio anhidro	4,0 mg
Púrpura de bromocresol	2,0 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°C ± 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 7.4.2.4.3 Agar nutritivo

Ingredientes	Cantidades
Extracto de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1,0 l
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°C ± 1°C por 15 min. Inclinan los tubos antes que el agar solidifique.

B 7.4.2.4.4 Medio de SIM (para Sulfuro, Indol y Movilidad)

Ingredientes	Cantidades
Extracto de carne	3,0 g
Peptona	30,0 g
Hierro peptonizado	0,20 g
Tiosulfato de sodio	0,025 g
Agua destilada	1,0 l
pH final	7,3 ± 0,2

Preparación

Suspender los ingredientes en el agua destilada, calentar a ebullición agitando frecuentemente hasta lograr una disolución completa.

Enfriar 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°C ± 1°C durante 15 min. Se dejan enfriar los tubos en posición vertical.

B 7.4.2.4.5 Agar citrato de Simmons

Ingredientes	Cantidades
Fosfato de amonio	1,0 g
Fosfato dipotásico	1,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Citrato de sodio	2,0 g
Sulfato de magnesio	0,20 g
Azul de bromotimol	0,08 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1,0 l
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°C ± 1°C durante 15 min.

Dejar enfriar los tubos en posición inclinada.

B 7.4.2.4.6 Caldo MR-VP (Rojo de metilo-Voges Proskauer)

Ingredientes	Cantidades
Peptona	7,0 g
Dextrosa	5,0 g
Difosfato de potasio	5,0 g
Agua destilada	1,0 l
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°C ± 1°C durante 15 min.

B 7.4.2.4.7 Caldo manitol

Ingredientes	Cantidades
Extracto de carne	1,0 g
Proteosa peptona	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Rojo de fenol	0,018 g
Manitol	10,0 g
Agua	1,0 l
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°C ± 1°C durante 15 min.

B 7.4.2.4.8 Caldo malonato

Ingredientes	Cantidades
Extracto de levadura	1,0 g
Sulfato de amonio	2,0 g
Fosfato dipotásico	0,6 g
Fosfato monopotásico	0,6 g
Cloruro de sodio	2,0 g
Malonato	3,0 g
Glucosa	0,250 g
Azul de bromotimol	0,025 g
Agua	1,0 l
pH final	6,7 ± 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°C ± 1°C durante 15 min.

B 7.4.2.4.9 Caldo urea

Ingredientes	Cantidades
Urea	20,0 g
Extracto de levadura	0,1 g
Fosfato monopotásico	9,10 g
Fosfato dipotásico	9,5 g
Rojo de fenol	0,01 g
Agua	1,0 l
pH final	6,8 ± 0,2

Preparación

Disolver los ingredientes en agua destilada.

NO CALENTAR. Esterilizar por filtración a través de membrana 0,45 µm 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 7.4.2.4.10 Caldo de urea rápido

Ingredientes	Cantidades
Urea	20, 0 g
Extracto de levadura	0,10 g
Fosfato monopotásico	0,091 g
Fosfato dipotásico	0,095 g
Rojo de fenol	0,010 g
Agua	1,0 l
pH final	6,8 ± 0,2

Preparación

Disolver los ingredientes en agua destilada.

NO CALENTAR. Esterilizar por filtración a través de membrana 0,45 µm.

Distribuir asépticamente de 1,5 a 3 mL en tubos estériles de 13 x 100 mm.

B 7.4.2.4.11 Caldo infusión cerebro corazón

Ingredientes	Cantidades
Infusión cerebro corazón	200,0 g
Infusión de corazón de res	250,0 g
Proteosa peptona	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Fosfato disódico dodecahidratado	2,5 g
Dextrosa	2,0 g
Agua destilada	1,0 l
pH final	7,4 ± 0,2

Preparación

Disolver los ingredientes en agua destilada, calentar suavemente.

Distribuir y esterilizar a 121°C ± 1°C durante 15 min.

B 7.4.2.5 Soluciones**B 7.4.2.5.1 Solución verde brillante al 0,1% (1:1000)**

Ingredientes	Cantidades
Verde brillante	0,1 g
Agua destilada estéril	100,0 mL

Disolver 0,1 g de verde brillante en agua destilada estéril hasta completar 100 mL.

B 7.4.2.5.2 Solución de yodo-yoduro

Ingredientes	Cantidades
Cristales de yodo	6,0 g
Yoduro de potasio	6,0 g
Agua destilada	100,0 mL

Disolver los cristales y el yoduro de potasio en agua destilada hasta completar 100 mL.

Conservar en frasco ámbar.

B 7.4.2.5.3 Solución salina al 0,85%

Ingredientes	Cantidades
Cloruro de sodio	0,85 g
Agua destilada	100,0 mL

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

B 7.4.2.5.4 Solución salina formalizada

Ingredientes	Cantidades
Solución de formaldehído (36-38 %)	6,0 mL
Cloruro de sodio	8,5 g
Agua destilada	1,0 L

Disolver 8,5 g de cloruro de sodio en 1 litro de agua destilada. Esterilizar a 121°C ± 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 7.4.2.5.5 Reactivo de Kovac

Ingredientes	Cantidades
p-dimetil-aminobenzaldehído	5,0 g
Alcohol amílico	75,0 mL
Acido clorhídrico concentrado	25,0 mL

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

B 7.4.2.5.6 Solución de alfa-naftol al 5%

Ingredientes	Cantidades
Alfa-naftol	5,0 g
Alcohol	100,0 mL

Disolver 5 g de alfa-naftol en alcohol hasta completar 100 mL.

B 7.4.2.5.7 Solución de rojo de metilo

Ingredientes	Cantidades
Rojo de metilo	0,10 g
Alcohol etílico	300,0 mL
Agua destilada c.b.p.	500,0 mL

Disolver el rojo de metilo en el alcohol etílico y adicionar agua hasta completar 500 mL.

B 7.4.2.5.8 Solución de hidróxido de potasio al 40%

Ingredientes	Cantidades
Hidróxido de potasio	40,0 g
Agua destilada	100,0 mL

Disolver 40 g de hidróxido de potasio en agua hasta completar 100 mL.

B 7.4.2.5.9 Solución de gelatinasa al 5%

Ingredientes	Cantidades
Gelatinasa	5,0 g
Agua	100,0 mL

Disolver 5 g de gelatinasa en 100 mL de agua destilada. NO CALENTAR.

B 7.4.2.6 Antisueros**B 7.4.2.6.1** Antisuero polivalente somático (O)**B 7.4.2.6.2** Antisuero polivalente flagelar (H)**B 7.4.2.6.3** Antisuero Vi**B.7.4.3** Material**B 7.4.3.1** Matraces Erlenmeyer de 500 mL

B 7.4.3.2 Recipientes de boca ancha, de capacidad apropiada para contener las muestras simples y compuestas

B 7.4.3.3 Angulos de vidrio**B 7.4.3.4** Cucharas, bisturíes, cuchillos y pinzas**B 7.4.3.5** Tubos de ensaye de 16 x 150 mm y de 20 x 100 mm

B 7.4.3.6 Tubos para serología de 10 x 75 mm o de 13 x 100 mm

B 7.4.3.7 Pipetas bacteriológicas de 10,0 y 5,0 mL, graduadas en 0,1 mL y protegidas con tapón de algodón

B 7.4.3.8 Pipetas de 1 mL, con graduaciones de 0,01 mL

B 7.4.3.9 Cajas de petri estériles de vidrio o desechables

B 7.4.3.10 Rejillas para tubos de ensaye

B 7.4.3.11 Asa de platino o nicromel de aproximadamente 3 mm de diámetro

B 7.4.3.12 Papel pH (intervalo de 6-8) con graduaciones máximas de 0,4 unidades de pH para cambios de color

B 7.4.3.13 Todo el material que tenga contacto con las muestras bajo estudio debe esterilizarse mediante:

B 7.4.3.14 Horno, durante 2 horas a 170-175°C o autoclave, durante 15 min como mínimo a 121°C ± 1°C

B 7.4.4 Equipo

B 7.4.4.1 Horno para esterilizar que alcance los 180°C

B 7.4.4.2 Incubadora con termostato para evitar variaciones mayores de ± 0,1°C y termómetro

B 7.4.4.3 Autoclave con termómetro o manómetro, probado con termómetro de máximas

B 7.4.4.4 Baño maría con termostato y termómetro

B 7.4.4.5 Balanza granataria con sensibilidad de 0,1 g

B 7.4.4.6 Licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato, con vasos esterilizables (vidrio o aluminio)

B 7.4.4.7 Mecheros Bunsen o Fisher

B 7.4.4.8 Potenciómetro

B.7.4.5 Procedimiento

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 7.4.5.1 Procedimiento general para la preparación de muestras

B 7.4.5.1.1 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.

B 7.4.5.1.2 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 ± 0,2 con hidróxido de sodio 1N o ácido clorhídrico 1N estériles. Mezclar y cubrir el recipiente enroscando suavemente la tapa. Incubar 24 ± 2 h a 35°C. Continuar como se indica en el punto i) del numeral 7.4.5.2

B 7.4.5.2 Aislamiento de Salmonella

B 7.4.5.2.1 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 7.4.5.2.2 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 7.4.5.2.3 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 7.4.5.2.4 Examinar las placas para investigar la presencia de colonias típicas de *Salmonella*, de acuerdo con las siguientes características:

B 7.4.5.2.5 Agar XLD: colonias rosas o rojas que pueden ser transparentes con o sin centro negro. En algunos casos las colonias pueden aparecer completamente negras.

B 7.4.5.2.6 Agar VB: colonias rojas o rosas que pueden ser transparentes rodeadas por medio enrojecido; las bacterias fermentadoras de la lactosa dan colonias amarillas.

B 7.4.5.2.7 Agar entérico Hektoen: colonias verdes o azulverdes con o sin centro negro. En algunos casos las colonias pueden aparecer completamente negras.

B 7.4.5.2.8 Agar Sulfito de Bismuto: las colonias típicas de *Salmonella* pueden ser cafés, 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.

B 7.4.5.2.9 Agar SS: colonias translúcidas, ocasionalmente opacas. Algunas colonias dan centro negro. Las colonias fermentadoras de la lactosa son rojas.

B 7.4.5.3 Identificación bioquímica

B 7.4.5.3.1 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 si es necesario retomar más colonias. Observar el crecimiento en los tubos y considerar presuntivamente positivas para *Salmonella* las colonias que den las siguientes reacciones:

B 7.4.5.3.2 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 7.4.5.3.3 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* spp. producen ácido sulfhídrico en este medio con ennegrecimiento a lo largo de la punción.

B 7.4.5.3.4 Retener todos los cultivos que muestren las reacciones características de *Salmonella* en los medios TSI y LIA para las pruebas adicionales, indicadas en el punto B.7.4.5.3.5.

B 7.4.5.3.5 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 7.4.5.3.6 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 7.4.5.3.7 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 7.4.5.3.8 Prueba de ureasa

B 7.4.5.3.8.1 Prueba de ureasa (convencional).

Con un 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 7.4.5.3.8.2 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.

B 7.4.5.3.8.3 Descartar todos los cultivos que den ureasa positiva. Retener los cultivos que den la prueba negativa (sin cambio de color del medio).

B 7.4.5.4. Identificación serológica

B 7.4.5.4.1 Ensayo de los antígenos somáticos de *Salmonella* (Antisuero polivalente O)

B 7.4.5.4.1.1 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 7.4.5.4.1.2 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 7.4.5.4.1.3 Agitar inclinando la lámina hacia atrás y hacia adelante durante aproximadamente un min. Observar bajo buena iluminación sobre un fondo oscuro.

B 7.4.5.4.1.4 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 7.4.5.4.1.5 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 7.4.5.4.1.6 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 7.4.5.4.1.7 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 al Laboratorio Nacional de Salud Pública.

B 7.4.5.4.2 Si se requiere, practicar el ensayo de los antígenos flagelares de *Salmonella* (Antisuero polivalente H).

B 7.4.5.4.2.1 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 7.4.5.4.2.2 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 una 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 7.4.5.5 Pruebas bioquímicas complementarias

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

Interpretar los cambios en los medios inoculados conforme lo siguiente:

B 7.4.5.5.1 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 7.4.5.5.2 Medio SIM

Inocular por punción.

Incubar 24 h a 35 ± 2°C.

B 7.4.5.5.2.1 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.

B 7.4.5.5.2.2 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.

B 7.4.5.5.2.3 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 7.4.5.5.3 Caldo RM-VP

Inocular un tubo con el medio.

Incubar 48 ± 2 h a 35 ± 2°C para la prueba de VP y 96 h para la prueba RM.

B 7.4.5.5.3.1 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 ± 2°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 ± 2°C.

B 7.4.5.5.3.2 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 7.4.5.5.4 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 7.4.5.5.5 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 7.4.5.5.6 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 7.4.6 Cálculo y expresión de resultados**B 7.4.6.1 Interpretación de reacciones bioquímicas y serológicas.****CUADRO 1**

Reacciones bioquímicas	Reacciones serológicas	Interpretación
Típica	Antígeno O, Vi o H positivo	Cepas consideradas como <i>Salmonella</i> spp.
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>

Nota: ver figura 1

CUADRO 2

Prueba o sustrato	Positivo	Negativo	Reacción
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	Amarillo o gas	No hay cambio de color ni gas	+ b
Caldo KCN	Crecimiento	No hay crecimiento	-
Caldo malonato	Azul	No hay cambio de color	- c
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	- c
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 o 2 días; -, 90% o más negativas en 1 o 2 días; v, variable.

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

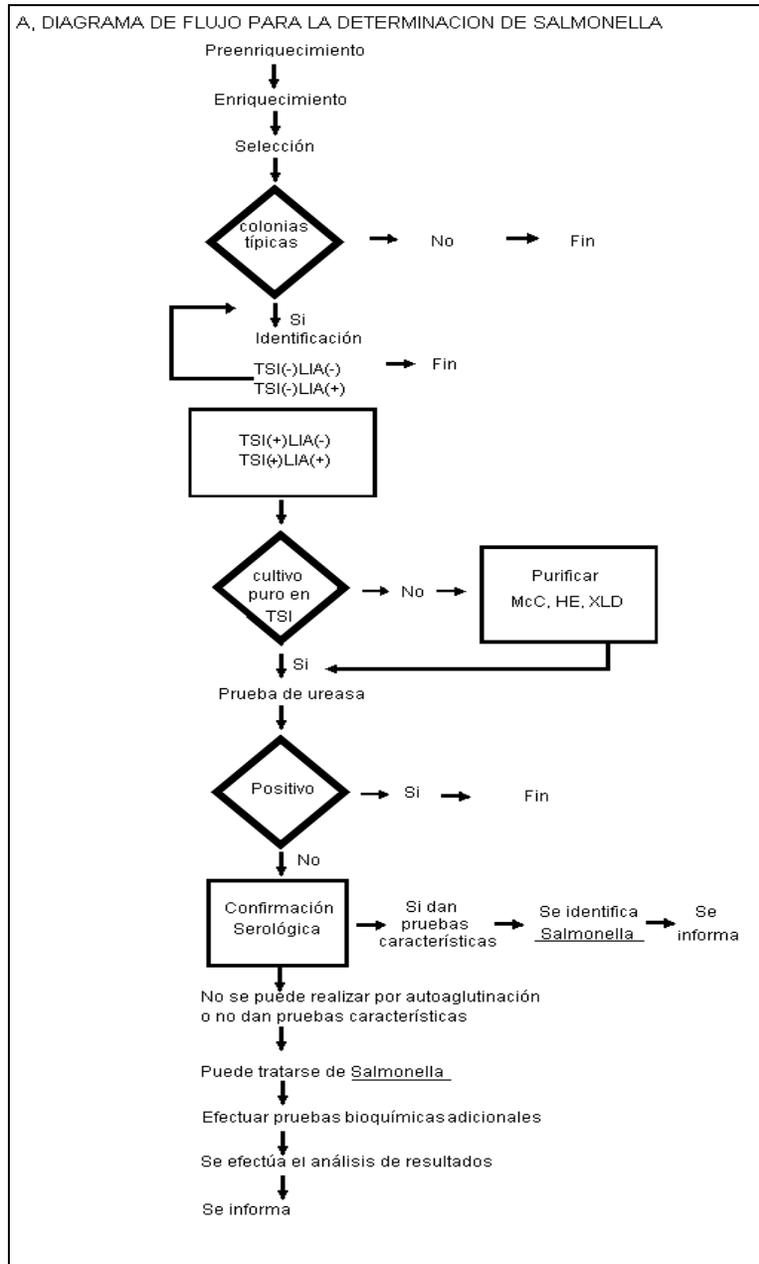
c La mayoría de los cultivos *S. arizonae* son positivos.

B 7.4.6.2 Informe de resultados

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

Figura 1

DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA IDENTIFICACION DE SALMONELLA



B 7.5 Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable

B 7.5.1 Fundamento

El método se basa en que las bacterias coliformes, fermentan la lactosa incubadas a 35 ± 1°C durante 24 a 48 horas, resultando una producción de ácidos y gas el cual se manifiesta en las campanas de fermentación.

B 7.5.2 Reactivos

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 7.5.2.1 Soluciones diluyentes**B 7.5.2.1.1 Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada)**

Ingredientes	Cantidades
Fosfato monopotásico	34,0 g
Agua	1,0 l

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 minutos a $121 \pm 1,0$ °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 minutos a 121 ± 1 °C.

Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

B 7.5.2.1.2 Agua peptonada

Ingredientes	Cantidades
Peptona	1,0 g
Cloruro de sodio	8,5 g
Agua	1,0 l

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 minutos a $121 \pm 1,0$ °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 7.5.2.2 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 7.5.2.2.1 Caldo lactosado**CUADRO 1**

Ingredientes	Medio de concentración 1,5	Medio de concentración sencilla
Extracto de carne	4,5 g	3,5 g
Peptona de gelatina	7,5 g	5,0 g
Lactosa	7,5 g	5,0 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 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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 minutos a $121 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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 7.5.2.2.2 Caldo lauril sulfato triptosa.

CUADRO 2

Ingredientes	Medio de concentración 1,5	Medio de concentración sencilla
Triptosa	30 g	20 g
Lactosa	7,5 g	5,0 g
Fosfato dipotásico	4,125 g	2,75 g
Fosfato monopotásico	4,125 g	2,75 g
Cloruro de sodio	7,5 g	5,0 g
Laurel 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 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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 minutos a $121 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Se recomienda almacenar el medio una vez preparado.

Las campanas de fermentación no deben de 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 7.5.2.2.3 Caldo lactosa bilis verde brillante

Ingredientes	Cantidades
Peptona	10,0 g
Lactosa	10,0 g
Sales biliares	20,0 g
Verde brillante	0,013 g
Agua	1,0 L

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 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Distribuir el medio en cantidades de 10 mL en tubos de 16 X 160 mm conteniendo campana de fermentación. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a $121 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Las campanas de fermentación no deben contener burbujas de aire después de la esterilización.

B 7.5.2.3 Materiales

B 7.5.2.3.1 Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 mL (o si es necesario de 11 y 2 mL), con tapón de algodón.

B 7.5.2.3.2 Las pipetas pueden ser graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total.

B 7.5.2.3.3 Frascos de vidrio de 250 mL con tapón de rosca.

B 7.5.2.3.4 Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc.

B 7.5.2.3.5 Tubos de cultivo 20 x 200 mm y de 16 x 160 mm con tapones metálicos o de rosca.

B 7.5.2.3.6 Campanas de fermentación (tubos de Durham).

B 7.5.2.3.7 Pipetas bacteriológicas graduadas de 10 y 1 mL.

B 7.5.2.3.8 Gradillas.

B 7.5.2.3.9 Asa de platino o nicromel de aproximadamente 3 mm de diámetro.

B 7.5.2.3.10 Todo el material que tenga contacto con las muestras bajo estudio debe esterilizarse mediante:

B 7.5.2.3.11 Horno, durante 2 horas a 170 a 175 °C o 1 h a 180 °C o autoclave, durante 15 minutos como mínimo a 121 ± 1,0 °C.

B 7.5.2.3.12 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 7.5.2.4 Aparatos e instrumentos

B 7.5.2.4.1 Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de 170 °C.

B 7.5.2.4.2 Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de ± 1,0 °C, provista con termómetro calibrado.

B 7.5.2.4.3 Termómetro de máximas y mínimas.

B 7.5.2.4.4 Autoclave que alcance una temperatura mínima de 121 ± 1,0 °C.

B 7.5.2.4.5 Potenciómetro con una escala mínima de 0,1 unidades de pH a 25 °C.

B 7.5.2.5 Preparación de la muestra

Seguir el procedimiento como lo indica el punto B.7.1 "Procedimiento para la preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológicos".

B 7.5.2.6 Procedimiento

B 7.5.2.6.1 Para agua potable y hielo

B 7.5.2.6.1.1 Prueba presuntiva

B 7.5.2.6.1.1.1 Inoculación. Agitar la muestra. Transferir volúmenes de 10 mL de muestra a cada uno de 5 tubos con 20 mL de caldo lactosado de mayor concentración y 1,0 mL y 0,1 mL de muestra a cada uno de los tubos de las series de 5 respectivamente con 10 mL de caldo lactosado de concentración sencilla o caldo laurel sulfato triptosa con púrpura de bromocresol.

B 7.5.2.6.1.1.2 Incubación. Incubar los tubos a 35 °C. Examinar a las 24 ± 2 h y observar si hay formación de gas o la formación de gas no se observa en este tiempo, incubar por 48 ± 2 h.

B 7.5.2.6.1.2 Prueba confirmativa

De cada tubo que muestre formación de gas, tomar una azada y sembrar en un número igual de tubos con medio de confirmación, caldo lactosa lauril bilis verde brillante. Incubar a 35 ± 0,5 °C por 24 ± 2 horas o si la formación de gas no se observa en este tiempo, incubar por 48 ± 2 horas.

En esta Norma Oficial Mexicana, para el análisis de agua potable, agua purificada así como hielo, se emplea la serie de 5 tubos inoculados, 5 tubos con 10 mL, 5 tubos con 1 mL y 5 tubos con 0,1 mL, véase el cuadro 4.

B 7.5.2.6.2 Para sólidos.

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

B 7.5.2.6.2.1 Prueba presuntiva

B 7.5.2.6.2.1.1 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 7.5.2.6.2.1.2 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 7.5.2.6.2.1.3 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 7.5.2.6.2.1.4 Incubación. Incubar los tubos a $35 \pm 0,5$ °C por 24 ± 2 horas y observar si hay formación de gas, en caso contrario prolongar la incubación hasta 48 ± 2 horas.

B 7.5.2.6.2.2 Prueba confirmativa

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

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 7.5.2.7 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.

B 7.5.2.7.1 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.

B 7.5.2.7.2 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.

B 7.5.2.7.3 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.

B 7.5.2.7.4 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 g), 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		
	tubos incubados, para las siguientes cantidades								
J	de muestra inoculada por tubo								
E	Producto								
M	líquido	(ml)	10	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	Producto	Otros
P									
L	Otros								
O	productos	(g)	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	líquido	productos
mayor dilución = menor concentración									
								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>	<u>0</u>	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, 1,0 y 0,1 g)**

Combinación de positivos	Índice del NMP por g	3 tubos por dilución 95 % límites de confianza		5 tubos por dilución 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	0,13
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	0,17
2-2-0	0,21	0,04	0,47	0,09	0,02	0,21
2-2-1	0,28	0,10	1,50	--	--	0,21
2-3-0	--	--	--	0,12	0,03	--
3-0-0	0,23	0,04	1,20	0,08	0,01	0,28
3-0-1	0,39	0,07	1,3	0,11	0,02	0,19
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	3,3	--	--	--
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	24,0	--	--	--
3-3-2	11,0	1,50	48,0	--	--	--
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	1,7
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	10,0
5-5-0	---			2,40	0,68	7,5
5-5-1	---			3,50	1,60	10,0
5-5-2	---			5,40	1,80	14,0
5-5-3	---			9,20	3,0	32,0
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, 0,1 y 0,01 g)**

Combinación de positivos	Índice del NMP por g	3 tubos por dilución 95 % límites de confianza		5 tubos por dilución 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	0,2	<0,05	0,7
1-0-1	0,7	0,1	2,0	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	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	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	12,0	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	1,7	0,5	4,6
3-2-2	21,0	3,5	47	---	--	---
3-3-0	24,0	3,6	130	---	--	---
3-3-1	46,0	7,1	240	---	--	---
3-3-2	110	15,0	480	---	--	---
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	9,3
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	12,0
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	22,0
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	---			22,0	5,7	70,0
5-4-3	---			28,0	9,0	85,0
5-4-4	---			35,0	12,0	100,0
5-5-0	---			24,0	6,8	75,0
5-5-1	---			35,0	12,0	100,0
5-5-2	---			54,0	18,0	140,0
5-5-3	---			92,0	30,0	320,0
5-5-4	---			161,0	64,0	580,0
5-5-5	---			>161,0	>64,0	>580,0

**CUADRO 6. Índice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos.
(Diluciones 0,1, 0,01 y 0,001 g)**

Combinación de positivos	Índice del NMP por g	3 tubos por dilución 95 % límites de confianza		5 tubos por dilución Índice 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	2,0	21
2-2-0	21	4	47	9	2,0	21
2-2-1	28	10	150	--	--	--
2-3-0	--	--	--	12	3,0	28
3-0-0	23	4	120	8	1,0	19
3-0-1	39	7	13	11	2,0	25
3-0-2	64	15	380	--	--	--
3-1-0	43	7	210	11	2,0	25
3-1-1	75	14	230	14	4,0	34
3-1-2	120	30	380	--	--	--
3-2-0	93	15	380	14	4,0	34
3-2-1	150	30	440	17	5,0	46
3-2-2	210	35	470	---	--	--
3-3-0	240	36	130	---	--	--
3-3-1	460	71	240	---	--	--
3-3-2	1100	150	480	---	--	--
3-3-3	>1100	>150	>480	---	--	--

4-0-0	---			13	3,0	31
4-0-1	---			17	5,0	46
4-1-0	---			17	5,0	46
4-1-1	---			21	7,0	63
4-1-2	---			26	9,0	78
4-2-0	---			22	7,0	67
4-2-1	---			26	9,0	78
4-3-0	---			27	9,0	80
4-3-1	---			33	11,0	93
4-4-0	---			34	12,0	93
5-0-0	---			23	7,0	70
5-0-1	---			31	11,0	89
5-0-2	---			43	15,0	114
5-1-0	---			33	11,0	93
5-1-1	---			46	16,0	120
5-1-2	---			63	21,0	150
5-2-0	---			49	17,0	130
5-2-1	---			70	23,0	170
5-2-2	---			94	28,0	220
5-3-0	---			79	25,0	190
5-3-1	---			110	31,0	250
5-3-2	---			140	37,0	340
5-3-3	---			180	44,0	500
5-4-0	---			130	35,0	300
5-4-1	---			170	43,0	490
5-4-2	---			220	57,0	700
5-4-3	---			280	90,0	850
5-4-4	---			350	120,0	1000
5-5-0	---			240	68,0	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)**

Combinación de positivos	Índice del NMP por g	3 tubos por dilución 95 % límites de confianza		5 tubos por dilución 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 7.5.2.8 Informe de la prueba

B 7.5.2.8.1 Informar "Número más probable (NMP) de coliformes por gramo o mililitro de muestra".

B 7.5.2.8.2 En caso de muestras de agua informar NMP/100 mL.

B 7.6 De la estimación de la densidad microbiana por la técnica del número más probable. Determinación de bacterias coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli* por la técnica de diluciones en tubo múltiple.

B 7.6.1 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:

B 7.6.1.1 Una distribución aleatoria de las bacterias que existen en la muestra.

B 7.6.1.2 Las bacterias se encuentran como entidades no agrupadas.

B 7.6.1.3 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 7.6.2 Procedimientos.

B 7.6.2.1 Uso de tablas de NMP con 95% de límite de confianza.

B 7.6.2.1.1 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 para obtener el NMP aproximado.

B 7.6.2.1.2 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.

B 7.6.2.1.3 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).

B 7.6.2.1.4 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 1 como 43 y dividir entre 10, lo que da 4,3 como el NMP presuntivo por gramo de muestra.

B 7.6.2.1.5 Un método alternativo para obtener el número más probable es usando la siguiente fórmula:

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

Para calcular el NMP/100 g multiplicar por 100.

B 7.6.2.2 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: $NMP/g = P/(N \cdot T)^{1/2}$

Donde: P es el número de tubos positivos, N es la cantidad total de muestra (g) en todos los tubos negativos y T es la cantidad total de muestra (g) en todos los tubos.

Por ejemplo, considerando que se tuvieran 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: $P = (5 + 4 + 2 + 1) = 12$; $N = (8 \times 0) + (4 \times 1) + (2 \times 3) + (1 \times 5) + (0,5 \times 4) + (0,25 \times 5) = 18,25$; y $T = 5 (8 + 4 + 2 + 1 + 0,5 + 0,25) = 78,75$

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

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

$$\log (NMP/g) \pm 1,08 (\log a/n)^{1/2}$$

Donde: a es el radio de dilución y 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:

$$n_H = k / (1/n_i)$$

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

$$\text{Por lo tanto } n_H = 3 / (1/5) + (1/4) + (1/4)^{1/2} = 3/0,70 = 4,3$$

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

$$\log 0,32 \pm 1,08 (\log 2/5)^{1/2}$$

$$-0,495 \text{ a } 0,265$$

Entonces el límite inferior es el antilogaritmo $(-0,495) = 0,17/g$ o $17/100 \text{ g}$ y el límite superior es el antilogaritmo $(0,265) = 0,59/g$ o $59/100 \text{ g}$. 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) ^b	95% de límite de confianza	
0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior
0	0	0	3	-	-
0	1	0	3+	1	17
1	0	0	4	1	21
1	0	1	7+	2	27
1	1	0	7	2	28
1	2	0	11+	4	35
2	0	0	9	2	38
2	0	1	14+	5	48
2	1	0	15	5	50
2	1	1	20+	7	60
2	2	0	21	8	62
3	0	0	23	9	130
3	0	1	39	10	180
3	1	0	43	10	210
3	1	1	75	20	280
3	2	0	93	30	380
3	2	1	150	50	500
3	2	2	210+	80	640
3	3	0	240	90	1400
3	3	1	460	100	2400
3	3	2	1100	300	4800
3	3	3	1100	-	-

^a Los resultados normales, obtenidos en un 95% de las pruebas no están seguidos por un símbolo más (+). Menos del 4% de los resultados de las pruebas obtenidos están marcados por un símbolo más (+). Combinaciones de tubos positivos no encontrados en esta tabla se presentan en menos del 1% de las pruebas y si se presentaran con mayor frecuencia indican un error de técnica o que el valor del número más probable se encuentra en el límite. El NMP de combinaciones que no aparecen en la tabla, se puede obtener por extrapolación a la combinación cercana más elevada.

^b 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) ^b	95% de límite de confianza	
0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior
0	0	0	2	-	-
0	0	1	2+	1	10
0	1	0	2	1	10
1	0	0	2	1	11
1	0	1	4+	1	15
1	1	0	4	1	15
1	2	0	6+	2	18
2	0	0	4	1	17

2	0	1	7+	2	20
2	1	0	7	2	21
2	1	1	9+	3	25
2	2	0	9	3	25
3	0	0	8	3	24
3	0	1	11	4	29
3	1	0	11	4	30
3	1	1	14+	6	35
3	2	0	14	6	35
3	2	1	17+	7	40
3	3	0	17+	7	41
4	0	0	13	5	38
4	0	1	17	7	45
4	1	0	17	7	46
4	1	1	21	9	55
4	2	0	22	9	56
4	2	1	26+	12	65
4	3	0	27	12	67
4	3	1	33+	15	77
4	4	0	34+	16	80
5	0	0	23	9	68
5	0	1	31	13	110
5	1	0	33	14	120
5	1	1	46	20	150
5	1	2	63+	22	180
5	2	0	49	21	170
5	2	1	70	30	210
5	2	2	94+	40	250
5	3	0	79	30	250
5	3	1	110	40	300
5	3	2	140	60	360
5	4	0	130	50	390
5	4	1	170	70	480
5	4	2	220	100	580
5	4	3	280+	120	690
5	4	4	350+	160	820
5	5	0	240	100	940
5	5	1	350	100	1300
5	5	2	540	220	2000
5	5	3	920	300	2900
5	5	4	1600	600	5300
5	5	5	1600	-	-

^a Los resultados normales, obtenidos en un 95% de las pruebas, no están seguidos por un símbolo más(+). Menos del 4% de los resultados de las pruebas obtenidos están marcados por un símbolo más (+). Combinaciones de tubos positivos no encontrados en esta tabla se presentan en menos del 1% de las pruebas y si se presentaran con mayor frecuencia indican un error de técnica o que el valor del número más probable se encuentra en el límite. El NMP de combinaciones que no aparecen en la tabla, se pueden obtener por extrapolación a la combinación cercana más elevada.

^b 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) ^b	95% de límite de confianza	
0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior
0	0	0	1	-	-
0	0	1	1+	1	5
0	1	0	1	1	5
0	2	0	2+	1	7
1	0	0	1	1	5
1	0	1	2+	1	7
1	1	0	2	1	7
1	2	0	3+	1	8
2	0	0	2	1	7
2	0	1	3+	1	9
2	1	0	3	1	9
2	1	1	4+	1	10
2	2	0	4	2	10
2	3	0	5+	2	12
3	0	0	3	1	9
3	0	1	4	2	11
3	1	0	4	2	11
3	1	1	5+	2	13
3	2	0	5	2	13
3	2	1	6+	3	14
3	3	0	6+	3	14
4	0	0	4	2	12
4	0	1	6	2	13
4	1	0	6	2	14
4	1	1	7	3	15
4	2	0	7	3	15
4	2	1	8	4	17
4	3	0	8	4	17
4	4	0	9+	5	19
5	0	0	6	2	15
5	0	1	7	3	16
5	1	0	7	3	17
5	1	1	9	4	18
5	2	0	9	4	18
5	2	1	10+	5	20
5	3	0	10	5	20
5	3	1	11+	6	22
5	4	0	11+	6	22

6	0	0	8	3	18
6	0	1	9	4	20
6	1	0	9	4	20
6	1	1	11	5	22
6	2	0	11	5	22
6	2	1	12	6	24
6	3	0	12	6	25
6	3	1	14+	7	27
6	4	0	14+	7	27
6	5	0	15+	8	29
7	0	0	10	5	22
7	0	1	12	6	24
7	0	2	13+	7	27
7	1	0	12	6	25
7	1	1	13	7	27
7	1	2	15+	8	30
7	2	0	13	7	27
7	2	1	15	8	30
7	2	2	17+	9	32
7	3	0	15	8	30
7	3	1	17	9	33
7	4	0	17	9	33
7	4	1	19+	10	36
7	5	0	19+	10	36
8	0	0	13	6	28
8	0	1	15	7	31
8	0	2	17+	8	34
8	1	0	15	7	31
8	1	1	17	9	34
8	1	2	19+	10	37
8	2	0	17	9	35
8	2	1	19	10	38
8	2	2	21+	12	42
8	3	0	19	10	39
8	3	1	21	12	42
8	3	2	24+	13	46
8	4	0	22	12	43
8	4	1	24	13	46
8	5	0	24	13	47
8	5	1	27+	15	51
8	6	0	27+	15	52

9	0	0	17	8	37
9	0	1	19	10	41
9	0	2	22+	11	46
9	1	0	19	10	42
9	1	1	22	11	47
9	1	2	25+	13	52
9	2	0	22	12	47
9	2	1	25	13	53
9	2	2	28+	15	58
9	3	0	25	13	54
9	3	1	29	15	60
9	3	2	32+	18	66
9	4	0	29	16	61
9	4	1	33	18	67
9	4	2	37+	20	74
9	5	0	33	18	69
9	5	1	37	20	76
9	5	2	42+	23	83
9	6	0	38	21	77
9	6	1	43+	24	85
9	7	0	44+	24	87
10	0	0	23	12	58
10	0	1	27	14	67
10	0	2	31+	16	77
10	1	0	27	14	69
10	1	1	32	17	79
10	1	2	38	20	92
10	2	0	33	17	83
10	2	1	39	20	96
10	2	2	50	20	110
10	2	3	50+	30	120
10	3	0	40	20	100
10	3	1	50	20	120
10	3	2	60+	30	130
10	3	3	70+	30	150
10	4	0	50	30	120
10	4	1	60	30	140
10	4	2	70	30	160
10	4	3	80+	40	170
10	5	0	60	30	150
10	5	1	70	40	170

10	5	2	90	40	190
10	5	3	100	50	210
10	6	0	80	40	180
10	6	1	90	50	200
10	6	2	110	50	230
10	6	3	120	60	250
10	6	4	140+	70	270
10	7	0	100	50	220
10	7	1	120	60	250
10	7	2	140	70	280
10	7	3	150	80	310
10	7	4	170+	90	340
10	8	0	130	60	280
10	8	1	150	80	320
10	8	2	170	90	360
10	8	3	200	100	400
10	8	4	220	120	440
10	8	5	250+	140	480
10	9	0	170	90	380
10	9	1	200	100	430
10	9	2	230	120	490
10	9	3	260	140	560
10	9	4	300	160	640
10	9	5	350	180	720
10	9	6	400+	210	820
10	10	0	240	120	610
10	10	1	290	150	750
10	10	2	350	170	910
10	10	3	400	200	1100
10	10	4	500	300	1400
10	10	5	700	300	1700
10	10	6	900	400	2100
10	10	7	1120	600	2700
10	10	8	1160	800	3700
10	10	9	2300	1100	6000
10	10	10	2300	-	-

^a Los resultados normales, obtenidos en un 95% de las pruebas, no están seguidos por un símbolo más (+). Menos del 4% de los resultados de las pruebas obtenidos están marcados por un símbolo más(+). Combinaciones de tubos positivos no encontrados en esta tabla se presentan en menos del 1% de las pruebas y si se presentaran con mayor frecuencia indican un error de técnica o que el valor del número más probable se encuentra en el límite. El NMP de combinaciones que no aparecen en la tabla, se pueden obtener por extrapolación a la combinación cercana más elevada.

^b 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 1g de muestra cuando se usan 3 tubos con porciones de 0,1, 0,01 y 0,001g

Tubos Positivos															
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																							
10	1	0,1	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 1g (mL) de muestra por tubo

Ejemplo	Cantidad de muestra (g o mL) ^a					Valores positivos reportados	NMP estimado/g o mL ^b
	0,10	,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 7.6.3 Determinación de bacterias coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli* por la técnica de diluciones en tubo múltiple.

B 7.6.3.1 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 horas de incubación a 35,0,5°C (coliformes) y 44,50,2°C (coliformes fecales y *E. coli*).

B 7.6.3.2 Equipo

Además de los mencionados en el método Preparación y dilución de muestras de alimentos para análisis microbiológico, lo siguiente:

B 7.6.3.2.1 Baño de agua con agitación continua cubierto y con termostato que evite variaciones mayores a 0,1°C.

B 7.6.3.2.2 Termómetro calibrado y verificado 1/10

B 7.6.3.2.3 Tubos de cultivo de 20x200 y de 16x160 mm con tapón de rosca

B 7.6.3.2.4 Campanas de fermentación (tubos de Durham)

B 7.6.3.2.5 Gradillas

B 7.6.3.2.6 Asas bacteriológicas de 3 mm de diámetro

B 7.6.3.2.7 Lámpara de luz ultravioleta de longitud amplia 4 watts.

B 7.6.3.2.8 Lentes protectores.

B 7.6.3.3 Reactivos y medios de cultivo

B 7.6.3.3.1 Medios de cultivo

B 7.6.3.3.1.1 Caldo lauril

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

pH final: 6,8 0,2 a 25°C.

Preparación:

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada.

Ajustar el pH.

Distribuir en tubos de ensaye con campanas de Durham.

Adicionar 10 mL de medio para cada tubo.

Esterilizar en autoclave durante 15 minutos 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 del 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

B 7.6.3.3.1.2 Caldo EC (*E. coli*)

Ingredientes	
Bacto triptosa	20.0 g
Bacto lactosa	5.0 g
Bacto sales biliares No. 3	1.5 g
Fosfato dipotásico	4.0 g
Fosfato monopotásico	1.5 g
Cloruro de sodio	5.0 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 ensaye con campanas de Durham.

Adicionar 10 mL de medio para cada tubo.

Esterilizar en autoclave durante 15 minutos 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.

B 7.6.3.3.1.3 Agar McConkey

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

Enfriar a 50-60°C y vaciar en cajas Petri.

B 7.6.3.3.1.4 Agar eosina azul de metileno de Levin (EMB-L)

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

pH final: 7,1 0,2

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 minutos.

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.

B 7.6.3.3.1.5 Caldo triptona al 1% (triptófano)

Ingredientes	Cantidad
Triptona o tripticasa	10 g
Agua destilada	1000 mL
pH final: 6,9	

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 minutos.

B 7.6.3.3.1.6 Caldo MR-VP

Medio 1

Ingredientes	Cantidad
Peptona tamponada	7 g
Glucosa	5 g
K ₂ HPO ₄	5 g
Agua destilada	1000 mL

pH final: 6.9

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 minutos.

B 7.6.3.3.1.7 Caldo citrato de Koser

Ingredientes	Cantidad
NaNH ₄ HPO ₄ • 4H ₂ O	1,5 g
KH ₂ PO ₄ (monobásico)	1,0 g
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,2 g
Citrato de sodio • 2H ₂ O	3,0 g
Agua destilada	1000 mL

pH final: 6,7 0,2.

Distribuir preferentemente en tubos de ensaye con tapa de rosca.

Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

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.

B 7.6.3.3.2 Reactivos.**B 7.6.3.3.2.1** Reactivo de Kovacs

Ingredientes	Cantidad
p-imetilaminobenzaldehído	5 g
Alcohol amílico (normal)	75 mL
HCl concentrado	25 mL

Disolver el p-Dimetilaminobenzaldehído en alcohol amílico normal.

Adicionar lentamente el HCl. Almacenar a 4°C.

Para la prueba de indol

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.

B 7.6.3.3.2.2 Reactivo de Voges-Proskauer (VP)

Solución 1

Ingredientes	Cantidad
alfa-naftol	5 g
Alcohol absoluto	100 g

Solución 2

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

Prueba de Voges-Proskauer (VP).

Transferir 1 mL del cultivo a probar con 48 horas de incubación a un tubo de ensaye.

Adicionar 0,6 mL de la solución 1 y 0,2 mL de la solución 2.

Agitar después de la adición de cada solución.

Para intensificar y acelerar la reacción adicionar unos cuantos cristales de creatina y mezclar.

Dejar a temperatura ambiente.

Leer resultados después de 4 horas de adicionar los reactivos.

El desarrollo de una coloración rosa es una prueba positiva.

B 7.6.3.3.2.3 Reactivos para la coloración de Gram

Cristal violeta

Solución A	
Cristal violeta (colorante 90%)	2 g
Etanol 95%	20 mL

Solución B	
Oxalato de amonio	8.0 g
Agua destilada	80 mL

Indicador rojo de metilo (R44)

Mezclar la solución A y B. Almacenar por 24 horas

Filtrar a través de un papel filtro áspero.

B 7.6.3.3.2.4 Iodo de Gram

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

Colocar el KI en un mortero.

Adicionar el yodo.

Triturar con el pistilo por 5-10 segundos.

Adicionar 1 mL de agua y triturar

Adicionar 5 mL de agua y triturar

Adicionar 10 mL de agua y triturar

Vaciar esta solución en una botella de reactivo.

Enjuagar el mortero y el pistilo con la cantidad de agua necesaria para completar 300 mL.

B 7.6.3.3.2.5 Colorante de contraste (solución concentrada)

Ingredientes:	
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.

B 7.6.3.3.2.6 Procedimiento para la tinción de Gram

Fijar con calor moderado los frotis de la muestra a teñir.

Adicionar la solución de cristal violeta al frotis.

Dejar actuar por un minuto.

Lavar con agua corriente y escurrir.

Aplicar la solución de yodo por un minuto.

Lavar con agua corriente y escurrir.

Decolorar con etanol al 95% hasta que la coloración azul deje de fluir (aproximadamente 30 segundos).

Inmediatamente después enjuagar con agua corriente.

Escurrir.

Aplicar el colorante de contraste (safranina) por 30 segundos.

Enjuagar, escurrir y secar al aire. Examinar al microscopio.

B 7.6.3.3.2.7 Medio EC-MUG

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

B 7.6.3.4 Procedimiento**B 7.6.3.4.1 Agua y hielo****B 7.6.3.4.1.1 Prueba presuntiva**

B 7.6.3.4.1.1.1 Agitar la muestra y transferir volúmenes de 10 mL a cada uno de 5 tubos con 20 mL de caldo lauril sulfato triptosa de doble concentración, 5 tubos con 1 mL y 5 tubos con 0,1 mL de caldo lauril sulfato triptosa de concentración sencilla o las siguientes porciones: 10 tubos con 10 mL de muestra; 5 tubos con 20 mL de muestra o una porción de 100 mL, consultar la tabla del inciso 2 en la preparación del "caldo lauril triptosa" para la concentración de caldo lauril triptosa requerido. Los tubos deben contener una campana de fermentación (Durham).

B 7.6.3.4.1.1.2 Incubar los tubos a 35 0,5°C. Examinar los tubos a las 24 horas y observar si hay formación de gas; si la formación de gas no se observa, incubar 24 horas más.

B 7.6.3.4.1.2 Prueba confirmativa

B 7.6.3.4.1.2.1 De cada tubo que muestre formación de gas, tomar una asada y sembrar en un número igual de tubos con medio de confirmación, para la determinación de bacterias coliformes referirse al método de Determinación de bacterias coliformes. Técnica del Número más probable, para la determinación de bacterias coliformes fecales, sembrar en caldo EC. Inocular a dos tubos con caldo EC una cepa de *E. coli* como control positivo y una de *Enterobacter aerogenes* como control negativo e incubar con las muestras.

B 7.6.3.4.1.2.2 Para la determinación de coliformes fecales incubar los tubos a 44,5 0,2°C en baño de agua con agitación durante 24 horas, observar si hay formación de gas; si la formación de gas no se observa, continuar la incubación 24 horas más, hacer la lectura. Utilizar estos resultados para calcular el número más probable (NMP) de coliformes fecales.

B 7.6.3.4.1.3 Prueba confirmativa para Escherichia coli (por identificación bioquímica)

B 7.6.3.4.1.3.1 Tomar una asada de cada uno de los tubos positivos y sembrar por estría cruzada en agar EMB-L para su aislamiento.

B 7.6.3.4.1.3.2 Incubar las placas invertidas a 35°C por 18-24 horas.

B 7.6.3.4.1.3.3 Seleccionar dos colonias de cada placa con la siguiente morfología colonial: Colonias con centro negro, planas con o sin brillo metálico y sembrarlas en agar cuenta estándar para realizar las pruebas de morfología microscópica y pruebas bioquímicas. Incubar las placas a 35°C por 18-24 horas.

B 7.6.3.4.1.3.4 Si no hay colonias con morfología típica, probar una o más colonias lo más parecido *E. coli* de cada placa.

B 7.6.3.4.1.3.5 Hacer un frotis y teñirlo por Gram. Observar al microscopio la presencia de bacilos cortos o cocabacilos Gram-negativos.

B 7.6.3.4.1.3.6 Pruebas bioquímicas Indol, Rojo de metilo, Voges Proskauer, Citrato (IMViC).

B 7.6.3.4.1.3.6.1 Producción de indol

Inocular un tubo en caldo triptona e incubarlo a 35°C por 24 horas. Adicionar 0,2-0,3 mL de reactivo de Kovacs. La presencia de una coloración en la superficie del tubo se considera una prueba positiva.

B 7.6.3.4.1.3.6.2 Voges-Proskauer (VP)

Inocular un tubo con caldo MR-VP e incubar a 35°C por 48 horas. Transferir 1 mL a un tubo de 13X100 mm. Adicionar 0,6 mL de solución de alfa naftol y 0,2 mL de hidróxido de potasio al 40% y agitar. Se considera una prueba positiva cuando se desarrolla un color rosa.

B 7.6.3.4.1.3.6.3 Rojo de metilo

Inocular un tubo adicional con caldo MR-VP e incubar a 35°C por 48 horas. Adicionar 5 gotas de solución de rojo de metilo. Se considera una prueba positiva cuando se desarrolla un color rojo. Un color amarillo es una prueba negativa.

B 7.6.3.4.1.3.6.4 Citrato

Inocular un tubo con caldo citrato de Koser un inóculo ligero para evitar turbiedad en el tubo. Incubar a 35°C por 96 horas. El desarrollo del cultivo que se observa con la turbiedad del medio, se considera una prueba positiva.

B 7.6.3.4.1.3.6.5 Interpretación de resultados

Todos los cultivos que: 1. Fermenten la lactosa con producción de gas dentro de las 48 horas a 35°C; 2. Sean bacilos o cocobacilos Gram negativos no esporulados y 3. Se obtenga las siguientes combinaciones para el IMVIC:

Biotipo 1--, o Biotipo 2---, son consideradas como *E. coli*. Calcular el NMP de *E. coli* basada en la proporción de los tubos positivos de caldo EC.

B 7.6.3.4.1.4 Prueba confirmativa para *Escherichia coli* (por el método de EC-MUG)**B 7.6.3.4.1.4.1 Fundamento.**

Alrededor del 94% de las cepas de *E. coli* incluso las cepas no productoras de gas producen la enzima beta-glucuronidasa (GUD), la cual rompe el sustrato específico 4-metilumbelliferyl-beta-D-glucurónido (MUG) en 4-metilumbelliferona (MU), que al ser expuesto a una fuente de luz ultravioleta (UV) de onda larga (365 nm) produce una fluorescencia azul, fácil de observar. Cuando el MUG es incorporado al caldo EC se puede identificar *E. coli*.

B 7.6.3.4.1.4.2 Prueba presuntiva.

Seguir lo indicado en el punto B.7.6.3.4.1

B 7.6.3.4.1.4.3 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 EC-MUG. Inocular dos tubos con caldo EC-MUG una cepa de *E. coli* como control positivo y *K. pneumoniae* como control negativo. Incubar a estos tubos con uno adicional de caldo EC-MUG sin inocular a 44,5 0,5°C en baño de agua con los tubos de las muestras durante 24 horas, observar si hay formación de gas; si la formación de gas no se observa continuar la incubación 24 horas más. Irradiar los tubos con una fuente de luz UV, observar fluorescencia y hacer la lectura. Utilizar estos resultados para calcular el número más probable (NMP) de *E. coli*.

B 7.6.3.4.2 Alimentos**B 7.6.3.4.2.1 Prueba presuntiva.**

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.7.6.3.4.1.1

B 7.6.3.4.2.2 Prueba confirmativa.

Continuar como en el punto B.7.6.3.4.1.2 y 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 0,5°C durante 24 horas, 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 B.7.6.3.4.1.2. Hacer tinción de Gram para observación de la morfología microscópica.

B 7.6.3.5 Interpretación de resultados.

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

B 7.6.3.6 Cálculos

Calcular la densidad microbiana en número más probable conforme al 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	NMP/100 mL	95% de Límite 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	12,0	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 7.7 Técnicas y procedimientos para la investigación de *Vibrio cholerae***B 7.7.1 Material y equipo****B 7.7.1.1** Licuadora y vasos de licuadora estériles.**B 7.7.1.2** Frascos de vidrio de boca ancha tipo tarro de 500 mL de capacidad con tapa de rosca.**B 7.7.1.3** Varilla de vidrio de 3 mm de diámetro y 20 cm de largo, con un doblez terminal en ángulo recto de 4 cm.**B 7.7.1.4** Balanza granataria de 2000 g de capacidad y 0,2 g de sensibilidad.**B 7.7.1.5** Balanza analítica de 120 g de capacidad y 5 mg de sensibilidad.**B 7.7.1.6** Incubadoras de 39-40°C.**B 7.7.1.7** Baño de agua de 42 ± 0,2°C y 35-37°C.**B 7.7.1.8** Cucharas estériles u otros instrumentos apropiados para transferir muestras de alimentos.

B 7.7.1.9 Cajas Petri estériles de 15 x 100 mm de plástico.

B 7.7.1.10 Pipetas estériles de 1 mL con graduación de 0,01 mL, de 5 y 10 mL con graduación de 0,1 mL.

B 7.7.1.11 Asas bacteriológicas de 3 mm de diámetro de nicromel o platino.

B 7.7.1.12 Tubos de cultivo o de ensayo de 16 x 150 mm y 20 x 150 mm.

B 7.7.1.13 Tubos para bioquímicas o ensaye de 10 x 75 mm o 13 x 100 mm.

B 7.7.1.14 Tijeras y pinzas estériles.

B 7.7.1.15 Lámpara (para observar reacciones serológicas).

B 7.7.1.16 Mecheros.

B 7.7.1.17 Papel pH (rango 1-14) con un máximo de graduación de 0,4 unidades de pH por cambio de color.

B 7.7.1.18 Potenciómetro.

B 7.7.1.19 Bolsas de polietileno de 28 x 37 cm con tapa resellable.

B 7.7.1.20 Aparato de filtración y membranas de 0,45 micras.

B 7.7.2 Medios de cultivo

B 7.7.2.1 Agua Peptonada Alcalina (APW)

Peptona	10 g
Cloruro de Sodio	10 g
Agua destilada	1 000 mL

Disolver los ingredientes. Ajustar el pH de tal forma que después de esterilizar éste sea de $8,5 \pm 0,2$. Esterilizar en autoclave 10 minutos a 121°C .

B 7.7.2.2 Agar Tiosulfato, Citrato, Sales Biliares y Sacarosa (TCBS)

Extracto de levadura	5 g
Proteosa peptona	10 g
Sacarosa	20 g
Tiosulfato de sodio·5H ₂ O	10 g
Citrato de sodio·2H ₂ O	10 g
Sales biliares	3 g
Bilis de buey	5 g
Cloruro de sodio	10 g
Citrato férrico	1 g
Azul de bromotimol	40 mg
Azul de timol	40 mg
Agar	15 g
Agua destilada	1 000 mL

Preparar en un matraz por lo menos tres veces más grande que el volumen requerido de medio. Adicionar los ingredientes en agua destilada tibia y calentar con agitación constante hasta ebullición e inmediatamente retirar del calor. No esterilizar. Enfriar a 50°C y colocar en cajas de Petri. Dejar secar las placas de $37-45^{\circ}\text{C}$ antes de usar.

B 7.7.2.3 Agar modificado con Celobiosa, Polimixina B y Colistina (mCPC)

SOLUCION 1	
Peptona	10 g
Extracto de carne	5 g
Cloruro de sodio	20 g
Solución Stock de colorante 1 000	1 mL
Agar	15 g
Agua destilada	900 mL

Ajustar el pH a 7,6. Hierva hasta que se disuelva el Agar.

Esterilizar por autoclave 15 minutos a 121°C. Enfríe de 48-55°C.

SOLUCION STOCK DE COLORANTES 1 000 X :	
Azul de Bromotimol	4 g
Rojo de cresol	4 g
Etanol al 95%	100 mL

Para obtener un color firme del medio usar una solución colorante stock en lugar de estar pesando repetidamente los colorantes en polvo. Disuelva el colorante en etanol hasta obtener una solución al 4% (peso/volumen). Agregue 1 mL de esta solución a cada litro de agar mCPC, la cual tendrá al final 40 mg de Azul de Bromotimol y 40 mg de Rojo Cresol por litro.

SOLUCION 2:	
Celobiosa	10 g
Colistina	400 000 UI
Polimixina B	100 000 UI
Agua destilada	100 mL

Disuelva la celobiosa por calentamiento en agua destilada. Enfríe y agregue los antibióticos. Esterilice por filtración, agregue la solución 2 a la solución 1 mezcle y distribuya en cajas Petri.

B 7.7.2.4 Agar T1N1 (Agar Triptona y Sal)

Triptona o tripticasa	10 g
Cloruro de sodio	10 g
Agar	20 g
Agua destilada	1 000 mL

Suspenda los ingredientes y hierva hasta disolución del agar, si lo desea inclinado, distribuya en tubos. Esterilice en autoclave 15 minutos a 121°C. Deje solidificar los tubos inclinados, para placas enfríe el medio de 45-50°C y distribuya en cajas Petri estériles.

B 7.7.2.5 Agar Gelatina (GA)

Peptona	4 g
Extracto de levadura	1 g
Gelatina	15 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 000 mL

Suspenda los ingredientes y hierva hasta disolución de la gelatina y el agar, ajuste el pH a 7,2 ± 0.2. Esterilice en autoclave 15 minutos a 121°C. Enfríe de 45-50°C y distribuya en cajas Petri estériles.

B 7.7.2.6 Agar Gelatina con Sal (GS)

Preparar agar gelatina (GA), pero adicionando 30 g de Cloruro de Sodio por cada litro. Suspenda los ingredientes y hierva hasta disolver la gelatina y el agar. Ajuste el pH de $7,2 \pm 0,2$. Esterilice en autoclave 15 minutos a 121°C . Enfríe de $45-50^\circ\text{C}$, coloque en cajas Petri. Si es necesario para inhibir la diseminación de *Vibrio* spp. tal como *V. alginolyticus*, use de 25-30 g de agar por litro.

B 7.7.2.7 Caldo Glucosa de Hugh-Leifson

Peptona	2 g
Extracto de levadura	0,5 g
Cloruro de Sodio	20 g
Dextrosa	10 g
Púrpura de Bromocresol	0,015 g
Agar	3 g
Agua destilada	1 000 mL

Suspenda los ingredientes y hierva hasta disolver el agar. Ajuste el pH a $7,4 \pm 0,2$. Coloque en tubos y esterilice en autoclave 15 minutos a 121°C .

B 7.7.2.8 Medio Base de Descarboxilasa (Arginina, Lisina y Ornitina)

BASE	
Peptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
Dextrosa (D-glucosa)	1 g
Púrpura de Bromocresol	0.02 g
Agua destilada	1 000 mL

Para caldo de Arginina, Lisina y Ornitina, adicione 5 g de L-aminoácido a 1 litro de base. Como control, use base sin suplemento (aminoácido). Para *Vibrio* spp. halofílicos, adicionar 15 g de Cloruro de Sodio por litro. Ajuste el pH de tal manera que después de la esterilización sea de $6,5 \pm 0,2$. Distribuya en tubos y esterilice en autoclave 10 minutos a 121°C .

B 7.7.2.9 Caldo Triptona y Caldos Triptona Sal T_1N_0 , T_1N_1 , T_1N_3

T_1N_6 , T_1N_8 y T_1N_{10}

Triptona o Tripticasa	10 g
Cloruro de Sodio	0,10,30,60,80,o 100 g
Agua destilada	1 000 mL

Disuelva los ingredientes en agua destilada, para T_1N_0 no agregue Cloruro de Sodio, para T_1N_1 use 10 g de Cloruro de Sodio (1% w/v concentración de Cloruro de Sodio); así respectivamente. Para T_1N_3 usar 30 g de NaCl por litro (3% w/v concentración de Cloruro de Sodio) Distribuya en tubos de tapón de rosca de 16 x 150 mm, tape los tubos. Esterilice en autoclave durante 15 minutos a 121°C . Ajuste el pH a $7,2 \pm 0,2$.

B 7.7.2.10 Caldo Soya Tripticasa (TSB)

Peptona de Tripticasa (Triptona)	17 g
Peptona de fitona (Soytona)	3 g
Cloruro de Sodio	5 g
Fosfato dipotásico	2,5 g
Dextrosa	2,5 g
Agua destilada	1 000 mL

Suspenda los ingredientes en agua destilada y caliente hasta disolución. Distribuya 225 mL en matraces de 500 mL o tubos. Esterilice en autoclave durante 15 minutos a 121°C . El pH final debe ser de $7,2 \pm 0,2$.

B 7.7.2.11 Agar Soya Trypticasa (TSA)

Peptona de fitona (Soytona)	5 g
Peptona tripticasa (Triptona)	15 g
Cloruro de Sodio	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 000 mL

Suspenda los ingredientes en agua destilada y hierva durante un minuto hasta disolución del agar. Para *Vibrio* spp. halófilicos, agregar 15 g de Cloruro de Sodio. Distribuya dentro de tubos o matraces. Esterilice en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Deje solidificar los tubos inclinados o deje enfriar de 45-50°C y distribuya en cajas Petri. El pH final debe ser de $7,3 \pm 0,2$.

B 7.7.2.12 Agar de Hierro Kligler (KIA)

Peptona polipeptona	20 g
Dextrosa	1 g
Citrato férrico amoniacal	0.5 g
Lactosa	20 g
Cloruro de Sodio	5 g
Tiosulfito de sodio	0.5 g
Rojo de fenol	0.025 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Suspender los ingredientes y hervir hasta disolución del agar. Distribuir en tubos de tapón de rosca. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Dejar solidificar los tubos inclinados. Ajustar el pH de $7,4 \pm 0,2$.

B 7.7.2.13 Agar Arginina Glucosa Inclinado (AGS)

Peptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
Tristona	10 g
Cloruro de Sodio	20 g
Glucosa	1 g
L-Arginina (hidrocloruro)	5 g
Citrato férrico amónico	0,5 g
Tiosulfato de Sodio	0,3 g
Púrpura de Bromocresol	0,2 g
Agar	13,5 g
Agua destilada	1 000 mL

Suspender los ingredientes en agua destilada, hervir hasta disolución del agar, y distribuir en cantidades de 5 mL a tubos de 13 x 100 mm. Ajustar el pH de 6,8 a 7,0. Esterilizar en autoclave de 10 a 12 minutos a 121°C. Deje solidificar el medio inclinado.

B 7.7.2.14 Agar Triple Azúcar y Hierro (TSI)

Polipeptona	20 g
Cloruro de Sodio	5 g
Lactosa	10 g
Sacarosa	10 g
Glucosa	1 g
Sulfato ferroso amónico	0,2 g
Tiosulfato de Sodio	0,2 g
Rojo de fenol	0,025 g
Agar	13 g
Agua destilada	1 000 mL

Disolver los ingredientes en agua destilada. Mezclar bien y calentar a ebullición, agitando ocasionalmente hasta completa disolución. Enfriar a 60°C y ajuste el pH de $7,3 \pm 0,1$.

B 7.7.2.15 Agar de Hierro y Lisina (LIA)

Peptona o gelisato	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Glucosa	1,0 g
L-Lisina	10,0 g
Citrato férrico amónico	0,5 g
Tiosulfato de sodio	0,04 g
Púrpura de bromocresol	0,02 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1 000 mL

Disolver los ingredientes en el agua destilada y mezclar bien; calentar hasta ebullición con agitación frecuente hasta conseguir la disolución completa. Esterilizar en autoclave 12 minutos a 121°C. Enfriar de 50-60°C y ajustar el pH de $6,7 \pm 0,1$. Distribuir en volúmenes de 3 mL en tubos de 13 x 100 mm. Los tubos se enfrían en posición inclinada, de tal modo que se obtengan columnas de medio de 3 cm y una parte inclinada de 2 cm.

B 7.7.2.16 Caldo Rojo de Metilo y Vogues Proskauer(RM-VP)

Peptona	7 g
Glucosa	5 g
Fosfato dipotásico	5 g
Agua destilada	1000 mL

Disolver los ingredientes en 800 mL de agua tibia. Para *Vibrio spp* halófilicos, agregar 15 g más de Cloruro de Sodio (para una concentración final del 2%). Filtrar, enfriar a 20°C y diluir a 1 litro. Distribuya en tubos. Esterilizar en autoclaves durante 12 - 15 minutos a 121°C. Ajustar el pH de $6,9 \pm 0,2$.

B 7.7.2.17 Medio para prueba de movilidad (Semisólida)

Peptona	10 g
Extracto de carne	3 g
Cloruro de Sodio	5 g
Agar	4 g
Agua destilada	1000 mL

Calentar con agitación y hervir de 1 a 2 minutos hasta disolución del agar. Para *Vibrio spp* halofílicos agregar 15 g más de Cloruro de Sodio (para una concentración final del 2%). Distribuir en tubos con tapón de rosca. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C. Ajustar el pH de $7,4 \pm 0,2$.

B 7.7.3 Soluciones y reactivos para pruebas bioquímicas**B 7.7.3.1** Prueba de Rojo de Metilo.

Rojo de metilo	0,1 g
Alcohol etílico	300 mL
Agua destilada	200 mL

Disolver el Rojo de Metilo en el alcohol y diluir con el agua destilada, para llevar a cabo la prueba, añadir 5 gotas de la solución a 5 mL del cultivo problema.

Resultados: Un color rojo demuestra un pH menor a 4,5 y la prueba es Positiva. Un color amarillo se reporta como prueba Negativa.

B 7.7.3.2 Prueba de Vogues-Proskauer.

Esta prueba es para comprobar la presencia del Diacetilo.

Alfa Naftol	5 g
Alcohol Etílico absoluto	100 mL

Añadir 0,6 mL de la solución de Alfa Naftol y 0,2 mL de una solución acuosa al 40% de KOH a 1 mL de cultivo.

Resultados: El desarrollo de una coloración roja en 15 minutos constituye una reacción POSITIVA.

B 7.7.3.3 Prueba de Oxidasa.

N,N,N,N-Tetrametil-p-Fenilendiamino	0,5 g
Agua destilada	100 mL

Conservar en frasco oscuro a 5-10°C. El reactivo se conserva durante 14 días.

Sembrar en un tubo de base de gelosa para sangre. Incubar 18 horas a 35°C. Agregar 0,3 mL de reactivo.

Resultado: La reacción positiva se observa por la producción de un color azul en un minuto.

B 7.7.3.4 Reacción de Indol.

REACTIVO DE KOVAC

p-dimetilaminobenzaldehído	5.0 g
Alcohol amílico o alcohol isoamílico	750 mL
Acido clorhídrico concentrado	25 mL

Disolver el p-dimetilaminobenzaldehído en el alcohol amílico y agregar el ácido clorhídrico lentamente, gota a gota y agitando. Debe conservarse en frasco ámbar con tapón esmerilado; el color del reactivo va del amarillo al café claro. Se debe conservar a 4°C.

Sembrar un tubo con 5 mL de caldo triptona. Incubar 48 horas a 35°C. Agregar de 0,2 a 0,3 mL del reactivo. El desarrollo de un color intenso, constituye una prueba Positiva para indol.

B 7.7.4 Toma de muestra

La toma de muestra para análisis microbiológicos, se deberá hacer en condiciones asépticas y en recipientes estériles.

B 7.7.5 Preparación de la muestra.

B 7.7.5.1 Líquidos.

De cada muestra tomar 25 mL e introducir las en un matraz que contenga 225 mL de agua peptonada alcalina (APW) y homogeneizar por 2 min. Esta es la dilución 1:10. De esta dilución preparar la dilución 1:100 y 1:1000, en 9 o 90 mL de agua peptonada alcalina.

Incubar las tres diluciones de 35 a 37°C.

B 7.7.5.2 Sólidos.

De cada muestra pesar 50 g y colocar en un matraz que contenga 450 mL de agua peptonada alcalina (APW). Esto hace la dilución 1:10. Preparar dos series de diluciones de 1:100 y 1:1000. Por lo tanto tenemos dos series de 3 diluciones. Incubar una serie de 35 a 37°C y la otra a 42°C.

B 7.7.6 Resembrar

Después de la incubación, y sin agitar, transferir el inóculo de la película (crecimiento superficial) con un asa de 3-5 mm de diámetro a una placa por lo menos, de cada uno de los medios de cultivo selectivos: Agar con tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa (TCBS) o al agar modificado con celobiosa, polimixina B y colistina (mCPC), la polimixina inhibe al biotipo Clásico de *V. cholerae*. Incubar el agar TCBS durante 18 a 24 horas de 35-37°C y el agar mCPC durante 18 a 24 horas de 39-40°C.

B 7.7.6.1 Morfología colonial.

Examinar las placas a fin de determinar si se presentan las características coloniales que a continuación se describen, seleccionar por lo menos 3 colonias sospechosas de cada placa y aplicarlas con estría cruzada para aislar en agar T₁N₁ o en agar soya tripticasa con sal (al 2% de concentración de NaCl) e incubar durante 12-18 horas a 35-37°C. Es necesario hacer un cultivo en un medio no selectivo a fin de garantizar la pureza de las colonias, antes de las pruebas bioquímicas, se puede inocular a los agares gelatina (GA) y gelatina sal (GS) en el segundo día. Los resultados serán confiables si las placas de aislamiento muestran colonias puras.

B 7.7.6.1.1 Agar TCBS. Las colonias de *V. cholerae* (El Tor y Clásico) son grandes, lisas, amarillas (positivas para la fermentación de la sacarosa) y ligeramente achatadas, con el centro opaco y los bordes translúcidos.

Nota: Las especies de *Vibrio* no producen colonias pequeñas de color crema en agar TCBS. Las colonias de *V. mimicus*, que están estrechamente relacionadas con la especie anterior, son verdes (sacarosa negativas). La mayoría de las demás especies de *Vibrio* crecen en agar TCBS y producen colonias amarillas y verdes.

B 7.7.6.1.2 Agar mCPC. Las colonias de *V. cholerae* El Tor son púrpuras (negativas para la fermentación de la celobiosa). El *V. vulnificus* produce colonias amarillas achatadas, con el centro opaco y los bordes translúcidos. La mayoría de las demás especies de *Vibrio* no crecen fácilmente en agar mCPC.

B 7.7.6.2 Diferenciación.

Diferenciación de los vibrios sospechosos de los microorganismos que no son vibrios.

B 7.7.6.2.1 TSI, KIA y agar inclinado de Arginina y Glucosa (AGS). Inocular las colonias individuales en medios de cultivo TSI (Agar de Triple Azúcar y Hierro), KIA (Agar de Hierro Kliger) y AGS, picar y estriar en el agar inclinado. Incubar los tubos inoculados, con el tapón no muy apretado, durante 18 a 24 horas de 35-37°C. Se recomiendan estos medios porque las reacciones permiten efectuar una diferenciación presuntiva entre la mayoría de las especies de *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Shigella* y otras bacterias.

B 7.7.6.2.2 Caldo triptona al 3% de NaCl (T_1N_3). Inocular las colonias en los caldos T_1N_0 y T_1N_3 e incubar durante 18 a 24 horas de 35-37°C. El *V. cholerae* y el *V. mimicus* crecerán en T_1N_0 y T_1N_3 . Algunas especies de bacterias que no son vibrios y que presentan reacciones similares a las de *V. cholerae* en medios de TSI y LIA no crecen en T_1N_3 . La mayoría de las especies *Vibrio* spp, incluyen algunos *V. cholerae* No. 01, crecerán en T_1N_3 únicamente de la familia *Vibrionaceae* crece solamente en T_1N_3 .

B 7.7.6.2.3 Una alternativa consiste en usar agar gelatina (GA) y agar gelatina con 3% de NaCl (GS) para determinar la tolerancia de los cultivos puros a la sal. Dividir las placas en ocho sectores, inocular una línea recta en el centro de un sector de las placas, tanto de GA como de GS con cada cultivo puro. Incubar durante 18 a 24 horas de 35 - 37°C. El *V. cholerae* y el *V. mimicus* crecerán. El *Vibrio* spp halofílico crecerá en ambas placas, porque ellos no requieren de sal. Sólo en la placa con GS. Para leer la reacción de la gelatinasa sostener la placa sobre una superficie negra, observará un halo opaco alrededor de la colonia de los microorganismos gelatinasa positivos.

B 7.7.6.2.4 Caldo glucosa de Hugh-Leifson. Inocular colonias individuales en tubos duplicados con caldo de glucosa de Hugh-Leifson. Recubrir un tubo con una capa de aceite mineral estéril o vapor líquido (50% de petrolato y 50% de parafina) unos dos centímetros de grueso. Incubar ambos tubos durante 18 a 24 horas de 35-37°C. Las especies de *Vibrio* spp utilizan la glucosa tanto para la oxidación como para la fermentación. Las especies de *Pseudomonas* que comúnmente se aíslan del pescado y los mariscos con métodos de enriquecimiento que se usan para las especies de *Vibrio*, utilizan la glucosa sólo para la oxidación.

B 7.7.6.2.5 Prueba de oxidasa. Realizar la prueba de oxidasa con cultivos puros de agar soya tripticasa (2% de NaCl) u otro medio que no contenga carbohidratos fermentables. Un método fácil consiste en colocar un círculo de papel filtro en una caja de Petri y humedecerlo con algunas gotas de reactivo de oxidasa. Con un palito aplicador de madera, un mondadientes o una asa de platino estéril, sacar un poco de cultivo de la placa y tocar el papel humedecido, si hay microorganismos oxidasa positivos, el papel se tornará púrpura oscura o azul en pocos segundos. Las especies patógenas de *Vibrio* spp. son oxidasa positivas (excepto el *V. metschnikovii*).

B 7.7.6.3 Identificación y Confirmación de *V. cholerae* 01, *V. cholerae* NO 01 y *V. mimicus*.

B 7.7.6.3.1 Leer los resultados de las prueba bioquímicas de TSI, KIA, AGS, T_1N_0 y T_1N_3 o GA Y GS, y caldo glucosa de Hugh-Leifson.

B 7.7.6.3.2 Hacer una tinción de Gram a un cultivo de 18 a 24 horas en caldo o agar.

NOTA: Los cultivos puros que se someterán a las demás pruebas serológicas y bioquímicas para el *V. cholerae* son sacarosa positivos (amarillo) en agar TCBS y sacarosa negativos (verdes) en el caso de *V. mimicus* o son celobiosa negativos (verde-púrpura) en agar mCPC, crecen en caldo T_1N_0 o en placas con GA; presentan reacciones características en TSI, KIA y AGS. Son gelatina y oxidasa positivos, son bacilos curvos gram negativos y producen ácido a partir de la glucosa, tanto en la oxidación como en la fermentación, en el caldo de cultivo de Hugh-Leifson.

B 7.7.6.3.3 Pruebas bioquímicas. Las reacciones bioquímicas para identificación de *V. cholerae* y otras especies bacterianas afines figuran en el cuadro anexo. La fórmula para todos los medios bioquímicos deberá contener por lo menos un 2% de NaCl. En vez de medios convencionales se pueden usar tiras AP120E, con 2% de NaCl como diluyente. Para el *V. cholerae* se puede usar solución salina fisiológica (0,85% de NaCl) como diluyente.

B 7.7.6.3.4 Prueba serológica de aglutinación. Usar antisuero de diagnóstico del grupo 01 y del subgrupo Inaba (factores AC) y Ogawa (Factores AB) para el antígeno del serotipo 01. Usar cultivos de 16 a 24 horas producidos en TSA. Incluir cultivos positivos y negativos, y los controles salinos para cada antisuero usado. Seguir las instrucciones del antisuero. Como es posible que los antígenos de los antisueros estén relacionados entre sí, hay que realizar pruebas bioquímicas para confirmar que el cultivo puro sea de *V. cholerae* 01 o No 01.

Nota: Anticuerpos monoclonales están disponibles, pero el anti-B y anti-C reaccionan opuestamente con bacterias de otras especies. Uso de anticuerpos policlonales y/o monoclonales será para el antígeno del complejo 01.

B 7.7.6.3.4.1 Los cultivos que aglutinan con el antisuero del grupo 01, pero no en solución salina fisiológica simple, son de *V. cholerae* del grupo 01 si las reacciones bioquímicas confirman que el cultivo puro es de *V. cholerae*. Los cultivos que se aglutinan con este antisuero para grupos específicos pueden ser clasificados según el subtipo con anticuerpos Inaba y Ogawa.

B 7.7.6.3.4.2 Los cultivos que aglutinan con el suero polivalente (grupo 01) y con los antisueros Inaba y Ogawa, tienen los 3 factores (A, B y C) y son del serotipo Hikojima.

B 7.7.6.3.4.3 Los cultivos que aglutinan con el antisuero polivalente pero no aglutinan con antisueros Inaba y Ogawa, no se pueden tipificar con estos antisueros.

B 7.7.6.3.4.4 Los cultivos de *V. cholerae* cuya identidad se haya confirmado con métodos bioquímicos y que no aglutinen con el antisuero del grupo 01 son *V. cholerae* No 01. El suero para la clasificación de *V. cholerae*_No 01 según el tipo se puede obtener de R.J. Siebeling.

B 7.7.6.3.4.5 Los cultivos que se aglutinan en el antisuero del grupo 01 y en solución salina, no se pueden clasificar según el tipo. Sin embargo, si se usa un medio más rico, como en TSA o agar infusión cerebro corazón (BHI), se puede eliminar esta autoaglutinación.

B 7.7.6.3.5 Características mínimas para la identificación de *V. cholerae*.

Las características que permiten suponer la presencia de *V. cholerae* como mínimo son las siguientes:

B 7.7.6.3.5.1 Morfología.

B 7.7.6.3.5.2 Bacilo o bacilo encorvado, esporogénico y gram negativo.

B 7.7.6.3.5.3 Aspecto en TSI.

B 7.7.6.3.5.4 Estría ácido, picadura ácido, gas negativo y H₂S negativo.

B 7.7.6.3.5.5 Prueba de Hugh-Leifson.

B 7.7.6.3.5.6 Fermentación de la glucosa y oxidación positiva.

B 7.7.6.3.5.7 Citocromo-oxidasa positivo.

B 7.7.6.3.5.8 Prueba de la Dihidrolasa arginina: negativo.

B 7.7.6.3.5.9 Prueba de la Lisinadescarboxilasa: positivo.

B 7.7.6.3.5.10 Prueba de VP: Positivo El Tor, negativo Clásico y *V. mimicus*.

Crecimiento a 42°C: positivo.

B 7.7.6.3.5.11 Prueba de halofilia con NaCl. 0% : positivo, 3% : positivo, 6%: usualmente negativo. Algunas cepas de *V. cholerae* NO 01 se desarrollan a 0% de NaCl.

B 7.7.6.3.5.12 Fermentación de la sacarosa: positivo para *V. cholerae* (negativo para *V. mimicus*).

B 7.7.6.3.5.13 Prueba de ONPG: positivo.

B 7.7.6.3.5.14 Fermentación de la arabinosa: negativo.

B 7.7.6.3.5.15 0/129 sensitiva: sensible para 10 y 150 µg 0/129

REACCIONES DE ALGUNOS *Vibrio* spp. EN AGAR KIA, TSI Y AGS.

Microorganismos	KIA		TSI		AGS	
	Estría	Picadura	Estría	Picadura	Estría	Picadura
<i>V. cholerae</i>	K	A	A(K)*	A	K	a
<i>V. mimicus</i>	K	A	K(A)*	A	K	A
<i>V. parahaemolyticus</i>	K	A	K	A	K	A
<i>V. alginolyticus</i>	K	A	A	A	K	A
<i>V. vulnificus</i>	K o A	A	K(A)*	A	K	A
<i>Aeromonas hydrophyla</i>	K o A	A	K o A	A	K	K
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	K o A	A	K o A	A	N	N

* = Raramente K = Alcalino A = Acido a = Ligeramente ácido N = Neutro

Ninguna de las especies enumeradas produce sulfuro de hidrógeno en medios KIA, TSI o AGS, ni una cantidad perceptible de gas a partir de glucosa en medios KIA, TSI o AGS. Algunas especies de *Aeromonas* spp. Pueden producir gas a partir de glucosa en estos medios.

B 7.8 Método para la determinación de *Staphylococcus aureus***B 7.8.1 Fundamento**

Este método permite hacer una estimación del contenido de *Staphylococcus aureus* en alimentos, se efectúa directamente en placas de medio de cultivo selectivo y diferencial, con la confirmación mediante las pruebas de coagulasa y termonucleasa. Este método es adecuado para el análisis de alimentos en los cuales se esperen más de 100 células de *Staphylococcus aureus* por g.

B 7.8.2 Reactivos

En caso de disponerse de fórmulas comerciales deshidratadas, para su preparación se 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 objeto de esta norma deben ser grado analítico.

B 7.8.2.1 Soluciones diluyentes**B 7.8.2.2 Solución reguladora de fosfatos (Solución concentrada)**

Ingredientes	Cantidad
Fosfato monopotásico	34,0 g
Agua	1 L

Preparación

Disolver el fosfato en 500 mL de agua y ajustar el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio 1 N, aforar con agua a 1 L.

Esterilizar durante 15 min a 121°C ±1, conservar en refrigeración (solución concentrada).

Tomar 1,25 mL de la solución concentrada y llevar a 1 L con agua (solución de trabajo).

Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 mL según se requiera.

Esterilizar a 121°C ±1 durante 15 min.

Después de la esterilización, los volúmenes finales y el pH de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

B 7.8.2.3 Agua peptonada

Ingredientes	Cantidad
Peptona	1,0 g
Cloruro de sodio	8,5 g
Agua	1 L

Preparación

Disolver los componentes en un litro de agua.

Ajustar el pH a 7,0 con solución de hidróxido de sodio 1N.

Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 mL según se requiera.

Esterilizar a 121°C ±1 durante 15 min.

Después de la esterilización los volúmenes finales y el pH de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

B 7.8.2.4 Medios de cultivo**B 7.8.2.5 Medio de Baird-Parker**

Ingredientes	Cantidad
Medio base (numeral B 7.8.2.6)	95,0 mL
Solución de telurito de potasio (numeral B 7.8.2.7)	1,0 mL
Emulsión de yema de huevo (numeral B 7.8.2.9)	5,0 mL

Preparación

Cuando el medio base esté a 45°C, agregar los demás ingredientes y mezclar.

Colocar de 15 a 20 mL del medio completo, enfriar y dejar solidificar.

Las placas pueden almacenarse por 48 h a temperatura de 0 a 5°C.

B 7.8.2.6 Medio base de Baird-Parker

Ingredientes	Cantidad
Tripóna	10 g
Extracto de levadura	1,0 g
Extracto de carne	5,0 g
Glicina	12,0 g
Cloruro de litio	5,0 g
Piruvato de sodio	10,0 g
Agar	20,0 g
Agua	1,0 l

Preparación

Disolver los ingredientes o el agar base en agua y calentar con agitación constante y hervir durante 1 min. Esterilizar a 121°C ±1 durante 15 min.

Enfriar y mantener el medio a 45°C.

B 7.8.2.7 Solución de telurito

Ingredientes	Cantidad
Telurito de potasio	1,0 g
Agua	100,0 mL

Preparación

Disolver el telurito de potasio en agua y esterilizar.

La solución puede ser almacenada por varios meses a temperatura de 0 a 5°C.

B 7.8.2.8 Solución salina isotónica

Ingredientes	Cantidad
Cloruro de sodio	0,85 g
Agua	100,0 mL

Preparación

Disolver el ingrediente en agua y esterilizar a 121°C ±1 durante 15 min.

B 7.8.2.9 Emulsión de yema de huevo

Preparación

Lavar con agua y jabón los huevos frescos que sean necesarios y limpiarlos con una solución de tintura de yodo (solución alcohólica al 2%) o sumergirlos en solución de cloruro mercúrico (1:1000). Enjuagar con agua estéril y secar con gasa estéril.

En campana de flujo laminar o en condiciones asépticas, abrir los huevos y vaciarlos en un separador de claras estéril. Transferir las yemas a una probeta hasta un volumen de 60 mL y completar a 90 mL con solución salina isotónica.

Verter la emulsión a un matraz Erlenmeyer con perlas de vidrio estéril y agitar fuertemente para formar la emulsión.

Filtrar a través de gasa.

Las placas deben utilizarse dentro de las 48 h siguientes a su preparación.

B 7.8.2.9 Caldo de infusión cerebro-corazón (BHI)

Ingredientes	Cantidad
Infusión de cerebro de ternera	200,0 mL
Infusión de corazón de res	250,0 mL
Peptona de gelatina	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Fosfato disódico dodecahidratado	2,5 g
Glucosa	2,0 g
Agua	1,0 mL

Preparación

Disolver los ingredientes en agua y calentar ligeramente si es necesario.

Distribuir y esterilizar durante 15 min a 121°C ±1.

B 7.8.2.10 Acido desoxirribonucleico helicoidal de timo de ternera.

Ingredientes	Cantidad
Acido desoxirribonucleico helicoidal de timo de ternera o equivalente	0,03 g
Agar	1,0 g
Cloruro de calcio anhidro (solución 0,01 M) (numeral B 7.8.2.11)	0,10 mL
Cloruro de sodio	1,0 g
Azul de toluidina (solución 0,1 M) (numeral B 7.8.2.12)	0,30 mL
Tris-(hidroximetil-aminometano) (Tris solución 0,05 M, pH 9) (numeral B 7.8.2.13)	100 mL

Preparación

Disolver los ingredientes, excepto el azul de toluidina agitando hasta completar la disolución del ácido desoxirribonucleico y calentar a ebullición.

Agregar el azul de toluidina. Distribuir en frascos pequeños con tapón de hule. No es necesario esterilizar.

Este medio es estable a temperatura ambiente hasta 4 meses y funciona perfectamente aun después de fundirlo varias veces.

Tomar un porta objetos limpio y agregar 3 mL del medio fundido esparciéndolo por la superficie.

Cuando el agar solidifique, hacer orificios con la punta de una pipeta Pasteur.

Conservar en refrigeración para evitar la deshidratación.

B 7.8.2.11 Solución de cloruro de calcio anhidro 0,01 M

Cloruro de calcio PM = 110,99

Disolver 0,1199 g de cloruro de calcio en 100 mL de agua.

B 7.8.2.12 Solución de azul de toluidina 0,1 M

Disolver 3,05 g de azul de toluidina en 100 mL de agua.

B 7.8.2.13 Solución amortiguadora 0,05 M Tris-(hidroximetilaminometano)

(Tris pH 9) PM = 121,1

Disolver 6,055 g de Tris en 100 mL de agua.

B 7.8.2.14 Plasma de conejo

Emplear plasma deshidratado o rehidratado de conejo siguiendo las instrucciones del fabricante y agregar ácido etilendiaminotetracético (EDTA) en solución al 0,1% en plasma rehidratado. Si se utiliza plasma deshidratado diluir con agua estéril en proporción de 1:3.

Puede emplearse plasma de conejo liofilizado adicionado de EDTA. No debe emplearse sangre citratada.

B 7.8.3 Materiales

Todos los instrumentos que se utilicen para trabajar la muestra deben esterilizarse mediante horno, durante 2 h de 170-175°C o como alternativa en autoclave durante 15 min como mínimo a 121°C ±1.

B 7.8.3.1 Cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas y separador de huevo.**B 7.8.3.2** Tubos de cultivo de 16 mm x 150 mm o frascos de 125 a 250 mL de capacidad.**B 7.8.3.3** Tubos de cultivo de 10 mm x 75 mm.**B 7.8.3.4** Cajas Petri de 90 a 100 mm de diámetro.

B 7.8.3.5 Pipetas bacteriológicas de 1 mL y 10 mL de capacidad graduadas en 0,1 mL y 1 mL respectivamente y diámetro de 2 a 3 mm.

B 7.8.3.6 Pipetas Pasteur.**B 7.8.3.7** Probetas.

B 7.8.3.8 Varillas de vidrio de 3,5 mm de diámetro aproximadamente y 20 cm de largo dobladas en ángulo recto.

B 7.8.3.9 Matraz Erlenmeyer con perlas de vidrio

B 7.8.3.10 Cámara húmeda: consiste en una caja Petri en la cual se coloca una varilla de vidrio en forma de "V" rodeada de algodón humedecido con agua.

B 7.8.4 Aparatos**B 7.8.4.1** Horno para esterilizar que alcance 180°C.**B 7.8.4.2** Autoclave con termómetro.**B 7.8.4.3** Baño de agua con regulador de temperatura de 35 ± 0,5°C.**B 7.8.4.4** Baño de agua con regulador de temperatura de 45 ± 0,5°C.**B 7.8.4.5** Balanza con capacidad no mayor de 2,500 g y sensibilidad de 0,1 g.**B 7.8.4.6** Incubadora a 35 ± 1°C.**B 7.8.5** Preparación de la muestra

La preparación de la muestra se debe realizar de acuerdo a lo establecido en B 7.1 "Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico".

B 7.8.6 Procedimiento

B 7.8.6.1 Utilizando diferentes pipetas de 1 mL para cada dilución, depositar 0,1 mL sobre la superficie de las placas de agar Baird-Parker.

B 7.8.6.2 Distribuir el inóculo sobre la superficie del agar con varillas estériles de vidrio en ángulo recto, utilizando una para cada dilución.

B 7.8.6.3 Mantener las placas en su posición hasta que el inóculo sea absorbido por el agar.

B 7.8.6.4 Invertir las placas e incubar de 45 a 48 h a 35°C.

B 7.8.6.5 Seleccionar las placas que tengan entre 15 y 150 colonias típicas de *Staphylococcus aureus*; si no es posible, seleccionar las placas de las diluciones más altas no obstante tengan más de 150 colonias.

B 7.8.6.6 Cuando las placas tengan menos de 15 colonias típicas también pueden ser utilizadas y al informe se debe agregar la nota de "valor estimado".

B 7.8.6.7 Las colonias típicas son negras, circulares, brillantes, convexas, lisas, de diámetro de 1 a 2 mm y muestran una zona opaca y un halo claro alrededor de la colonia.

B 7.8.6.8 Seleccionar las colonias de acuerdo con el siguiente cuadro para realizar las pruebas de coagulasa y termonucleasa:

CUADRO 1

Número de colonias sospechosas en caja	Número de colonias por probar
Menos de 50	3
51 a 100	5
101 a 150 o más	7

B 7.8.6.9 Seleccionar el número de colonias y sembrar cada una en tubos con 0,5 mL de caldo de infusión cerebro-corazón.

B 7.8.6.10 Incubar a 35°C durante 24 h.

B 7.8.6.11 Inocular en la misma forma cepas conocidas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* como testigos positivo y negativo.

B 7.8.6.12 Después del periodo de incubación pasar con una pipeta de 1 mL, 0,3 mL de cada cultivo a otro tubo de 10 mm x 75 mm y conservarlo para la prueba de termonucleasa. El resto del cultivo se usa para la prueba de coagulasa.

B 7.8.6.13 Prueba de coagulasa

B 7.8.6.13.1 Agregar a los 0,2 mL del cultivo anterior, 0,2 mL de plasma de conejo diluido volumen a volumen con solución salina estéril.

B 7.8.6.13.2 Incubar en baño de agua de 35 a 37°C y observar durante 6 h a intervalos de 1 h; si no hay formación de coágulo, observar a las 24 h. Considerar positiva la prueba si hay formación de coágulo.

B 7.8.6.13.3 Para comprobar la coagulabilidad del plasma de conejo se añade una gota de cloruro de calcio al 5% a 0,5 mL de plasma reconstituido empleado, formándose un coágulo en 10-15 seg.

B 7.8.6.14 Prueba de termonucleasa

B 7.8.6.14.1 Calentar durante 15 min, 0,3 mL de cultivo en caldo de infusión cerebro-corazón en baño de agua hirviendo.

B 7.8.6.14.2 Pasar una gota de cada cultivo por medio de una pipeta Pasteur a un orificio del medio, incluye testigo.

B 7.8.6.14.3 Incubar a 35°C en cámara húmeda de 4 a 24 h.

B 7.8.6.14.4 La aparición de un halo color rosa extendido de por lo menos 1 mm alrededor de la perforación se califica como positiva.

B 7.8.7 Cálculo y expresión de resultados**B 7.8.7.1 Cálculo**

Hacer el cálculo del contenido de microorganismos en el producto tomando en cuenta el número de colonias totales, el número de colonias confirmadas, la dilución y el volumen inoculado (0,1 mL).

Ejemplo 1:

Si la caja tiene 80 colonias en la dilución 1:1000

Se toman 5 colonias para la prueba, de éstas dan 4 positivas, el cálculo es:

$$\frac{80 \times 4}{5} = 64 \times 1000 \times 10 = 640\,000$$

Ejemplo 2:

Si la caja tiene 14 colonias en la dilución 1:10

Se toman 3 colonias para la prueba, de éstas dan 2 positivas, el cálculo es:

$$\frac{14 \times 2}{3} = 9,3 \times 10 \times 10 = 930$$

B 7.8.7.2 Expresión de los resultados:

Según ejemplo 1:

Informar como *Staphylococcus aureus* 640 000 UFC/g

Según ejemplo 2:

Informar como *Staphylococcus aureus* 930 UFC/g valor estimado

Si las pruebas confirmativas resultan negativas en todas las colonias probadas, informar como:

0 UFC/g en muestras directas

-10 UFC/g en muestras de dilución 1:10

-100 UFC/g en muestras de dilución 1:100

En la práctica los resultados pueden variar, esto dependerá del técnico que trabaje el método y el grado de confiabilidad del mismo, que en el 95% de los casos es de $\pm 16\%$ a $\pm 52\%$.

B 7.9 Determinación de enterotoxina estafilocócica por el método de ELISA.**B 7.9.1 Principio del método.**

Este método se basa en un inmunoensayo visual el cual proporciona una prueba rápida (4 h), sensible (1,0 ng o más por mL o g), y específica para la identificación de las enterotoxinas A-E estafilocócicas. Sin embargo, con esta prueba no se identifican los serotipos de enterotoxina, en forma individual. La prueba de Elisa se realiza en configuración de "sandwich".

B 7.9.2 Materiales y Equipo

B 7.9.2.1 Algodón absorbente.

B 7.9.2.2 Micropipetas de 50-200 μ L y 5-20 μ L.

B 7.9.2.3 Puntas de plástico para micropipeta.

B 7.9.2.4 Plástico para envolver o sellar recipientes de plástico.

B 7.9.2.5 Papel pH (intervalo 0-14).

B 7.9.2.6 Frascos de plástico de 500 mL.

B 7.9.2.7 Jeringas de plástico de 25 mL.

B 7.9.2.8 Tubos para centrífuga.

B 7.9.2.9 Tubos de polipropileno de 12 x 75 mm.

B 7.9.2.10 Polietilen glicol (PEG, peso molecular de 15,000-20,000).

B 7.9.2.11 Tubo de diálisis (12,000-14,000 peso molecular exclusión).

B 7.9.2.12 Vasos de precipitados de 250 mL.

B 7.9.2.13 Filtros tipo jeringa (para filtrar los alimentos). Preparar jeringas de plástico desechables (0,25 mL) e insertar suficiente cantidad de algodón absorbente, para hacer un empaque de 0,5 cm. Pasar 5,0 mL de agua destilada, presionar con el émbolo para asegurarse de formar un paquete firme. Preparar inmediatamente antes de filtrar los extractos de alimento, para tratar con el aditivo provisto con el equipo.

B 7.9.2.14 Placa de 48 o 96 pozos recubiertos con el grupo de antisueros *.

B 7.9.2.15 Soporte para sostener la placa *.

B 7.9.2.16 Instructivo del método *.

B 7.9.2.17 Comparador de color *.

B 7.9.2.18 Hoja de resultados *.

*Materiales suministrados por el fabricante.

B 7.9.2.19 Equipo TECRA™

B 7.9.2.20 Incubadora a 35-37°C.

B 7.9.2.21 Omnimixer, licuadora (o equivalente) para la preparación de los extractos de alimentos.

B 7.9.2.22 Centrifuga a 1000 -3000 x g.

B 7.9.2.23 Agitador de microplacas (opcional).

B 7.9.2.24 Lector de microplacas (opcional).

B 7.9.2.25 Balanza.

B 7.9.3 Reactivos.

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y por agua debe entenderse agua destilada.

B 7.9.3.1 Solución amortiguadora Tris 0,25 M (30,28 g TRIS/L, pH 8,0).

B 7.9.3.2 Solución de hidróxido de sodio 1,0 N (NaOH).

B 7.9.3.3 Acido clorhídrico (HCl).

B 7.9.3.4 Agua destilada o deionizada.

B 7.9.3.5 Hipoclorito de sodio.

B 7.9.3.6 BHI con 0,7% de agar (m/v).

B 7.9.3.7 Solución de lavado. Contiene: 1,5 g de tris(hidroximetil) aminometano (Tris), 6g de NaCl, 2,0 g polioxietileno sorbitano monolaurato (Tween 20), y 0,001 g de timerosal en 25,0 mL de H₂O *

B 7.9.3.8 Aditivo para la muestra. Es una solución que contiene: 2 g de Tween 20 y 0,001 g de timerosal en 6,0 mL de H₂O *.

B 7.9.3.9 Control positivo: Diluir 25 µL de control positivo concentrado (toxina estafilocócica tipo B, 0,1 g Na₂B₄O₇, 0,1 g de NaCl y 0,001 g de timerosal en 4,0 mL de H₂O), en 2,5 mL de sol. de lavado (7.10.5.1) *.

B 7.9.3.10 Control negativo. Contiene: 0,0072 g de Tris, 0,1 g de NaCl, 0,001 g de timerosal y 0,01 g de Tween 20 en 6,0 mL de H₂O *.

B 7.9.3.11 Diluyente del Conjugado. Contiene: 0,2 g Na₂B₄O₇, 0,1 g de NaCl, 0,1 g de gelatina, y 0,001 g de timerosal en 13,5 mL de H₂O *.

B 7.9.3.12 Conjugado liofilizado. Un frasco que contiene antisuero polivalente (A-E) liofilizado, conjugado; 0,003g de Na₂B₄O₇, 0,002 g de CaCl₂, y 0,0001 g de timerosal. Para su uso, agregar al frasco 13 mL del diluyente del párrafo anterior*.

B 7.9.3.13 Aditivo para la muestra Diluyente del Substrato. Cada 26 mL de H₂O contienen 0,2 g de ácido acético y 0,01 g de H₂O₂*.

B 7.9.3.14 Substrato. Un frasco de liofilizado que contiene; 0,01 g de 2,2'-di-azino(sulfonato de 3-etil benzotiazolin), 0,01 g de EDTA, y 0,1 g de NaH₂PO₄. Para su uso, agregar al frasco 26mL del diluyente del substrato.

B 7.9.3.15 Solución para detener la reacción (solución stop). Cada 6,0 mL contienen; 1,5 g de NaF en 6,0 mL de agua

*Reactivos suministrados por el fabricante

B 7.9.4 Procedimiento.

B 7.9.4.1 Preparación de las muestras.

B 7.9.4.1.1 Productos fluidos y productos deshidratados.

Pesar 25 g de leche deshidratada y agregar 125 mL de solución Tris 0,25 M pH 8,0 Solución amortiguadora Tris. Continuar como se indica para leche fluida. En muestras de 5,0 mL, verificar que el pH esté en un intervalo de 7,0-8,0. Agregar 50 µL de Aditivo para la muestra. En el caso de extractos más claros, ajustar el pH a 4,0 con HCl concentrado. Para muestras de leche de 50 mL, verificar que el pH esté en un intervalo de 7,0-8,0. Agregar 50 µL de aditivo Aditivo para la muestra. Centrifugar la muestra 10 min a 1000-3000 x g. Decantar el extracto y pasar 5,0 mL aproximadamente, a través de una jeringa empacada con algodón absorbente humedecido previamente, y recibir en un tubo de polipropileno. Ajustar nuevamente el pH a 7,0-8,0 (usar papel pH). Agregar 50 µL de aditivo Aditivo para la muestra y mezclar.

B 7.9.4.1.2 Ingredientes deshidratados.

Agregar 125 mL de solución Tris 0,25 M pH 8,0 a 25 g de muestra, homogeneizar en licuadora (a velocidad alta), durante 3 min. Centrifugar la muestra 10 min a 1000-3000 x g y recoger el extracto (sobrenadante). Quitar el émbolo de la jeringa de plástico que contiene el empaque de algodón absorbente humedecido previamente y con cuidado, pasar el extracto a través del empaque y recibir el eluido. Tomar 5,0 mL de eluido y ajustar el pH a 7,0-8,0. Agregar 50 µL de aditivo, y mezclar.

B 7.9.4.1.3 Otros alimentos.

Agregar 50 mL de solución Tris 0,25 M pH 8,0 a 25 g de muestra, y homogeneizar en licuadora durante 3 min a velocidad alta. Centrifugar la muestra durante 10 min a 1000-3000 x g. Quitar el émbolo de la jeringa de plástico que contiene el empaque de algodón absorbente humedecido previamente, y pasar 5,0 mL de extracto a la jeringa, insertar el émbolo y con cuidado presionar el émbolo y recoger el eluido. Tomar 5 mL del eluido, ajustar a pH 7,0-8,0, si es necesario; agregar 50 µL de aditivo, y mezclar.

Nota 1: Preparar los extractos de alimentos inmediatamente antes de realizar la prueba.

Precauciones generales.

En caso de alimentos crudos fermentados, procesados o enlatados, con evidentes defectos; o de cultivos fluidos obtenidos en el laboratorio, que pudieran dar como resultado el crecimiento de microorganismos productores de peroxidasa, es necesario, antes de hacer la determinación de toxina, verificar si los extractos de alimentos o preparados a partir del cultivo en el laboratorio, contienen peroxidasa, debido a que esta enzima podría interferir con la interpretación de los resultados.

Para determinar la presencia de peroxidasa, agregar 50 µL del sustrato, en una placa de microtitulación sin tratar (no contiene anticuerpos para la enterotoxina estafilocócica). Dejar en reposo 10 min. Si el color cambia a azul o azulverdoso, indica que la muestra contiene peroxidasa intrínseca; la cual debe inactivarse. Si la muestra permanece incolora (o con el color original), realizar el análisis de enterotoxina. Para inactivar la peroxidasa intrínseca, preparar una solución al 30% (m/v) de azida de sodio y agregar 1 mL de esta solución a 4 mL de muestra (la concentración final de la azida de sodio es de 6% (m/v). Mezclar y agregar un poco de aditivo, dejar en reposo 1-2 min a temperatura del laboratorio (20-25°C). Repetir la prueba para determinar presencia de peroxidasa, como se describió anteriormente. Si la reacción es incolora o presenta el color original, continuar con la prueba.

Nota 2: Para alimentos crudos (ejemplo: verduras), seguir las precauciones generales señaladas anteriormente.

B 7.9.4.2 Preparación de reactivos.

B 7.9.4.2.1 Reconstitución de la solución de lavado.

Diluir, en un frasco de reactivos la solución concentrada (como lo indique el fabricante), con agua destilada o deionizada, para obtener 2 L. Utilizar esta "solución de lavado" para lavar los pozos y diluir el control positivo. Es recomendable el uso de pizeta. Almacenar a 4°C, cuando no se use.

B 7.9.4.2.2 Preparación del conjugado.

Agregar el diluyente del conjugado y rehidratar a temperatura del laboratorio. Mezclar suavemente. Esta preparación es el "Conjugado reconstituido".

B 7.9.4.2.3 Preparación del sustrato.

Disolver el sustrato con el diluyente asegurarse que el contenido se haya disuelto completamente. Dejar a la temperatura del laboratorio (20-25°C), antes de su uso.

B 7.9.4.2.4 Precauciones generales:

B 7.9.4.2.4.1 Observar la fecha de caducidad del equipo adquirido. Es la última fecha en la cual el producto debe utilizarse. Preparar todos los reactivos con cuidado y anotar la fecha de reconstitución, en la etiqueta externa de la caja. Usar los reactivos dentro de los 65 días a la fecha anotada en la etiqueta. Refrigerar todos los componentes (2-8°C) cuando no estén en uso. NO CONGELAR.

B 7.9.4.2.4.2 El equipo de inmunoensayo visual está preparado para utilizarse como una unidad integral; por tanto, no se deben mezclar los componentes de diferentes lotes.

B 7.9.4.2.4.3 Utilizar puntas nuevas para cada muestra de alimento. Evitar la contaminación cruzada al llenar los pozos. Si se usan propipetas de plástico para distribuir el conjugado y el sustrato, se deben mantener siempre por separado. Asegurarse de no confundir las tapas de los reactivos.

B 7.9.4.2.4.4 Usar controles positivos y negativos en cada prueba.

B 7.9.4.2.4.5 Preparar recipientes con solución al 2% de hipoclorito de sodio para desechar todas las muestras y materiales que contengan toxina.

Mantener los pozos removibles que no se usen dentro del paquete y volver a sellar con cinta, después de cada uso.

B 7.9.4.5 Determinación de la enterotoxina.**B 7.9.4.5.1** Preparación de los pozos.

Tomar del paquete el número necesario de pozos; uno para cada muestra, uno para control positivo y uno para control negativo. Si se requiere, pueden utilizarse pozos adicionales (control positivo y negativo en alimento).

B 7.9.4.5.2 Prelavado.

Con la ayuda de una piceta llenar cada pozo con solución de lavado y dejar en reposo durante 10 minutos a la temperatura de laboratorio (20-25°C). Vaciar los pozos por inversión rápida del soporte (placa); eliminar completamente todo residuo de líquido, golpeando varias veces, firmemente hacia abajo la placa, sobre una toalla de papel absorbente.

B 7.9.4.5.3 Colocación de las muestras.

Pasar alícuotas de 200 µL de los controles y muestras (extractos de alimento o de cultivos) dentro de pozos individuales. Registrar la posición de cada muestra en la hoja de registro específica. Golpear suavemente la placa para asegurarse de la distribución homogénea y del contacto de las muestras con las paredes de los pozos; el uso de un agitador de microplacas durante 30 segundos, es opcional. Cubrir los pozos con una película plástica, estirable, autoadherible o sello especial de microplacas; para evitar la evaporación. Incubar 2 hrs. a 35-37°C.

B 7.9.4.5.4 Segundo lavado.

Presionar firmemente los pozos en la placa e invertir rápidamente. Vaciar el contenido de los pozos en el recipiente de desecho (con hipoclorito de sodio al 2%). Eliminar el residuo de líquido golpeando enérgicamente, varias veces la placa invertida, sobre una toalla de papel absorbente; llenar completamente los pozos con solución de lavado, y repetir el lavado en la misma forma, de 2 a 3 veces más y finalmente vaciar los pozos.

Nota 3: El lavado profundo de los pozos es un paso crítico y asegurará una clara interpretación de los resultados.

B 7.9.4.5.5 Adición de conjugado.

Agregar 200 µL del conjugado reconstituido (enzima) a cada pozo. Volver a cubrir la placa e incubar 1 h a temperatura de laboratorio (20-25°C). Vaciar las placas y lavar profundamente, 5 veces, como se describió anteriormente en el segundo lavado.

B 7.9.4.5.6 Adición del sustrato.

Agregar, a cada pozo, 200 μ L del sustrato reconstituido. Dejar a temperatura del laboratorio (20-25°C) durante 30 min, como mínimo, hasta que el control positivo alcance la máxima absorbancia (mayor a 1,0) o al color más intenso que el número 4 del comparador de color. El desarrollo de color tiende a concentrarse alrededor de las orillas de los pozos. Para obtener resultados más precisos, golpee con suavidad los extremos de la placa, con el propósito de que el contenido de los pozos se mezcle bien antes de la lectura. Agregar a cada pozo 20 μ L de solución stop; golpear con suavidad, para mezclar los contenidos.

B 7.9.4.5.7 Determinar los resultados visualmente o mediante un lector de microtitulación.

B 7.9.4.6 Interpretación de los resultados:

Colocar la placa que sostiene los pozos sobre un fondo blanco. Comparar el color de cada pozo con el comparador de color. El control positivo de toxina (y el control positivo de alimento, si se usó) deben dar un color verde intenso, lo que indica que todos los reactivos han funcionado. Si el control negativo es significativamente más oscuro que el representado en comparador de color, significa que hubo, probablemente, un lavado inadecuado y la prueba debe repetirse.

La muestra se considera positiva, si cumple los siguientes criterios:

B 7.9.4.6.1 El control negativo está dentro del intervalo de color negativo, representado en el comparador de color, y las muestras presentan un color verde o azul más oscuro que el intervalo negativo representado en el comparador de color.

La prueba de enterotoxina se considera negativa, si se cumplen los siguientes criterios:

B 7.9.4.6.2 El control negativo está dentro del intervalo de color negativo, representado en el comparador de color, y

B 7.9.4.6.3 La muestra es incolora o tiene el color dentro del intervalo negativo, representado en el comparador de color.

B 7.9.4.7 Expresión de resultados.

Prueba positiva o negativa para enterotoxina estafilocócica

B 8 Método de prueba para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, fierro, zinc y mercurio en alimentos.

B 8.1 Fundamento

El método de absorción atómica se basa en hacer pasar un haz de luz monocromática de una frecuencia tal que puede ser absorbido por el analito que se encuentra presente en forma de vapor atómico. La medida de la intensidad luminosa antes y después de su paso por el vapor atómico permite determinar el por ciento de absorción.

La cantidad de absorción aumenta con la concentración de los átomos en el medio absorbente, es decir, la medida de la absorción aumenta con la concentración del elemento en la muestra, ya sea que esté en su condición original o sujeta a pretratamiento.

B 8.2 Reactivos

Soluciones estándares de referencia certificadas de cada uno de los metales.

Agua, debe ser destilada deionizada, con un grado máximo de conductividad de 1 μ mho/cm a 25°C.

B 8.2.1 Acido nítrico (densidad específica 1,41), grado suprapuro.

B 8.2.2 Acido nítrico (densidad específica 1,41), contenido de mercurio muy bajo.

B 8.2.3 Acido perclórico (densidad específica 1,67), grado suprapuro.

B 8.2.4 Acido clorhídrico (densidad específica 1,19), grado suprapuro.

B 8.2.5 Acido sulfúrico (densidad específica 1,84), grado suprapuro.

B 8.2.6 Acido sulfúrico 1 N a partir de la solución grado suprapuro.

B 8.2.7 Acido nítrico 65% v/v grado RA.

B 8.2.8 Peróxido de hidrógeno (densidad específica 1,12).

- B 8.2.9** Hidróxido de sodio granalla reactivo RA.
- B 8.2.10** Aire comprimido seco y limpio.
- B 8.2.11** Gases: acetileno, óxido nitroso, argón y nitrógeno, grado absorción atómica.
- B 8.2.12** Solución de Nitrato de Magnesio hexahidratado al 7% p/v. Disolver 70 g de $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ en 1000 mL de HCl 1 N.
- B 8.2.13** Acido clorhídrico 1 N. Diluir 8,3 mL de HCl y llevar a 100 mL de agua.
- B 8.2.14** Acido nítrico al 50% v/v. Diluir 50 mL de HNO_3 al 65% v/v grado suprapuro en 50 mL de agua.
- B 8.2.15** Acido clorhídrico 8 M. Diluir 66,0 mL de HCl y llevar a 100 mL con agua.
- B 8.2.16** Acido clorhídrico 0,5 N. Diluir 4,15 mL de HCl y llevar a 100 mL con agua.
- B 8.2.17** Solución de Yoduro de Potasio al 15% p/v. Disolver 15 g de KI en 100 mL de agua (esta solución debe prepararse en el momento de usarse).
- B 8.2.18** Solución de Yoduro de Potasio al 20% p/v. Disolver 20 g de KI en 100 mL de agua (esta solución debe prepararse en el momento de usarse).
- B 8.2.19** Solución de Cloruro de Potasio (10 mg/mL de K). Disolver 1,91 g de KCl en agua y diluir a 100 mL con agua.
- B 8.2.20** Solución de Nitrato de Magnesio al 50% p/v. Disolver 50 g de $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ en 100 mL de agua.
- B 8.2.21** Solución de ácido clorhídrico al 1,5% p/v. Diluir 1,5 mL de HCl en 100 mL de agua destilada deionizada.
- B 8.2.22** Solución de hidróxido de sodio al 1% p/v. Pesar 1 g de hidróxido de sodio y diluir a 100 mL con agua destilada deionizada.
- B 8.2.23** Solución de borohidruro de sodio al 4% p/v en solución de hidróxido de sodio al 1% p/v. Pesar 4 g de borohidruro de sodio en 100 mL de una solución de hidróxido de sodio al 1% p/v. Filtrar al vacío.
- B 8.2.24** Solución reductora para mercurio. Mezclar 50 mL de ácido sulfúrico concentrado con aproximadamente 300 mL de agua. Enfriar a temperatura ambiente y disolver 15 g de cloruro de sodio, 15 g de sulfato o cloruro de hidroxilamina y 25 g de cloruro o sulfato estanoso en solución.
- B 8.2.25** Diluir a 500 mL. Solución de dilución para mercurio. En un matraz de 1 L, conteniendo de 300 a 500 mL de agua destilada deionizada, agregar 58 mL de ácido nítrico concentrado de muy baja concentración de mercurio y 67 mL de ácido sulfúrico concentrado. Diluir al volumen con agua.
- B 8.2.26** Solución de trabajo de As de 1 $\mu g/mL$. Diluir 1 mL de la solución patrón de 1000 $\mu g/mL$ a 1 L con ácido sulfúrico 1N preparada a partir de la solución grado suprapuro. Preparar fresca cada día.
- B 8.3** Materiales
- B 8.3.1** Matraces Kjeldahl de 500 mL y 800 mL.
- B 8.3.2** Sistema de reflujo con refrigerante.
- B 8.3.3** Crisoles Vycor de 40 a 50 mL de capacidad.
- B 8.3.4** Crisoles de platino de 40 a 50 mL de capacidad.
- B 8.3.5** Matraces Erlenmeyer de diferentes capacidades.
- B 8.3.6** Matraces volumétricos de diferentes capacidades.
- B 8.3.7** Matraces redondos de fondo plano de 50 mL.
- B 8.3.8** Bombas Parr.
- B 8.3.9** Micropipetas o pipetas de Eppendorf de diferentes capacidades.
- B 8.3.10** Puntas de plástico para micropipetas.
- B 8.3.11** Papel filtro Whatman No. 2.
- B 8.3.12** Perlas de ebullición.
- B 8.3.13** Varillas de plástico.

B 8.3.14 Tubos de ensayo graduados de propilen o propileno de 15 mL.

B 8.3.15 Recipientes de propilen o propileno.

B 8.3.16 Embudos de filtración de diferentes capacidades.

B 8.3.17 Material común de laboratorio.

B 8.3.18 Todo el material utilizado debe someterse a lavado de acuerdo con las siguientes instrucciones:

B 8.3.19 El jabón que se use debe ser de preferencia neutro.

B 8.3.20 Enjuagar perfectamente con agua corriente.

B 8.3.21 Sumergir el material de vidrio o plástico en un recipiente (de preferencia plástico) que contenga una solución de ácido nítrico grado RA al 30 %.

B 8.3.22 Dejarlo tapado y reposando por un lapso de 24 horas.

B 8.3.23 Quitar el exceso de ácido nítrico con varios enjuagues (5 o 6 veces) con agua deionizada.

B 8.3.24 Dejar escurrir y secar.

B 8.3.25 Guardar en cuanto esté seco para evitar contaminación por partículas en el aire.

B 8.4 Aparatos e instrumentos

B 8.4.1 Aparatos

B 8.4.1.1 Lámparas de cátodo hueco o de descarga sin electrodos para determinar arsénico, cadmio, cobre, estaño, fierro, mercurio, plomo y zinc.

B 8.4.1.2 Fuente de radiofrecuencia en caso de usar lámparas de descarga.

B 8.4.1.3 Automuestreador y recirculador de agua.

B 8.4.1.4 Placa de calentamiento con regulador que alcance una temperatura de 400 a 450 °C.

B 8.4.1.5 Horno de microondas.

B 8.4.1.6 Autoclave que alcance $121 \pm 5^\circ\text{C}$ o 15 lb de presión.

B 8.4.1.7 Centrifuga de laboratorio capaz de mantener 1600 rpm.

B 8.4.2 Instrumentos

Los instrumentos que a continuación se indican deben estar calibrados y ajustados antes de su operación.

B 8.4.2.1 Espectrómetro de absorción atómica equipado con los accesorios para flama, horno de grafito, generador de hidruros o vapor frío, dependiendo del método a seguir.

B 8.4.2.2 Balanza analítica con sensibilidad de 0,1 mg.

B 8.4.2.3 Mufla capaz de mantener una temperatura de $550 \pm 10^\circ\text{C}$.

B 8.4.2.4 Horno de calentamiento (estufa) con intervalo de temperatura de $120 \pm 5^\circ\text{C}$.

B 8.5 Preparación de la muestra

B 8.5.1 Digestión para la determinación de Cd, Cu, Fe, Pb y Zn.

B 8.5.1.1 Digestión por vía húmeda.

B 8.5.1.1.1 Pesar con precisión de $\pm 0,1$ mg, una cantidad apropiada de muestra.

Para la determinación por el método de absorción por flama pesar como máximo 40 g de jugo o bebida, 20 g de alimentos que contengan del 50 al 75% de agua y 10 g de alimentos sólidos o semisólidos. Limite el contenido de grasa o aceite a un máximo de 4 g y el total de materia orgánica a 5 g.

B 8.5.1.1.2 Añadir 10 mL de ácido nítrico concentrado y dejar reposar toda la noche o iniciar directamente la digestión.

B 8.5.1.1.3 Usar matraz de Kjeldhal o matraz conectado al sistema de refrigerantes.

B 8.5.1.1.4 Calentar suavemente.

B 8.5.1.1.5 Digerir la muestra 3 horas o más tiempo si es necesario (algunas muestras requieren la adición de mayor cantidad de ácido nítrico) hasta la aparición del color traslúcido, si queda ámbar, adicionar peróxido de hidrógeno gota a gota con agitación continua (reacción exotérmica).

B 8.5.1.1.6 Enfriar.

B 8.5.1.1.7 Recuperar, filtrar y llevar a un volumen conocido en matraz volumétrico.

B 8.5.1.1.8 Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

B 8.5.1.1.9 Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica por flama u horno de grafito).

B 8.5.1.2 Digestión por vía seca.

B 8.5.1.2.1 Pesar con precisión de $\pm 0,1$ mg, una cantidad apropiada de muestra.

B 8.5.1.2.2 Para la determinación por el método de absorción por flama pesar como máximo 40 g de jugo o bebida, 20 g de alimentos que contengan del 50 al 75% de agua y 10 g de alimentos sólidos y semisólidos. Limite el contenido de grasa o aceite a un máximo de 4 g y el total de materia orgánica a 5 g.

B 8.5.1.2.3 Añadir 10 mL de ácido nítrico concentrado y dejar reposar toda la noche o iniciar directamente la digestión. En productos con alta concentración de proteínas adicionar una solución de nitrato de magnesio al 7,0% p/v y mezclar completamente, llevar a sequedad aproximadamente durante 6 horas en estufa a una temperatura de 90 a 95°C.

B 8.5.1.2.4 Colocar la muestra en una mufla y elevar la temperatura lentamente de 2 a 4°C por minuto hasta 350°C. Mantener la temperatura hasta que cesen los humos.

B 8.5.1.2.5 Elevar gradualmente la temperatura de 500 a 550°C para evitar que la muestra se incinere y mantener esa temperatura durante 16 horas o toda la noche.

B 8.5.1.2.6 Apagar la mufla y dejar enfriar.

B 8.5.1.2.7 Un segundo paso de calcinación puede ser requerido para remover algunos residuos de carbón, mediante el siguiente procedimiento:

B 8.5.1.2.8 Lavar las paredes del crisol con 2 mL de ácido nítrico al 50%. Colocar la muestra en una placa de calentamiento puesta a 120°C para remover el exceso de ácido. Colocar la muestra en una mufla fría y elevar la temperatura gradualmente de 500 a 550°C, manteniéndola por el tiempo necesario. Repetir este procedimiento cuantas veces sea necesario hasta que quede libre de carbón remanente.

B 8.5.1.2.9 Disolver las cenizas completamente en 5 mL de ácido clorhídrico 1N, transferir la muestra disuelta a un tubo de propileno o a un matraz de volumen conocido, enjuagar el crisol con dos alícuotas de 5 mL de ácido clorhídrico 1 N y transferir al mismo tubo o matraz para obtener un volumen de 15 mL en el primero y llevar al aforo en el segundo, tapar y mezclar, si existe presencia de partículas o materia insoluble, filtrar en papel Whatman No. 2, antes de la determinación.

B 8.5.1.2.10 Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

B 8.5.1.2.11 Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica: flama u horno de grafito).

B 8.5.1.3 Digestión por vía húmeda para la determinación de Sn.

B 8.5.1.3.1 Proceder igual que en el punto I) de B 8.5.1.1

B 8.5.1.3.2 No adicionar ácido nítrico si no se lleva cabo la digestión total en el mismo día.

B 8.5.1.3.3 Adicionar 30 mL de ácido nítrico concentrado al matraz y calentar suavemente por 15 minutos en campana para iniciar la digestión, evitando una excesiva producción de espuma.

B 8.5.1.3.4 Hervir suavemente hasta tener un remanente de 3 a 6 mL o hasta que la muestra empiece a secarse en el fondo. No dejar que la muestra se calcine.

B 8.5.1.3.5 Retirar la muestra del calor.

B 8.5.1.3.6 Al mismo tiempo correr dos blancos de reactivos.

B 8.5.1.3.7 Adicionar 25 mL de ácido clorhídrico concentrado, calentar suavemente durante aproximadamente 15 minutos, hasta que todo el cloro sea liberado. Aumentar la temperatura gradualmente hasta ebullición.

B 8.5.1.3.8 Evaporar hasta obtener de 10 a 15 mL, usando un matraz similar con 15 mL de agua como patrón de volumen.

- B 8.5.1.3.9** Adicionar aproximadamente 40 mL de agua.
- B 8.5.1.3.10** Agitar y pasar a un matraz de 100 mL y enjuagar con 10 mL de agua.
- B 8.5.1.3.11** Cuando el ácido clorhídrico está presente en la digestión, las muestras se pueden quedar toda la
- B 8.5.1.3.12** noche o por más tiempo.
- B 8.5.1.3.13** Agregar 1 mL de solución de cloruro de potasio en cada matraz.
- B 8.5.1.3.14** Enfriar a temperatura ambiente.
- B 8.5.1.3.15** Diluir con agua y agregar más agua para compensar el volumen de grasa en el matraz.
- B 8.5.1.3.16** Mezclar perfectamente y filtrar de 30 a 50 mL a través de un papel filtro Whatman No. 2 y recoger el filtrado en un recipiente de propileno, polipropileno o polietileno.
- B 8.5.1.3.17** No filtrar los blancos. Tapar las botellas durante el análisis. Las soluciones son estables por varios meses.
- B 8.5.1.3.18** Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.
- B 8.5.1.3.19** Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica: flama u horno de grafito).
- B 8.5.1.4** Digestión por vía húmeda para la determinación de Hg.
- B 8.5.1.4.1** Sistema de reflujo.
- B 8.5.1.4.1.1** Pesar con precisión de $\pm 0,1$ mg, la cantidad apropiada de muestra, dependiendo el tipo de ésta, en un matraz de digestión y adicionar perlas de ebullición.
- B 8.5.1.4.1.2** Conectar el matraz al sistema de reflujo y agregar poco a poco la cantidad necesaria de ácido nítrico concentrado y calentar durante media hora o hasta que no se observen cambios en la digestión.
- B 8.5.1.4.1.3** Dejar enfriar y agregar una mezcla de ácido nítrico y ácido sulfúrico concentrados (1 + 1).
- B 8.5.1.4.1.4** Calentar y agregar más ácido nítrico gota a gota sobre las paredes del recipiente, hasta que el color oscuro de la solución desaparezca.
- B 8.5.1.4.1.5** Enfriar.
- B 8.5.1.4.1.6** Si existe grasa o cera filtrar la solución.
- B 8.5.1.4.1.7** Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.
- B 8.5.1.4.1.8** Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica de vapor frío).
- B 8.5.1.4.2** Sistema cerrado.
- B 8.5.1.4.2.1** Pesar con precisión de $\pm 0,1$ mg, la cantidad apropiada de muestra, dependiendo el tipo de ésta, en el recipiente de digestión.
- B 8.5.1.4.2.2** Agregar la cantidad necesaria de ácido nítrico concentrado.
- B 8.5.1.4.2.3** Tapar y sellar perfectamente el recipiente de digestión.
- B 8.5.1.4.2.4** Si el recipiente de digestión es un matraz Erlenmeyer, colocar éste en una autoclave a 15 lb por 30 minutos. Si se utiliza bomba Parr, calentar en parrilla controlando la temperatura a un máximo de 300°C por 30 minutos.
- B 8.5.1.4.2.5** Enfriar a temperatura ambiente.
- B 8.5.1.4.2.6** En caso de que la digestión no sea completa adicionar peróxido de hidrógeno y repetir la digestión.
- Filtrar en caso de que exista grasa o cera y analizar el contenido de Hg.
- B 8.5.1.4.2.7** Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.
- B 8.5.1.4.2.8** Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica de vapor frío).
- B 8.5.1.5** Digestión para la determinación de As.
- B 8.5.1.5.1** Digestión por vía húmeda-seca.

B 8.5.1.5.1.1 Proceder como en el punto 8.4.3.2 hasta que la digestión sea completa y posteriormente continuar con los siguientes pasos.

B 8.5.1.5.1.2 Con una pipeta tomar una alícuota de la solución de muestra digerida y colocarla en un crisol Vycor o vaso de precipitados.

B 8.5.1.5.1.3 Añadir 1 mL de solución de nitrato de magnesio al 7% p/v y calentar en una parrilla a temperatura baja, hasta sequedad.

B 8.5.1.5.1.4 Incrementar el calor de la placa a un máximo de 375°C.

B 8.5.1.5.1.5 Colocar el matraz en la mufla a 450°C para oxidar cualquier residuo de carbón y descomponer el exceso de nitrato de magnesio, por un tiempo mayor o igual a 30 minutos.

B 8.5.1.5.1.6 Enfriar y disolver el residuo en 2,0 mL de ácido clorhídrico 8 M.

B 8.5.1.5.1.7 Añadir 0,1 mL de yoduro de potasio al 20% p/v para reducir el As(V) a As(III).

B 8.5.1.5.1.8 Dejar reposar por un tiempo mayor a 2 minutos y transferir a un matraz y llevar al aforo con agua.

B 8.5.1.5.1.9 Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

B 8.5.1.5.1.10 Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica con adaptación para horno de grafito o generador de hidruros).

B 8.5.1.5.2 Digestión por vía seca.

B 8.5.1.5.2.1 Pesar con precisión de $\pm 0,1$ mg, la cantidad necesaria de muestra en un crisol Vycor o de platino.

B 8.5.1.5.2.2 Añadir el volumen necesario de nitrato de magnesio al 50% p/v.

B 8.5.1.5.2.3 Homogeneizar con una varilla limpia de plástico extendiendo la mezcla en el crisol.

B 8.5.1.5.2.4 Colocar la muestra en una mufla subiendo gradualmente la temperatura hasta 300°C por 2 horas. Posteriormente subir gradualmente la temperatura hasta 500°C por 16 horas o durante toda la noche.

B 8.5.1.5.2.5 Enfriar a temperatura ambiente y humedecer las cenizas con ácido nítrico al 50% v/v.

B 8.5.1.5.2.6 Calentar en parrilla hasta la eliminación del ácido.

B 8.5.1.5.2.7 Llevar los crisoles a una mufla elevando gradualmente la temperatura de 23 a 500°C, manteniendo ésta 30 min hasta evaporación total.

B 8.5.1.5.2.8 Transferir las cenizas del crisol a un matraz aforado usando una porción de 10 mL de ácido clorhídrico 0,5 N.

B 8.5.1.5.2.9 Enjuagar los crisoles con 5 mL de agua destilada y transferir al matraz, añadir 1 mL de solución de yoduro de potasio al 15% y mezclar.

B 8.5.1.5.2.10 Dejar reposar durante 15 minutos y llevar al aforo.

B 8.5.1.5.2.11 Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

B 8.5.1.5.2.12 Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica con adaptación para horno de grafito o generador de hidruros).

B 8.5.1.6. Digestión para la determinación de Cd, As, Pb, Sn, Cu, Fe, Zn y Hg por horno de microondas.

Pesar con precisión de $\pm 0,1$ mg, 0,500 g como máximo de muestra, añadir 6 mL de ácido nítrico concentrado y 2 mL de agua oxigenada al 30%, cerrar perfectamente el envase de reacción y proceder según el manual del fabricante.

B 8.5.1.7 Determinación de metales en agua potable y agua purificada.

Las muestras incoloras, transparentes e inodoras y de una sola fase, pueden analizarse directamente por espectrometría de absorción atómica, sin digestión.

Previo a dicho análisis, adicionar a 100 mL de muestra, 1 mL de ácido nítrico, en caso de que se observe un precipitado, realizar una digestión adicionando 1 mL más de ácido nítrico concentrado, calentar a 85°C hasta reducir el volumen a 20 mL cuidando de que no hierva. Calentar a reflujo 30 minutos y transferir a un matraz volumétrico de 50 mL. Centrifugar a 1600 rpm por 30 minutos o dejar reposar toda la noche y analizar el sobrenadante.

B 8.6 Procedimiento**B.8.6.1 Espectrometría de absorción atómica por flama.****B.8.6.1.1 Calibración.**

Es necesario comprobar que se tiene una calibración inicial y periódica aceptable.

B 8.6.1.1.1 Se inicia la configuración operacional del instrumento y en el sistema de adquisición de datos.

B 8.6.1.1.2 Permitir un periodo no menor a 30 minutos para el calentamiento de las lámparas de descarga sin electrodos.

B 8.6.1.1.3 Se debe verificar la estabilidad del instrumento mediante el análisis de una solución estándar 20 veces más concentrada que el límite de detección del instrumento (LDI) para el analito, leída un mínimo de cinco veces y calculando la desviación estándar resultante, la cual debe ser menor al 5%.

B 8.6.1.1.4 El instrumento debe calibrarse para el analito a determinar usando el blanco de calibración y los estándares de calibración preparados a 3 o 4 niveles de concentración dentro del intervalo dinámico de concentración del analito.

B 8.6.1.1.5 Ajustar el instrumento a 0 con el blanco de calibración. Introducir los estándares de calibración del analito de menor a mayor concentración y registrar al menos tres réplicas de la absorbancia de cada uno.

B 8.6.1.1.6 Elaborar una curva de calibración graficando absorbancia en función de la concentración.

B 8.6.1.1.7 Lo anterior puede llevarse a cabo en equipos que se programan directamente, en los cuales sólo es necesario introducir los estándares y marcar su concentración teórica.

B.8.6.1.2 Operación del instrumento.

El desempeño del instrumento se verifica mediante el empleo de blancos de calibración, estándares de calibración y una muestra de control de calidad (MCC).

B 8.6.1.2.1 Después de que se ha realizado la calibración, se debe verificar que el instrumento trabaje adecuadamente para el analito. Para ello se analiza una muestra de control de calidad. Si las mediciones varían en $\pm 10\%$ o más, al valor establecido para la MCC, el análisis debe interrumpirse y buscar la posible causa de error, el instrumento se debe recalibrar y verificar la nueva calibración.

B 8.6.1.2.2 Para verificar que el instrumento no presenta deriva, por cada 10 análisis se debe analizar el blanco de calibración. Si el valor verdadero del analito difiere $\pm 10\%$ o más, el instrumento debe recalibrarse. Si el error persiste debe identificarse el problema y corregirse.

B 8.6.1.2.3 Si la matriz de la muestra es responsable de la deriva o afecta la respuesta del analito puede ser necesario trabajar por adiciones estándar.

B 8.6.1.2.4 La demostración de la operatividad inicial del instrumento se hace estableciendo los límites de detección del método (LDM) para el analito y el intervalo de calibración lineal. Para determinar el LDM se usa un blanco de reactivos fortificado con una concentración del analito equivalente de 2 a 5 veces el límite de detección estimado. Se hacen al menos 4 réplicas de lectura de absorbancia del blanco de reactivos fortificado procesado a través de todo el método analítico. Los LDM se calculan de acuerdo a:

$LDM = t \times s$ donde: t = valor de la "T" de Student a un intervalo de confianza de 99% y una desviación estándar estimada para $n-1$ grados de libertad. $t = 3,14$ para 7 réplicas. s = desviación estándar de las réplicas del análisis.

B 8.6.1.2.5 El intervalo lineal de calibración se establece a partir de por lo menos 4 estándares de diferente concentración, uno de los cuales debe estar próximo al límite superior del intervalo lineal.

B 8.6.1.3 Determinación

B 8.6.1.3.1 Ajustar el instrumento de absorción atómica en las condiciones adecuadas para la determinación del analito de acuerdo a las indicaciones del manual del instrumento.

B 8.6.1.3.2 Introducir el blanco de reactivos y la muestra a analizar y registrar los valores de absorbancia. Se debe analizar al menos un blanco de reactivos con cada grupo de muestras. Los valores obtenidos ponen

B 8.6.1.3.3 de manifiesto la calidad de los reactivos usados y el grado de contaminación del laboratorio.

B 8.6.1.3.4 En los equipos que pueden programarse, la lectura obtenida da directamente la concentración del elemento en las unidades de concentración utilizadas.

B 8.6.1.3.5 Se debe analizar al menos un blanco de reactivos fortificado para cada grupo de muestras. Se calcula la exactitud como el por ciento de recuperación.

B 8.6.1.3.6 Se debe fortificar al menos una muestra por grupo o el 10% de ellas lo que resulte mayor. La concentración añadida debe ser de aproximadamente 0,1 unidades de absorbancia.

B 8.6.1.3.7 Se debe calcular el por ciento de recuperación para el analito, de acuerdo a:

$$R = \frac{CM - C}{CA} \times 100$$

R = % recuperación

CM = Concentración de la muestra fortificada

C = Concentración de la muestra

CA = Concentración equivalente de analito añadido a la muestra.

Si la recuperación del analito en la muestra fortificada está fuera del intervalo previamente establecido y el blanco de reactivos fortificado está correcto, puede existir un problema relacionado con la matriz de la muestra. Los datos se deben verificar por el método de las adiciones estándar.

B 8.6.2 Espectrometría de absorción atómica por horno de grafito.

B 8.6.2.1 Calibración.

B 8.6.2.1.1 Proceder de acuerdo al punto B.8.6.1.1

B 8.6.2.1.2 Elaborar una curva de calibración graficando área de pico o altura máxima contra concentración del analito.

B 8.6.2.1.3 La calibración mediante el uso de una computadora o una calculadora basada en el ajuste sobre los datos de concentración respuesta es aceptada.

B 8.6.2.1.4 Lo anterior puede llevarse a cabo en equipos que se programan directamente, en los cuales sólo es necesario introducir los estándares y marcar su concentración teórica.

B 8.6.2.2 Operación del instrumento.

Proceder de acuerdo a B.8.6.1.2

B 8.6.2.3 Determinación.

B 8.6.2.3.1 Ajustar el instrumento de absorción atómica en las condiciones adecuadas para la determinación del analito, de acuerdo a las recomendaciones del manual del instrumento.

B 8.6.2.3.2 El programa de temperaturas para el horno de grafito puede variar dependiendo de la matriz de la muestra. En el caso de existir interferencias no específicas (absorción molecular o dispersión de la luz), se recomienda consultar la bibliografía existente en cuanto a los métodos disponibles para eliminarlas, así como en el caso de interferencias de matriz.

B 8.6.3 Espectrometría de absorción atómica por generador de hidruros.

B 8.6.3.1 Calibración.

B 8.6.3.1.1 Proceder de acuerdo al punto B.8.6.1.1

B 8.6.3.1.2 A partir de la solución estándar de As de 1000 mg/L, preparar una solución de As de 1 mg/L en ácido clorhídrico de concentración apropiada al método. Trazar una curva de calibración de absorbancia (máximo de la altura de pico) en función de la concentración del analito para un intervalo de concentración

B 8.6.3.1.3 de 0 a 10 µg/L de As bajo las mismas condiciones de la matriz de la muestra.

B.8.6.3.2 Operación del instrumento.

B 8.6.3.2.1 Proceder de acuerdo al punto B.8.6.1.2

B 8.6.3.3 Determinación.

B 8.6.3.3.1 Ajustar el instrumento de absorción atómica en las condiciones adecuadas para la determinación de As: longitud de onda de 193,7 nm y lámpara de descarga sin electrodos. Colocar y ajustar la celda de absorción de acuerdo al manual del fabricante. Ajustar el flujo de gas (nitrógeno o argón).

B 8.6.3.3.2 Ajustar a 0 de absorbancia con el blanco de calibración de ácido clorhídrico al 1,5% siguiendo las instrucciones del manual del fabricante.

B 8.6.3.3.3 Optimizar con un estándar de calibración la respuesta del instrumento al analito (por lo general, 10 mL de una solución de 5 µg/l de As da una absorbancia de 0,2), ajustando el tiempo de purga I, el tiempo de reacción y el tiempo de purga II.

B 8.6.3.3.4 Tomar un volumen conocido de la muestra dirigida y seguir el mismo procedimiento que con los estándares de calibración.

B 8.6.4 Espectrometría de absorción atómica por vapor frío.

B 8.6.4.1 Calibración.

B 8.6.4.1.1 Proceder de acuerdo al punto B.8.6.1.1

B 8.6.4.1.2 A partir de la solución de trabajo de 1 µg/mL preparar estándares de calibración que contengan 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 y 1,0 µg de Hg a frascos de reacción. A cada frasco agregar 100 mL de la solución de dilución y 20 mL de la solución de reducción. Trazar la curva de calibración de absorbancia (altura máxima de pico) en función de la concentración del analito.

B 8.6.4.2 Operación del instrumento.

B 8.6.4.2.1 Proceder de acuerdo al punto B.8.6.1.2

B 8.6.4.3 Determinación.

B 8.6.4.3.1 Ajustar el instrumento de absorción atómica en las condiciones adecuadas para la determinación de Hg: longitud de onda de 253,6 nm, slit 0,7 nm y lámpara de cátodo hueco. Colocar y ajustar la celda de absorción de acuerdo al manual del fabricante. Ajustar el flujo de gas (nitrógeno o argón).

B 8.6.4.3.2 Ajustar a 0 de absorbancia con el blanco de calibración (solución de dilución y de reducción) siguiendo las instrucciones del manual del fabricante.

B 8.6.4.3.3 Optimizar con un estándar de calibración la respuesta del instrumento al analito.

B 8.6.4.3.4 Tomar 25 mL de la muestra digerida y seguir el mismo procedimiento que con los estándares de calibración.

B 8.7 Expresión de resultados

B 8.7.1 Método de cálculo.

Interpolar los valores de absorbancia o altura de pico de la muestra analizada en la curva de calibración y obtener los mg/kg del elemento en la muestra y realizar los cálculos empleando la siguiente fórmula:

$$\text{mg/ kg} = \frac{A \times B}{C}$$

en donde:

A = Concentración en mg/kg de la muestra a interpolar en la curva de calibración.

B = Volumen final al que se llevó la muestra (mL).

C = Peso de la muestra (g) o volumen de la muestra (mL) en el caso de agua.

En los equipos que pueden programarse, la lectura obtenida da directamente la concentración del elemento en mg/kg o µg/kg.

B 8.7.2 Informe de la prueba

Los resultados se informarán en mg/kg o µg/kg del elemento a determinar.
