Fuente : Diario Oficial de la Federación **Fecha de publicación:** 3 de Diciembre de 1999

NOM-145-SSA1-1995,

NORMA OFICIAL MEXICANA, PRODUCTOS CARNICOS TROCEADOS Y CURADOS. PRODUCTOS CARNICOS CURADOS Y MADURADOS. DISPOSICIONES Y ESPECIFICACIONES SANITARIAS.

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

JOSE MELJEM MOCTEZUMA, Director General de Calidad Sanitaria de Bienes y Servicios, por acuerdo del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en los artículos 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 3o. fracciones XXII, XXIV, 13, apartado A, fracciones II, IX, X, 194 fracción I, 197, 205, 210, 212 y 393 de la Ley General de Salud; 1o. fracción VI, 4o., 15, 25, 29, 60, 70 y demás relativos del Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios; 3o. fracciones XI y XVI, 38 fracción II, 40 fracciones I, II, III y XI, 41 fracciones I, II, III, IV, VI, VII y VIII, 43, 44 y 47 fracciones I a la IV de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 28 fracciones I, II, incisos b), c), d), y V y 34 del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización y 21 fracciones I, II, IV y V del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud, y

CONSIDERANDO

Que con fecha 15 de abril de 1997, en cumplimiento de lo previsto en el artículo 46 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, la Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios presentó al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, el anteproyecto de la presente Norma Oficial Mexicana.

Que con fecha 13 de agosto de 1997, en cumplimiento del Acuerdo del Comité y lo previsto en el artículo 47 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, se publicó en el **Diario Oficial de la Federación** el proyecto de la presente Norma Oficial Mexicana, a efecto de que dentro de los siguientes sesenta días naturales posteriores a dicha publicación, los interesados presentaran sus comentarios al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario.

Que con fecha 3 de febrero de 1999, fueron publicadas en el **Diario Oficial de la Federación** las respuestas a los comentarios recibidos por el mencionado Comité, en términos del artículo 47 fracción III de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

Que en atención a las anteriores consideraciones, contando con la aprobación del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, se expide la siguiente Norma Oficial Mexicana NOM-145-SSA1-1995, Productos cárnicos troceados y curados. Productos cárnicos curados y madurados. Disposiciones y especificaciones sanitarias.

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 17 de noviembre de 1999.- El Director General de Calidad Sanitaria de Bienes y Servicios, **José Meljem Moctezuma**.- Rúbrica.

PREFACIO

En la elaboración de la presente Norma participaron las siguientes Unidades Administrativas e Instituciones:

SECRETARIA DE SALUD
Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios.
Laboratorio Nacional de Salud Pública.

SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA Y DESARROLLO RURAL
Dirección General de Ganadería.

SECRETARIA DE COMERCIO Y FOMENTO INDUSTRIAL
Dirección General de Política de Comercio Interior.

PROCURADURIA FEDERAL DEL CONSUMIDOR
Dirección General de Investigación Tecnológica.

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán.
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
Programa Universitario de Alimentos.

ASOCIACION NACIONAL DE EMPACADORAS TIPO INSPECCION FEDERAL

ASOCIACION NACIONAL DE TIENDAS DE AUTOSERVICIO Y DEPARTAMENTALES

CAMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DE TRANSFORMACION

CONSEJO NACIONAL DE EMPACADORAS DE CARNES FRIAS Y EMBUTIDOS

LABORATORIOS ICCABI, S.A. DE C.V.

INDICE

1. Objetivo y campo de aplicación
2. Referencias
3. Definiciones
4. Símbolos y abreviaturas
5. Clasificación
6. Disposiciones y especificaciones sanitarias
7. Muestreo
8. Métodos de prueba
9. Etiquetado
10. Envase y embalaje
11. Concordancia con normas internacionales
12. Bibliografía
13. Observancia de la Norma
14. Vigencia
15. Apéndices normativos
Apéndice A
Apéndice B

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta Norma Oficial Mexicana establece las disposiciones y especificaciones sanitarias que deben cumplir los productos cárnicos troceados y curados, así como los productos cárnicos curados y madurados.

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

2. Referencias

Esta Norma se complementa con lo siguiente:

NOM-051-SCFI-1994	Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados.
NOM-092-SSA1-1994	Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
NOM-114-SSA1-1994	Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos.
NOM-115-SSA1-1994	Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos.
NOM-117-SSA1-1994	Método de prueba para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, fierro, zinc y mercurio en alimentos, agua potable y agua purificada, por espectrometría de absorción atómica.
NOM-120-SSA1-1994	Prácticas de higiene y sanidad para el proceso de alimentos, bebidas no alcohólicas y alcohólicas.

NOM-122-SSA1-1994 Productos cárnicos curados y cocidos y curados emulsionados y cocidos. Especificaciones sanitarias.

3. Definiciones

Para fines de esta Norma se entiende por:

3.1 Aditivo para alimentos, aquellas substancias que se adicionan directamente a los alimentos y bebidas, durante su elaboración para proporcionar o intensificar aroma, color o sabor; para mejorar su estabilidad o para su conservación.

3.2 Ahumado, procedimiento por el que se aplica a los alimentos humo o sus derivados para conferir sabor a éstos y reforzar su color, pudiendo mejorar su capacidad de conservación.

3.3 Buenas prácticas de fabricación, conjunto de normas y actividades relacionadas entre sí, destinadas a garantizar que los productos tengan y mantengan las especificaciones requeridas para su uso.

3.4 Centro térmico, área de temperatura en torno al centro geométrico de la pieza donde se unen los ejes longitudinal y transversal.

3.5 Cocción, proceso por medio del cual se someten los productos a la acción del calor húmedo o seco hasta que alcancen en su centro térmico una temperatura de 68°C.

3.6 Curación, procedimiento por medio del cual se agregan por vía seca o vía húmeda sales como cloruro de sodio, nitritos, nitratos y otros aditivos alimentarios autorizados por la Secretaría, con el propósito de conservar la calidad sanitaria de los productos objeto de esta Norma.

3.7 Envase, todo recipiente destinado a contener un producto y que entra en contacto con el mismo, conservando su integridad física, química y sanitaria.

3.8 Etiqueta, todo rótulo, marbete, inscripción, imagen u otra forma descriptiva o gráfica, ya sea que esté impreso, marcado, grabado, en relieve, hueco, estarcido o adherido al empaque o envase del producto.

3.9 Inocuo, aquello que no hace o causa daño a la salud.

3.10 Límite máximo, cantidad establecida de aditivos, microorganismos, parásitos, materia extraña, plaguicidas, biotoxinas, residuos de medicamentos, metales pesados y metaloides que no se debe exceder en un alimento, bebida o materia prima.

3.11 Lote, la cantidad de un producto elaborado en un mismo lapso para garantizar su homogeneidad.

3.12 Maduración, procedimiento por el cual se desarrollan en el producto aromas específicos deseados por la presencia de microorganismos acidolácticos adicionados o no, con formación de los colores del curado, disminución del pH, de una consistencia firme y compacta al corte.

3.13 Materia extraña, toda aquella substancia, resto o desecho orgánico o no, que se presenta en el producto sea por contaminación o por manejo poco higiénico del mismo durante su elaboración, considerándose entre otros: excretas y pelos de cualquier especie, fragmentos de hueso e insectos, que resultan perjudiciales para la salud.

3.14 Metal pesado y metaloide, aquellos elementos químicos que causan efectos indeseables en el metabolismo aun en concentraciones bajas. Su toxicidad depende de las dosis en que se ingieran, así como de su acumulación en el organismo

3.15 Método de prueba, procedimiento analítico utilizado en el laboratorio para comprobar que un producto satisface las especificaciones que establece la Norma.

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

3.17 Proceso, 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 los productos.

3.18 Productos cárnicos curados y madurados, aquellos elaborados con cortes definidos de las especies animales consideradas aptas para consumo humano, sometidos a curación, parcialmente deshidratados, ahumados o no, madurados por cierto tiempo -por medio de cultivos microbianos o de la adición de azúcares- de manera que se asegure

su calidad sanitaria. Los productos correspondientes a este grupo son: salami, jamón serrano, jamón tipo Westfalia, salchichón, lomo embuchado, entre otros.

3.19 Productos cárnicos troceados y curados, aquellos cuya carne curada, fue troceada o picada hasta lograr trozos no menores de 2 mm, pudiendo ser crudos, madurados -por medio de cultivos microbianos o de la adición de azúcares- cocidos o no y ahumados o no. Los productos correspondientes a este grupo son: chorizo, longaniza, queso de puerco, salami cocido, chistorra, entre otros.

3.20 Punto de venta, lugar donde se reciben, conservan, almacenan, exhiben, manipulan y expenden los productos objeto de esta Norma.

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

3.22 Sanitización, conjunto de procedimientos que tienen por objeto la reducción de microorganismos.

4. Símbolos y abreviaturas

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

K	grado Kelvin
ºC	grado Celsius
kg	kilogramo
g	gramo(s)
mg	miligramo
cm	centímetro
mm	milímetro
NMP	número más probable
UFC	unidades formadoras de colonias
pH	potencial de Hidrógeno
P_2O_5	pentóxido de fósforo
BPF	buenas prácticas de fabricación
BHA	butil hidroxianisol
BHT	butil hidroxitolueno
TBHQ	terbutilhidroquinona
###	menor o igual que
/	por
%	por ciento

Cuando en la presente Norma se mencione al Reglamento, debe entenderse que se trata del Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios.

5. Clasificación

Los productos objeto de esta Norma por su proceso se clasifican en:

5.1 Productos cárnicos curados y madurados

5.2 Productos cárnicos troceados y curados

5.2.1 Productos cárnicos troceados y curados, cocidos

5.2.2 Productos cárnicos troceados y curados, crudos

5.2.3 Productos cárnicos troceados y curados, madurados

6. Disposiciones y especificaciones sanitarias

6.1 Disposiciones sanitarias

En el punto de venta de los productos objeto de esta Norma, se debe cumplir con las disposiciones sanitarias establecidas en el Apéndice Normativo A.

6.2 Especificaciones sanitarias

Los productos objeto de este ordenamiento, deben cumplir con las siguientes especificaciones:

6.2.1 Microbiológicas

6.2.1.1 En planta:

	Productos Cárnicos			
	curados	troceados y curados		
ESPECIFICACIONES:	madurados	cocidos	crudos	madurados
(Límite máximo)				
Mesofílicos aerobios UFC/g	---	100,000	---	---
Coliformes fecales NMP/g	### 3	### 3	---	### 3
Salmonella spp en 25 g muestra	ausente	ausente	ausente	ausente
Staphylococcus aureus UFC/g	### 100	### 100	### 100	### 100

6.2.1.2 En punto de venta:

	Productos Cárnicos			
	curados	troceados y curados		
ESPECIFICACIONES:	madurados	cocidos	crudos	madurados
(Límite máximo)				
Mesofílicos aerobios UFC/g	---	600,000	---	---
Coliformes fecales NMP/g	### 3	### 3	---	### 3
Salmonella spp en 25 g muestra	ausente	ausente	ausente	ausente
Staphylococcus aureus UFC/g	### 1000	### 1000	### 1000	### 1000

6.2.2 Contaminación por metales pesados

ESPECIFICACIONES:	Productos Cárnicos			
(Límite máximo)	curados	troceados y curados		
	madurados	cocidos	crudos	madurados
Plomo(Pb) mg/kg	1,0	1,0	1,0	1,0

6.2.3 Materia extraña

Los productos objeto de esta Norma deben estar exentos de materia extraña.

6.2.4 Aditivos para alimentos

Unicamente se permiten los aditivos para alimentos señalados a continuación:

6.2.4.1 Acelerador del color

	Productos Cárnicos			
	curados	troceados y curados		
ADITIVO:	madurados	cocidos	crudos	madurados
(Límite máximo)	BPF	BPF	BPF	BPF
Glucono-delta-lactona (mg/kg)				

6.2.4.2 Acentuadores de sabor:

	Productos Cárnicos			
	curados	troceados y curados		
ADITIVO:	madurados	cocidos	crudos	madurados
(Límite máximo)				
Glutamato monosódico (mg/kg)	BPF	BPF	BPF	BPF
Guanilato disódico (mg/kg):	---	BPF	BPF	BPF

Inosinato disódico (mg/kg):	---	BPF	BPF	BPF
Humo proveniente de maderas no resinosas ni tratadas	BPF	BPF	BPF	BPF
Sabor humo	BPF	BPF	BPF	BPF

6.2.4.3 Agentes de curación:

	Productos Cárnicos			
	curados		troceados y curados	
ADITIVO:	madurados	cocidos	crudos	madurados
(Límite máximo)				
Nitratos o nitritos de sodio o potasio (mg/kg):	156	156	156	156

Nota: Expresados como nitritos.

6.2.4.4 Antioxidantes

	Productos Cárnicos			
	curados		troceados y curados	
ADITIVO:	madurados	cocidos	crudos	madurados
(Límite máximo)				
Acido ascórbico y sus sales de sodio, potasio o calcio (mg/kg)	500	500	----	500
Acido eritórbico y sus sales de sodio (mg/kg)	----	500	----	500
Alfa tocoferol (mg/kg)	----	160	----	160
BHA (mg/kg)	----	100 (*)	----	100 (*)
BHT (mg/kg)	----	100 (*)	----	100 (*)
TBHQ(mg/kg)	----	100 (*)	----	100 (*)

(*) Niveles en relación con el contenido de grasa.

6.2.4.5 Colorantes

	Productos Cárnicos			
	curados		troceados y curados	
ADITIVO:	madurados	cocidos	crudos	madurados
(Límite máximo)				
Colorantes naturales	----	BPF	BPF	BPF

6.2.4.6 Conservadores

	Productos Cárnicos			
	curados		troceados y curados	
ADITIVO:	madurados	cocidos	crudos	madurados
(Límite máximo)				
Acido sórbico y sus sales de sodio y potasio (mg/kg)	----	----	1000	1000(*)
Propil parabeno (mg/kg)	----	1000	1000	1000
Propionato de sodio (mg/kg)	----	1000	1000	1000

(*) Unicamente para la cubierta.

En el caso de los productos cárnicos troceados y curados, la suma total de los conservadores no podrá ser mayor a 1000 mg/kg.

6.2.4.7 Estabilizantes o retenedores de humedad

	Productos Cárnicos			
	curados		troceados y curados	
ADITIVO:	madurados	cocidos	crudos	madurados
(Límite máximo)				
Fosfatos mono y disódico (mg/kg)	----	5000	----	----
Hexametafosfato de sodio (mg/kg)	----	5000	----	----
Pirofosfato de sodio (mg/kg)	----	5000	----	----

Pirofosfato ácido de sodio (mg/kg)	----	5000	----	----
Pirofosfato tetrasódico	----	5000	----	----
Meta y polifosfato de sodio (mg/kg)	----	5000	----	----
Polifosfato de potasio (mg/kg)	----	5000	----	----
Tripolifosfato de sodio (mg/kg)	----	5000	----	----
Gomas vegetales:				
Acido algínico y sus sales de sodio y potasio (mg/kg)	----	4000	4000	4000
Agar-agar	----	BPF	BPF	BPF
Alginato de propilenglicol (mg/kg)	----	4000	4000	4000
Carragenina	----	BPF	BPF	BPF
Goma karaya	----	BPF	BPF	BPF
Goma guar	----	BPF	BPF	BPF

Nota: Fosfatos totales expresados como P_2O_5

6.2.4.8 Reguladores del pH:

	Productos Cárnicos			
	curados	troceados y curados		
ADITIVO:	madurados	cocidos	crudos	madurados
(Límite máximo)				
Acido acético (mg/kg)	----	BPF	BPF	BPF
Acido cítrico (mg/kg)	BPF	BPF	BPF	BPF
Acido láctico y sus sales de calcio y potasio (mg/kg)	BPF	BPF	BPF	BPF
Acido fosfórico (mg/kg)	----	5000	5000	5000
Acido tartárico y sus sales de sodio y potasio (mg/kg)	2400	2400	2400	2400
Acido fumárico (mg/kg)	----	BPF	----	BPF

7. Muestreo

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

8. Métodos de prueba

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

Para la determinación de nitritos y nitratos se aplicará el método señalado en el apéndice normativo B de la Norma Oficial Mexicana NOM-122-SSA1-1994, "Productos cárnicos curados y cocidos y curados emulsionados y cocidos. Especificaciones sanitarias".

Para la determinación de los coliformes fecales se aplicará el método de prueba señalado en el apéndice normativo B de este ordenamiento.

9. Etiquetado

La etiqueta de los productos objeto de esta Norma, además de cumplir con lo establecido en el Reglamento y la Norma Oficial Mexicana correspondiente, debe sujetarse a lo siguiente:

La etiqueta de los productos cárnicos troceados y curados además de lo anterior debe señalar lo siguiente:

Fecha de caducidad, señalando mes, día y año.

Identificación del lote.

Los productos cárnicos troceados y curados crudos deben incluir también la leyenda: "Este producto no debe consumirse crudo" o "Este producto debe consumirse cocinado".

10. Envase y embalaje

10.1 Envase

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

10.2 Embalaje

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

11. Concordancia con normas internacionales.

Esta Norma no tiene concordancia con normas internacionales.

12. Bibliografía

12.1 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1992. Ley Federal sobre Metrología y Normalización. **Diario Oficial de la Federación**. México, D.F.

12.2 Secretaría de Salud. 1984. Ley General de Salud. **Diario Oficial de la Federación**. México, D.F.

12.3 Secretaría de Salud, 1988. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. **Diario Oficial de la Federación**. México, D.F.

12.4 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1994. NOM-008-SCFI-1994. Sistema general de unidades de medida. México, D.F.

12.5 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1994. NORMA Z-013; Guía para la redacción, estructuración y presentación de las Normas Oficiales Mexicanas. México, D.F.

12.6 Ministerio de Salud, Perú, 1986. "Reglamento Sanitario de Alimentos. Cap. II Alimentos de origen animal. De la carne y productos animales. Lima, Perú. p. 58-65.

12.7 Ministerio de Sanidad y Consumo. 1985. "El Código alimentario español". Vol. II Cap. X. Carnes y derivados. Artes Gráficas Reyes, S.A. Madrid, España.

12.8 Anónimo. 1977. "Estudio sobre el jamón típico de Parma. Influencia de la fase de salazón sobre la evolución de los parámetros físico-químicos y de la población bacteriana". Industria Conservera. Enero-Marzo p. 16-25.

12.9 Barradas, S.H. et al. 1989: "Control físico-químico de productos cárnicos". Laboratorio Nacional de Salud Pública, México, D.F. p. 9-10.

12.10 Carrascosa, V.A./Cornejo, I. 1989: "Aspectos fisicoquímicos del curado de jamón serrano y su influencia sobre el desarrollo microbiano". Alimentaria 89/27 p. 27-32.

12.11 Dirección General de Epidemiología. 1991. "Revisión de brotes de ETA notificados durante el período 1981-1990". Secretaría de Salud, México, D.F.

12.12 Fernández, E.E. 1981. "Microbiología Sanitaria. Agua y Alimentos. Ed. EDUG. Universidad de Guadalajara. Vol. I. p. 307-313, 316-325.

12.13 ICSMF.1980. "Ecología microbiana de los alimentos". Ed. Acribia, Zaragoza, España. p. 382-392.

12.14 Lewis, R. 1990. "Food additives handbook". Van Nostrand Reinhold, New York, USA. p. 68, 150, 231, 286, 287, 400, 401.

12.15 Llorente, B.A./J. López. 1994. "Fundamentación técnico-sanitaria para las especificaciones sanitarias de los productos troceados crudos desde un enfoque del A.R.I.C.P.C". Programa Universitario de Alimentos. UNAM, México, D.F.

12.16 Molins, R. 1993. "Microbiología cárnica" en: "Lácteos y Cárnicos Mexicanos" 8 (4). p. 7-11.

12.17 Organización Panamericana de la Salud, 1993. Guía técnica para el estudio. "Evaluación microbiológica de los alimentos vendidos en la vía pública en algunas ciudades de América Latina y el Caribe".

12.18 Price, J.F./B.S. Schweigert. 1978. "The science of meat and meat products". Food & Nutrition Press, Inc. pp. 265- 275.

12.19 Speck, M.L. 1992. "Compendium of methods for the microbiological examination of foods". APHA. USA. p. 830-833.

12.20 Zarco, G.E. 1993. "Manual de aplicación del análisis de riesgos, identificación y control de puntos críticos". Secretaría de Salud, México, D.F. p. 8, 9, 18-21, 38-43.

13. Observancia de la Norma

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

14. Vigencia

La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor a los 2 meses siguientes de su publicación en el **Diario Oficial de la Federación**.

Atentamente

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 17 de noviembre de 1999.- El Director General, **José Meljem Moctezuma**.- Rúbrica.

Apéndice Normativo
A

A. De las Disposiciones Sanitarias.

1. Para el punto de venta:

1.1 Para el punto de venta además de cumplir con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-120-SSA1-1994. Prácticas de higiene y sanidad para el proceso de alimentos, bebidas no alcohólicas y alcohólicas, debe sujetarse a las siguientes disposiciones:

1.2 En todas las áreas donde se manipulen los productos objeto de esta Norma deben adoptarse las medidas conducentes a fin de evitar la presencia de fauna nociva, debiendo cumplir además con las siguientes disposiciones específicas:

Area de almacén:

1.3 Las áreas destinadas al almacenamiento de los productos objeto de esta Norma, deben contar con una separación física de otros productos alimenticios a fin de evitar la contaminación cruzada.

1.4 No deben permanecer en esta área productos abiertos o con la envoltura rota.

1.5 La estiba en cualquier área, debe ser realizada de manera que se evite el rompimiento y exudación de empaques y envolturas.

1.6 El almacenamiento de los productos cocidos debe realizarse inmediatamente después de haberse recibido los mismos, con el objeto de mantener la temperatura de 7°C como máximo.

1.7 Las unidades de refrigeración, deben contar con termómetros en lugar visible y con graficadores que permitan verificar el mantenimiento y continuidad de la temperatura entre 2 y 7°C como máximo, registrándose en una bitácora el cumplimiento de esta disposición.

Personal:

1.8 Portar uniforme de color claro que no muestre signos de suciedad.

1.9 Estar aseado, con el pelo recogido y uñas recortadas y sin ornamentos en antebrazos y manos, usar turbante, cofia o cuartelera de color claro.

1.10 No debe manejar dinero.

1.11 Usar guantes desechables de plástico transparentes, mismos que deben ser cambiados cuantas veces sea necesario, especialmente antes de rebanar diferentes tipos de productos.

Area de venta:

1.12 La estiba en cualquier área, debe realizarse evitando el rompimiento y exudación de empaques y envolturas.

1.13 Debe mantenerse una rotación adecuada de los productos a través del sistema primeras entradas-primeras salidas.

1.14 La cantidad del producto a exhibirse, debe permitir una ventilación adecuada.

1.15 Los productos que se encuentren en esta área, no deben entrar en contacto con techos y paredes.

1.16 Los productos objeto de esta Norma, no deben entrar en contacto directo con mesas o básculas.

1.17 Los productos que se expenden al público a granel, deben ser rebanados únicamente en presencia del consumidor.

1.18 Las unidades de corte, deben limpiarse al inicio de la labor y sanitizarse por lo menos cada 4 horas de trabajo, en especial cuando en la misma unidad se realice el rebanado de productos distintos a los objeto de esta Norma, no

deben usarse franelas o telas semejantes para ejecutar la limpieza. Se debe mantener una bitácora que evidencie el cumplimiento de esta disposición.

1.19 Los productos cárnicos troceados, curados y cocidos deben mantenerse en refrigeración, en el caso de los productos curados y madurados y de los troceados curados madurados y crudos, pueden exhibirse a temperatura ambiente.

1.20 Las unidades de refrigeración deben tener termómetros en lugar visible y bitácora a fin de verificar el mantenimiento de la temperatura en esta área, que debe estar entre 2 y 7°C en forma constante.

1.21 Debe existir un área específica para el manejo y depósito de desechos sólidos.

Apéndice Normativo
B

B. De la estimación de la densidad microbiana por la técnica del número más probable.

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.).

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.

Equipo, materiales y reactivos.

No aplica.

Procedimientos.

B.1 Uso de tablas de NMP con 95% de límite de confianza.

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

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

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

Con frecuencia es necesario el NMP desde el inicio con volúmenes diferentes de los enlistados en las tablas 1-5. Si el volumen de muestra es mayor que 0,01 g multiplicar el NMP enlistado en la tabla por 10. El resultado de una determinación de 5 tubos que dé 3 tubos positivos en 0,01 g; 2 tubos positivos en 0,001 g y 1 tubo positivo en 0,0001 g (3-2-1) leer en la tabla No. 2 como 17 y multiplicar por 10 para así obtener 170 como el NMP actual por gramo de

muestra. De igual forma si la cantidad más grande utilizada para la tabla de referencia es 1 g en lugar de 0,1 g, dividir el NMP derivado de la tabla entre 10. Por ejemplo el resultado de la determinación del NMP en 3 tubos para *Salmonella spp* que dé 3 tubos positivos en 1 g; 1 tubo positivo en 0,1 g y ningún positivo en 0,01 g (3-1-0) leer en la tabla No. 1 como 43 y dividir entre 10, lo que da 4,3 como el NMP presuntivo por gramo de muestra.

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

(NMP/g de la tabla - 100) X factor de dilución del tubo de enmedio = NMP/g

Para calcular el NMP/100 g multiplicar por 100.

B.2 Cálculo aproximado del NMP y 95% de límite de confianza.

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

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

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 = ###(8x0) + (4x1) + (2x3) + (1x5) + (0,5x4) + (0,25x5)### = 18,25; y T = 5 (8+4+2+1+0,5+0,25) = 78,75

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

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

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

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 $1{,}14(n)^{½}$ 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:

$$n_H = k / \text{###}(1/ n_i)$$

k es el número de diluciones. Por ejemplo: Suponiendo que el resultado de 3 diluciones en n_i fuera 5-4-4. Por lo tanto n_H = 3/ ###(1/5) + (1/4) + (1/4)### ^{½} = 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)### ½

-0,495 ### 0,265

entonces el límite inferior es el antilogaritmo (-0-76) = 0.17/g o 17/100 g y el límite inferior 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				95% de límite de confianza	
0,1	0,01	0,001	NMP/g (ml)[b]	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				95% de límite de confianza	
0,1	0,01	0,001	NMP/g (ml)[b]	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				95% de límite de confianza	
0,1	0,01	0,001	NMP/g (ml)[b]	Inferior	Superior
0	0	0	###1	-	-
0	0	1	1+	###1	5
0	1	0	1	###1	5
0	2	0	2+	###1	7
1	0	0	1	###1	5
1	0	1	2+	###1	7
1	1	0	2	###1	7
1	2	0	3+	1	8
2	0	0	2	###1	7
2	0	1	3+	1	9
2	1	0	3	1	9
2	1	1	4+	1	10
2	2	0	4	2	10
2	3	0	5+	2	12
3	0	0	3	1	9
3	0	1	4	2	11
3	1	0	4	2	11
3	1	1	5+	2	13
3	2	0	5	2	13
3	2	1	6+	3	14
3	3	0	6+	3	14
4	0	0	4	2	12
4	0	1	6	2	13
4	1	0	6	2	14
4	1	1	7	3	15
4	2	0	7	3	15
4	2	1	8	4	17
4	3	0	8	4	17
4	4	0	9+	5	19
5	0	0	6	2	15
5	0	1	7	3	16
5	1	0	7	3	17
5	1	1	9	4	18
5	2	0	9	4	18
5	2	1	10+	5	20
5	3	0	10	5	20
5	3	1	11+	6	22
5	4	0	11+	6	22
6	0	0	8	3	18
6	0	1	9	4	20
6	1	0	9	4	20
6	1	1	11	5	22
6	2	0	11	5	22
6	2	1	12	6	24
6	3	0	12	6	25
6	3	1	14+	7	27
6	4	0	14+	7	27
6	5	0	15+	8	29
7	0	0	10	5	22
7	0	1	12	6	24
7	0	2	13+	7	27

7	1	0	12	6	25
7	1	1	13	7	27
7	1	2	15+	8	30
7	2	0	13	7	27
7	2	1	15	8	30
7	2	2	17+	9	32
7	3	0	15	8	30
7	3	1	17	9	33
7	4	0	17	9	33
7	4	1	19+	10	36
7	5	0	19+	10	36
8	0	0	13	6	28
8	0	1	15	7	31
8	0	2	17+	8	34
8	1	0	15	7	31
8	1	1	17	9	34
8	1	2	19+	10	37
8	2	0	17	9	35
8	2	1	19	10	38
8	2	2	21+	12	42
8	3	0	19	10	39
8	3	1	21	12	42
8	3	2	24+	13	46
8	4	0	22	12	43
8	4	1	24	13	46
8	5	0	24	13	47
8	5	1	27+	15	51
8	6	0	27+	15	52
9	0	0	17	8	37
9	0	1	19	10	41
9	0	2	22+	11	46
9	1	0	19	10	42
9	1	1	22	11	47
9	1	2	25+	13	52
9	2	0	22	12	47
9	2	1	25	13	53
9	2	2	28+	15	58
9	3	0	25	13	54
9	3	1	29	15	60
9	3	2	32+	18	66
9	4	0	29	16	61
9	4	1	33	18	67
9	4	2	37+	20	74
9	5	0	33	18	69
9	5	1	37	20	76
9	5	2	42+	23	83
9	6	0	38	21	77
9	6	1	43+	24	85
9	7	0	44+	24	87
10	0	0	23	12	58
10	0	1	27	14	67
10	0	2	31+	16	77
10	1	0	27	14	69
10	1	1	32	17	79

10	1	2	38	20	92
10	2	0	33	17	83
10	2	1	39	20	96
10	2	2	50	20	110
10	2	3	50+	30	120
10	3	0	40	20	100
10	3	1	50	20	120
10	3	2	60+	30	130
10	3	3	70+	30	150
10	4	0	50	30	120
10	4	1	60	30	140
10	4	2	70	30	160
10	4	3	80+	40	170
10	5	0	60	30	150
10	5	1	70	40	170
10	5	2	90	40	190
10	5	3	100	50	210
10	6	0	80	40	180
10	6	1	90	50	200
10	6	2	110	50	230
10	6	3	120	60	250
10	6	4	140+	70	270
10	7	0	100	50	220
10	7	1	120	60	250
10	7	2	140	70	280
10	7	3	150	80	310
10	7	4	170+	90	340
10	8	0	130	60	280
10	8	1	150	80	320
10	8	2	170	90	360
10	8	3	200	100	400
10	8	4	220	120	440
10	8	5	250+	140	480
10	9	0	170	90	380
10	9	1	200	100	430
10	9	2	230	120	490
10	9	3	260	140	560
10	9	4	300	160	640
10	9	5	350	180	720
10	9	6	400+	210	820
10	10	0	240	120	610
10	10	1	290	150	750
10	10	2	350	170	910
10	10	3	400	200	1100
10	10	4	500	300	1400
10	10	5	700	300	1700
10	10	6	900	400	2100
10	10	7	1120	600	2700
10	10	8	1160	800	3700
10	10	9	2300	1100	6000
10	10	10	###2300	-	-

[a] Los resultados normales, obtenidos en un 95% de las pruebas, no están seguidos por un símbolo más (+). Menos del 4% de los resultados de las pruebas obtenidos están marcados por un símbolo más(+). Combinaciones de tubos positivos no encontrados en esta tabla se presentan en menos del 1% de las pruebas y si se presentaran con mayor

frecuencia indican un error de técnica o que el valor del número más probable se encuentra en el límite. El NMP de combinaciones que no aparecen en la tabla, se pueden obtener por extrapolación a la combinación cercana más elevada.

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

Tabla No. 4 Número más probable (NMP) para 1g de muestra cuando se usan 3 tubos con porciones de 0,1, 0,01 y 0,001g.

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

Tabla No. 5 Número más probable (NMP) para 100 ml de muestra cuando se usan 5 porciones en cada una de 3 diluciones con series geométricas.

No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos			
10	1	0,1		10	1	0,1		10	1	0,1		10	1	0,1		10	1	0,1		10	1	0,1	
ml	ml	ml	NMP	ml	ml	ml	NMP	ml	ml	ml	NMP	ml	ml	ml	NMP	ml	ml	ml	NMP	ml	ml	ml	NMP
0	0	0		1	0	0	2	2	0	0	4,5	3	0	0	7,8	4	0	0	13	5	0	0	23
0	0	1	1,8	1	0	1	4	2	0	1	6,8	3	0	1	11	4	0	1	17	5	0	1	31
0	0	2	3,6	1	0	2	6	2	0	2	9,1	3	0	2	13	4	0	2	21	5	0	2	43
0	0	3	5,4	1	0	3	8	2	0	3	12	3	0	3	16	4	0	3	25	5	0	3	58
0	0	4	7,2	1	0	4	10	2	0	4	14	3	0	4	20	4	0	4	30	5	0	4	76
0	0	5	9,0	1	0	5	12	2	0	5	16	3	0	5	23	4	0	5	36	5	0	5	95
0	1	0	1,8	1	1	0	4	2	1	0	6,8	3	1	0	11	4	1	0	17	5	1	0	33
0	1	1	3,6	1	1	1	6,1	2	1	1	9,2	3	1	1	14	4	1	1	21	5	1	1	46
0	1	2	5,5	1	1	2	8,1	2	1	2	12	3	1	2	17	4	1	2	26	5	1	2	64
0	1	3	7,3	1	1	3	10	2	1	3	14	3	1	3	20	4	1	3	31	5	1	3	84
0	1	4	9,1	1	1	4	12	2	1	4	17	3	1	4	23	4	1	4	35	5	1	4	110
0	1	5	11	1	1	5	14	2	1	5	19	3	1	5	27	4	1	5	42	5	1	5	130
0	2	0	3,7	1	2	0	6,1	2	2	0	9,3	3	2	0	14	4	2	0	22	5	2	0	49
0	2	1	5,5	1	2	1	8,2	2	2	1	12	3	2	1	17	4	2	1	26	5	2	1	70
0	2	2	7,4	1	2	2	10	2	2	2	14	3	2	2	20	4	2	2	32	5	2	2	95
0	2	3	9,2	1	2	3	12	2	2	3	17	3	2	3	24	4	2	3	38	5	2	3	120
0	2	4	11	1	2	4	15	2	2	4	19	3	2	4	27	4	2	4	44	5	2	4	150
0	2	5	13	1	2	5	17	2	2	5	22	3	2	5	31	4	2	5	50	5	2	5	180
0	3	0	5,6	1	3	0	8,3	2	3	0	12	3	3	0	17	4	3	0	27	5	3	0	79

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

Tabla No. 6 Ejemplos para determinar el NMP estimado en series de tres tubos con 1g (ml) de muestra por tubo.

	Cantidad de muestra (g o ml)[a]					Valores positivos	NMP estimado/g o ml[b]
Ejemplo	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,00001	reportados	
A	3/3	3/3	2/3	0/3	0/3	3-2-0	930
B	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3	3-2-0	9300
C	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0-1-0	30
D	3/3	3/3	2/3	1/3	1/3	3-2-2	2100
E	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3-3-3	###110000

[a] Numerador/denominador = número de tubos positivos/número de tubos inoculados.

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

Tabla No. 7 Ejemplos para determinar el NMP estimado en series de 5 tubos con 1 g (ml) de muestra por tubo.

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

[a] Numerador/denominador = número de tubos positivos/número de tubos inoculados.

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

B.2 Determinación de bacterias coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli* por la técnica de diluciones en tubo múltiple.

1. Fundamento

Este método se basa en la propiedad de los microorganismos coliformes para producir gas a partir de glucosa y fermentación de lactosa dentro de las 48 horas de incubación a 35 ### 0,5°C (coliformes) y 44,5 ### 0,2°C (coliformes fecales y *E. coli*).

2. Equipo y materiales

Además de los mencionados en la NOM-110-SSA. Preparación y dilución de muestras de alimentos para análisis microbiológico, lo siguiente:

- Baño de agua con agitación continua cubierto y con termostato que evite variaciones mayores a 0,1°C.
- Termómetro calibrado y verificado 1/10
- Tubos de cultivo de 20x200 y de 16x160 mm con tapón de rosca
- Campanas de fermentación (tubos de Durham)
- Gradillas
- Asas bacteriológicas de 3 mm de diámetro
- Lámpara de luz ultravioleta de longitud amplia 4 watts.
- Lentes protectores.

Medios de cultivo

Caldo lauril

Ingredientes:

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

pH final: 6,8 ### 0,2 a 25°C.

Preparación:

1. Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada.
2. Ajustar el pH.
3. Distribuir en tubos de ensaye con campanas de Durham.
4. Adicionar 10 ml de medio para cada tubo.
5. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121###C.
6. Antes de abrir el autoclave, dejar bajar la temperatura a 75###C para que no queden burbujas en las campanas de Durham.

Preparación de caldo lauril triptosa

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

Caldo EC (*E. coli*.)

Ingredientes:

Bacto triptosa	20,0 g

Bacto lactosa	5,0 g
Bacto sales biliares No. 3	1,5 g
Fosfato dipotásico	4,0 g
Fosfato monopotásico	1,5 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Agua destilada	1000,0 ml

pH final: 6,9 ### 0,2 a 25°C.

Preparación:

1. Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada y calentar ligeramente para que se disuelva por completo.

2. Ajustar el pH.

3. Distribuir en tubos de ensaye con campanas de Durham.

4. Adicionar 10 ml de medio para cada tubo.

5. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

6. Antes de abrir el autoclave, dejar bajar la temperatura a 75°C para evitar que queden burbujas en las campanas de Durham.

Agar McConkey

Ingredientes:

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

pH final: 7,1 ### 0,2 a 25°C

Preparación:

1. Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada.

2. Calentar hasta ebullición para disolver por completo.

3. Ajustar el pH.

4. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

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

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

Ingredientes:

Peptona	10,0 g
Lactosa	10,0 g
K_2HPO_4	2,0 g
Eosina Y	0,4 g
Azul de metileno	0,065 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: 7,1 ### 0,2

1. Disolver la peptona, el fosfato y el agar en un litro de agua.

2. Calentar hasta ebullición para la disolución completa.

3. Distribuir en porciones de 100 o 200 ml y esterilizar a no más de 121°C por 15 minutos.

4. Fundir antes de su uso y adicionar a cada porción de 100 ml:

a) 5 ml de solución de lactosa al 20%

b) 2 ml de solución acuosa de eosina al 2%

c) 4,3 ml de solución acuosa de azul de metileno al 0,15%.

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

Caldo triptona al 1% (triptofano)

Ingredientes:

Triptona o tripticasa	10 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: 6,9 ### 0,2

1. Disolver los ingredientes

2. Distribuir en porciones de 5 ml en tubos de ensaye de 16 x 125 o 16 x 150 mm.

3. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Caldo MR-VP

Medio 1

Ingredientes:

Peptona tamponada	7 g
Glucosa	5 g
K_2HPO_4	5 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: 6,9 ### 0,2

1. Disolver los ingredientes con calentamiento suave si es necesario.

2. Distribuir en volúmenes de 10 ml en tubos de ensaye de 16x150 mm.

3. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Caldo citrato de Koser

Ingredientes:

$NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$	1,5 g
KH_2PO_4 (monobásico)	1,0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
Citrato de sodio $\cdot 2H_2O$	3,0 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: 6,7 ### 0,2.

1. Distribuir preferentemente en tubos de ensaye con tapa de rosca.

2. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Esta formulación se recomienda en los Métodos de Análisis Oficial de AOAC y en los Métodos Estándares para el Análisis de Agua y Aguas de Desecho (APHA). Este difiere de la composición del medio deshidratado disponible comercialmente y es recomendable su uso.

Reactivos

Reactivo de Kovacs

Ingredientes:

p-imetilaminobenzaldehído	5 g
Alcohol amílico (normal)	75 ml
HCl concentrado	25 ml

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

Para la prueba de indol

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

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

Reactivo de Voges-Proskauer (VP)

Solución 1

Ingredientes:

alfa-naftol	5 g
Alcohol absoluto	100 g

Solución 2

Ingredientes:

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

Prueba de Voges-Proskauer (VP).

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

El desarrollo de una coloración rosa es una prueba positiva.

Reactivos para la coloración de Gram

Cristal violeta

Solución A

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

Solución B

Ingredientes:

Oxalato de amonio	0,8 g
Agua destilada	80 ml

Indicador rojo de metilo (R44)

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

lodo de Gram

Ingredientes:

lodo	1g
Ioduro de potasio (Kl)	2 g
Agua destilada	300 ml

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

Colorante de contraste (solución concentrada)

Ingredientes:

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

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

Procedimiento para la tinción de Gram

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

Medio EC-MUG

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

3. Procedimiento

3.1 Agua y hielo

3.1.1 Prueba presuntiva

3.1.1.1 Agitar la muestra y transferir volúmenes de 10 ml a cada uno de 5 tubos con 20 ml de caldo lauril sulfato triptosa de doble concentración, 5 tubos con 1 ml y 5 tubos con 0,1 ml de caldo lauril sulfato triptosa de concentración sencilla o las siguientes porciones: 10 tubos con 10 ml de muestra; 5 tubos con 20 ml de muestra o una porción de 100 ml, consultar la tabla del inciso 2 en la preparación del “caldo lauril triptosa” para la

concentración de caldo lauril triptosa requerido. Los tubos deben contener una campana de fermentación (Durham).

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

3.1.2 Prueba confirmativa

3.1.2.1 De cada tubo que muestre formación de gas, tomar una asada y sembrar en un número igual de tubos con medio de confirmación, para la determinación de bacterias coliformes referirse a la NOM-112-SSA1-1994. Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del Número más probable, para la determinación de bacterias coliformes fecales, sembrar en caldo EC. Inocular a dos tubos con caldo EC una cepa de *E. coli* como control positivo y una de *Enterobacter aerogenes* como control negativo e incubar con las muestras.

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

3.1.3 Prueba confirmativa para *Escherichia coli* (por identificación bioquímica)

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

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

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

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

3.1.3.5 Hacer un frotis y teñirlo por Gram. Observar al microscopio la presencia de bacilos cortos o cocobacilos Gram-negativos.

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

a. Producción de indol

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

b. Voges-Proskauer (VP)

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

c. Rojo de metilo

Inocular un tubo adicional con caldo MR-VP e incubar a 35°C por 48 ### 2 horas. Adicionar 5 gotas de solución de rojo de metilo. Se considera una prueba positiva cuando se desarrolla un color rojo. Un color amarillo es una prueba negativa.

d. Citrato

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

e. Interpretación de resultados

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

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

3.1.4 Prueba confirmativa para *Escherichia coli* (por el método de EC-MUG)

Fundamento.

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

3.1.4.1 Prueba presuntiva. Seguir lo indicado en el punto 3.1 o 3.2.1.1

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

3.2 Alimentos

3.2.1 Prueba presuntiva.

3.2.1.1 Preparar la muestra como se indica en la NOM-110-SSA1-1994. Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para análisis microbiológico; y de acuerdo con el tipo de producto, utilizar las diluciones apropiadas, según se indica en el procedimiento de la densidad microbiana por la técnica del número más probable.

Utilizar como medio de enriquecimiento caldo lauril triptosa y continuar como en el punto 3.1.1.2

3.2.2 Prueba confirmativa. Continuar como en el punto 3.1.2.

3.3 Prueba confirmatoria.

Confirmar la presencia de *Escherichia coli* en por lo menos el 10% de las pruebas con resultados positivos a coliformes fecales por cultivo en placas de agar McConkey a partir de los tubos que demostraron la presencia de gas en la prueba confirmativa. Incubar las placas a 35 ### 0,5°C durante 24 ### 2 horas, observar las colonias típicas fermentadoras de color rojo rodeadas de un halo opaco de precipitación de sales biliares. Seleccionar 1 o más colonias aisladas y pasar a tubos de fermentación con caldo lauril triptosa, continuar como se indica en el punto 3.1.1. Hacer tinción de Gram para observación de la morfología de las colonias.

3.3.1 Interpretación de resultados.

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

3.4 Cálculos

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

TABLA 1. Indice del NMP con 95% de límite de confianza para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan 5 tubos con 20 ml de muestra de agua o hielo.

No. de Tubos Positivos	NMP/100 ml	95% de Límite de Confianza (aproximado)	
		Inferior	Superior
0	###1,1	0	3,0
1	1,1	0,05	6,3
2	2,6	0,3	9,6
3	4,6	0,8	14,7
4	8,0	1,7	26,4
5	###8,0	4,0	Infinito

TABLA 2. Indice del NMP con 95% de límite de confianza para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan 10 tubos con 10 ml de muestra de agua o hielo.

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