

PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-131-SSA1-2011, Productos y servicios. Fórmulas de inicio, continuación y para necesidades especiales de nutrición. Alimentos y bebidas no alcohólicas para lactantes y niños de corta edad. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Etiquetado y métodos de prueba.

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

MIKEL ANDONI ARRIOLA PEÑALOSA, Comisionado Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en lo dispuesto por el artículo 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 4 de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo; 3 fracción XXII, 17 Bis fracción III, 115 fracciones IV y VI, 194 fracción I, 195, 199, 210, 212, 215 fracciones I, II, III y IV y 216 de la Ley General de Salud; 3 fracción XI, 38 fracción II, 40 fracciones I, XI y XII, 41, 43, 47 fracción I, 51 y 52 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 28 y 33 del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 1 fracción XII, 25, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150 y 151 del Reglamento Control Sanitario de Productos y Servicios; 2 inciso C fracción X y 36 del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud; 3 fracciones I incisos c, d y I, y II, 10 fracciones IV y VIII del Reglamento de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, tengo a bien ordenar la publicación en el Diario Oficial de la Federación del Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-131-SSA1-2011, Productos y servicios. Fórmulas de inicio, continuación y para necesidades especiales de nutrición. Alimentos y bebidas no alcohólicas para lactantes y niños de corta edad. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Etiquetado y Métodos de prueba.

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

1. Objetivo y campo de aplicación
 2. Referencias
 3. Definiciones
 4. Símbolos y abreviaturas
 5. Clasificación
 6. Disposiciones sanitarias generales
 7. Disposiciones sanitarias para fórmulas o preparados
 8. Disposiciones sanitarias para alimentos y bebidas no alcohólicas para lactantes y niños de corta edad
 9. Muestreo y métodos de prueba
 10. Etiquetado
 11. Envase y embalaje
 12. Concordancia con normas internacionales
 13. Bibliografía
 14. Observancia de la norma
 15. Vigencia
- Apéndices normativos
- “A” Aditivos
- “B” Fuentes de vitaminas y minerales

“C” Métodos de prueba

PREFACIO

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

Secretaría de Salud.

Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.

Centro Nacional de Equidad de Género y Salud Reproductiva.

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

Instituto Nacional de Pediatría.

Instituto Nacional de Perinatología.

Procuraduría Federal del Consumidor.

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

Instituto Politécnico Nacional.

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

Escuela de Dietética y Nutrición del ISSSTE.

Cámara Nacional de Industriales de la Leche (CANILEC).

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

Asociación Pro Lactancia Materna.

Bayer de México, S.A. de C.V.

Bristol Myers Squibb de México, S. de R.L. de C.V.

Grupo DANONE.

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

Nestlé México, S.A. C.V.

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

Productos Gerber, S.A. de C.V.

Vázquez Tercero y Asociados, S.C.

Wyeth, S.A de C.V.

1. Objetivo y campo de aplicación

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

las fórmulas de inicio, sucedáneos de la leche materna,

las fórmulas de continuación,

las fórmulas para necesidades especiales de nutrición, y

los alimentos y bebidas no alcohólicas para lactantes y niños de corta edad

Así como los métodos de prueba.

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

2. Referencias

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

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

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

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

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

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

3. Definiciones

Para fines de esta norma se entiende por:

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

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

3.3. Aditivo, a 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.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.13. Declaración de propiedades, a cualquier texto o representación que afirme, sugiera o implique que un alimento o bebida no alcohólica preenvasado tiene cualidades especiales por su origen, propiedades nutrimentales, naturaleza, elaboración, composición u otra cualidad cualquiera, excepto la marca del producto y el nombre de los ingredientes.

3.14. Declaración nutrimental, a la relación o enumeración del contenido de nutrimentos de un alimento o bebida no alcohólica preenvasado.

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

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

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

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

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

3.20. Fórmula o preparado para necesidades especiales de nutrición, al sucedáneo de la leche materna o de la fórmula, especialmente preparado para satisfacer, por sí mismo o en combinación con la leche materna o fórmula de inicio o la fórmula de continuación, las necesidades nutricionales especiales de lactantes o niños de corta edad con trastornos, enfermedades o condiciones médicas específicas, incluidos los fortificadores de leche.

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

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

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

La declaración nutrimental obligatoria.

La declaración nutrimental complementaria.

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

3.25. Leche materna, a secreción producida por las glándulas mamarias después del calostro y cuya función es alimentar al lactante. Esta leche contiene todos los nutrimentos que el lactante requiere para su crecimiento y desarrollo en los primeros meses de vida y le proporciona los anticuerpos o sustancias que lo protegen de las infecciones.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.35. Recién nacido pretérmino, al producto de la concepción menor a 37 semanas. Cuando no se conoce la edad gestacional, se considerará así a un producto que pese menos de 2,500 gramos.

4. Símbolos y abreviaturas

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

A	absorbancia
ARA	ácido araquidónico
BPF	buenas prácticas de fabricación
°C	grados Celsius
cm	centímetro
cm ²	centímetro cuadrado
DHA	ácido docosahexanoico
EPA	ácido eicosapentanoico
g	gramo
h	hora
IDR	ingesta diaria recomendada
IDS	ingesta diaria sugerida
kcal	kilocalorías
kg	kilogramo
kJ	kilojoules
l	litro
L	levógiro
m	masa
mg	miligramo
min	minutos
ml	mililitro
mM	milimolar
mm	milímetro
m/m	masa masa
mOsm	miliosmol
mv	milivolt
M	molar
N	normal
N.A.	no aplica
ng	nanogramo
nm	nanómetro
NMP	número más probable
No	número
NSR	Nivel Superior de Referencia

pH	potencial de hidrógeno
REP	Relación de Eficiencia Proteica
rpm	revoluciones por minuto
S.E.	sin especificar
T	transmitancia
UFC	unidades formadoras de colonias
U.I.	unidad internacional
µg	microgramo
µm	micrómetro
VNR	valores nutrimentales de referencia
v/v	volumen a volumen
/	por
%	por ciento
NaCl	Cloruro de sodio
	menor o igual
>	mayor que
<	menor que
eq	equivalente
oz	onza

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

Acuerdo, el “Acuerdo por el que se determinan las sustancias permitidas como aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios”.

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

Fórmula, las fórmulas o preparados.

Productos, los regulados por este ordenamiento, según corresponda.

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

Secretaría, la Secretaría de Salud.

5. Clasificación

Los productos se clasifican en:

5.1 Fórmulas:

5.1.1 De inicio, sucedáneos de la leche materna

5.1.2 De continuación: para lactantes y para niños de corta edad

5.1.3 Para necesidades especiales de nutrición,

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

5.2.1 A base de cereales:

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

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

5.2.1.3 Galletas y otros productos de panificación

5.2.2 Listos para consumo

5.2.3 Deshidratados.

6. Disposiciones sanitarias generales

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

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

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

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

6.3.1 Deben estar limpias y ser inocuas.

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

6.3.3 Cumplir con las normas oficiales mexicanas correspondientes.

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

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

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

6.7 Los productos no podrán ser adicionados con flúor.

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

6.9 En la elaboración de los productos sólo se permite el uso de los aditivos señalados en el Apéndice Normativo A.

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

6.10.1 Medios tecnológicos y procedimientos de elaboración que permitan la incorporación de los nutrientes en forma satisfactoria, y

6.10.2 Métodos de medición y control de las concentraciones de los nutrientes añadidos a los productos.

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

7. Disposiciones sanitarias para las fórmulas o preparados

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

7.2 En las unidades médicas, no se permite la distribución gratuita ni la promoción de fórmulas de inicio sucedáneos de leche materna directamente a las madres, queda sujeta la entrega y/o indicación de fórmulas de inicio para menores de cuatro meses únicamente bajo prescripción médica y con justificación por escrito en las unidades de atención del parto y en las de consulta externa.

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

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

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

7.6 Especificaciones

7.6.1 Microbiológicas:

Tabla No. 1 Fórmulas o preparado en polvo

ESPECIFICACION	LIMITE MAXIMO
Mesofílicos aerobios	5 000 UFC/g
<i>Salmonella</i> spp en 25g	Ausente
<i>Enterobacteriaceas</i> en 10 g	0 NMP
<i>Escherichia coli</i>	Negativo
<i>Enterobacter sakazakii</i> ** (especie de <i>Cronobacter</i>)	Ausente en 300 g

* No aplica para aquellos productos que contienen cultivos productores de ácido lácticos en su formulación.

**Sólo aplica a fórmulas para lactantes y para necesidades especiales de nutrición en polvo, cuando se detecte presencia de enterobacterias.

Tabla No. 2 Fórmulas líquidas

Especificación	Límite máximo
Mesofílicos anaerobios	Negativo
Mesofílicos aerobios	Negativo
Termofílicos anaerobios	Negativo
Termofílicos aerobios	Negativo

7.6.2 Fisicoquímicos

7.6.2.1 Metales pesados o metaloides

Tabla No. 3

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

* Límite establecido para producto listo para su consumo

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

7.6.3 Nutrimientales

7.6.3.1 Contenido energético

7.6.3.1.1 Las fórmulas de inicio deben proporcionar no menos de 60 kcal (o 250 kJ) y no más de 70 kcal (o 295 kJ) por 100 ml del producto listo para el consumo, comercializado tal cual o reconstituido según las instrucciones del fabricante.

7.6.3.1.2 Las fórmulas de continuación deben proporcionar no menos de 60 kcal (o 250 kJ) y no más de 85 kcal (o 295 kJ) por 100 ml del producto listo para el consumo, comercializado tal cual o reconstituido según las instrucciones del fabricante.

7.6.3.2 Vitaminas y minerales

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

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

Tabla No. 4

Vitaminas	Fórmulas de inicio y para necesidades especiales de nutrición			Fórmulas de continuación	
	Mínimo/100 kcal	Máximo/100 kcal	NSR/100 kcal	Mínimo/100 kcal	Máximo/100 kcal
Vitamina A	250 U.I. o 60 µg expresados en retinol	600 U.I. o 180 µg expresados en retinol	-	250 U.I. o 75 µg expresados en retinol	750 U.I. o 225 µg expresados en retinol
Vitamina D	1 µg o 40 U.I.	2,5 µg o 100 U.I.	-	40 U.I. o 1 µg	120 U.I. o 3 µg
Vitamina C (Ac. Ascórbico)	10 mg	S.E.	70 mg ⁽¹⁾	8 mg	S.E.
Tiamina (B₁)	60 µg	S.E.	300 µg	40 µg	S.E.
Riboflavina (B₂)	80 µg	S.E.	500 µg	60 µg	S.E.
Niacina (B₃)	300 µg	S.E.	1500 µg	250 µg	S.E.
Piridoxina (B₆)	35 µg ⁽²⁾	S.E.	175 µg	45 µg ⁽²⁾	S.E.
Acido Fólico (B₉)	10 µg	S.E.	50 µg	4 µg	S.E.
Acido Pantoténico (B₅)	400 µg	S.E.	2000 µg	300 µg	S.E.
Cianocobalamina (B₁₂)	0,1 µg	S.E.	1,5 µg	0,15 µg	S.E.
Vitamina K	4 µg	S.E.	27 µg	4 µg	S.E.
Biotina (H)	1,5 µg	S.E.	10 µg	1,5 µg	S.E.
Vitamina E (alfa tocoferol)	0.5 mg de alfa tocoferol/g de ácidos grasos poliinsaturados ⁽³⁾	S.E.	5	0,7 U.I./g de ácido linoleico o por gramo de ácidos grasos poliinsaturados expresados en ácido linoleico pero en ningún caso menos de 0,7 U.I. por 100 kcal utilizables	S.E.

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

2) Las fórmulas que contengan más de 1,8 g de proteínas por cada 100 kcal contendrán, como mínimo 15 µg de vitamina B₆/g de proteína

3) Aplicando los siguientes factores de equivalencia para adaptar el contenido mínimo de vitamina E al número de dobles enlaces de ácidos grasos en el preparado: 0.5 mg de alfa tocoferol/1g de ác. linoleico; 0.75 mg de alfa tocoferol/1g de ácido alfa linolenico; 1 mg de alfa tocoferol/1g de ARA; 1,25 mg de alfa tocoferol/1g de EPA; 1,5 mg alfa tocoferol/1g de DHA.

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

Tabla No. 5

Nutrientes inorgánicos (minerales)	Fórmula de inicio y para necesidades especiales de nutrición			Fórmula de continuación	
	Mínimo/100 kcal	Máximo/100 Kcal	NSR/100 kcal	Mínimo/100 kcal	Máximo/100 kcal
Sodio (Na)	20 mg	60 mg	---	20 mg	85 mg
Potasio (K)	60 mg	180 mg	---	80 mg	S.E.
Cloro (Cl)	50 mg	160 mg	----	55 mg	S.E.
Calcio (Ca)	50 mg ⁽¹⁾	S.E.	140 mg ⁽¹⁾	90 mg	S.E.
Fósforo (P)	25 mg ⁽¹⁾	S.E.	100 mg ^(1,2)	60 mg	S.E.
Magnesio (Mg)	5 mg	S.E.	15 mg	6 mg	S.E.
Hierro (Fe)	0,45 mg	S.E.	S.E.	1 mg ⁽²⁾	2 mg ⁽²⁾
Yodo (I)	10 µg	S.E.	60 µg	5 µg	S.E.
Cobre (Cu)	35 µg ⁽³⁾	S.E.	120 µg ⁽³⁾	---	---
Cinc (Zn)	0,5 mg	S.E.	1,5 mg	0,5 mg	S.E.
Manganeso (Mn)	1,0 µg	S.E.	100 µg	---	---
Selenio	1 µg	S.E.	9 µg	---	---

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

2) Este límite debe ajustarse en razón de necesidades más altas en el caso de las fórmulas a base de soya.

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

7.6.3.2.4 El contenido de nutrientes en las fórmulas de inicio no debería por lo general superar los NSR a menos que no puedan evitarse niveles de nutrientes más elevados debido a su contenido alto o variable en los ingredientes de las fórmulas o debido a razones técnicas. Cuando un tipo o forma de producto ha contenido normalmente niveles inferiores a los NSR los fabricantes no deberían aumentar los niveles de nutrientes a fin de aproximarse a los NSR.

7.6.3.2.5 Las fórmulas para necesidades especiales de nutrición se ajustarán a las disposiciones establecidas en los numerales 7.6.3.1, 7.6.3.2, 7.6.3.3, 7.6.3.4 y 7.6.3.5, excepto en determinadas especificaciones sobre la composición, que deberá modificarse para satisfacer los requerimientos nutricionales especiales consecuentes al trastorno, condiciones médicas específicas o afección para cuyo tratamiento dietético se haya formulado, etiquetado y presentado cada tipo de fórmula.

7.6.3.2.6 Además de los requisitos estipulados en el numeral 7.6.3.2.5, las fórmulas para necesidades especiales destinadas a recién nacidos pretérmino deben cumplir con las especificaciones nutricionales señaladas en las tablas Nos. 4 y 5 a excepción de las siguientes vitaminas.

Tabla No. 6

Vitamina	Límite máximo
Vitamina A	550 µg/100 kcal
Vitamina D	333 UI/100 kcal o 8,5 µg calciferol
Vitamina E	8 mg/100 kcal

7.6.3.2.7 Las fórmulas de inicio y para necesidades especiales de nutrición podrán adicionar además:

Tabla No. 7

Nutriente	Fórmulas de inicio y para necesidades especiales
-----------	--

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

* si se añade, el contenido de ARA y EPA deberá ser al menos el mismo.

7.6.3.2.8 Además, las fórmulas para necesidades especiales de nutrición podrán adicionar los nutrimentos siguientes en los límites señalados.

Tabla No. 8

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

7.6.3.2.9 Adicional a lo establecido en el numeral 7.6.3.2.3, las fórmulas elaboradas a partir de aislados de proteína de soya solos o mezclados con las proteínas de la leche de vaca, deben de cumplir con los límites establecidos en la Tabla No. 5 a excepción de los establecidos para el hierro y el fósforo, en cuyos casos; se debe cumplir con lo siguiente:

Tabla No. 9

Nutrimento	Mínimo/100 kcal	Máximo/100 kcal
Hierro (Fe) mg	0,45	2,0
Fósforo (P) mg	30	100

7.6.3.3 Proteínas

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

Tabla No. 10

Fuente de proteína	Fórmulas de inicio		Fórmulas de continuación	
	Mín g/100 kcal utilizables	Máx g/100 kcal utilizables	Mín g/100 kcal utilizables	Máx g/100 kcal utilizables
a) Leche de vaca	1,8	3	3,0	5,5
b) Hidrolizados de proteína	2,25	3	2,25	S.E.
c) Aislados de proteína de soya sola o mezclada con proteínas de leche de vaca.	2,25	3	2,25	S.E.

7.6.3.3.2 La calidad nutritiva de las proteínas deberá determinarse empleando el método de la REP.

7.6.3.3.3 La calidad de la proteína no debe ser inferior al 85% de la calidad de la caseína.

7.6.3.3.4 Para mejorar la calidad nutritiva de las proteínas, podrán añadirse aminoácidos esenciales, únicamente en las cantidades estrictamente necesarias, los cuales deben ser en su forma natural L, de acuerdo a lo que se indica en la tabla No. B.3 del Apéndice normativo B.

7.6.3.4 Ácidos grasos y lípidos o grasas.

7.6.3.4.1 El contenido de lípidos o grasas y ácidos grasos en las fórmulas deben cumplir con lo establecido en la tabla No. 11.

Tabla No. 11

Nutrimento	Fórmulas de inicio y para necesidades especiales de nutrición		Fórmulas de continuación	
	Mínimo/100 kcal	Máximo/100 kcal	Mínimo/100 kcal	Máximo/100 kcal
Grasas	4,4 g	6 g	3 g	6 g
Acido linoleico	300 mg	1400 NSR	300 mg	S.E.
Acido alfa-linolenico	50 mg	S.E.	50 mg	S.E.

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

7.6.3.4.2 El contenido de ácidos grasos trans no será superior al 3% del contenido total de materia grasa.

7.6.3.5 Hidratos de carbono.

7.6.3.5.1 El contenido mínimo de hidratos de carbono totales debe ser de 9,0 g/100kcal y máximo de 14,0 g/100Kcal.

7.6.3.5.2 La lactosa y glucosa deben ser los carbohidratos preferidos para las fórmulas a base de proteínas de la leche de vaca y de proteínas hidrolizadas.

7.6.3.5.3 Sólo podrán añadirse almidones naturalmente exentos de gluten precocidos y/o gelatinizados hasta un máximo de 30% del contenido total de hidratos de carbono y hasta un máximo de 2g/100 ml.

7.6.3.5.4 Debe evitarse el uso de sacarosa, así como la adición de fructosa como ingrediente, salvo cuando sea necesario por justificación tecnológica.

7.6.3.6 Nutrimientos o ingredientes opcionales.

7.6.3.6.1 En las fórmulas de inicio y para necesidades especiales de nutrición podrán añadirse otros nutrimentos/ingredientes que normalmente están presentes en la leche humana, su idoneidad e inocuidad deberá estar demostrada científicamente, y en cantidad suficiente para lograr el efecto deseado sobre la base de las cantidades presentes en la leche materna y para asegurarse que sea adecuado como fuente única de la nutrición del lactante.

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

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

7.6.3.6.4 Para las fórmulas de continuación las concentraciones de sodio y potasio que derivan de los ingredientes vitamínicos y minerales deben ajustarse a los límites establecidos para el sodio y el potasio en la tabla No. 5.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

8.8 Especificaciones

8.8.1 Microbiológicas

8.8.1.1 Deben estar exentos de microorganismos patógenos.

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

Tabla No. 12. Alimentos a base de cereales

Microorganismos	Para lactantes (4 o 6 - 12 meses de edad) para consumirse directamente, incluye las galletas y los bizcochos	Para lactantes y niños de corta edad (4 ó 6 - 36 meses de edad) que llevan tratamiento térmico antes de su consumo	Alimentos a base de cereales para niños de corta edad para consumirse directamente
Mesofílicos aerobios	10 000 UFC/g	100,000 UFC/g	10 000 - 30 000 UFC/g
Enterobacteriáceas	9,3 NMP	1 000 UFC/g	21 NMP
Salmonella spp	Ausente / 25 g	Ausente / 25 g	Ausente / 25 g

8.8.1.3 Los alimentos listos para consumo comercialmente estériles, deben cumplir con las pruebas de esterilidad comercial señaladas a continuación:

Tabla No. 13 Alimentos comercialmente estériles.

Productos	Microorganismos	Límite máximo
pH > 4,6	Mesofílicos Aerobios	Negativo
	Mesofílicos Anaerobios	Negativo
	Termofílicos Aerobios	Negativo
	Termofílicos Anaerobios	Negativo
pH ≤ 4,6	Mesofílicos Anaerobios	Negativo
	Mesofílicos Aerobios	Negativo
	Termofílicos	Negativo*
	Mohos y Levaduras	Negativo

* En algunos casos por probabilidad estadística, puede existir la presencia de esporas termofílicas en alimentos ácidos con pH por abajo de 4,6.

8.8.1.4 Los productos deshidratados deben cumplir con lo siguiente:

Tabla No. 14 Alimentos deshidratados.

Microorganismos	Límite máximo
Mesofílicos aerobios	2 500 UFC/g o 100,000 UFC/g*
<i>Salmonella</i> spp en 25 g	Ausente
Coliformes totales	20 NMP/g

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

8.8.2 Contaminantes

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

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

8.8.3 Nutrimientales

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

8.8.3.2 Contenido de sodio

8.8.3.2.1 Para los alimentos a base de cereales el contenido de sodio en el cereal seco y harinas de cereal no debe exceder de 100 mg/100 g del producto listo para ser consumido.

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

8.8.3.3 Contenido de vitaminas

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

8.8.3.4 Contenido de proteínas.

8.8.3.4.1 Podrán añadirse aminoácidos esenciales (isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina, arginina e histidina) en sus formas naturales L, sólo en las cantidades necesarias para mejorar la calidad de la proteína presente.

8.8.3.4.2 Cuando los alimentos a base de cereales deban prepararse con agua antes de ser consumidos deben contener un mínimo del 15% de proteínas en base seca. El REP no debe ser inferior al 70% de la calidad de la caseína.

8.8.3.5 Contenido de hidratos de carbono.

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

8.8.3.5.2 La cantidad total de hidratos de carbono en alimentos dulces (jugos de fruta y verduras, néctares, platos de fruta y postres o cremas) no debe exceder de 25 g/100 g del producto.

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

8.8.3.6 Contenido de lípidos.

8.8.3.6.1 La cantidad total de grasa no debe ser superior a 6g/100 kcal.

8.8.3.6.2 Las galletas y otros productos de panificación no deben exceder un contenido máximo de 3,3 g/100kcal, para los otros productos a base de cereales su contenido máximo no deberá ser superior a 4,5g/100kcal.

8.8.3.7 Ingrediente facultativos:

8.8.3.7.1 Sólo podrán utilizarse cultivos productores de ácido láctico.

9. Muestreo y métodos de prueba

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

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

10. Etiquetado

10.1 La etiqueta de los productos debe cumplir con lo establecido en el Reglamento y en la NOM-051-SCFI/SSA1-2010, señalada en el apartado de referencias, salvo los apartados referidos particularmente en este capítulo.

10.1.1 Deben ostentar fecha de caducidad, a excepción de los productos comercialmente estériles que podrán declarar fecha de consumo preferente.

10.1.2 Fórmulas

10.1.2.1 Deben denominarse conforme a la clasificación señalada en el numeral 5.1, según corresponda.

10.1.2.2 No podrán incluir ningún tipo de declaración de propiedades saludables.

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

10.1.2.4 No deben ostentar imágenes o textos que sugieran a las fórmulas de inicio como idénticas y superiores a la leche materna, conforme a las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud para la comercialización de sucedáneos de la leche materna.

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

10.1.2.6 Las fórmulas de inicio y para necesidades especiales de nutrición que contengan como mínimo 1 mg de hierro por 100 kcal utilizables, deben ostentar la denominación "Fórmula con hierro para lactantes".

10.1.2.7 Las fórmulas no enriquecidas con hierro, deben ostentar una indicación precisando que cuando el producto se administra a niños mayores de cuatro meses las necesidades totales de hierro deben satisfacerse mediante otras fuentes.

10.1.2.8 Se debe indicar el origen de las proteínas en la lista de ingredientes.

10.1.2.9 Las fórmulas que no contengan leche ni algún derivado lácteo deben incluir la leyenda: "Fórmula no láctea".

10.1.2.10 Las fórmulas para necesidades especiales de nutrición, deben indicar en términos descriptivos adecuados, cerca del nombre, la característica esencial de la fórmula, pero no el estado o trastorno a que está destinada.

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

10.1.2.11.1 El contenido energético expresado en kilocalorías (kcal) o kilojoules (kJ) y la cantidad en gramos de proteínas, hidratos de carbono y grasas o lípidos por cada 100 g o 100 ml, así como por 100 ml del producto listo para el consumo que se haya preparado de acuerdo con las indicaciones señaladas en la etiqueta.

10.1.2.11.2 La cantidad total en las unidades correspondientes de vitaminas y nutrimentos inorgánicos (minerales), colina y de cualquier otro nutrimento declarado en la lista de ingredientes por 100 g o 100 ml, así como por 100 ml del producto listo para el consumo que se haya preparado de acuerdo con las indicaciones señaladas en la etiqueta.

10.1.2.11.3 Además se podrá declarar el contenido de nutrimentos por cada 100 kcal.

10.1.2.11.4 En las fórmulas de inicio líquidas, además, se debe declarar el contenido energético y la cantidad en gramos de proteínas, carbohidratos, grasas y demás nutrimentos por presentación (envase). Y si se declara por 100 kcal se deberá indicar la cantidad de producto equivalente a 100 kcal.

10.1.2.11.5 Las fórmulas para necesidades especiales de nutrición deberán declarar la cantidad total de los nutrientes específicos u otros componentes a los que se debe la característica esencial que hace que la fórmula se destine a esa necesidad especial por 100 g o 100 ml.

10.1.2.12 Instrucciones para su almacenamiento, conservación, uso, preparación y consumo

10.1.2.12.1 Deben ostentar la leyenda “Aviso Importante” o su equivalente. Posteriormente lo siguiente:

10.1.2.12.2 Una leyenda donde se afirme la superioridad de la lactancia materna, por ejemplo “la leche materna es el mejor alimento para el bebé”. “La leche materna contiene hormonas, enzimas activas y otros compuestos que no pueden ser duplicados en ninguna fórmula infantil”, y señalar “El uso de este producto debe hacerse bajo prescripción médica” o una leyenda equivalente, con un tamaño de letra que sea fácilmente visible, con negritas y en un fondo contrastante.

10.1.2.12.3 Una leyenda sobre las consecuencias de una preparación y uso impropio del producto, tal como “La salud de su hijo depende de que siga cuidadosamente las instrucciones para la preparación y uso” o alguna equivalente.

10.1.2.12.4 Las fórmulas para necesidades especiales de nutrición deben incluir una declaración destacada y en negritas que diga “UTILICESE BAJO SUPERVISION MEDICA” separada de toda información escrita, impresa o gráfica.

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

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

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

10.1.2.12.8 Las fórmulas de continuación deben contener una declaración que indique que son parte de la ablactación. No deben ser introducidas antes del sexto mes de vida, cuando la alimentación es exclusivamente con leche materna, ni antes de los cuatro meses cuando la alimentación es con fórmulas de inicio o cuando el peso es menor o igual a 6 kg.

10.1.2.12.9 En las fórmulas se debe incluir una leyenda indicando que no se debe calentar usando horno de microondas o alguno equivalente. Esto se debe al riesgo de causar graves quemaduras.

10.1.2.12.10 Los fortificadores de leche materna deben incluir una declaración destacada y en negritas que diga “PARA USO HOSPITALARIO”.

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

10.1.3.1 La denominación debe corresponder con lo establecido en los ordenamientos legales; en ausencia de éstos, puede indicarse el nombre de uso común, o bien, emplearse una descripción de acuerdo con las características básicas de la composición y naturaleza del producto, que no induzca a error o engaño al consumidor. Además, indicar el grupo al que va dirigido ejemplo “cereal seco para lactantes (y/o para niños de corta edad)”, “galletas para lactantes (y/o para niños de corta edad)”.

10.1.3.2 Los productos con modificación en su composición deben cumplir con lo señalado en la NOM-086-SSA1-1994, citada en el apartado de referencias.

10.1.3.3 En el caso de que haya sido objeto de algún tipo de tratamiento, se puede indicar el nombre de éste, con excepción de aquellos que de acuerdo con los ordenamientos correspondientes sean de carácter obligatorio.

10.1.3.4 Se debe indicar en cualquier parte de la etiqueta, el rango de edad al que está dirigido el producto. Para los productos a base de cereales tal edad no podrá ser inferior a los seis meses.

10.1.3.5 Cuando el producto contenga remolacha o espinacas, se indicará en la etiqueta "Para niños de más de doce semanas".

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

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

10.1.3.8 Productos a base de cereales.

10.1.3.8.1 Cuando el alimento contenga menos del 15% de proteína en base seca, debe indicarse la leyenda "Utilícese leche pero no agua" para prepararlo o una indicación equivalente. Cuando contengan más del 15% de proteína en base seca, en las instrucciones para prepararlo, debe indicarse que se puede utilizar agua, leche o jugo o una indicación equivalente.

10.1.3.8.2 Adicionalmente debe incluirse una leyenda que indique que la leche usada para preparar estos alimentos deberá ser recomendada por el médico.

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

10.1.3.10 Cuando la declaración de fibra dietética, vitaminas y nutrimentos inorgánicos (minerales) se haga en porcentaje de los VNR se deberán considerar los valores que corresponda al grupo de edad al que va dirigido el producto, conforme a la Tabla No. 15.

Tabla No. 15 Valores Nutrimientales de Referencia para la Población Mexicana por segmento.

Nutrimiento/unidad de medida	Edad		
	0-6 meses	7-12 meses	1-3 años
Vitamina D µg (como colecáliciferol)	5**	5**	5**
Vitamina E µg (equivalente de tocoferol)	4**	5**	6*
Vitamina K µg	2**	2.5**	30**
Tiamina (B ₁) µg	0.2**	0.3**	0.4*
Riboflavina (B ₂) µg	0.3**	0.4**	0.4*
Piridoxina (B ₆) µg	0.1**	0.3**	0.4*
Niacina mg	2**	4**	6*
Vitamina B ₁₂ µg (Cobalamina)	0.3**	0.5**	0.8*
Acido fólico (folacina) µg	76**	96**	168**
Vitamina C µg (ácido ascórbico)	40**	50**	15*
Acido pantoténico mg	1.7**	1.8**	2**
Calcio mg	210**	270**	500**
Cobre mg	220**	220**	340*
Cromo mg	0.2**	5.5**	11**
Fósforo mg	100**	275**	460**
Flúor mg	0.01**	0.45**	0.6**
Hierro mg	-	16	13
Yodo mg	-	-	65*
Magnesio mg	36**	90**	80*
Selenio mg	14**	21**	20*
Zinc mg	-	3.8**	4*

* Corresponden a IDR; ** Corresponden a IDS.

11. Envase y embalaje

11.1 Envase

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

11.2 Embalaje

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

12. Concordancia con normas internacionales

Esta Norma es parcialmente equivalente a las siguientes normas:

12.1 Norma del Codex para Fórmula para lactantes. Codex Stan 72-1981, Rev. 2007.

12.2 Norma de Codex para Alimentos envasados para lactantes y niños. Codex Stan 73-1981 Rev. 1989.

12.3 Norma del Codex para Alimentos elaborados a base de cereales para lactantes y niños. Codex Stan 74-1981, Rev.2006.

12.4 Norma del Codex para Preparados complementarios. Codex Stan 156-1987, enmienda 1989.

12.5 Código Internacional de comercialización de sucedáneos de la leche materna y resoluciones posteriores.

13. Bibliografía

13.1 Ley Federal sobre Metrología y Normalización. México, D.F.

13.2 Ley General de Salud. México, D.F.

13.3 Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización. México, D.F.

13.4 Reglamento de la Control Sanitario de Productos y Servicios. México, D.F.

13.5 Reglamento de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. México, D.F.

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

13.7 Norma Oficial Mexicana NOM-SCFI-008-2002. Sistema General de Unidades de Medida. México, D.F.

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

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

13.10 Directrices sobre etiquetado nutricional. CXG-002s(1). Enmendada 2009.

13.11 Code of Federal Regulations. 21 CFR 107.

13.12 Code of Hygienic Practice for Powdered Formulae for Infants and Young Children. CAC/RCP 66 – 2008.

13.13 Agostoni, C., Braegger, C. 2009. Breast-feeding: A Commentary by the ESPAHAN Committee on Nutrition. J. Pediatr Gastroenterol Nutr, Vol. 49:112–125.

13.14 Agostoni, C., Buonocore, G. 2010. Enteral Nutrient Supply for Preterm Infants: Commentary From the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Committee on Nutrition. J. Pediatr Gastroenterol Nutr. Vol. 50, No. 1.

13.15 Canadian Food Inspection Agency and Health Canada. 2007. Requirements Related to Nutrition Information and Nutrition and Health Claims for Infant Formula.

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

13.17 FAO/WHO. 2004 and 2006. *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula. Meeting Report. Assesment. Series No. 6.

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

13.19 Kathleen, M.L., Escott, S.S. 2001. Nutrición y Dietoterapia de Krause. Décima Edición. Edit. McGraw-Hill.

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

13.21 Real Decreto 867. 2008. Reglamentación Técnico-Sanitaria específica de los Preparados para lactantes y de los preparados de continuación; España. 25121-25138.

13.22 Sisk, M. P., Lovelady, A. Ch., Dillard, G. R., Gruber, J.K. 2006. Lactation Counseling for Mothers of Very Low Birth Weight Infants: Effect on Maternal Anxiety and Infant intake of Human Milk. *Pediatric*. 117; e67-e75.

13.23 Udaeta-M, E., Toussaint-M, G. 2005. Uso de una fórmula para prematuros adicionada con ácidos poliinsaturados de cadena larga: aceptabilidad y tolerancia. *Gac Méd Méx Vol.* 141 No. 1.

13.24 Rosado Jorge; Casanueva Esther y Bourges Héctor; Recomendaciones de ingestión de nutrimentos para la población mexicana. *Bases Fisiológicas; Médica Panamericana*, 2005.

14. Observancia de la norma

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

15. Vigencia

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

Sufragio Efectivo. No Reelección.

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

APENDICE NORMATIVO A

A.1 LIMITES MAXIMOS PARA ADITIVOS

Agentes espesantes.

Nombre	Producto	Límite Dosis máxima en 100 ml del producto listo para consumo	Observación
Acetato de dialmidón SIN no reportado	Alimentos a base de cereales	5,000 mg/100g solo o mezclado con otros espesantes	
Adipato acetilado de dialmidón SIN 1422	Alimentos administrados directamente	6 g/100g solo o mezclado	
	Alimentos deshidratados		
	Alimentos a base de cereales	5 g/100g solo o mezclado	
	Fórmulas de continuación	2,5 g/100ml solo o combinado	Solamente en fórmulas a base de proteínas hidrolizadas o aminoácidos
Almidón oxidado SIN 1404	Alimentos administrados directamente	6 g/100g solo o mezclado	
	Alimentos deshidratados		
	Alimentos a base de cereales	5 g/100g	
Almidón acetilado SIN 1420	Alimentos a base de cereales	5 g/100 g solos o combinados	
Almidón oxidado acetilado SIN 1451	Alimentos a base de cereales	5 g/100 g solo o combinados	
Carragenina	Fórmulas de inicio	0,03 g/100ml solo o	Fórmulas líquidas a

SIN 407	Fórmulas de continuación	mezclado	base de leche o a base de soya
		0,10 g/100 ml solo o mezclado	Fórmulas líquidas a base de proteína hidrolizada y/o aminoácidos
	Alimentos administrados directamente Alimentos deshidratados	500 mg/100 g	
Dialmidón glicerol SIN 1411	Fórmulas de continuación	6 g/100 ml solo o combinado	
	Alimentos administrados directamente Alimentos deshidratados	6 g/100 g solo o mezclado	
Dialmidón glicerol acetilado SIN 1423	Alimentos administrados directamente Alimentos deshidratados	6 g/100 g solo o mezclado con otros espesantes	
	Fórmulas de continuación Fórmulas para necesidades especiales de nutrición	6 g/100 ml solo o combinado	
Fosfato de dialmidón acetilado SIN 1414	Fórmulas de inicio Fórmulas continuación Fórmulas para necesidades especiales	0,5 g/100 ml solo o combinado con otros espesantes	Fórmulas a base de soya
		2,5 g/100 ml solo o combinados con otros espesantes	Fórmulas a base de proteína hidrolizada y/o aminoácidos
	Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados	6 g/100 g solo o mezclado con otros espesantes	
	Alimentos a base de cereales	5,000 mg/100g solo o mezclado con otros espesantes	
Fosfato de dialmidón SIN 1412	Fórmulas de inicio Fórmulas de continuación Fórmulas para necesidades especiales de nutrición	0,5 g/100ml solo o en combinación con otros espesantes	Fórmulas a base de soya
		2,5 g/100 ml solo o en combinación con otros espesantes	Fórmulas a base de proteínas hidrolizadas y/o aminoácidos
	Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados	6 g/100 g solo o mezclado	
	Alimentos a base de cereales	5,000 mg/100 g	
Fosfato de monoalmidón SIN 1410	Alimentos administrados directamente Alimentos deshidratados	6,000 mg/100 g solos o mezclado	
	Alimentos a base de cereales	5000 mg/100 g solo o mezclado con otros espesantes	
Fosfato fosfatado de dialmidón SIN 1413	Fórmulas de inicio Fórmulas de continuación	0,5 g/100 ml solo o combinados	Fórmulas a base de soya
	Fórmulas para necesidades especiales	2,5 g/100 ml solo o	Fórmulas a base

	de nutrición	combinados	de proteínas hidrolizadas y/o aminoácidos
	Alimentos administrados directamente Alimentos deshidratados	6 g/100 g solo o mezclado	
	Alimentos a base de cereales	5,000 mg/100 g solo o mezclado	
Goma arábica SIN 414	Alimentos a base de cereales Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados	1,000 mg/100 g solo o mezclado	
	Alimentos a base de cereales	2,000 mg/100 g	Exentos de gluten
Goma de algarrobo SIN 410	Fórmulas de inicio Fórmulas continuación Fórmulas para necesidades especiales de nutrición	0,1 g/100 ml	
	Alimentos a base de cereales	1,000 mg/100 g solo o combinado	
	Alimentos a base de cereales	2,000 mg/100 g	Exentos de gluten
	Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados	0,2 g/100 g	
Goma guar SIN 412	Fórmulas de inicio Fórmulas para necesidades especiales de nutrición	0,1 g/100 ml	Fórmulas líquidas que contengan proteínas hidrolizadas
	Fórmulas continuación	0,1 g/100 ml	
	Alimentos a base de cereales	1,000 mg/100 g solos o combinados	
	Alimentos a base de cereales	2,000 mg/100 g	Exentos de gluten
	Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados	0,2 g/100 g	
Goma xantana SIN 415	Alimentos a base de cereales Alimentos administrados directamente Alimentos deshidratados	1,000 mg/100 g solos o combinado	
	Alimentos a base de cereales	2,000 mg/100 g	Exentos de gluten
	Fórmulas para necesidades especiales de nutrición	100 mg/100 ml solo o mezclado	
Hidroxipropil almidón SIN 1440	Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados	6 g/100 g solos o mezclados	
	Fórmulas de inicio Fórmulas de continuación	0,5 g/100 ml solo o en combinación	Fórmulas a base de soya
	Fórmulas especiales de nutrición	2,5 g/100 ml solos o combinados	Fórmulas a base de proteínas

			hidrolizadas y/o aminoácidos
Octenilsuccinato sódico de almidón SIN 1450	Alimentos para ser administrados directamente	6 g/100 g solo o combinado	
	Alimentos deshidratados		
	Alimentos a base de cereales	5,000 mg/100 g solo o mezclado	
	Fórmulas para necesidades especiales de nutrición	2 g/100 ml	
Pectinas (aminadas y no aminadas) SIN 440	Fórmulas de continuación	1 g/100 ml solo o mezclado	
	Fórmulas para necesidades especiales de nutrición		
	Alimentos para ser administrados directamente	1 g/100 g solo o mezclado	Alimentos a base de fruta
	Alimentos deshidratados		
	Alimentos a base de cereales	2,000 mg/100 g solo o mezclado	Exentos de gluten

Antiaglomerantes

Nombre	Producto	Límite Dosis máxima en 100 ml del producto listo para consumo	Observaciones
Cera blanca y amarilla de abeja SIN 901	Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados	BPF	
Dextrina SIN 1400	Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados	BPF	
Dióxido de silicio amorfo SIN 551	Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados	1,000 mg/100 g	
	Alimentos a base de cereales	200 mg/100 g	Solo para cereales secos

Antioxidantes

Nombre	Producto	Límite	Observaciones
Acido ascórbico y sus sales de calcio, potasio y sodio SIN 300	Fórmulas de continuación	5mg/100g expresados en ácido ascórbico	Incluidas las fórmulas para necesidades especiales de nutrición
	Alimentos para ser administrados directamente	50mg/100g expresados en ácido ascórbico	
	Alimentos deshidratados Alimentos a base de cereales		
d-alfa-Tocoferol concentrado SIN 307a	Fórmulas de continuación	3 mg/kg grasa solo o mezclado	
	Alimentos a base de cereales	300 mg/kg de grasa solo o mezclado	
dl-alfa-Tocoferol	Alimentos para ser administrados	300 mg/kg de grasa	

SIN 307c	directamente Alimentos deshidratados Alimentos a base de cereales	solo o mezclado	
Tocoferoles concentrados. (Mezcla) SIN 307b	Fórmulas de inicio Fórmulas para necesidades especiales de nutrición	1 mg/100 ml solo o en combinación	
	Fórmulas de continuación	3 mg/100 ml solo o mezclado	
	Alimentos a base de cereales Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados	300 mg/kg de grasa solo o mezclado	
Palmitato de ascorbilo SIN 304	Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados Alimentos a base de cereales	200 mg/kg de grasa	
	Fórmulas de inicio Fórmulas para necesidades especiales de nutrición	1 mg/100 ml solo o combinado	
	Fórmulas de continuación	5 mg/100 ml solo o mezclado	

Aromas y saborizantes

Nombre	Producto	Límite Dosis máxima en 100 ml del producto listo para consumo	Observaciones
Etilvainillina	Fórmulas de continuación	5 mg/100 ml	Incluyendo las fórmulas para necesidades especiales de nutrición
	Alimentos a base de cereales Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados	7 mg/100 g	
Extractos naturales de fruta	Fórmulas de inicio Fórmulas de continuación Fórmulas para necesidades especiales de nutrición Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados Alimentos a base de cereales	BPF	
Extracto de vainilla	Fórmulas de continuación Alimentos para ser administrados directamente	BPF	Incluyendo las fórmulas para necesidades especiales de nutrición

	Alimentos deshidratados Alimentos a base de cereales		
Saborizantes naturales	Fórmulas de inicio Fórmulas de continuación Fórmulas para necesidades especiales de nutrición Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados Alimentos a base de cereales	BPF	
Vainillina	Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados Alimentos a base de cereales	7 mg/100 g	
	Fórmulas de continuación	5 mg/100 ml	Incluyendo las fórmulas para necesidades especiales de nutrición

Emulsificantes

Nombre	Producto	Límite Dosis máxima en 100 ml del producto listo para consumo	Observaciones
Esteres acéticos de los mono y diglicéridos de los ácidos grasos SIN 472a	Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados Alimentos a base de cereales	500 mg/100 g solos o mezclados	
Esteres cítricos de los mono y diglicéridos de los ácidos grasos SIN 472c	Alimentos a base de cereales Fórmulas para necesidades especiales de nutrición	500 mg/100 g solo o mezclado	
Esteres de ácidos lácticos y grasos de glicerol SIN 472b	Alimentos a base de cereales Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados	500 mg/100 g solo o mezclado	
Lecitina SIN 322 (i)	Fórmulas de inicio Fórmulas para necesidades especiales de nutrición	0,5 g/100 ml	Si se añade más de otro emulsificante el nivel máximo de cada uno se debe reducir proporcionalmente en función de las otras

			sustancias presentes
	Fórmulas de continuación	0,5 g/100 ml	
	Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados	0,5 g/100 g	
	Alimentos a base de cereales	1,5 g/100 g	Con respecto al peso seco
Monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos: Monoestearato de glicerilo	Fórmulas de inicio	0,4 g/100 ml	
	Fórmulas de continuación Fórmulas para necesidades especiales de nutrición		
Monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos Monopalmitato de glicerilo Monooleato de glicerilo SIN 471	Alimentos a base de cereales	1,5 g/100 g	
	Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados	0,15 g/100 g	

Leudantes

Nombre	Producto	Límite Dosis máxima en 100 ml del producto listo para consumo	Observaciones
Carbonato hidrogenado de potasio SIN 501 (ii)	Fórmulas de inicio Fórmulas de continuación Fórmulas necesidades especiales de nutrición Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados Alimentos a base de cereales	BPF	
Carbonato hidrogenado de sodio SIN 500 (ii)	Fórmulas de inicio Fórmulas de continuación Fórmulas de necesidades especiales de nutrición Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados Alimentos a base de cereales	BPF	limitado al nivel máximo de sodio

Carbonato hidrogenado de amonio SIN 503 (ii)	Alimentos a base cereales Alimentos para ser administrados directamente Fórmulas deshidratados	BPF	
Carbonato de amonio SIN 503 (i)	Alimentos a base de cereales Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados	BPF	
Carbonato de calcio SIN 170 (i)	Alimentos a base de cereales Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados	BPF	
Fosfato dihidrogenado de calcio SIN 341 (i)	Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados	BPF	
	Alimentos a base de cereales	440 mg solo o en combinación	Únicamente para regular la acidez
Pirofosfato disódico SIN 450 (i)	Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados	BPF	

Reguladores de pH

Nombre	Producto	Límite Dosis máxima en 100 g del producto con respecto al peso seco	Observaciones
Acetato de calcio SIN 263	Alimentos a base de cereales Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados	BPF	
Acetato de potasio SIN 261	Alimentos a base de cereales Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados	BPF	
Acetato de sodio SIN 262 (i)	Alimentos a base de cereales Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados	BPF	
Acido acético glacial SIN 260	Alimentos a base de cereales Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados	BPF	
Acido cítrico SIN 330	Fórmulas de inicio Fórmulas de continuación Fórmulas para necesidades especiales de nutrición Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados	BPF	

	Alimentos a base de cereales		
Acido clorhídrico SIN 507	Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados Alimentos a base de cereales	BPF	
Acido láctico SIN 270	Fórmulas de inicio Fórmulas de continuación Fórmulas para necesidades especiales de nutrición Alimentos a base de cereales	BPF	
	Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados	0,2 g/100 g	
Acido L(+)-tartárico SIN 334	Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados	BPF	
	Alimentos a base de cereales	500 mg/100 g solo o combinado	
Acido D,L-málico SIN 296	Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados Alimentos a base de cereales	BPF	
Acido ortofosfórico Acido fosfórico SIN 338	Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados	0,1 mg como P ₂ O ₅ solo o combinado	Como fósforo únicamente para regular la acidez
	Alimentos a base de cereales	440 mg solo o en combinación	
Carbonato hidrogenado de calcio SIN 170(ii)	Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados Alimentos a base de cereales	BPF	
Carbonato hidrogenado de potasio SIN 501 (ii)	Fórmulas de inicio Fórmulas para necesidades especiales de nutrición	0,2 g/100 ml solo o combinado	Dentro de los límites de potasio
	Fórmulas de continuación Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados Alimentos a base de cereales	BPF	
Carbonato hidrogenado de sodio SIN 500 (ii)	Fórmulas de inicio Fórmulas para necesidades especiales de nutrición	0,2 g/100 ml solo o combinado	Dentro de los límites de sodio
	Fórmulas de continuación Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados Alimentos a base de cereales	BPF	
Carbonato de potasio SIN 501 (i)	Fórmulas de inicio Fórmulas para necesidades especiales de nutrición	0,2 g/100 ml solo o combinado	Dentro de los límites de potasio
	Fórmulas continuación	BPF	

	Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados Alimentos a base de cereales		
Carbonato de sodio SIN 500 (i)	Fórmulas de inicio Fórmulas para necesidades especiales de nutrición	0,2 g/100 ml solo o combinado	Dentro de los límites de sodio
	Fórmulas de continuación Alimentos a base de cereales Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados	BPF	
Carbonato de calcio SIN 170 (i)	Alimentos a base de cereales	BPF	
Citrato de calcio SIN 333	Fórmulas de inicio Fórmulas continuación Fórmulas para necesidades especiales de nutrición Alimentos a base de cereales Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados	BPF	
Citrato tripotásico SIN 332 (ii)	Fórmulas de inicio Fórmulas de continuación Fórmulas para necesidades especiales de nutrición	BPF	Dentro de los límites para potasio.
	Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados Alimentos a base de cereales	BPF	
Citrato trisódico SIN 331 (iii)	Fórmulas de inicio Fórmulas de continuación Fórmulas para necesidades especiales de nutrición	BPF	Dentro de los límites para sodio
	Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados Alimentos a base de cereales	BPF	
Citrato monopotásico Citrato dihidrogenado de potasio SIN 332 (i)	Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados Alimentos a base de cereales	BPF	
Citrato monosódico Citrato dihidrogenado de sodio. SIN 331 (i)	Fórmulas de inicio Fórmulas de continuación Fórmulas para necesidades especiales de nutrición Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados	BPF	

	Alimentos a base de cereales		
Cultivos productores de ácido l láctico y del ácido cítrico	Fórmulas de continuación Fórmulas para necesidades especiales de nutrición	BPF	
Glucono delta lactona SIN 575	Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados	500 mg/100 g	
	Alimentos a base de cereales	BPF	
Hidróxido de calcio SIN 526	Fórmulas de inicio Fórmulas para necesidades especiales de nutrición	0,2 g/100 ml solo o combinado	Dentro de los límites de calcio
	Fórmulas de continuación Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados Alimentos a base de cereales	BPF	
Hidróxido de potasio SIN 525	Fórmulas de inicio Fórmulas para necesidades especiales de nutrición	0,2 g/100 ml solo o combinado	Dentro de los límites de potasio
	Fórmulas de continuación Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados Alimentos a base de cereales	BPF	
Hidróxido de sodio SIN 524	Fórmulas de inicio Fórmulas para necesidades especiales de nutrición	0,2g/100 ml solo o combinado	Dentro de los límites para sodio
	Fórmulas de continuación Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados Alimentos a base de cereales	BPF	
Lactato de calcio Unicamente en su forma L(+) SIN 327	Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados Alimentos a base de cereales	BPF	
Lactato de potasio Unicamente en su forma L(+) SIN 326	Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados Alimentos a base de cereales	BPF	Dentro de los límites para potasio
Lactato de sodio Unicamente en su forma L(+) SIN 325	Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados Alimentos a base de cereales	BPF	Dentro de los límites para sodio
Ortofosfato dicálcico Fosfato hidrogenado de	Alimentos a base de cereales	440 mg/100 g solo o combinado como	

calcio SIN 341 (ii)		fósforo	
Ortofosfato dipotásico Fosfato hidrogenado dipotásico SIN 340 (ii)	Alimentos a base de cereales	440 mg/100 g solo o combinado	Como fósforo
Ortofosfato disódico Fosfato hidrogenado disódico SIN 339 (ii)	Alimentos a base de cereales	440 mg/100 g solo o en combinación	Como fósforo
Ortofosfato monocalcico Fosfato dihidrogenado de calcio SIN 341 (i)	Alimentos a base de cereales	440 mg/100 g solo o en combinación	Como fósforo
Ortofosfato monopotásico Fosfato dihidrogenado de potasio SIN 340 (i)	Alimentos a base de cereales	440 mg/100 g solo o en combinación	Como fósforo
Ortofosfato monosódico Fosfato dihidrogenado de sodio SIN 339 (i)	Alimentos a base de cereales	440 mg/100 mg solos o en combinación como fósforo	
Ortofosfato tricálcico Fosfato tricálcico SIN 341 (iii)	Alimentos a base de cereales	440 mg/100 g solos o en combinación	Como fósforo
Ortofosfato tripotásico Fosfato tripotásico SIN 340 (iii)	Alimentos a base de cereales	440 mg/100 g solos o en combinación	Como fósforo
Ortofosfato trisódico Fosfato trisódico SIN 339 (iii)	Alimentos a base de cereales	440 mg/100 g solos o en combinación	Como fósforo
Tartrato dipotásico únicamente en su forma L (+) SIN 336 (ii)	Alimentos a base de cereales	500 mg solos o combinados como tartratos en residuo en bizcochos y galletas	En residuo en bizcochos y galletas
Tartrato disódico L (+)-Tartrato de sodio SIN 335 (ii)	Alimentos a base de cereales	500 mg solos o combinados como tartratos	En residuo en bizcochos y galletas
Tartrato monopotásico Tartrato ácido de potasio Tartrato monopotásico SIN 336 (i)	Alimentos a base de cereales	500 mg solos o combinados como tartratos en residuo en bizcochos y galletas	En residuo en bizcochos y galletas
Tartrato monosódico L (+)Tartrato monosódico SIN 335 (i)	Alimentos a base de cereales	500 mg solos o combinados como tartratos	En residuo en bizcochos y galletas
Tartrato de sodio y potasio únicamente en su	Alimentos a base de cereales	500 mg solos o combinados como	En residuo en bizcochos y

forma L(+) Sal Rochelle Sal Seignette Dextrotartrato de sodio y potasio SIN 337		tartratos	galletas
---	--	-----------	----------

Gases de envasado

Nombre	Producto	Límite Dosis máxima en 100 g del producto con respecto al peso seco	Observaciones
Dióxido de carbono (coadyuvante, gasificante) SIN 290	Fórmulas de inicio Fórmulas continuación Fórmulas para necesidades especiales de nutrición Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados Alimentos a base de cereales	BPF	
Nitrógeno (propulsor) SIN 941	Fórmulas de inicio Fórmulas de continuación Fórmulas para necesidades especiales de nutrición Alimentos para ser administrados directamente Alimentos deshidratados Alimentos a base de cereales	BPF	

APENDICE NORMATIVO B

SUSTANCIAS NUTRITIVAS

Tabla B1. Sales Minerales

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

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

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

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

Tabla B2. **Vitaminas**

Vitamina	Fuente
Vitamina A	Todo trans retinol Acetato de Retinilo Palmitato de retinol
Provitamina A	Beta caroteno
Vitamina D ₂	Ergocalciferol
Vitamina D ₃	Colecalciferol
Vitamina E	d-alfa tocoferol dl-alfa tocoferol d-alfa tocoferil acetato dl-alfa tocoferil acetato Succinato ácido d-alfa tocoferil Succionato ácido dl-alfa tocoferil Succinato de dl-alfa tocoferil polietileno glicol 1000
Tiamina (Vitamina B ₁)	Hidrocloruro de tiamina cloruro Tiamina mononitrato
Riboflavina (Vitamina B ₂)	Riboflavina Riboflavina 5´-fosfato sódico
Niacina	Nicotinamida Acido nicotínico
Vitamina B ₆	Hidrocloruro de piridoxina Piridoxal 5- fosfato

Biotina (vitamina H)	D-biotina
Acido fólico	Acido N-pteroil-L-glutámico L-metilfolato cálcico
Acido pantoténico	D-Pantotenato cálcico D-Pantenol DL-Pantenol D-pantotenato sódico
Vitamina B ₁₂	Cianocobalamina Hidroxocobalamina
Vitamina K ₁	Fitomenadiona (2-metil-3-fetil-1,4-naftoquinona filoquinona / fitonadiona)
Vitamina C	Acido L-ascórbico L-Ascorbato sódico L-Ascorbato cálcico Acido 6- palmitil-L-ascórbico (palmitato de ascorbilo) L-Ascorbato potásico

Tabla B3. **Aminoácidos y otros nutrientes nitrogenados**

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

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

APENDICE NORMATIVO C.

METODOS MICROBIOLÓGICOS

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

C1.1 Fundamento

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

C1.2 Reactivos y materiales

C1.2.1 Reactivos

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

C1.2.1.1 Preparación de reactivos

C1.2.1.1.1 Solución de hidróxido de sodio 1,0 N

FORMULA

Ingredientes	Cantidades
--------------	------------

Hidróxido de sodio	4,0 g
Agua	100,0 ml

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

C.1.2.1.1.2 Soluciones diluyentes

C.1.2.1.1.2.1 Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada).

FORMULA

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.

C.1.2.1.1.2.2 Agua peptonada

FORMULA

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.

C.1.2.2 Materiales

Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 ml (o si es necesario de 1 ml y 2 ml), con tapón de algodón. Las pipetas pueden ser graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total.

Fascos de vidrio de 250 ml con tapón de rosca.

Tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca.

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

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

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

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

C.1.3 Aparatos e instrumentos

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

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

Baño de agua con control de temperatura y circulación mecánica, provista con termómetro calibrado con divisiones de $0,1^{\circ}\text{C}$ y que mantenga la temperatura a $45 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

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

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

Balanza granataria con sensibilidad de 0,1 g.

C.1.4 Procedimiento

C.1.4.1 Preparación de la dilución primaria.

C.1.4.1.1 A partir de muestras líquidas:

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

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

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

C.1.4.1.1.1 Agitar la muestra manualmente con 25 movimientos de arriba a abajo en un arco de 30 cm efectuados en un tiempo de 7 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.

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

C.1.4.1.2 A partir de muestras sólidas o semisólidas.

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

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

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

C.1.4.1.2.3 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.

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

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

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

C.1.4.2 Preparación de las diluciones decimales adicionales.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

C.1.4.3 Duración del procedimiento.

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

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

C.2.1 Fundamento

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

C.2.2 Reactivos y materiales

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

C.2.2.1 Reactivos

C.2.2.1.1 Soluciones diluyentes

C.2.2.1.1.1 Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada)

FORMULA

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

C.2.2.1.1.2. Agua peptonada

FORMULA

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 $121 \pm 1,0^\circ\text{C}$. Después de la esterilización los volúmenes finales de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales. Si este diluyente no es usado inmediatamente, almacenar en lugar obscuro a una temperatura entre 0 a 5°C por un tiempo no mayor de un mes, en condiciones tales que no alteren su volumen o composición.

C.2.2.1.2 Medios de cultivo.

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

Caldo lauril sulfato triptosa (medio de enriquecimiento selectivo).

Caldo lactosa bilis verde brillante (medio de confirmación).

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

C.2.2.1.2.1 Caldo lactosado

Ingrediente	Medio de concentración	Medio de concentración sencilla
	1,5	
Extracto de carne	4,5 g	3,0 g
Peptona de gelatina	7,5 g	5,0 g
Lactosa	7,5 g	5,0 g
Agua destilada	1000,0 ml	1000,0 ml

Disolver los ingredientes en 1 l de agua, calentando si es necesario o el medio completo deshidratado, siguiendo las instrucciones del fabricante. Ajustar el Ph final de tal manera que después de la esterilización éste sea de $6,9 \pm 0,2$ a 25°C . Distribuir en volúmenes de 10 ml en tubos con dimensiones de 16 x 160 mm el medio de concentración sencilla y de 20 ml en tubos de 20 x 200 mm el medio de concentración 1,5, cada tubo debe tener campana de fermentación. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a $121 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$. 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.

C.2.2.1.2.2 Caldo lauril sulfato triptosa.

Ingrediente	Medio de concentración	Medio de concentración sencilla
	1,5	
Triptosa	30,0 g	20,0 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	7,50 g	5,0 g
Lauril sulfato de sodio	0,15 g	0,1 g
Agua destilada	1000,0 ml	1000,0 ml

Disolver los componentes en 1 l de agua, calentando si es necesario o el medio de cultivo completo deshidratado, siguiendo las instrucciones del fabricante. Ajustar el pH de tal manera que después de la esterilización éste sea de $6,8 \pm 0,2$ a 25°C . Distribuir en volúmenes de 10 ml en tubos con dimensiones de 16 x 160 mm el medio de concentración sencilla y de 20 ml en tubos de 20 x 200 mm el medio de concentración 1,5, cada tubo debe tener campana de fermentación. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a $121 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$. 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.

C.2.2.1.2.3 Lactosa bilis verde brillante

FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Peptona	10,0 g
Lactosa	10,0 g
Sales biliares	20,0 g
Verde brillante	0,0133 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°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 $121 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$. Las campanas de fermentación no deben contener burbujas de aire después de la esterilización.

C.2.2.2 Materiales

Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 ml (o si es necesario de 11 y 2 ml), con tapón de algodón. Las pipetas pueden ser graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total.

Frascos de vidrio de 250 ml con tapón de rosca.

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

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

Campanas de fermentación (tubos de Durham).

Pipetas bacteriológicas graduadas de 10 y 1 ml

Gradillas.

Asa de platino o nicromel de aproximadamente 3 mm de diámetro

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

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

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

C.2.3 Aparatos e instrumentos

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

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

Termómetro de máximas y mínimas.

Autoclave que alcance una temperatura mínima de $121 \pm 1,0^\circ\text{C}$.

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

C.2.4 Preparación de la muestra

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

C.2.5 Procedimiento

C.2.5.1 Para alimentos.

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

C.2.5.1.1 Prueba presuntiva

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

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

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

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

C.2.5.1.2 Prueba confirmativa

De cada tubo que muestre formación de gas, tomar una asada y sembrar en un número igual de tubos con medio de confirmación. Incubar a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 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.

C.2.6 EXPRESION DE LOS RESULTADOS.

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

El cuadro 3 muestra algunos ejemplos que se pueden presentar.

Ejemplos:

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

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

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

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

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

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

CUADRO 3.- Ejemplos de la selección de resultados positivos para el cálculo del NMP.

E	Número de tubos positivos obtenidos de tres Tubos incubados, para las siguientes cantidades de muestra inoculada por tubo						NMP				
	J	Producto					Producto	Otros			
E	Líquido	(ml)	10	1	10 ⁻¹	10 ⁻²			10 ⁻³	Líquido	Otros
	Otros Productos	(g)	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴				
		Mayor dilución = menor concentración									
M											
P											
L											
O											
								ml ⁻¹	g ⁻¹		
1			3	<u>3</u>	<u>2</u>	<u>1</u>	0	15	(5)	150	(6)
2			3	<u>3</u>	<u>3</u>	0		24	(5)	240	(6)
3			2	2	<u>1</u>	<u>1</u>	0	7	(6)	70	(7)
4			<u>3</u>	<u>3</u>	<u>0</u>	0	0	2.4	(4)	24	(5)
5			<u>2</u>	<u>2</u>	<u>0</u>	1	0	0,21	(4)	2,1	(5)

CUADRO 4. Índice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos. (Diluciones 10, 1,0 y 0,1 g)

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

0-0-1	0,03	<0,005	<0,09	0,02	<0,005	0,07
0-1-0	0,03	<0,005	0,13	0,02	<0,005	0,07
0-2-0	---	---	---	0,04	<0,005	0,11
1-0-0	0,04	<0,005	0,20	0,02	<0,005	0,07
1-0-1	0,07	0,01	0,21	0,04	<0,005	0,11
1-1-0	0,07	0,01	0,23	0,04	<0,005	0,11
1-1-1	0,11	0,03	0,36	0,06	<0,005	0,15
1-2-0	0,11	0,03	0,36	0,06	<0,005	0,15
2-0-0	0,09	0,01	0,36	0,05	<0,005	0,13
2-0-1	0,14	0,03	0,37	0,07	0,01	0,17
2-1-0	0,15	0,03	0,44	0,07	0,01	0,17
2-1-1	0,20	0,07	0,89	0,09	0,02	0,21
2-2-0	0,21	0,04	0,47	0,09	0,02	0,21
2-2-1	0,28	0,10	1,50	----	---	---
2-3-0	---	---	---	0,12	0,03	0,28
3-0-0	0,23	0,04	1,20	0,08	0,01	0,19
3-0-1	0,39	0,07	1,3	0,11	0,02	0,25
3-0-2	0,64	0,15	3,80	---	---	---
3-1-0	0,43	0,07	2,1	0,11	0,02	0,25
3-1-1	0,75	0,14	2,3	0,14	0,04	0,34
3-1-2	1,20	0,30	3,8	---	---	---
3-2-0	0,93	0,15	3,80	0,14	0,04	0,34
3-2-1	1,50	0,30	4,40	0,17	0,05	0,46
3-2-2	2,10	0,35	4,70	--	--	--
3-3-0	2,40	0,36	13,0	--	--	--
3-3-1	4,60	0,71	24,0	--	--	--
3-3-2	11,0	1,50	48,0	--	--	--
3-3-3	>11.0	>1,50	>48.0	--	--	--
4-0-0	--	---	---	0,13	0,03	0,31
4-0-1	--	---	---	0,17	0,05	0,46
4-1-0	--	---	---	0,17	0,05	0,46
4-1-1	--	--	---	0,21	0,07	0,63
4-1-2	--	--	---	0,26	0,09	0,78

4-2-0	--	--	---	0,22	0,07	0,67
4-2-1	--	---	---	0,26	0,09	0,78
4-3-0	--	---	---	0,27	0,09	0,80
4-3-1	--	---	---	0,33	0,11	0,93
4-4-0	--	---	---	0,34	0,12	0,93
5-0-0	--	---	---	0,23	0,07	0,70
5-0-1	--	---	---	0,31	0,11	0,89
5-0-2	--	---	---	0,43	0,15	1,14
5-1-0	--	---	---	0,33	0,11	0,93
5-1-1	--	---	----	0,46	0,16	1,2
5-1-2	--	---	---	0,63	0,21	1,5
5-2-0	--	---	---	0,49	0,17	1,3
5-2-1	--	---	---	0,70	0,23	1,70
5-2-2	--	---	---	0,94	0,28	2,2
5-3-0	--	---	---	0,79	0,25	1,9
5-3-1	--	---	---	1,10	0,31	2,5
5-3-2	--	---	---	1,4	0,37	3,4
5-3-3	--	---	---	1,80	0,44	5,0
5-4-0	--	---	---	1,30	0,35	3,0
5-4-1	--	---	---	1,70	0,43	4,9
5-4-2	--	---	---	2,20	0,57	7,0
5-4-3	--	---	---	2,80	0,90	8,5
5-4-4	--	---	---	3,50	1,20	10,0
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)

		3 TUBOS POR DILUCION		5 TUBOS POR DILUCION		
Combinación de positivos	Índice del NMP por g	95% Límites de confianza		Índice del NMP por g	95% Límites de confianza	
		bajo	alto		bajo	alto

0-0-0	<0,3	<0,05	<0,9	<0,2	<0,05	<0,7
0-0-1	0,3	<0,05	<0,9	0,2	<0,05	0,7
0-1-0	0,3	<0,05	1,3	0,2	<0,05	0,7
0-2-0	---	---	---	0,4	<0,05	0,11
1-0-0	0,4	<0,05	2,0	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	44,0	1,7	0,5	4,6
3-2-2	21,0	3,5	47,0	--	--	--
3-3-0	24,0	3,6	130,0	--	--	--
3-3-1	46,0	7,1	240,0	--	--	--
3-3-2	110,0	15,0	480,0	--	--	--
3-3-3	>110,0	>15,0	>480,0	--	--	--
4-0-0	--	---	---	1,3	0,3	3,1
4-0-1	--	---	---	1,7	0,5	4,6
4-1-0	--	---	---	1,7	0,5	4,6
4-1-1	--	---	---	2,1	0,7	6,3

4-1-2	--	---	---	2,6	0,9	7,8
4-2-0	--	---	---	2,2	0,7	6,7
4-2-1	--	---	---	2,6	0,9	7,8
4-3-0	--	---	---	2,7	0,9	8,0
4-3-1	--	---	---	3,3	1,1	9,3
4-4-0	--	---	---	3,4	1,2	3,
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, 0,001 y 0,0001 g)

		3 TUBOS POR DILUCION		5 TUBOS POR DILUCION	
Combinación	Índice del	95% Límites de confianza	Índice del	95% Límites de confianza	

de positivos	NMP por g	bajo	Alto	NMP por g	bajo	alto
0-0-0	<3	<0,5	<9	<2	<0,5	<7
0-0-1	3	<0,5	<9	2	<0,5	7
0-1-0	3	<0,5	13	2	<0,5	7
0-2-0	---	---	---	4	<0,5	11
1-0-0	4	<0,5	20	2	<0,5	7
1-0-1	7	1	21	4	<0,5	11
1-1-0	7	1	23	4	<0,5	11
1-1-1	11	3	36	6	<0,5	15
1-2-0	11	3	36	6	<0,5	15
2-0-0	9	1	36	5	<0,5	13
2-0-1	14	3	37	7	1,0	17
2-1-0	15	3	44	7	1,0	17
2-1-1	20	7	89	9	2	21
2-2-0	21	4	47	9	2	21
2-2-1	28	10	150	---	---	---
2-3-0	---	---	---	12	3	28
3-0-0	23	4	120	8	1	19
3-0-1	39	7	13,0	11	2	25
3-0-2	64	15	380	--	--	--
3-1-0	43	7	210	11	2	25
3-1-1	75	14	230	14	4	34
3-1-2	120	30	380	--	--	--
3-2-0	93	15	380	14	4	34
3-2-1	150	30	440	17	5	46
3-2-2	210	35	470	--	--	--
3-3-0	240	36	130,0	--	--	--
3-3-1	460	71	240,0	--	--	--
3-3-2	1100	150	480,0	--	--	--
3-3-3	>1100	>150	>480,0	--	--	--
4-0-0	--	---	---	13	3	31
4-0-1	--	---	---	17	5	46
4-1-0	--	---	---	17	5	46

4-1-1	--	---	---	21	7	63
4-1-2	--	---	---	26	9	78
4-2-0	--	---	---	22	7	67
4-2-1	--	---	---	26	9	78
4-3-0	--	---	---	27	9	80
4-3-1	--	---	---	33	11	93
4-4-0	--	---	---	34	12	93
5-0-0	--	---	---	23	7	7
5-0-1	--	---	---	31	11	89
5-0-2	--	---	---	43	15	114
5-1-0	--	---	---	33	11	93
5-1-1	--	---	---	46	16	120
5-1-2	--	---	---	63	21	150
5-2-0	--	---	---	49	17	130
5-2-1	--	---	---	70	23	170
5-2-2	--	---	---	94	28	220
5-3-0	--	---	---	79	25	190
5-3-1	--	---	---	110	31	250
5-3-2	--	---	---	140	37	340
5-3-3	--	---	---	180	44	500
5-4-0	--	---	---	130	35	300
5-4-1	--	---	---	170	43	490
5-4-2	--	---	---	220	57	700
5-4-3	--	---	---	280	90	850
5-4-4	--	---	---	350	120	1000
5-5-0	--	---	---	240	68	750
5-5-1	--	---	---	350	120	1000
5-5-2	--	---	---	540	180	1400
5-5-3	--	---	---	920	300	3200
5-5-4	--	---	---	1600	640	5800
5-5-5	--	---	---	>1600	>640	>5800

CUADRO 7. Índice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos. (Diluciones 0,01, 0,001 y 0,0001 g)

	3 TUBOS POR DILUCION	5 TUBOS POR DILUCION
--	----------------------	----------------------

Combinación de positivos	Indice del NMP por g	95% Límites de confianza		Indice del NMP por g	95% Límites de confianza	
		bajo	Alto		bajo	alto
0-0-0	<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

C.2.7 Informe de la prueba

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

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

C.3. METODO PARA LA CUENTA DE MICROORGANISMOS COLIFORMES TOTALES EN PLACA.

C.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.

C.3.2 Reactivos y materiales

C.3.2.1 Reactivos

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

C.3.2.1.1 Soluciones diluyentes

C.3.2.1.1.1 Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada)

FORMULA

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 $121 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ 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 $121 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$. Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

C.3.2.1.1.2 Agua Peptonada

FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Peptona	1,0 g
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.

C.3.2.1.2 Medio de Cultivo

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

FORMULA

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.

C.3.2.2 Materiales

Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 ml (o si es necesario de 11 y 2 ml), con tapón de algodón. Las pipetas pueden ser graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total.

Fascos de vidrio de 250 ml con tapón de rosca.

Tubos de 16 X 150 mm con tapón de rosca.

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

Cajas Petri.

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

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

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

C.3.3 Aparatos e instrumentos

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

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

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

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

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

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

Registrador mecánico o electrónico.

Microscopio óptico.

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

C.3.4 Preparación de la muestra

La preparación de la muestra debe ser de acuerdo a lo establecido en el método de Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

C.3.5 Procedimiento

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

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

C.3.5.3 Verter 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.

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

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

C.3.5.6 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.

C.3.5.7 Invertir las placas y colocarlas en la incubadora a 35°C, durante 24 ± 2 horas.

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

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

C.3.6 Expresión de los resultados

C.3.6.1 Cálculo del Método

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

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

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

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

C.3.6.1.3 Placas con colonias no características.

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

C.3.7 Informe de la prueba

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

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

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

C.4. METODO PARA LA DETERMINACION DE *Salmonella* EN ALIMENTOS.

C.4.1 Fundamento

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

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

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

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

C.4.1.4 Identificación bioquímica, este paso permite la identificación genérica de los cultivos de *Salmonella* y la eliminación de cultivos sospechosos falsos.

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

C.4.2 Reactivos y materiales

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

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

C.4.2.1 Reactivos

C.4.2.1.1 Medios de pre-enriquecimiento

C.4.2.1.1.1 Agua de peptona tamponada

FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Peptona	10,0 g
Cloruro sódico	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

C.4.2.1.1.2 Caldo lactosado

FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Extracto de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Lactosa	5,0 g
Agua destilada	1,0 l

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 $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

C.4.2.1.2 Caldo de enriquecimiento

C.4.2.1.2.1 Caldo selenito-cistina

FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Triptona o polipeptona	5,00 g
Lactosa	4,00 g
Fosfato disódico	10,00 g
Selenito ácido de sodio	4,00 g
L-cistina	0,01 g
Agua destilada	1,00 l

pH final: $7,0 \pm 0,2$ a 25°C

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

C.4.2.1.2.2 Caldo tetratonato

FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Proteosa peptona o tristona	5,0 g
Sales biliares	1,0 g
Carbonato de calcio	10,0 g
Tiosulfato de sodio pentahidratado	30,0 g
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.

C.4.2.1.2.3 Vassiliadis-Rappaport

Solución A

FORMULA

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

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

Solución B

FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Cloruro de magnesio hexahidratado	400,0 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	100,0 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.

C.4.2.1.2.4 Caldo de Soya Tripticasa

FORMULA

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 l
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.

C.4.2.1.2.5 Leche descremada reconstituida

Suspender 100 g de leche descremada en polvo en un litro de agua destilada. Agitar circularmente hasta disolución. Distribuir en volúmenes de 225 ml en matraces Erlenmeyer de 500 ml. Esterilizar a 121°C ± 1°C por 15 min. El volumen final debe corregirse para mantener 225 ml.

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

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

C.4.2.1.3 Medios de Aislamiento

C.4.2.1.3.1 Agar verde brillante (VB)

FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Extracto de levadura	3,0000 g
Polipeptona (Proteosa peptona No. 3)	10,0000 g
Cloruro de sodio	5,0000 g
Lactosa	10,0000 g
Sacarosa	10,0000 g
Rojo de fenol	0,0800 g
Agar	20,0000 g
Verde brillante	0,0125 g
Agua destilada	1,0000 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 obscuro, de color marrón.

C.4.2.1.3.2 Agar con sulfito de bismuto

FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Extracto de carne de res	5,000 g
Mezcla de peptonas	10,000 g
Glucosa	5,000 g
Fosfato disódico (anhidro)	5,000 g
Sulfato ferroso (anhidro)	0,300 g
Sulfito de bismuto	8,000 g
Verde brillante	0,025 g
Agar	20,000 g
Agua destilada	1,000 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.

C.4.2.1.3.3 Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)

FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Xilosa	3,75 g
L-lisina	5,00 g
Lactosa	7,50 g
Sacarosa	7,50 g
Cloruro de sodio	5,00 g
Extracto de levadura	3,00 g

Rojo de fenol	0,08 g
Agar	15,00 g
Desoxicolato de sodio	2,50 g
Citrato férrico-amónico	0,80 g
Tiosulfato de sodio	6,80 g
Agua destilada	1,00 l

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

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.

C.4.2.1.3.4 Agar para Salmonella y Shigella (SS)

FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Extracto de carne	5,000 g
Polipeptona *	5,000 g
Lactosa	10,000 g
Sales biliares	8,500 g
Citrato de sodio dihidratado	8,500 g
Tiosulfato de sodio pentahidratado	8,500 g
Citrato férrico	1,000 g
Agar	13,500 g
Rojo neutro	0,025 g
Verde brillante	0,330 mg
Agua destilada	1,000 l

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

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

Preparación: Suspender los ingredientes en 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.

C.4.2.1.3.5 Agar entérico Hektoen

FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Proteosa peptona	12,000 g
Extracto de levadura	3,000 g
Lactosa	12,000 g
Sacarosa	12,000 g
Salicina	2,000 g
Sales biliares	9,000 g
Cloruro de sodio	5,000 g
Tiosulfato de sodio	5,000 g
Citrato amónico férrico	1,500 g
Azul de bromotimol	0,064 g

Fuscina ácida	0,100 g
Agar	13,500 g
Agua	1,000 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.

C.4.2.1.4 Medios para pruebas bioquímicas

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

FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Peptona de carne *	1,0 g
Peptona 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	100,0 ml
pH final: 7,3 ± 0,2	

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

Preparación: Suspender los ingredientes en 100 ml de agua destilada. Calentar a ebullición, agitando ocasionalmente, hasta disolución completa. Enfriar a 60°C y ajustar el pH. Distribuir en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar a 121°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.

C.4.2.1.4.2 Agar de hierro y lisina (LIA)

FORMULA

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	50,0 mg
Tiosulfato de sodio anhidro	4,0 mg
Púrpura de bromocresol	2,0 mg
Agar	1,5 g
Agua destilada	100,0 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.

C.4.2.1.4.3 Agar nutritivo

FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Extracto de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1,0 l

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

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 $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 15 min. Inclinar los tubos antes que el agar solidifique.

C.4.2.1.4.4 Medio de SIM (para Sulfuro, Indol y Movilidad)

FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Extracto de carne	3,000 g
Peptona	30,000 g
Hierro peatonizado	0,200 g
Tiosulfato de sodio	0,025 g
Agua destilada	1,000 l

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

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 $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 15 min. Se dejan enfriar los tubos en posición vertical.

C.4.2.1.4.5 Agar citrato de Simmons

FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Fosfato de amonio	1,00 g
Fosfato dipotásico	1,00 g
Cloruro de sodio	5,00 g
Citrato de sodio	2,00 g
Sulfato de magnesio	0,20 g
Azul de bromotimol	0,08 g
Agar	15,00 g
Agua destilada	1,00 l

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

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 $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 15 min. Dejar enfriar los tubos en posición inclinada.

C.4.2.1.4.6 Caldo MR-VP (Rojo de metilo-Voges Proskauer)

FORMULA

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.

C.4.2.1.4.7 Caldo manitol

FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Extracto de carne	1,000 g
Proteosa peptona	10,000 g
Cloruro de sodio	5,000 g
Rojo de fenol	0,018 g
Manitol	10,000 g
Agua	1,000 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

C.4.2.1.4.8 Caldo malonato

FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Extracto de levadura	1,000 g
Sulfato de amonio	2,000 g
Fosfato dipotásico	0,600 g
Fosfato monopotásico	0,400 g
Cloruro de sodio	2,000 g
Malonato	3,000 g
Glucosa	0,250 g
Azul de bromotimol	0,025 g
Agua	1,000 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.

C.4.2.1.4.9 Caldo Urea

FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Urea	20,00 g
Extracto de levadura	0,10 g
Fosfato monopotásico	9,10 g
Fosfato disódico	9,50 g
Rojo de fenol	0,01 g
Agua	1,00 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.

C.4.2.1.4.10 Caldo de urea rápido

FORMULA	
Ingredientes	Cantidades
Urea	20,000 g
Extracto de levadura	0,100 g
Fosfato monopotásico	0,091 g
Fosfato disódico	0,095 g
Rojo de fenol	0,010 g
Agua	1,000 l

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

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

C.4.2.1.4.11 Caldo infusión cerebro corazón

FORMULA

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: $7,4 \pm 0,2$

Preparación: Disolver los ingredientes en agua destilada, calentar suavemente. Distribuir y esterilizar a $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 15 min.

C.4.2.1.5 Soluciones

C.4.2.1.5.1 Solución verde brillante al 0,1% (1:1000)

FORMULA

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.

C.4.2.1.5.2 Solución de yodo-yoduro

FORMULA

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

C.4.2.1.5.3 Solución salina al 0,85%

FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Cloruro de sodio	0,85 g
Agua destilada	100,00 ml

Disolver el cloruro de sodio en el agua y esterilizar a $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 15 min.

C.4.2.1.5.4 Solución salina formalizada

FORMULA

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 $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 15 min. Enfriar a temperatura ambiente. Adicionar 6 ml de la solución de formaldehído. No esterilizar después de la adición de formaldehído.

C.4.2.1.5.5 Reactivo de Kovac

FORMULA

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.

C.4.2.1.5.6 Solución de alfa-naftol al 5%

FORMULA

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

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

C.4.2.1.5.7 Solución de rojo de metilo

FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Rojo de metilo	0,10 g
Alcohol etílico	300,00 ml
agua destilada c.b.p	500,00 ml

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

C.4.2.1.5.8 Solución de hidróxido de potasio al 40%

FORMULA

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.

C.4.2.1.5.9 Solución de gelatinasa al 5%

FORMULA

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

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

C.4.2.1.6 Antisueros

Antisuero polivalente somático (O)

Antisuero polivalente flagelar (H)

Antisuero Vi

C.4.2.2 Material

Matraces Erlenmeyer de 500 ml

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

Angulos de vidrio

Cucharas, bisturís, cuchillos y pinzas

Tubos de ensaye de 16 x 150 mm y de 20 x 100 mm

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

Pipetas bacteriológicas de 10,0 y 5,0 ml, graduadas en 0,1 ml y protegidas con tapón de algodón.

Pipetas de 1 ml, con graduaciones de 0,01 ml

Cajas de Petri estériles de vidrio o desechables

Rejillas para tubos de ensaye

Asa de platino o nicromel de aproximadamente 3 mm de diámetro

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

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

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

C.4.3 Equipo

Horno para esterilizar que alcance los 180°C

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

Autoclave con termómetro o manómetro, probado con termómetro de máximas.

Baño maría con termostato y termómetro.

Balanza granataria con sensibilidad de 0,1 g

Licuada de una o dos velocidades controladas por un reóstato, con vasos esterilizables (vidrio o aluminio).

Mecheros Bunsen o Fisher

Potenciómetro

C.4.4 Procedimiento

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

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

C.4.4.1.1 Procedimiento general para la preparación de muestras

Pesar asépticamente 25 g de la muestra en un vaso estéril de licuadora o en bolsa estéril para trabajar en homogeneizador peristáltico (stomacher). Adicionar 225 ml del medio de preenriquecimiento estéril (generalmente caldo lactosado, a menos que se indique otro) y licuar si es necesario durante un min. Transferir asépticamente la mezcla homogeneizada a un recipiente estéril de boca ancha con tapón de rosca y dejar reposar por 60 min a temperatura ambiente con la tapa bien enroscada. Mezclar bien y determinar el pH aproximado con papel pH. Ajustar, si es necesario, a un pH $6,8 \pm 0,2$ con hidróxido de sodio 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 C.4.4.2.1

C.4.4.1.2 Procedimiento específico para la preparación

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

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

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

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

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

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

C.4.4.2 Aislamiento de *Salmonella*

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

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

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

Efectuar el mismo procedimiento para el caldo tetrionato.

Incubar las placas 24 ± 2 h a 35°C .

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

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

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

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

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

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

C.4.4.3 Identificación bioquímica

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

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

Incubar por 24 ± 2 h a 35°C .

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

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

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

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

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

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

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

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

C.4.4.3.6 Prueba de ureasa

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

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

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

C.4.4.4 Identificación serológica

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

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

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

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

C.4.4.4.1.4 Considerar cualquier grado de aglutinación como positiva.

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

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

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

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

C.4.4.4.2.2 Si no se cuenta con los sueros grupo-específicos, solicitar la tipificación de la cepa al Laboratorio de Enterobacterias del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia de la Secretaría de Salud o al Laboratorio Nacional de Salud Pública.

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

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

C.4.4.4.3.2 Colocar 0,5 ml del antisuero polivalente flagelar (H) preparado en un tubo para serología (13 x 100 mm aproximadamente). Adicionar 0,5 ml del cultivo formalizado. Preparar un control de solución salina mezclando 0,5 ml de solución salina formalizada con 0,5 ml del antígeno formalizado. Incubar las mezclas en baño de agua a 48- 50°C. Observar a intervalos de 15 min por espacio de 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.

C.4.4.5 Pruebas bioquímicas complementarias

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

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

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

C.4.4.5.2.1 Agar citrato Simmons

Inocular por estría el tubo

Incubar 96 ± 2 h a 35 ± 2°C

Prueba positiva: crecimiento acompañado de un cambio de color de verde a azul.

Prueba negativa: ausencia de crecimiento y sin cambio de color.

C.4.4.5.2.2 Medio SIM

Inocular por punción

Incubar 24 h a 35 ± 2°C

Movilidad

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

Prueba negativa: crecimiento a lo largo de la punción exclusivamente.

Producción de ácido sulfhídrico

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

Prueba negativa: ausencia de color negro.

Producción de indol

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

Prueba positiva: desarrollo de un anillo de color rojo.

Prueba negativa: sin cambio de color.

C.4.4.5.2.3 Caldo RM-VP

Inocular un tubo con el medio

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

C.4.4.5.2.3.1 Prueba de Voges-Proskauer (VP)

Transferir a un tubo un ml del cultivo de 48 h

Adicionar 0,6 ml de solución de alfa naftol

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

Adicionar algunos cristales de creatinina (opcional)

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

Prueba positiva: desarrollo de color rojo ladrillo

Prueba negativa: sin cambio de color

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

C.4.4.5.2.3.2 Prueba de rojo de metilo (RM)

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

Interpretar los resultados inmediatamente

Prueba positiva: desarrollo de color rojo

Prueba negativa: desarrollo de color amarillo

C.4.4.5.2.4 Caldo malonato

Inocular un tubo conteniendo el medio

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

Prueba positiva: desarrollo de color azul

Prueba negativa: sin cambio de color

C.4.4.5.2.5 Caldo manitol

Inocular un tubo conteniendo el medio

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

Prueba positiva: desarrollo de color amarillo

Prueba negativa: sin cambio de color

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

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

C.4.5 Cálculo y expresión de resultados

C.4.5.1 Interpretación de reacciones bioquímicas y serológicas.

CUADRO 1

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

C.4.5.2 Reacciones bioquímicas y serológicas de *Salmonella*

CUADRO 2

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

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

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

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

C.4.5.3 Informe de Resultados

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

C.5. METODO PARA LA DETERMINACION DE *Staphylococcus aureus* EN ALIMENTOS.

C.5.1 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.

C.5.2 Reactivos y materiales

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.

C.5.2.1 Reactivos

C.5.2.1.1 Soluciones diluyentes

C.5.2.1.1.1 Solución reguladora de fosfatos (Solución concentrada)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
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, 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.

C.5.2.1.1.2 Agua peptonada

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
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 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.

C.5.2.1.2 Medios de cultivo

C.5.2.1.2.1 Medio de Baird-Parker

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Medio base (C.6.1.2.1.1)	95,0 ml
Solución de telurito de potasio (C.6.1.2.1.2)	1,0 ml
Emulsión de yema de huevo (6.1.2.1.3)	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.

C.5.2.1.2.1.1. Medio base de Baird-Parker

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Triptona	10,0 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.

C.5.2.1.2.1.2 Solución de telurito

FORMULA

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.

C.5.2.1.2.1.3 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.

C.5.2.1.2.1.4 Solución salina isotónica

FORMULA

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

Preparación: Disolver el ingrediente en agua y esterilizar a $121^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante 15 min.

C.5.2.1.2.2 Caldo de infusión cerebro-corazón (BHI)

FORMULA

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 l

Preparación: Disolver los ingredientes en agua y calentar ligeramente si es necesario. Distribuir y esterilizar durante 15 min a $121^{\circ}\text{C} \pm 1$.

C.5.2.1.2.3 Acido desoxirribonucleico helicoidal de timo de ternera.

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Acido desoxirribonucleico helicoidal de timo de ternera o equivalente	0,03 g
Agar	1,00 g
Cloruro de calcio anhidro (Solución 0,01 M) (6.1.2.3.1)	0,10 ml
Cloruro de sodio	1,00 g
Azul de toluidina (Solución 0,1 M) (6.1.2.3.2)	0,30 ml
Tris-(hidroximetil-aminometano) (Tris solución 0,05 M, pH 9) (C.6.1.2.3.3)	100,00 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 portaobjetos 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.

C.5.2.1.2.3.1 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.

C.5.2.1.2.3.2 Solución de azul de toluidina 0,1 M

Disolver 3,05 g de azul de toluidina en 100 ml de agua.

C.5.2.1.2.3.3 Solución amortiguadora 0,05 M Tris-(hidroximetilaminometano)

(Tris pH 9) PM = 121,1

Disolver 6,055 g de Tris en 100 ml de agua.

C.5.2.1.3 Reactivo biológico:

Plasma de conejo

Emplear plasma de conejo deshidratado o rehidratado 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.

C.5.2.2 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.

Cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas y separador de huevo.

Tubos de cultivo de 16 mm x 150 mm o frascos de 125 a 250 ml de capacidad.

Tubos de cultivo de 10 mm x 75 mm.

Cajas Petri de 90 a 100 mm de diámetro.

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.

Pipetas Pasteur.

Probetas.

Varillas de vidrio de 3,5 mm de diámetro aproximadamente y 20 cm de largo dobladas en ángulo recto.

Matraz Erlenmeyer con perlas de vidrio

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.

C.5.3 Aparatos

Horno para esterilizar que alcance 180°C.

Autoclave con termómetro.

Baño de agua con regulador de temperatura de 35 ± 0,5°C.

Baño de agua con regulador de temperatura de 45 ± 0,5°C.

Balanza con capacidad no mayor de 2,500 g y sensibilidad de 0,1 g.

Incubadora a 35 ± 1°C.

C.5.4 Preparación de la muestra

La preparación de la muestra se debe realizar de acuerdo a lo establecido en el método Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

C.5.5 Procedimiento

C.5.5.1 Utilizando diferentes pipetas de 1 ml para cada dilución, depositar 0,1 ml sobre la superficie de las placas de agar Baird-Parker.

C.5.5.2 Distribuir el inóculo sobre la superficie del agar con varillas estériles de vidrio en ángulo recto, utilizando una para cada dilución.

C.5.5.3 Mantener las placas en su posición hasta que el inóculo sea absorbido por el agar.

C.5.5.4 Invertir las placas e incubar de 45 a 48 h a 35°C.

C.5.5.5 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.

C.5.5.6 Cuando las placas tengan menos de 15 colonias típicas también pueden ser utilizadas y al informe se debe agregar la nota de "valor estimado".

C.5.5.7 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.

C.5.5.8 Seleccionar las colonias de acuerdo con el siguiente cuadro para realizar las pruebas de coagulasa y termonucleasa:

NUMERO DE COLONIAS	NUMERO DE COLONIAS SOSPECHOSAS EN PLACA POR PROBAR
Menos de 50	3
51 a 100	5
101 a 150 o más	7

C.5.5.9 Seleccionar el número de colonias y sembrar cada una en tubos con 0,5 ml de caldo de infusión cerebro-corazón.

C.5.5.10 Incubar a 35°C durante 24 h.

C.5.5.11 Inocular en la misma forma cepas conocidas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* como testigos positivo y negativo.

C.5.5.12 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.

C.5.5.13 Prueba de coagulasa

C.5.5.13.1 Agregar a los 0,2 ml del cultivo anterior, 0,2 ml de plasma de conejo diluido volumen a volumen con solución salina estéril.

C.5.5.13.2 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.

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.

C.5.5.14 Prueba de termonucleasa

C.5.5.14.1 Calentar durante 15 min, 0,3 ml de cultivo en caldo de infusión cerebro-corazón en baño de agua hirviendo.

C.5.5.14.2 Pasar una gota de cada cultivo por medio de una pipeta Pasteur a un orificio del medio, incluye testigo.

C.5.5.14.3 Incubar a 35°C en cámara húmeda de 4 a 24 h.

C.5.5.14.4 La aparición de un halo color rosa extendido de por lo menos 1 mm alrededor de la perforación se califica como positiva.

C.5.6 Cálculo y expresión de resultados

C.5.6.1 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:

$$\frac{14 \times 2}{3} = 9,3 \times 10 \times 10 = 930$$

3

C.5.6.2 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 $\pm 52\%$.

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

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

C.6.1 Fundamento.

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

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

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

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

C.6.2 Equipo, materiales y reactivos.

No aplica.

C.6.3 Procedimientos.

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

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

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

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

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

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

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

Para calcular el NMP/100 g multiplicar por 100.

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

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

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

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

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

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

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.

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

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

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

$$-0,495 \ 0,265$$

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

Tabla No. 1 Selección del NMP con un límite de confianza de 95% para la prueba de fermentación utilizando 3 tubos: con porciones de 0,1, 0,01 y 0,001 g (ml) de muestra.

No. de tubos positivos			NMP/g (ml) ^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 0,001 g

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

(Continúa en la Tercera Sección)

