

**NORMA Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.**

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

MIGUEL ANGEL TOSCANO VELASCO, Comisionado Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en el artículo 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 4 de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo; 3 fracción XXIV, 13 apartado A fracciones I y II, 17 bis fracción III, 17 bis 2, 114, 115, fracción VII, 194 fracción I, 197, 199, 201, 205, 210, 212, 214, 215 fracción I, 216 de la Ley General de Salud; 3 fracción XI, 38 fracción II, 40 fracciones I, II y XI, 41, 43, 46, 47 fracción IV de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 28 del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 1 fracción I, 4, 8, 13, 15, 25, 30, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 52, 53, 54, 55 y 56 del Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios; 2 inciso C fracción X del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud; 3 fracción I inciso C y fracción II y 10 fracciones IV y VIII del Reglamento de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, y

**CONSIDERANDO**

Que en cumplimiento a lo previsto en el artículo 46 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, el Subcomité de Productos y Servicios presentó en el año de 2005 al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, el anteproyecto de Norma Oficial Mexicana.

Que con fecha 23 de junio de 2008, 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 el Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-243-SSA1-2005, PRODUCTOS Y SERVICIOS. LECHE, FORMULA LACTEA, PRODUCTO LACTEO COMBINADO Y DERIVADOS LACTEOS. DISPOSICIONES Y ESPECIFICACIONES SANITARIAS. METODOS DE PRUEBA en el Diario Oficial de la Federación, a efecto que dentro los sesenta días naturales posteriores a dicha publicación, los interesados presentaran sus comentarios al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario.

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

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

**NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-243-SSA1-2010. PRODUCTOS Y SERVICIOS. LECHE, FORMULA LACTEA, PRODUCTO LACTEO COMBINADO Y DERIVADOS LACTEOS. DISPOSICIONES Y ESPECIFICACIONES SANITARIAS. METODOS DE PRUEBA****PREFACIO**

En la elaboración de la presente Norma Oficial Mexicana participaron las siguientes unidades administrativas, organismos e instituciones:

**SECRETARIA DE SALUD**

Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Programa Universitario de Alimentos

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

LICONSA, S.A. DE C.V.

CONSEJO PARA EL FOMENTO DE LA CALIDAD DE LA LECHE Y SUS DERIVADOS A.C.

CAMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DE TRANSFORMACION

CAMARA NACIONAL DE INDUSTRIALES DE LA LECHE

ASOCIACION DE GANADEROS PRODUCTORES DE LECHE PURA, S.A DE C.V.

DANONE DE MEXICO, S.A. DE C.V.

GRUPO CHEN

UNILEVER DE MEXICO, S DE R.L. DE C.V.

**INDICE**

**1. Objetivo y Campo de Aplicación**

**2. Referencias**

**3. Definiciones**

4. Clasificación
5. Símbolos y Abreviaturas
6. Especificaciones sanitarias
7. Muestreo
8. Métodos de prueba
9. Etiquetado
10. Concordancia con normas internacionales
11. Bibliografía
12. Observancia de la norma
13. Vigencia

Apéndice Normativo A. Límites máximos para aditivos alimentarios.

Apéndice Normativo B. Métodos de Prueba

Apéndice Informativo A. Lista de sustancias desinfectantes recomendadas

Apéndice Informativo B. Procedimiento de limpieza y descontaminación del material de vidrio y área de trabajo para la determinación de aflatoxinas.

## **1. Objetivo y Campo de Aplicación**

- 1.1 Esta Norma Oficial Mexicana establece las especificaciones sanitarias y nutrimentales que debe cumplir la leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y los derivados lácteos.
- 1.2 Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el territorio nacional para las personas físicas o morales que se dedican al proceso e importación de la leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos.

## **2. Referencias**

Esta norma se complementa con las siguientes o las que las sustituyan:

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

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

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

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

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.

## **3. Definiciones**

Los términos en los que se definen y clasifican los productos específicos no son denominaciones comerciales y su aplicación se relaciona exclusivamente con el control sanitario.

Para efectos de esta Norma Oficial Mexicana se entiende por.

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

**3.2 Alimento y bebida no alcohólicas con modificaciones en su composición**, al que ha sufrido cambios en su composición por adición, disminución o eliminación de uno o más de sus nutrientes, tales como hidratos de carbono, proteínas, lípidos, vitaminas, minerales o fibra; y que forman parte de la dieta habitual.

**3.3 Azúcares**, a todos los mono y disacáridos presentes en un alimento o bebida no alcohólica.

**3.4 Bases o mezclas para helados**, es la emulsión cuya composición se ajusta al helado, según sea el caso, pudiendo presentarse en forma líquida, concentrada o en polvo.

**3.5 Bitácora o registro**, al documento controlado que provee evidencia objetiva y auditável de las actividades ejecutadas o resultados obtenidos durante el proceso del producto y su análisis.

**3.6 Buenas prácticas de fabricación**, en particular para el caso de los aditivos se refiere a la cantidad mínima indispensable para lograr el efecto deseado.

**3.7 Congelación**, método de conservación físico que se efectúa por medio de equipo especial para lograr una reducción de la temperatura de los productos objeto de esta norma en su centro térmico a máximo -18°C (255°K).

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

**3.9 Contaminantes**, entidades físicas, químicas o biológicas indeseables, que se encuentran en el producto, por arriba de los límites permisibles.

**3.10 Crema**, al producto terminado en el que se ha reunido una fracción determinada de grasa y sólidos no grasos de la leche, ya sea por reposo, por centrifugación o reconstitución sometida a pasteurización y cualquier otro tratamiento térmico que asegure su inocuidad.

**3.11 Derivados o productos lácteos**, productos obtenidos a partir de la leche o sus componentes y otros ingredientes funcionalmente necesarios para su elaboración, incluidos los productos con grasa vegetal.

**3.12 Deshidratación**, al tratamiento que consiste en la eliminación de agua de un producto.

**3.13 Dulces a base de leche**, a los productos elaborados por tratamiento térmico de la leche y edulcorantes, pudiendo ser adicionados de aditivos e ingredientes opcionales.

**3.14 Edulcorante**, sustancia que produce la sensación de dulzura, de orígenes naturales o sintéticos.

**3.15 Envasado aséptico**, al proceso que reúne las condiciones de esterilidad comercial para evitar la presencia de microorganismos en el producto durante el envasado.

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

**3.17 Esterilización comercial**, al tratamiento térmico aplicado al producto para la destrucción de todos los microorganismos viables de importancia en la salud pública y aquellos capaces de reproducirse en el alimento bajo condiciones normales de almacenamiento y distribución, sin la condición de refrigeración.

**3.18 Etiqueta**, marbete rótulo, inscripción, marca, imagen gráfica u otra forma descriptiva, que se haya escrito, impreso, estarcido, marcado, en relieve o en hueco, grabado, adherido, precintado o anexado al empaque o envase del producto.

**3.19 Fecha de caducidad**, a la fecha límite en que se considera que un producto preenvasado almacenado en las condiciones establecidas por el fabricante, mantiene las características sanitarias que debe reunir para su consumo. Después de esta fecha no debe comercializarse ni consumirse.

**3.20 Fecha de consumo preferente**, fecha en que, bajo determinadas condiciones de almacenamiento, expira el periodo durante el cual el producto preenvasado es comercializable y mantiene las cualidades específicas se le atribuyen tácita o explícitamente, pero después de la cual el producto preenvasado puede ser consumido.

**3.21 Fórmula láctea**, es el producto elaborado a partir de ingredientes propios de la leche, tales como caseína, grasa, lactosueros y agua para consumo humano. En cantidades de conformidad con lo que establece la norma de denominación comercial correspondiente.

**3.22 Función tecnológica**, efecto que produce el uso de aditivos en los alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados, que proporciona o intensifica su aroma, color o sabor, y/o mejora su estabilidad y conservación, entre otros. Véase aditivo.

**3.23 Helado**, alimento producido mediante la congelación con o sin agitación de una mezcla pasteurizada compuesta por una combinación de ingredientes lácteos pudiendo contener grasas vegetales, frutas, huevo y sus derivados, saborizantes, edulcorantes y otros aditivos; cuando está empalillado se nombrará paleta.

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

- a) La declaración nutrimental obligatoria.
- b) La declaración nutrimental complementaria.

**3.25 Ingrediente**, cualquier sustancia o producto, incluidos los aditivos, que se emplee, en la fabricación o preparación de un alimento o bebida no alcohólica y esté presente en el producto final, transformado o no.

**3.26 Ingredientes opcionales**, a los que se pueden adicionar a los productos tales como: chiles, condimentos, especias, frutas, verduras, entre otros.

**3.27 Leche**, a la secreción natural de las glándulas mamarias de las vacas sanas o de cualquier otra especie animal, excluido el calostro.

**3.28 Leche acidificada**, a la obtenida por la acidificación de la leche entera, parcialmente descremada o descremada, pasteurizada, con agentes acidulantes.

**3.29 Leche condensada azucarada**, la que ha sido obtenida mediante la evaporación del agua de la leche a través de presión reducida, a la que se le ha agregado sacarosa y/o dextrosa u otro edulcorante natural, hasta alcanzar una determinada concentración de grasa butírica y sólidos totales.

**3.30 Leche evaporada**, producto obtenido mediante eliminación parcial del agua de la leche por el calor o por cualquier otro procedimiento que permita obtener un producto con la misma composición y características de la leche sin modificación en la proporción entre la caseína y la proteína de la leche.

**3.31 Leche fermentada**, a la obtenida por la acidificación de la leche estandarizada entera o deshidratada, pasteurizada, parcialmente descremada, semidescremada o descremada, debido a la acción de bacterias lácticas vivas con la consiguiente reducción del pH, adicionada o no por aditivos, por alimentos e ingredientes opcionales.

**3.32 Límite máximo**, cantidad establecida de aditivos, microorganismos, parásitos, materia extraña, plaguicidas, metales pesados y metaloides, entre otros, que no se debe exceder en un alimento, bebida o materia prima.

**3.33 Limpieza**, conjunto de procedimientos que tiene por objeto eliminar tierra, residuos, suciedad, polvo, grasa u otras sustancias objetables.

**3.34 Lote**, a la cantidad de un producto, elaborado en un mismo ciclo, integrado por unidades homogéneas.

**3.35 Mantequilla**, al producto obtenido a partir de la grasa de la leche o grasa de la crema, la cual ha sido pasteurizada, sometida a maduración, fermentación o acidificación, batido o amasado, pudiendo ser o no adicionada de sal. El contenido de grasa butírica debe ser mínimo de 80%.

**3.36 Materia extraña**, a cualquier sustancia, resto, desecho o material que se presenta en el producto pero que no forma parte de la composición normal de éste.

**3.37 Metal pesado**, a los elementos químicos que causan efectos indeseables en el metabolismo aun en concentraciones bajas. Su toxicidad depende de la dosis en que se ingieran, así como su acumulación en el organismo.

**3.38 Método de prueba**, al procedimiento analítico utilizado para comprobar que un producto satisface las especificaciones que establece la norma.

**3.39 Muestra**, al total de unidades de producto provenientes de un lote y que representan las características y condiciones del mismo.

**3.40 Pasteurización**, al tratamiento térmico al que se someten los productos, consistente en una relación de temperatura y tiempo que garantice la destrucción de organismos patógenos y la inactivación de algunas enzimas de los alimentos.

**3.41 Planta procesadora**, al establecimiento dedicado al proceso de pasteurización, ultrapasteurización, esterilización, deshidratación, rehidratación, entre otros procesos de la leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado.

**3.42 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 los productos objeto de esta norma.

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

**3.44 Producto lácteo combinado**, el producto elaborado a partir de sólidos lácteos u otros ingredientes que no proceden de la leche. En cantidades de conformidad con lo que establece la norma de denominación comercial correspondiente.

**3.45 Prueba de esterilidad comercial**, a la retención temporal de las muestras representativas de los productos bajo condiciones de tiempo y temperatura establecidas para verificar la esterilidad comercial del producto.

**3.46 Quesos**, productos elaborados de la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida de la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior, por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos pudiendo por su proceso ser: fresco, madurado o procesado.

**3.47 Quesos frescos**, aquellos que además de cumplir con la descripción general de queso se caracterizan por su alto contenido de humedad, y por no tener corteza o tener corteza muy fina, pudiendo o no adicionarles aditivos e ingredientes opcionales.

**3.48 Quesos madurados**, aquellos que además de cumplir con la descripción general de queso, se caracterizan por ser de pasta dura, semidura o blanda y pueden tener o no corteza; sometidos a un proceso de maduración mediante adición de microorganismos, bajo condiciones controladas de tiempo, temperatura y humedad, para provocar en ellos cambios bioquímicos y físicos característicos del producto del que se trate, lo que le permite prolongar su vida de anaquel, los cuales pueden o no requerir condiciones de refrigeración.

**3.49 Quesos procesados**, aquellos que además de cumplir con la descripción general de queso se caracterizan por ser elaborados con mezclas de quesos, fusión y emulsión con sales fundentes, aditivos para alimentos permitidos e ingredientes opcionales, sometidos a proceso térmico de 70°C durante 30 segundos o someterse a cualquier otra combinación equivalente o mayor de tiempo y temperatura, lo que le permite prolongar su vida de anaquel.

**3.50 Quesos de suero**, productos obtenidos a partir del suero de leche entera, semidescremada, o descremada pasteurizada de vaca, cabra u oveja, el cual es coagulado por calentamiento en medio ácido para favorecer la obtención de la cuajada, la que es salada, drenada, moldeada, empacada y etiquetada y posteriormente refrigerada para su conservación.

**3.51 Refrigeración**, al método de conservación físico con el cual se mantienen los productos a una temperatura máxima de 7°C (280°K) que se emplea para inhibir el desarrollo de la mayoría de los microorganismos, reducir las reacciones bioquímicas y el deterioro propio de los alimentos.

**3.52 Rehidratación**, al procedimiento mediante el cual se restituye el agua a los productos deshidratados objeto de esta norma.

**3.53 Sorbete**, producto que cumple con la definición de helado, excepto en que su contenido de grasa, sólidos no grasos y sólidos totales, son inferiores a los del helado.

**3.54 Suero de leche**, líquido obtenido de la coagulación de la caseína de la leche, mediante la acción de enzimas coagulantes de origen animal, vegetal o microbiano, por la adición de ácidos orgánicos o minerales de grado alimentario; acidificación por intercambio iónico hasta alcanzar el punto isoelectrónico de la caseína.

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

**3.56 Ultrapasteurización**, al proceso al cual es sometido el producto a una adecuada relación de temperatura y tiempo, envasado asepticamente para garantizar la esterilidad comercial.

#### 4. Clasificación

Los productos objeto de esta norma por su proceso se clasifican de la siguiente manera, la cual no corresponde a una denominación:

##### 4.1 Leche

###### 4.1.1 Pasteurizada

###### 4.1.2 Ultrapasteurizada

###### 4.1.3 Esterilizada

###### 4.1.4 Deshidratada

##### 4.2 Fórmula láctea

###### 4.2.1 Pasteurizada

###### 4.2.2 Ultrapasteurizada

###### 4.2.3 Esterilizada

###### 4.2.4 Deshidratada

##### 4.3 Producto lácteo combinado

###### 4.3.1 Pasteurizado

###### 4.3.2 Ultrapasteurizado

###### 4.3.3 Esterilizado

###### 4.3.4 Deshidratado

##### 4.4 Quesos

###### 4.4.1 Frescos

4.4.1.1 Frescales: Panela, Canasto, Sierra, Ranchero, Fresco, Blanco, Enchilado, Adobado.

4.4.1.2 De pasta cocida: Oaxaca, Asadero, Mozzarella, Del Morral, Adobera.

4.4.1.3 Acidificados: Cottage, Crema, Doble crema, Petit Suisse, Nuefchatel.

4.4.1.4 Quesos de suero: Broccio, Broccotle, Cerrase, Geitmysost, Gyetost, Mejetele, Mysost, Recuit, Requesón, Ricotta, Picotón, Schottenezinger, Zinder.

###### 4.4.2 Madurados

4.4.2.1 Madurados prensados de pasta dura: Añejo, Parmesano, Cotija, Reggianito.

4.4.2.2 Madurados prensados: Cheddar, Chester, Chihuahua, Manchego, Brick, Edam, Gouda, Gruyere, Emmental, Cheshire, Holandés, Amsterdam, Butterkase, Coulommiers, Dambo, Erom, Friese, Fynbo, Havarti, Harzer-Kase, Herrgardsost, Huskallsost, Leidse, Maribo, Norvergia, Provolone, Port Salut, Romadur, Saint Paulin, Samsoe, Svecia, Tilsiter, Bola, Jack.

4.4.2.3 De maduración con mohos: Azul, Cabrales, Camembert, Roquefort, Danablu, Limburgo, Brie.

###### 4.4.3 Procesados

###### 4.4.3.1 Fundidos

###### 4.4.3.2 Fundidos para untar

4.4.4 Otros quesos: frescos, madurados y procesados no considerados en los numerales 4.4.1, 4.4.2 y 4.4.3, deberán observar lo dispuesto en este ordenamiento.

##### 4.5 Mantequilla

##### 4.6 Cremas

###### 4.6.1 Pasteurizadas

###### 4.6.2 Ultrapasteurizadas

###### 4.6.3 Esterilizadas

###### 4.6.4 Deshidratadas

###### 4.6.5 Acidificadas

###### 4.6.6 Fermentadas

###### 4.6.7 Batidas y para batir

##### 4.7 Leche condensada azucarada

##### 4.8 Leche fermentada o acidificada

##### 4.9 Dulces a base de leche

4.9.1 Dulces de baja humedad (menos del 12%) o endurecidos: caramelos, chiclosos, jamoncillos, etc.

4.9.2 Dulces de humedad intermedia (12-20%) que se procesan mediante evaporación: glorias, cajeta y obleas con cajeta, etc.

**4.9.3** Dulces de alta humedad (más de 20%), procesados por coagulación, aireación y procesos enzimáticos: flanes, gelatinas, chongos, mousse, arroz con leche, etc.

**4.10 Helados y Sorbetes**

**4.10.1** Helados de crema

**4.10.2** Helados de leche

**4.10.3** Helados de grasa vegetal

**4.10.4** Sorbetes

**4.10.5** Bases para helados y sorbetes

**4.11** Otros productos lácteos no considerados, deberán observar lo dispuesto en este ordenamiento.

**5. Símbolos y Abreviaturas**

AFM <sub>1</sub>	aflatoxina M <sub>1</sub>
BPF	buenas prácticas de fabricación
cm	centímetro
cm <sup>2</sup>	centímetro cuadrado
CI	color index
conc.	concentración
HACCP	análisis de peligros y de puntos críticos de control (por su siglas en inglés).
HPLC	cromatografía de líquidos de alta eficacia
°C	grados Celsius
g	gramo
x g	gravedad (en centrifugado)
h	hora
=	igual
1/d	inversa de la dilución
kg	kilogramo
lb	libra
L	litro
+	más
m	masa
±	más-menos
Máx.	máximo
>	mayor que
<	menor que
≤	igual o menor que
μ	micra
μg	microgramo
μL	microlitro
mg	miligramo
μm	micrómetro
mL	mililitro
min	minutos
mm	milímetro
mM	milimolar
M	molar
m/v	masa a volumen
ng	nanogramo
nm	nanómetro
N	normal
No.	número
/	por
%	por ciento
pH	potencial de hidrógeno
Pulg	pulgada
rpm	revoluciones por minuto
seg	segundos
x	signo de multiplicación
UF	unidades de fenol
UFC	unidades formadoras de colonias
UI	unidades internacionales
UV	ultravioleta
v	volumen
v/v	volumen a volumen

Cuando en la presente norma se mencione:

- Acuerdo, debe entenderse que se trata del Acuerdo por el que se determinan las sustancias permitidas como aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, y sus modificaciones.
- Reglamento, debe entenderse que se trata del Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios.

## 6. Especificaciones sanitarias

### 6.1 Generales

Los productos objeto de esta norma, además de cumplir con lo establecido en el Reglamento, deben ajustarse a las siguientes disposiciones:

**6.1.1** Los establecimientos que se dediquen al proceso e importación de los productos comercializados en el Territorio Nacional objeto de esta norma, deben cumplir con lo establecido en la NOM-251-SSA1-2009, señalada en el apartado de referencias.

**6.1.2** Todos los ingredientes que se utilicen para la elaboración de los productos objeto de esta norma, deben cumplir con las especificaciones sanitarias establecidas en el Reglamento y las normas oficiales mexicanas correspondientes.

**6.1.3** 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.

**6.1.4** Los productos sujetos a tratamiento térmico y envasados en recipientes de cierre hermético, además de cumplir con lo establecido en este ordenamiento, deben cumplir con la NOM-130-SSA1-1995, señalada en el apartado de referencias.

**6.1.5** La leche, que se comercialice para su consumo humano o que se emplee como materia prima para la elaboración de productos lácteos debe cumplir con lo siguiente:

**6.1.5.1** No presentar materias extrañas, conservadores ni sustancias neutralizantes.

**6.1.5.2** No coagular por ebullición.

**6.1.5.3** Presentar prueba de alcohol al 68% negativa (sólo para leche de bovino).

**6.1.5.4** Presentar prueba de inhibidores bacterianos, negativa; detectados por métodos fisicoquímicos y microbiológicos, de conformidad con la tabla 1 del presente ordenamiento.

**Tabla 1.** Inhibidores bacterianos en leche.

PRODUCTO	Derivados Clorados	Sales cuaternarias de amonio	Oxidantes	Formaldehído	Antibióticos
Pasteurizados	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Ultrapasteurizados	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
OESTERILIZADOS	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

**6.1.5.5** Debe someterse a un tratamiento térmico con un tiempo y temperatura determinados que garantice su inocuidad, independientemente del uso que se le dé posteriormente. A excepción de la leche que se utilice para la elaboración de quesos que por las características de éstos no pueda ser sometida a tratamiento térmico, la cual debe cumplir con lo siguiente:

**6.1.5.5.1** Tener implementado un sistema HACCP para su proceso, conforme a lo establecido en el Apéndice A de la NOM-251-SSA1-2009, citada en el apartado de referencias.

**6.1.5.6** Los tratamientos térmicos a los que se someta la leche, fórmula láctea o producto lácteo combinado para su comercialización, o antes de su uso como materia prima para el caso de la leche, pueden ser: ebullición, pasteurización, ultrapasteurización, esterilización o deshidratación.

**Tabla 2.** Temperaturas y tiempos para tratamiento térmico de la leche, fórmula láctea o producto combinado.

Tratamiento	Temperatura y tiempo*
Pasteurización	Lenta 63°C / 30 min. Rápida 72°C / 15 seg.
Ultrapasteurización o esterilización	135°C a 149°C / 2 a 8 seg.

\* Puede emplearse alguna otra relación de tiempo-temperatura que sea equivalente para la destrucción de los microorganismos patógenos.

**6.1.5.7** El equipo para la pasteurización lenta debe contar, por lo menos, con un sistema para registro gráfico o numérico y control de la temperatura y tiempo del proceso, tina con tapa y sistema de agitación del producto, termómetro de mercurio con vástago de acero inoxidable funcionando y calibrado, o su equivalente.

**6.1.5.8** El equipo empleado para la pasteurización rápida debe contar, por lo menos, con un sistema de control y registro automático de la temperatura y tiempo del proceso, que no permita el paso del producto cuando no se haya alcanzado la temperatura mínima establecida, así mismo, un sistema en que el flujo del producto cumpla con el tiempo mínimo determinado. Termómetro de mercurio o su equivalente funcionando y calibrado, colocado al final de la "zona de sostenimiento" del equipo, en el que la terminal tenga contacto con el producto.

**6.1.5.8.1** La temperatura registrada en el sistema de control y registro del proceso debe ser  $\leq 1^{\circ}\text{C}$  de la temperatura que indique dicho termómetro.

**6.1.5.9** El equipo empleado para la ultrapasteurización o esterilización, debe contar con dispositivos de control y registro de temperatura de operación durante el tiempo de producción, que permita comprobar que los productos han sido sometidos al tratamiento térmico establecido.

**6.1.5.10** Una vez alcanzada la temperatura, la leche, fórmula láctea o producto combinado debe enfriarse rápidamente a una temperatura de  $6^{\circ}\text{C}$ , y manejarse a esta temperatura hasta el momento del envasado a excepción de productos ultrapasteurizados o esterilizados.

**6.1.5.11** Los productos sometidos a deshidratación deben cumplir con lo siguiente:

- a) Los que se utilicen como materia prima, deben ser pasteurizados previamente a la deshidratación.
- b) No se podrán vender a granel al consumidor.

**6.1.5.12** Los productos sometidos a rehidratación deben ser pasteurizados, ultrapasteurizados o esterilizados, conforme a este ordenamiento.

#### 6.1.6 Especificaciones físicas y químicas

##### 6.1.6.1 Prueba de fosfatasa residual.

**Tabla No. 3.** Límite máximo de fosfatasa residual.

Producto	Límite máximo de fosfatasa residual (UF/g)
Leche, fórmula láctea o producto lácteo combinado pasteurizado*	4
Quesos frescos, madurados y procesados	12
Quesos de suero	4
Helados de crema, de leche o grasa vegetal, sorbetes y bases o mezclas para helados	4
Mantequilla y cremas pasteurizada**	4

Nota: Se debe considerar que podrán presentar falsos positivos, por lo que esta prueba no puede ser concluyente.

\* No aplica para este tipo de productos ultrapasteurizados, esterilizados y deshidratados.

\*\* No aplica para leche condensada azucarada, leche fermentada o acidificada y dulces a base de leche

##### 6.1.6.2 No deben contener materia extraña.

#### 6.1.7 Especificaciones de contaminantes

**6.1.7.1** La presencia de contaminantes en los productos objeto de esta norma no debe rebasar el límite máximo señalado en la siguiente tabla.

**Tabla No. 4.** Límites máximos de contaminantes<sup>(1)</sup>

Contaminante	Límite máximo mg/kg
Arsénico <sup>(2)</sup>	0,2
Plomo	0,1 <sup>(3)</sup> 0,5 <sup>(4)</sup>
Mercurio	0,05 <sup>(3)</sup>
Estaño	250 <sup>(5)</sup>
Aflatoxina M1	0,5µg/L <sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup> No aplica ningún contaminante a los helados, sorbetes y bases o mezclas para helados; <sup>(2)</sup> No aplica a mantequillas, cremas, leche fermentada y acidificada, leche condensada azucarada, dulces a base de leche; <sup>(3)</sup> Límite sólo para leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado, <sup>(4)</sup> Límite para quesos

<sup>(5)</sup> Aplica sólo para aquellos productos envasados en hoja de lata sin barniz.

**6.1.7.2** El productor o fabricante de los productos objeto de esta norma, debe establecer mecanismos de control que permitan determinar la presencia y cantidad de metales pesados y metaloides en las materias primas o en el producto en proceso de elaboración o en el producto terminado. Es recomendable establecer una periodicidad de verificación de mecanismos de control de al menos 1 vez por año, considerando las condiciones del proceso e instalaciones. La información generada debe estar a disposición de la Secretaría de Salud, cuando ésta así lo requiera.

**6.1.8 Especificaciones Microbiológicas**

**6.1.8.1** Los productos objeto de esta norma no deben exceder los límites de microorganismos señalados a continuación:

**Tabla 5. Límites máximos de contenido microbiano para leche y derivados lácteos.**

Microorganismo	Límite máximo	Productos
<b>Organismos Coliformes totales</b>	≤100 UFC/g o mL	Helados y sorbetes. Quesos de suero
	≤50 UFC/g o mL	Bases o mezclas para helados.
	≤20 UFC/g o mL	En punto de venta: Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado; pasteurizados.
	≤10 UFC/g o mL	En planta: Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado; pasteurizados o deshidratados. Mantequilla, cremas, leche condensada azucarada, leche fermentada o acidificada, dulces a base de leche.
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	≤10 UFC/ mL por siembra directa	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado pasteurizado.
	≤100 UFC/g o mL	Mantequilla, cremas, leche condensada azucarada, leche fermentada o acidificada, dulces a base de leche. Quesos madurados y quesos procesados
	1000 UFC/g	Quesos frescos y quesos de suero
<b><i>Salmonella spp</i></b>	Ausente en 25g o mL	Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado: pasteurizados y deshidratados. Quesos frescos, madurados y procesados. Quesos de suero. Cremas, leche fermentada o acidificada, dulces a base de leche*, helados, sorbetes y bases para helados. Mantequillas.
<b><i>Escherichia coli</i></b>	100 UFC/g o mL	Quesos frescos.
	≤3 NMP/g o mL	Leche utilizada como materia prima para la elaboración de quesos. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado; deshidratados.
	≤10 NMP/g	Quesos madurados y procesados.
<b><i>Listeria monocytogenes</i></b>	Ausente en 25g o mL	Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado; pasteurizados ** Quesos. Quesos de suero. Helados, bases para helados y sorbetes**.
<b><i>Vibrio cholerae</i> ***</b>	Ausente en 25g	Quesos frescos. Helados, sorbetes y bases para helados.
	Ausente en 50g	Quesos de suero.
<b>Enterotoxina estafilococcica</b>	Negativa	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado; deshidratados y la que se emplee como materia prima para elaboración de quesos. Quesos frescos, madurados y procesados. Helados, sorbetes y bases para helados.
<b>Toxina botulínica**</b>	Negativa	Quesos frescos, madurados y procesados, envasados al alto vacío.
<b>Mohos y levaduras</b>	500 UFC/g o mL	Quesos frescos, madurados*** y quesos de suero.
	100 UFC/g o mL	Quesos procesados.
	50 UFC/g o mL	Bases o mezclas para helados.
<b>Mesofílicos aerobios</b>	200,000 UFC/g o mL	Helados y sorbetes.
	100,000 UFC/g o mL	Bases para helado.

\* Para aquellos que contienen chocolate, cacao, coco, huevo y semillas.

\*\* Se determinará únicamente en situaciones de emergencia sanitaria, cuando la SSA de acuerdo a los resultados microbiológicos detecte su presencia, y ordenará la realización de un plan de trabajo por parte del fabricante o importador para controlar la presencia.

\*\*\* Aquellos productos que para su maduración requieren de hongos, pudieran estar fuera de este límite.

**6.1.9 Aditivos**

**6.1.9.1** Únicamente se permiten los aditivos en los límites y productos que se señalan en el apéndice normativo A de este ordenamiento.

**6.1.10 Control documental del proceso:**

**6.1.10.1** Los registros de tratamiento térmico deben ser continuos y contar con la siguiente información:

**Tabla 6.** Información mínima de los procedimientos, bitácoras o registros de las diferentes etapas del proceso.

DOCUMENTO	INFORMACION
Bitácora o registro de Proceso	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Control de tratamiento térmico.           <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gráficas de temperatura y tiempo de tratamiento térmico (pasteurización, ultrapasteurización o esterilización, deshidratación), por equipo.</li> <li>• Temperatura y tiempo de enfriamiento.</li> <li>• Cantidad e identificación del producto</li> </ul> </li> <li>- Registro de los hechos no comunes.</li> </ul>
Procedimiento de operaciones de limpieza y desinfección de equipos para tratamiento térmico.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Personal encargado de la operación.</li> <li>- Frecuencia</li> <li>- Vigencia.</li> </ul>
Bitácora o Registro de operaciones de limpieza y desinfección de equipo para tratamiento térmico.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Registro de los hechos no comunes.</li> </ul>
Diagrama de proceso	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Etapas de proceso con tiempos y temperaturas de cada operación.</li> </ul>

**6.2 Específicas**

Además de las especificaciones sanitarias generales señaladas en el numeral 6.1 de este ordenamiento; se debe cumplir con lo siguiente:

**6.2.1 Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado.**

**6.2.1.1** Deben contener de 310 a 670 µg equivalentes de retinol/L (1033 a 2233 UI/L), de forma natural o por restauración. Y entre 5 a 7,5 µg/L de Vitamina D<sub>3</sub> (200-300 UI/L).

**6.2.1.2** Los productos adicionados con Vitamina A o D<sub>3</sub> no deben contener cantidades superiores a las establecidas en este ordenamiento.

**6.2.1.3** Los productos deshidratados deben contener una humedad no mayor al 4%.

**6.2.1.4** Los productos sometidos a ultrapasteurización o esterilización deben cumplir con lo siguiente:

**6.2.1.4.1** Ser envasados asépticamente en envases que cuenten con barreras para proteger el producto del oxígeno y la luz, y llenarse en ausencia de aire.

**6.2.1.4.2** El cierre de los envases debe ser hermético y llevar a cabo las pruebas para su control y los registros correspondientes.

**6.2.1.4.3** El envase que se emplee, debe someterse a un tratamiento de desinfección.

**6.2.1.4.4** Los agentes desinfectantes deben tener actividad esporicida, no degradar el material del envase, se deben evaporar fácilmente de la superficie del envase y no deben reaccionar con el producto.

**6.2.1.4.5** Sólo se permite el uso de peróxido de hidrógeno para efectos de desinfección de los envases, éste debe emplearse en una concentración de 30 al 50%.

**6.2.1.4.6** Los establecimientos deben destinar un área de incubación para la prueba de esterilidad comercial para efectos del control interno de una muestra representativa de la producción, de la cual se debe tomar una submuestra para someterse a análisis microbiológico.

**6.2.2 Cremas**

**6.2.2.1** Las cremas acidificadas y fermentadas deben tener una acidez titulable de no menos de 0,5% expresada como ácido láctico.

**6.2.2.2** Las cremas deshidratadas deben contener una humedad no mayor al 4%.

**6.2.3 Leche fermentada o acidificada.**

**6.2.3.1** Las leches fermentadas o acidificadas deben tener una acidez titulable de no menos de 0,5% expresada como ácido láctico y su pH debe ser máximo de 4,5.

**6.2.4 Helados, bases para helados y sorbetes**

**6.2.4.1** Para la elaboración de helados y sorbetes se permite la incorporación de aire limpio como coadyuvante en su elaboración.

**6.2.4.2** No se permite volver a congelar los productos después de haber sido descongelados.

**6.2.4.3** La mezcla para elaborar los helados, bases para helados y sorbetes debe pasteurizarse de la siguiente forma:

**6.2.4.3.1** Deben someterse a una temperatura de 68,5°C durante un tiempo de 30 minutos, o.

**6.2.4.3.2** Serán sometidas a una temperatura de 79,4°C durante un tiempo mínimo de 25 segundos, o

**6.2.4.3.3** Someterlas a otra relación de tiempos y temperaturas cuyo efecto sea el mismo.

**6.2.4.3.4** En cualquiera de los casos, una vez alcanzados, respectivamente, las temperaturas y tiempos señalados se enfriará bruscamente a 4°C.

**6.2.4.3.5** Una vez pasteurizadas las mezclas, deben mantenerse a una temperatura máxima de 6°C antes de someterse a congelación.

**7. Muestreo**

**7.1** El procedimiento de muestreo para los productos objeto de esta norma, debe sujetarse a lo que establece la Ley General de Salud, debiendo mantener la muestra en condiciones que eviten su contaminación o descomposición.

**8. Métodos de Prueba**

Para la verificación oficial de las especificaciones que se establecen en esta norma, se deben aplicar los métodos de prueba señalados 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 NOM-051-SCFI/SSA1-2010 señalada en el apartado de referencias, debe sujetarse a lo siguiente, sin interferir con las atribuciones de otras dependencias:

**9.1** En la superficie principal de exhibición de los envases de leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado, debe declararse el tratamiento térmico al que fue sometido, así como otros tratamientos aplicados para asegurar la inocuidad del producto, establecidos en otros ordenamientos legales correspondientes.

**9.2** En los productos objeto de esta norma que contienen sal yodada, debe declararse como tal en la lista de ingredientes.

**9.3** Cuando en la elaboración de los productos objeto de esta norma, se emplee leche que no procede de vaca, se debe indicar su origen.

**9.4** Los quesos deben indicar el contenido de grasa butírica.

**9.5** Los productos objeto de esta norma a excepción de los helados, bases para helados y sorbetes deben indicar "fecha de caducidad".

**9.6** Si la identificación del lote corresponde a la fecha de caducidad, se deben indicar las leyendas: "Lote" y "Fecha de caducidad" o sus abreviaturas o sus equivalentes.

**9.7** En la etiqueta de productos pasteurizados y de aquellos que requieren refrigeración para su conservación, se debe incluir la siguiente leyenda: "Manténgase en refrigeración" o "Consérvese en refrigeración" o cualquier otra equivalente.

**9.8** En el caso de los helados, sorbetes y otros productos que requieren congelación debe figurar la leyenda "Manténgase en congelación" o "Consérvese en congelación" o cualquier otra equivalente.

**9.9** Para productos deshidratados: "Consérvese en un lugar fresco y seco", "Una vez preparado el producto, manténgase o consérvese en refrigeración" o cualquier otra equivalente.

**9.10** Para dulces a base de leche de humedad baja e intermedia, debe indicarse "Manténgase en lugar fresco y seco", o cualquier otra equivalente.

**9.11** Los productos ultrapasteurizados o esterilizados deben de incluir las leyendas "Manténgase o consérvese en lugar fresco y seco". "No requiere refrigeración en tanto no se abra el envase". "Refrígérese después de abrirse" o leyendas equivalentes.

**9.12** Los productos objeto de esta norma que hayan sido modificados en su composición nutrimental, deben ostentar junto a la denominación, con el mismo tipo y tamaño de letra, la modificación que lo caracterice.

**9.13** La leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado, adicionados con vitamina D o con vitaminas A y D, según corresponda, deben hacer figurar su contenido con las siguientes leyendas:

**9.13.1** "Contiene \_\_\_\_\_ µg de Vitamina D por L", o

**9.13.2** "Contiene \_\_\_\_\_ µg de Vitamina D y \_\_\_\_\_ µg equivalentes de retinol (Vitamina A)/L".

**9.13.3** En el espacio en blanco debe figurar el contenido de dichos nutrientes, o sus equivalentes por 100 g, por porción o por envase, si éste contiene sólo una porción. El término entre paréntesis es opcional.

**9.13.4** El texto, "Adicionada con Vitamina D" para los productos adicionados con Vitamina D<sub>3</sub>.

**9.13.5** Cuando voluntariamente se señalen dentro de la declaración nutrimental, deben figurar como se señala a continuación:

**Tabla 8**

<b>Nutriamento</b>	<b>Cantidad por 100 g o por porción o por envase</b>
Vitamina A	μg equivalentes de retinol
Vitamina D	μg

**9.14** Los productos con modificación en su composición deben cumplir con lo señalado en la NOM-086-SSA1-1994, citada en el apartado de referencias, a excepción de los indicados en el numeral 9.8.2.1, los cuales deben cumplir con lo señalado en este ordenamiento.

**9.15** Cálculo de vitaminas

**9.15.1** Vitamina A

1 UI de vitamina A es equivalente a 0,3 μg equivalentes de retinol (todos los Retinoles "trans").

**9.15.2** Vitamina D<sub>3</sub>

1UI de vitamina D<sub>3</sub> es equivalente a 0,025 μg de colecalciferol.

**9.16** Leyendas precautorias

**9.16.1** Los productos que contengan alcohol etílico o bebidas alcohólicas en cantidades superiores al 0,5%, deben incluir en la superficie principal de exhibición de la etiqueta, la siguiente leyenda: "Este producto contiene \_\_\_\_\_% de alcohol. No recomendable para niños". (En el espacio en blanco citar el contenido de alcohol en %).

**9.17** La cantidad de proteínas que ha de indicarse, debe calcularse utilizando la siguiente fórmula:

Leche, derivados o productos lácteos y quesos

Proteína = contenido total de nitrógeno Kjeldahl X 6.38

Dulces a base de leche, Helados, Sorbetes:

Proteína = contenido total de nitrógeno Kjeldahl X 6.25

**9.18** En el caso de que los productos objeto de esta norma contengan o incluyan productos preenvasados como parte de promociones u obsequios, tales como productos de panificación, cereales, chocolate u otros alimentos, deben incluir en el envase del producto de promoción u obsequio, cuando menos la siguiente información: lista de ingredientes, identificación del responsable del producto, fecha de caducidad y lote.

**9.19** Cuando en las etiquetas se declaren u ostenten en forma escrita, gráfica o descriptiva que los productos, su uso, aplicación, ingredientes o cualquier otra característica están recomendados, respaldados o aceptados por centros de investigación, asociaciones, organizaciones, entre otros, los cuales deberán contar con reconocimiento nacional o internacional de su experiencia y estar calificados para dar opinión sobre la información declarada. Se deberá contar con el sustento técnico respectivo, el que estará a disposición de la Secretaría de Salud en el momento que lo solicite. Dichas declaraciones deben sujetarse a lo siguiente: la leyenda debe describir claramente la característica referida, estar precedida por el símbolo o nombre del organismo y figurar en caracteres claros y fácilmente legibles.

**9.20** Los productos destinados a ser reconstituidos o los contenidos en envases que requieran instrucciones de uso o consumo especiales, deben incluir una descripción escrita o gráfica de las instrucciones de uso, empleo o preparación.

**9.21** Los productos envasados en punto de venta, deben ostentar la siguiente información:

**9.21.1** Nombre o denominación del producto.

**9.21.2** Fecha de envasado y, en su caso, fecha de caducidad, señalando el día y el mes y anteponiendo la leyenda que corresponda "fecha de envasado \_\_\_\_\_", "fecha de caducidad \_\_\_\_\_", o leyenda equivalente.

## **10. Concordancia con normas internacionales**

Esta norma es parcialmente equivalente a las siguientes normas:

**10.1** Codex Alimentarius. CODEX STAN 232-2001. Norma Nivel Máximo para la Aflatoxina M<sub>1</sub> en la Leche.

**10.2** Codex Alimentarius. CODEX STAN A-9-1976, Rev. 1-2003. Norma del Codex Para Las Natas (Cremas) Y Las Natas (Cremas) Preparadas.

**10.3** Codex Alimentarius. CODEX STAN A-6-1978, Rev. 1-1999, enmendado en 2006. Norma del General del Codex para el Queso.

**10.4** Codex Alimentarius. CODEX STAN 221-2001. Norma colectiva para el Queso No Madurado, Incluido el Queso Fresco.

**11. Bibliografía**

- 11.1 Ley Federal sobre Metrología y Normalización.
- 11.2 Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.
- 11.3 Ley General de Salud.
- 11.4 Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios.
- 11.5 Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI-1994. Sistema general de unidades de medida. México, D.F.
- 11.6 Guía para la redacción, estructuración y presentación de las normas oficiales mexicanas. NORMA-Z-13/02.
- 11.7 Food and Drug Administration. Grade "A" Pasteurized Milk Ordinance. (2003 Revision). Department of Health and Human and Services. U.S.A.
- 11.8 Fernández Escartín, E. 2000. "Microbiología e inocuidad de los Alimentos". Universidad Autónoma de Querétaro.
- 11.9 Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1994. "Summary of evaluations performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)". ILSI Press, Washington.
- 11.10 U.S. Food & Drug Administration. 2001. Center for Food Safety & Applied Nutrition. Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook. "Bad bug book".
- 11.11 Secretaría de Salud. Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios. Aplicación de Análisis de Riesgos, Identificación y Control de Puntos Críticos en la Industria de la Leche Pasteurizada. México 1994.
- 11.12 Secretaría de Salud. Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios. Pasteurización de la Leche Controles y Exámenes Curso 302. Traducción de documentos de la FDA. México, 1994.
- 11.13 Norma Mexicana NMX-F-703-COFOCALEC-2004, Sistema de producto leche –alimentos- lácteos – leche y producto lácteo (o alimento lácteo)- fermentado o acidificado –denominaciones, especificaciones y métodos de prueba.
- 11.14 Norma Mexicana NMX-F-709-COFOCALEC-2004, Sistema producto leche –alimento- alimento lácteo regional- chongos zamoranos y producto lácteo tipo chongos zamoranos –denominaciones, especificaciones y métodos de prueba.

**12. Observancia de la norma**

- 12.1 La vigilancia del 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.

**13. Vigencia**

- 13.1 La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor a los 60 días naturales posteriores a la fecha de su publicación en el Diario Oficial de la Federación, a excepción de los numerales 6.1.5.5 y 6.1.5.5.1 los cuales entrarán en vigor a los 365 días naturales posteriores a la misma fecha.

**Transitorio**

**Único:** Con la entrada en vigor de la presente Norma Oficial Mexicana se cancelan las siguientes normas oficiales mexicanas:

- NOM-035-SSA1-1993, Bienes y servicios. Quesos de suero. Especificaciones sanitarias, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 30 de enero de 1995.
- NOM-036-SSA1-1993, Bienes y servicios. Helados de crema, de leche o grasa vegetal, sorbetes y bases o mezclas para helados. Especificaciones sanitarias, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 10 de marzo de 1995.
- NOM-121-SSA1-1994, Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 23 de febrero de 1996.
- NOM-184-SSA1-2002, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado. Especificaciones sanitarias, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 23 de octubre de 2002
- NOM-185-SSA1-2002, Productos y servicios. Mantequilla, cremas, producto lácteo condensado azucarado, productos lácteos fermentados y acidificados, dulces a base de leche. Especificaciones Sanitarias, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 16 de octubre de 2002.

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, Distrito Federal, a 25 de junio de 2010.- El Comisionado Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, **Miguel Angel Toscano Velasco**.- Rúbrica.

## APENDICE NORMATIVO A

## A.1 Límites Máximos para Aditivos Alimentarios.

Aditivo	Límite máximo mg/kg	Observaciones
Acido acético glacial	BPF	Quesos frescos y procesados. Leche fermentada o acidificada. Helados, sorbetes y bases para helados.
Acido algínico	10,000	Helados, sorbetes y bases para helados.
	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados). Quesos frescos y procesados
Acido ascórbico *	500 (expresado como ácido ascórbico)	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (deshidratados o con grasa vegetal). Crema deshidratada.
	BPF	Productos objeto de esta norma saborizados o edulcorados.
Acido benzoico y sus sales de sodio, potasio y calcio	1000	Crema y mantequillas Dulces a base de leche.
	50	Leche fermentada o acidificada **
Acido cítrico	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado esterilizados saborizados. Quesos frescos y procesados Mantequillas Para todo tipo de cremas (incluyendo cremas acidificadas). Leche fermentada o acidificada Dulces a base de leche Helados, sorbetes y bases para helados
Acido eritórbico	BPF	Dulces a base de leche.
Acido fosfórico	9,000 (total de compuestos de fósforo añadidos, calculados como fósforo)	Quesos frescos y procesados
	3,000 (mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listan en este apartado, expresados como sustancias anhidras).	Para todo tipo de cremas.
	2,000 (solo, expresado como sustancia anhidra).	Para todo tipo de cremas.
Acido fumárico	BPF	Leche fermentada o acidificada.
Acido L (+) tartárico	BPF	Leche fermentada o acidificada.
Acido láctico	BPF	Quesos frescos y procesados Para todo tipo de cremas (incluyendo cremas acidificadas) Leche fermentada o acidificada Dulces a base de leche Helados, sorbetes y bases para helados.
Acido D,L-málico	BPF	Quesos frescos Leche fermentada o acidificada Helados, sorbetes y bases para helados.
Acido propiónico	BPF	Quesos frescos y procesados.
Acido sóblico y sus sales de sodio, potasio y calcio	3,000 (sólo o mezclado, expresado como ácido sóblico)	Quesos frescos, procesados y madurados Para todo tipo de cremas Mantequillas Bases para helados
	600	Dulces a base de leche.
	250	Leche fermentada y acidificada. **

Adipato acetilado de dialmidón	10,000 (sólo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listan en este apartado.)	Quesos frescos saborizados (petit) Leche fermentada y acidificada.
	BPF	Dulces a base de leche.
Agar	5,000 (sólo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listan en este apartado.)	Para todo tipo de cremas. Leche fermentada y acidificada. Dulces a base de leche.
	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados). Quesos frescos y procesados.
Alginato de amonio	10,000	Helados, sorbetes y bases para helados.
	8,000 (sólo o mezclado con otros espesantes)	Quesos procesados
	BPF	Leche fermentada o acidificada. Para todo tipo de cremas Dulces a base de leche.
Alginato de calcio	10,000	Helados, sorbetes y bases para helados.
	2,000	Leche fermentada o acidificada
	BPF	Fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados). Quesos frescos y procesados. Para todo tipo de cremas
Alginato de potasio	10,000	Helados, sorbetes y bases para helados.
	2,000	Leche fermentada o acidificada.
	BPF	Fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados). Quesos frescos y procesados. Para todo tipo de cremas Leche fermentada o acidificada Dulces a base de leche.
Alginato de propilenglicol	10,000	Helados, sorbetes y bases para helados.
	8,000 (sólo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listan en este apartado.)	Quesos frescos y procesados
	5,000 (sólo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listan en este apartado.)	Crema para batir y crema vegetal. Dulces a base de leche.
	1,400	Fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados).
Alginato de sodio	10,000	Helados, sorbetes y bases para helados.
	2,000	Leche fermentada o acidificada.
	BPF	Fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados). Quesos frescos y procesados. Para todo tipo de cremas Leche fermentada o acidificada.
Almidón acetilado	20,000 sólo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listan en este apartado.)	Leche fermentada o acidificada.
	10,000 (sólo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listan en este apartado.)	Quesos frescos saborizados (petit)
	BPF	Dulces a base de leche. Quesos frescos y procesados

Almidón oxidado	20,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado.)	Leche fermentada o acidificada.
	10,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado.)	Quesos frescos saborizados (petit) y quesos procesados.
	BPF	Dulces a base de leche.
Almidones modificados	20,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado.)	Leche fermentada o acidificada Helados, sorbetes y bases para helados.
	10,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado.)	Quesos frescos saborizados (petit) y quesos procesados.
	BPF	Dulces a base de leche
Amarillo ocaso FCF Amarillo alimentos 3 No. C.I. 15985	300 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado.)	Leche condensada azucarada.
	200 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado.)	Dulces a base de leche.
	100	Quesos saborizados Helados, sorbetes y bases para helados
	35	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados o aromatizados).
	12	Leche fermentada o acidificada.
Ascorbato de calcio*	500 (expresado como ácido ascórbico)	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (deshidratados o con grasa vegetal).
Ascorbato de potasio*	500 (expresado como ácido ascórbico)	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (deshidratados o con grasa vegetal).
Ascorbato de sodio *	500 (expresado como ácido ascórbico)	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (deshidratados o con grasa vegetal). Crema deshidratada
Azafrán (Estigmas de <i>Crocus sativus L.</i> ) Amarillo natural 6 No. C.I. 75100	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados o aromatizados).
Azorrubina y sus lacas Rojo alimentos 3 y sus lacas No. C.I. 14720	100	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados o aromatizados), helados, sorbetes y bases para helados Quesos frescos saborizados (petit) Leche fermentada o acidificada.
Azul brillante FCF y sus lacas. Azul alimentos 2 y sus lacas. No. C.I. 42090	200	Dulces a base de leche.
	150	Leche fermentada o acidificada. Quesos frescos saborizados (petit) Crema para batir Helados, sorbetes y bases para helados
Beta caroteno sintético Anaranjado alimentos 5. No. C.I. 40800	600	Quesos procesados.
	100	Leche fermentada o acidificada
	35	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados o aromatizados).
	25	Quesos madurados. Mantequilla.

Beta-apo-8'-carotenal Anaranjado alimentos 6. No. C.I. 40820	100	Helados, sorbetes y bases para helados. Leche fermentada o acidificada
	35	Quesos madurados y procesados.
	35	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados o aromatizados).
	25	Mantequilla
Butil hidroquinona terciaria	200	Mantequilla (modificada en su composición)
	100	Dulces a base de leche.
Butil hidroxianisol	200	Mantequilla (modificada en su composición)
	100	Crema deshidratada y crema vegetal deshidratada. Dulces a base de leche.
Butil hidroxitolueno	100	Dulces a base de leche.
	200	Mantequillas
Cafeína	400	Helados, sorbetes y bases para helados.
Cantaxantina Anaranjado alimentos 8. No. C.I. 40850	100	Helados, sorbetes y bases para helados.
Caramelo Clase I	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados o aromatizados) Quesos frescos y procesados Quesos saborizados Leche condensada azucarada Leche fermentada o acidificada Dulces a base de leche Helados sorbetes y bases para helados
Caramelo Clase II	3,200	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados o aromatizados).
	150	Leche condensada azucarada Leche fermentada o acidificada Dulces a base de leche.
	100	Quesos saborizados Helados sorbetes y bases para helado
Caramelo Clase III	150	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados o aromatizados). Leche condensada azucarada. Leche fermentada o acidificada. Dulces a base de leche.
	100	Helados sorbetes y bases para helado Quesos saborizados
Caramelo Clase IV	150	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados o aromatizados). Leche condensada azucarada. Leche fermentada y acidificada. Dulces a base de leche.
	100	Helados, sorbetes y bases para helados Quesos saborizados
Carbonato de amonio	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados).
Carbonato de calcio	10,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listan en este apartado, expresado como sustancia anhidra).	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (deshidratados). Crema deshidratada. Leche fermentada o acidificada
	2,000 (solo, expresado como sustancia anhidra).	Leche condensada azucarada.
	BPF	Quesos frescos, madurados y procesados Para todo tipo de cremas
Carbonato de magnesio	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados).

Carbonato de potasio	5,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado, expresado como sustancia anhidra).	Crema deshidratada.
	3,000 (mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado, expresados como sustancias anhidras).	Leche condensada azucarada.
	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados). Para todo tipo de cremas
Carbonato de sodio	3,000 (mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado, expresados como sustancias anhidras).	Leche condensada azucarada.
	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados). Helados, sorbetes y bases para helados Para todo tipo de cremas. Mantequilla.
Carbonato hidrogenado de amonio	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados).
Carbonato hidrogenado de potasio	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados).
Carbonato hidrogenado de sodio	2,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado, expresado como sustancia anhidra).	Mantequilla.
	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados). Quesos frescos y procesados Dulces a base de leche.
Carboximetilcelulosa	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados o modificados en su composición). Quesos frescos, madurados y procesados. Helados, sorbetes y bases para helados.
Carboximetilcelulosa de sodio	10,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado)	Leche fermentada o acidificada. Dulces a base de leche. Helados, sorbetes y bases para helados.
	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados o esterilizados). Quesos frescos y procesados Todo tipo de cremas
Carotenos naturales Anaranjado alimentos 5. No. C.I. 75130	100	Leche fermentada o acidificada
	100	Productos objeto de esta norma, excepto: leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado. Helados, sorbetes y bases para helados.
	600	Mantequilla Quesos frescos y quesos madurados (corteza)
Carragenato de calcio	1,200 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado).	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados o modificados en su composición).

Carragenina y sus sales de potasio, sodio y amonio	10,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado).	Helados, sorbetes y bases para helados.
	8,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado).	Quesos procesados.
	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados). Quesos frescos Para todo tipo de cremas Leche fermentada o acidificados (cuajados naturalmente), Dulces a base de leche Leche condensada azucarada Productos esterilizados.
Celulosa microcristalina	BPF	Leches saborizadas, leche fermentada o acidificadas. Quesos madurados y quesos frescos Para todo tipo de cremas. Helados, sorbetes y bases para helados.
Cera blanca y amarilla de abeja	BPF	Cobertura de quesos.
Cera de candelilla	BPF	Cobertura de quesos.
Cera de carnauba	BPF	Cobertura de quesos.
Cera de cascarilla de arroz	BPF	Cobertura de quesos.
Cera microcristalina	30,000	Cobertura de quesos.
Citrato de calcio	3,000 (mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado, expresados como sustancias anhidras).	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (esterilizados). Fórmula láctea y producto lácteo combinado.
	2,000 (solo, expresado como sustancia anhidra).	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (esterilizados). Fórmula láctea y producto lácteo combinado.
	BPF	Quesos frescos y procesados Todo tipo de cremas Leche fermentada o acidificada
Citrato tripotásico	5,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado, expresado como sustancia anhidra).	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (deshidratados). Crema deshidratada.
	2,000 (solo, expresado como sustancia anhidra).	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (esterilizados). Fórmula láctea y producto lácteo combinado. Todo tipo de cremas Leche condensada azucarada.
	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (esterilizados). Quesos frescos y procesados Todo tipo de cremas Leche condensada azucarada Leche fermentada o acidificada

Citrato trisódico	5,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listan en este apartado, expresado como sustancia anhidra).	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (deshidratados).
	3,000 (mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listan en este apartado, expresados como sustancias anhidras).	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (esterilizados). Fórmula láctea y producto lácteo combinado. Leche condensada azucarada
	2,000 (solo, expresado como sustancia anhidra).	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (esterilizados). Fórmula láctea y producto lácteo combinado. Leche condensada azucarada Leche fermentada o acidificada. Dulces a base de leche
	BPF	Quesos frescos y procesados. Todo tipo de cremas Leche fermentada o acidificada
Clorofilas Verde natural 3 No. C.I. 75810	BPF	Quesos saborizados, procesados y madurados Dulces a base de leche
Cloruro de calcio	1,200 (solo o mezclado, expresado como sustancia anhidra).	Fórmula láctea y producto lácteo combinado.
	BPF	Quesos frescos, madurados y procesados. Dulces a base de leche. Leche condensada azucarada Todo tipo de cremas
Cloruro de potasio	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (esterilizados). Dulces a base de leche.
Complejos cúpricos de clorofilas Verde natural 3. No. C.I. 75810	300	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados o aromatizados).
Curcumina Cúrcuma (Raíz de <i>Curcuma longa</i> L.) No. C.I. 75300	100	Leche fermentada o acidificada. Dulces a base de leche. Quesos frescos y procesados
	50	Helados, sorbetes y bases para helados.
D-alfa-tocoferol concentrado	300	Dulces a base de leche. Helados, sorbetes y bases para helados
Dextrinas	20,000	Helados, sorbetes y bases para helados. Quesos frescos y procesados Leche fermentada o acidificada
Dióxido de azufre	50	Leche fermentada o acidificada. **
Dióxido de silicón amorfo	10,000	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (deshidratados). Crema deshidratada.
Dióxido de titanio Pigmento blanco 6. No C.I. 77891	BPF	Helados, sorbetes y bases para helados. Quesos frescos y procesados. Dulces a base de leche. Todo tipo de cremas
Dl-alfa tocoferol	300	Dulces a base de leche. Helados, sorbetes y bases para helados
Eritrosina Rojo alimentos 14 No. C.I. 45430	2	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados o aromatizados).
	27	Leche fermentada o acidificada Helados, sorbetes y bases para helados.
Esteres acéticos de los mono y diglicéridos de los ácidos grasos.	BPF	Fórmula láctea y producto lácteo combinado. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados). Todo tipo de Crema. Quesos frescos y madurados

Esteres cítricos de los mono y diglicéridos de los ácidos grasos	BPF	Fórmula láctea y producto lácteo combinado. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados). Todo tipo de Crema.
Esteres lácticos de los mono y diglicéridos de los ácidos grasos	10,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado)	Todo tipo de cremas
	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (modificados en su composición) Leches saborizadas Fórmula láctea y producto lácteo combinado Leche fermentada o acidificada Helados, sorbetes y bases para helados
Esteres diacetil tartáricos de los mono y diglicéridos de los ácidos grasos.	1,200 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado)	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (modificados en su composición).
	10,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado)	Helados, sorbetes y bases para helados.
	BPF	Fórmula láctea y producto lácteo combinado. Para todo tipo de cremas.
Esteres de propilengícol de ácidos grasos	10,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado)	Helados, sorbetes y bases para helados.
Esteres de ácidos grasos y sacarosa	10,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado)	Helados, sorbetes y bases para helados.
	BPF	Fórmula láctea y producto lácteo combinado.
Eter apocarotenóico	50	Helados, sorbetes y bases para helados.
Etil maltol	50	Helados, sorbetes y bases para helados.
Etilvainillina	1,000	Helados, sorbetes y bases para helados.
Extracto de annato (Extracto de semillas de <i>Bixa orellana</i> ). Anaranjado natural 4. No. C.I. 75120	600 (calculado como bixinia)	Quesos procesados.
	60 (calculado como bixinia)	Quesos madurados.
	20 (calculado como bixinia)	Mantequilla. Dulces a base de leche.
	10 (calculado como bixinia)	Leche fermentada o acidificada
	0.05 (calculado como bixinia)	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados o aromatizados).
Extracto de cochinilla (Extracto de <i>Coccus cacti</i> L.). Rojo natural 4. No. C.I. 75470	150	Helados, sorbetes y bases para helados
	100	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados o aromatizados).
	50	Leche fermentada o acidificadas. Dulces a base de leche. Quesos saborizados
	BPF	Leche condensada azucarada.
Fosfato de dialmidón acetilado	BPF	Leche fermentada o acidificada. Dulces a base de leche Quesos frescos y procesados
Fosfato de aluminio y sodio	1,000	Dulces a base de leche. Quesos procesados
Fosfato de amonio	1,000	Dulces a base de leche.
Fosfato de dialmidón	BPF	Leche fermentada o acidificada. Dulces a base de leche. Quesos frescos y procesados

Fosfato de hidroxipropil dialmidón	20,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listan en este apartado.)	Leche fermentada o acidificada
	BPF	Dulces a base de leche. Quesos frescos y procesados
Fosfato hidrogenado de magnesio	1,000	Dulces a base de leche.
Fosfato hidrogenado de sodio	9000 (solo o mezclado, calculado como pentóxido de fósforo)	Quesos frescos y procesados
	5000 (solo o mezclado, expresado como sustancia anhidra)	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (deshidratados)
	3000 (mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listan en este apartado, expresados como sustancias anhidras)	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (esterilizados)
	2000 (solo o mezclado, expresado como sustancia anhidra)	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (esterilizado)
	1200 (solo o mezclado, expresado como sustancia anhidra)	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado
	1000	Dulces a base de leche
	500 (solo o mezclado, expresado como sustancia anhidra)	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (modificados en su composición)
	150 (solo o mezclado, expresado como sustancia anhidra)	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (ultrapasteurizados)
	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados)
	20,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listan en este apartado.)	Leche fermentada o acidificada
Fosfato de monoalmidón	BPF	Dulces a base de leche. Quesos frescos y procesados
Fosfato dihidrogenado de calcio	9000	Quesos procesados
Fosfato dihidrogenado de potasio	9,000	Quesos procesados
	5,000 (solo o mezclado, expresado como sustancia anhidra)	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (deshidratados).
	3,000 (mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listan en este apartado, expresados como sustancias anhidras).	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (esterilizados).
	2,000 (solo, expresado como sustancia anhidra).	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (esterilizados).
	1,200 (solo o mezclado, expresado como sustancia anhidra)	Fórmula láctea y producto lácteo combinado.
	1,000	Dulces a base de leche.
	500 (solo o mezclado, expresado como sustancia anhidra)	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (modificados en su composición).
	150 (solo o mezclado, expresado como sustancia anhidra)	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (ultrapasteurizados).
	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados).

Fosfato dihidrogenado de sodio	9000	Quesos procesados
Fosfato hidrogenado de calcio	9,000 (total de fosfatos, calculados como fósforo)	Quesos procesados.
	3,000 (mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listan en este apartado, expresados como sustancias anhidras).	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (esterilizados).
	2,000 (solo, expresado como sustancia anhidra).	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (esterilizados).
	1,000	Dulces a base de leche.
Fosfato fosfatado de dialmidón	20,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listan en este apartado.)	Leche fermentada o acidificada.
	BPF	Dulces a base de leche. Quesos frescos y procesados
Fosfato hidrogenado dipotásico	5,000 (solo o mezclado, expresado como sustancia anhidra)	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (deshidratados). Quesos procesados
	3,000 (mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listan en este apartado, expresados como sustancias anhidras).	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (esterilizados).
	2,000 (solo, expresado como sustancia anhidra).	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (esterilizados).
	1,200 (solo o mezclado, expresado como sustancia anhidra)	Fórmula láctea y producto lácteo combinado.
	500 (solo o mezclado, expresado como sustancia anhidra)	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (modificados en su composición).
	150 (solo o mezclado, expresado como sustancia anhidra)	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (ultrapasteurizados).
	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados).
Fosfato hidrogenado disódico	30,000 (solo o mezclado, expresado como pentóxido de fósforo)	Quesos frescos y procesados.
	5,000 (solo o mezclado, expresado como sustancia anhidra)	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (deshidratados).
	3,000 (mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listan en este apartado, expresados como sustancias anhidras).	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (esterilizados).
	2,000 (solo, expresado como sustancia anhidra).	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (esterilizados).
	1,200 (solo o mezclado, expresado como sustancia anhidra)	Fórmula láctea y producto lácteo combinado.
	1,000	Dulces a base de leche. Cremas y cremas para batir
	500 (solo o mezclado, expresado como sustancia anhidra)	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (modificados en su composición).
	150 (solo o mezclado, expresado como sustancia anhidra)	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (ultrapasteurizados).
	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados).

Fosfato monomagnésico	1,000	Dulces a base de leche.
Fosfato tricálcico	9,000 "límite establecido como emulsificante" (solo o mezclado, calculado como pentóxido de fósforo)	Quesos frescos y procesados
	3,000 (mezclado con otros fosfatos que se listan en este apartado, expresados como $P_2O_5$ ).	Para todo tipo de cremas. Leche condensada azucarada
	2,000 (solo, expresado como $P_2O_5$ ).	Para todo tipo de cremas. Leche condensada azucarada
	1,000	Dulces a base de leche.
Fosfato trimagnésico	1,000	Dulces a base de leche.
Fosfato tripotásico	5,000 (solo o mezclado, expresado como sustancia anhidra)	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (deshidratados). Crema deshidratada.
	3,000 (mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listan en este apartado, expresados como sustancias anhidras).	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (esterilizados). Para todo tipo de cremas. Leche condensada azucarada.
	2,000 (solo, expresado como sustancia anhidra).	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (esterilizados). Para todo tipo de cremas. Leche condensada azucarada.
	1,000	Dulces a base de leche.
Fosfato trisódico	9,000 (solo o mezclado, calculado como pentóxido de fósforo)	Quesos frescos y procesados.
	5,000 (solo o mezclado, expresado como sustancia anhidra)	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (deshidratados). Crema deshidratada.
	3,000 (mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listan en este apartado, expresados como sustancias anhidras).	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (esterilizados). Para todo tipo de cremas. Leche condensada azucarada.
	2,000 (solo, expresado como sustancia anhidra).	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (esterilizados). Para todo tipo de cremas. Leche condensada azucarada.
	2,000 (solo o mezclado, expresado como sustancia anhidra)	Mantequillas
	1,000	Dulces a base de leche.
Galato de propilo	90	Dulces a base de leche.
	100	Mantequillas
Glicerol	10,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listan en este apartado.)	Helados, sorbetes y bases para helados.
Gluconato ferroso	BPF	Helados, sorbetes y bases para helados.
Glucono delta lactona	BPF	Todos los quesos Leche fermentada o acidificada
Glutamato monosódico	BPF	Quesos frescos y procesados
Goma arábiga o acacia	1,200 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listan en este apartado.)	Fórmula láctea y producto lácteo combinado.
	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados). Quesos frescos y procesados. Leche fermentada o acidificada. Helados, sorbetes y bases para helados Para todo tipo de Crema. Dulces a base de leche.

Goma damar	1,200 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado.)	Fórmula láctea y producto lácteo combinado.
	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados).
Goma de algarrobo	10,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado.)	Helados, sorbetes y bases para helados.
	5,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado.)	Para todo tipo de Crema Leche fermentada o acidificada. Dulces a base de leche.
	1,200 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado.)	Fórmula láctea y producto lácteo combinado.
Goma gellana	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados). Leche fermentada o acidificada. Quesos frescos y procesados.
	1,200 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado.)	Fórmula láctea y producto lácteo combinado.
Goma guar	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados).
	1,200 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado.)	Leche esterilizada, fórmula láctea y producto lácteo combinado.
Goma karaya	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados). Quesos frescos y procesados. Leche fermentada o acidificada. Helados, sorbetes y bases para helados Para todo tipo de Crema Dulces a base de leche.
	1,200 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado.)	Fórmula láctea y producto lácteo combinado.
Goma tara	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados). Quesos frescos y procesados. Helados, sorbetes y bases para helados
	1,200 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado.)	Fórmula láctea y producto lácteo combinado.
	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados). Quesos frescos y procesados

Goma tragacanto	1,200 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado.)	Fórmula láctea y producto lácteo combinado.
	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados). Productos lácteos acidificados.
Goma Xantana	5,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado.)	Para todo tipo de cremas. Leche fermentada o acidificados. Dulces a base de leche. Helados, sorbetes y bases para helados
	1,200 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado.)	Fórmula láctea y producto lácteo combinado.
Hidróxido de amonio	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados).
Hidróxido de calcio	2,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado.)	Mantequilla.
Hidróxido de magnesio	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados).
Hidróxido de potasio	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados).
	2,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado.)	Mantequilla.
Hidróxido de sodio	BPF	Quesos frescos Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados) Mantequillas (modificadas en su composición)
Hidroxipropil almidón	BPF	Leche fermentada o acidificada. Dulces a base de leche. Quesos frescos y procesados
Hidroxipropil metil celulosa	10,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado.)	Helados, sorbetes y bases para helados.
	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados).
Indigotina y sus lacas. Azul alimentos 1 y sus lacas No. C.I. 73015	1000	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados o aromatizados).
	300	Dulces a base de leche.
	100	Helados, sorbetes y bases para helados
	6	Leche fermentada o acidificada.
Lactato de calcio	BPF	Para todo tipo de Crema Leche fermentada o acidificada Quesos frescos
Lactato de sodio	BPF	Para todo tipo de Crema Quesos frescos

Lecitina	5,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado.)	Quesos procesados.
	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados, esterilizados o deshidratados). Mantequilla. Dulces a base de leche. Helados, sorbetes y bases para helados Cremas esterilizadas
Maltodextrinas	BPF	Todos los productos objeto de la norma.
Metil celulosa	10,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado.)	Helados, sorbetes y bases para helados.
Metil etil celulosa	10,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado.)	Helados, sorbetes y bases para helados.
Esteres metílico y etílico del ácido β-apo-8'-carotenóico o anaranjado alimentos 7 (éster etílico)	35	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados o aromatizados).
Mono y diglicéridos	10,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado.)	Helados, sorbetes y bases para helados Para todo tipo de Cremas.
	2000	Leche Quesos frescos, madurados y procesados. Leche fermentada o acidificada
	BPF	Dulces a base de leche Leches, Fórmula láctea y producto lácteo combinado.
Monoestearato de sorbitán	5,000	Quesos frescos
	1,000	Para todo tipo de cremas. Helados, sorbetes y bases para helados
Monoestearato de sorbitán polioxietilenoado (20)	1,000	Helados, sorbetes y bases para helados. Para todo tipo de cremas
	500	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados o aromatizados).
Monolaurato de sorbitán polioxietilenoado	1,000	Para todo tipo de cremas.
Monoleato de sorbitán polioxietilenoado	1,000	Para todo tipo de cremas. Helados, sorbetes y bases para helados
Pimaricina.	40 (solo para el tratamiento de la superficie o corteza de los quesos, ausente a la profundidad de 5 mm)	Quesos madurados
Nisina	12.5	Quesos frescos, madurados y procesados.
Nitrato de potasio	50	Quesos madurados.
Nitrato de sodio	50	Quesos madurados.
Octenil succinato sódico de almidón	10,000	Leche fermentada o acidificada
	BPF	Dulces a base de leche.
Oleoresina de paprika	BPF	Para todos los productos objeto de esta norma.
Oxido de magnesio	10,000	Crema deshidratada.
Palmitato de amonio	100	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (deshidratados o con grasa vegetal).
Palmitato de ascorbilo	500	Crema deshidratada.
	200	Dulces a base de leche.
	100	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (deshidratados o con grasa vegetal).

Palmitato de calcio	100	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (deshidratados o con grasa vegetal).
Palmitato de potasio	100	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (deshidratados o con grasa vegetal).
Palmitato de sodio	100	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (deshidratados o con grasa vegetal).
Pectato de amonio	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados).
Pectato de calcio	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados).
Pectato de potasio	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados).
Pectato de sodio	BPF	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados).
Pectinas	BPF	Helados, sorbetes y bases para helados. Leche fermentada o acidificada Para todo tipo de Cremas. Dulces a base de leche. Quesos frescos y procesados
Peróxido de hidrógeno	BPF	Quesos madurados
Piramicina o natamicina	40	Quesos frescos y procesados
Pirofosfato tetrapotásico	9000	Quesos procesados
Pirofosfato tetrasódico	9000	Quesos procesados
Pirofosfato dicálcico	9000	Quesos procesados
Polidextrosa	BPF	Helados, sorbetes y bases para helados. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado, dulces a base de leche, leche saborizada. Todo tipo de cremas. Leche fermentada o acidificada
Polifosfato de calcio	9,000	Quesos frescos y procesados
	5,000 (solo o mezclado, expresado como sustancia anhidra)	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (deshidratados).
	3,000 (mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listan en este apartado, expresados como sustancias anhidras).	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (esterilizados).
	2,000 (solo, expresado como sustancia anhidra).	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (esterilizados).
Polifosfato de potasio	9,000	Quesos frescos y procesados
	5,000 (solo o mezclado, expresado como sustancia anhidra)	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (deshidratados). Crema deshidratada.
	3,000 (mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listan en este apartado, expresados como sustancias anhidras).	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (esterilizados). Para todo tipo de cremas.
	2,000 (solo, expresado como sustancia anhidra).	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (esterilizados). Para todo tipo de cremas.
	1,200 (solo o mezclado, expresado como sustancia anhidra)	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados). Fórmula láctea y producto lácteo combinado.
	150 (solo o mezclado, expresado como sustancia anhidra)	Leche ultrapasteurizada.

Polifosfato de sodio	9,000	Quesos frescos y procesados
	5,000 (solo o mezclado, expresado como sustancia anhidra)	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (deshidratados). Crema deshidratada.
	3,000 (mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listan en este apartado, expresados como sustancias anhidras).	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (esterilizados). Para todo tipo de cremas.
	2,000 (solo, expresado como sustancia anhidra).	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (esterilizados). Para todo tipo de cremas. Dulces a base de leche
	1,200 (solo o mezclado, expresado como sustancia anhidra)	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados). Fórmula láctea y producto lácteo combinado.
	150 (solo o mezclado, expresado como sustancia anhidra)	Leche ultrapasteurizada.
Ponceau 4R Rojo alimentos 7 No C.I.16255	150	Leche condensada azucarada
	50	Helados, sorbetes y bases para helados. Dulces a base de leche.
	80	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados o aromatizados).
	48	Leche fermentada o acidificada. Quesos saborizados
Propionato de calcio	BPF (sólo para el tratamiento de la superficie)	Quesos frescos y procesados.
Propionato de potasio	BPF (sólo para el tratamiento de la superficie)	Quesos frescos y procesados.
Propionato de sodio	BPF (sólo para el tratamiento de la superficie)	Quesos frescos y procesados.
Riboflavina	10	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados o aromatizados).
	BPF	Quesos frescos, madurados y procesados.
Riboflavina-5'-fosfato de sodio	10	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados o aromatizados).
Rojo Allura AC y sus lacas. Rojo alimentos 17 y sus lacas. No. C.I. 16035	300 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listan en este apartado.)	Leche condensada azucarada. Dulces a base de leche.
	140	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados o aromatizados).
	50	Leche fermentada o acidificada.
Rojo betabel	BPF	Leche fermentada o acidificada Leche condensada azucarada.
Sales de sodio y potasio de complejos cúpricos de clorofilinas No C.I. 75810	300	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados o aromatizados).
Sales de sodio, potasio o calcio del ácido acético	BPF	Helados, sorbetes y bases para helados.
Sales de sodio, potasio o calcio del ácido cítrico	BPF	Helados, sorbetes y bases para helados.
Sales de sodio, potasio o calcio del ácido láctico	BPF	Helados, sorbetes y bases para helados.
Sales de sodio, potasio o calcio del ácido málico	BPF	Helados, sorbetes y bases para helados.
Sales de sodio, potasio o calcio del ácido tartárico	BPF	Helados, sorbetes y bases para helados.

Silicato de calcio	10,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado.)	Crema deshidratada.
Silicato de magnesio	10,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado.)	Crema deshidratada.
Sorbato de potasio	3,000 (solo o mezclado, expresado como ácido sóblico)	Quesos frescos, procesados y madurados Cremas, mantequillas y bases para helado.
	600	Dulces a base de leche.
	200	Leche fermentada o acidificada. **
Sorbato de sodio	3,000 (solo o mezclado, expresado como ácido sóblico)	Quesos frescos, procesados y madurados. Cremas, mantequillas y bases para helado.
	200	Leche fermentada o acidificada. **
	300 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado.)	Leche condensada azucarada.
Tartrazina y sus lacas. Amarillo alimentos 4 y sus lacas. No. C.I. 19140	200	Dulces a base de leche.
	150 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado.)	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados o aromatizados).
	100	Helados, sorbetes y bases para helados
	18	Leche fermentada o acidificada.
	10,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado.)	Helados, sorbetes y bases para helados.
Triestearato de sorbitán polioxietileno (20)	5,000 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado.)	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados). Para todo tipo de cremas.
	9000	Quesos procesados
	1100	Para todo tipo de cremas
Trifosfato pentapotásico	120 (solo o mezclado, expresado como sustancia anhidra)	Fórmula láctea y producto lácteo combinado
	9000	Quesos procesados
	1,200 (solo o mezclado, expresado como sustancia anhidra)	Fórmula láctea y producto lácteo combinado.
Verde rápido FCF y sus lacas. Verde alimentos 3 y sus lacas.	100 (solo o mezclado con otros aditivos que tengan la misma función y que se listen en este apartado.)	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado (saborizados o aromatizados).

\* No debe reportarse como nutriamento.

\*\* Exclusivamente para leche fermentada o acidificada preparados con vegetales.

## A2. Enzimas o cultivos de microorganismos

**A.2.1** Para la elaboración de leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado, sometidos a un proceso de transformación parcial de la lactosa en glucosa y galactosa, se permite emplear las siguientes enzimas:

Enzima	Límite Máximo
Lactasa derivada del <i>Aspergillus niger</i>	BPF
Lactasa derivada del <i>Aspergillus oryzae</i>	BPF
Lactasa derivada del <i>Saccharomyces spp</i>	BPF
Lactasa derivada del <i>Kluyveromyces fragilis</i>	BPF
Quimosina B derivada de <i>Kluyveromyces lactis</i>	BPF

### Y aquellas mencionadas en el Acuerdo y sus modificaciones

**A.2.2** Para la elaboración de los quesos frescos, madurados y procesados se permite emplear las siguientes enzimas para cuajar la leche:

Enzima	Límite Máximo
Pepsina derivada de estómagos de rumiantes y porcinos	BPF
Quimosina A derivada de la <i>Escherichia coli</i> K12, contiene gen de proquimosina A de ternera.	BPF
Quimosina B derivada de <i>Kluyveromyces lactis</i> , contiene gen de proquimiosina B de ternera.	BPF
Renina, derivada de <i>Bacillus cereus</i>	BPF
<i>Endothia parasitica</i>	BPF
<i>Rhizomucor miehei</i>	BPF

### Y aquellas mencionadas en el Acuerdo y sus modificaciones

**A.2.3** Para la elaboración de crema, dulces a base de leche, se permite emplear las enzimas listadas en el Acuerdo y sus modificaciones, derivadas de las fuentes que ahí se establecen y conforme a las BPF.

## A.3 Saborizantes

**A.3.1** Para la elaboración de los productos objeto de esta norma; se permite emplear los saborizantes naturales y sintéticos de acuerdo a las BPF y de conformidad con lo establecido en el Acuerdo y sus modificaciones.

## A.4 Edulcorantes no nutritivos

**A.4.1** Para la elaboración de leche productos edulcorados y saborizados objeto de esta norma, se permite el empleo de edulcorantes no nutritivos de conformidad con lo establecido en la NOM-086-SSA11994, citada en el apartado de referencias.

## A.5 Conservadores

**A.5.1** Para la elaboración de leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado no se permite el empleo de conservadores; a excepción de los productos saborizados o aromatizados en los que sólo se permite la presencia de ácido sórbico, ácido benzólico o las sales de sodio o potasio de los ácidos anteriores, como efecto de la transferencia de los ingredientes opcionales.

**A.5.2** Para la elaboración de helados, sorbetes y bases para helados, se permite la presencia de conservadores como principio de transferencia de los ingredientes opcionales.

**APENDICE NORMATIVO B****B. METODOS DE PRUEBA****Precauciones generales de seguridad.**

El analista debe consultar siempre la información respecto a la exposición y manejo seguro de los reactivos químicos especificados en estos métodos, para emplear el equipo de seguridad apropiado como bata de laboratorio, guantes de látex, anteojos de seguridad, mascarilla, etc., y trabajar cuando así se requiera bajo campana de extracción.

Para la aplicación de los siguientes métodos analíticos se debe cumplir con las Buenas Prácticas de Laboratorio.

**B.1. Recolección de la muestra**

Utilizar un frasco estéril de vidrio o de plástico provisto de tapón de cierre hermético, libre de fenol. Se recomienda el empleo de tapones de hule. Transportar la muestra en una hielera con refrigerante para lograr una temperatura de 2°C a 7°C; para el caso de productos congelados deben transportarse en congelación.

**B.2. Preparación de la muestra**

Antes de proceder al estudio fisicoquímico de la leche, homogeneizar la muestra por agitación e inversión repetida del recipiente que la contiene. En los casos que se observe la formación de grumos, calentar la muestra en baño de agua a temperatura aproximada de 38°C y emplear un agitador con gendarme para facilitar el desprendimiento de la crema adherida a la pared del frasco o del tapón.

Mantener la leche a 20°C al tomar las alícuotas necesarias para los análisis.

**B.3. Determinación de Inhibidores****B.3.1. Derivados Clorados (prueba cualitativa).****B.3.1.1. Principio del método.**

Cuando la muestra es tratada con ácido, se libera el cloro presente, si este cloro se hace reaccionar con yoduro de potasio y solución de almidón se desarrolla un color azul cuya intensidad va a depender de la cantidad de cloro presente.

**B.3.1.2. Equipo.**

B.3.1.2.1. Baño de agua a 85°C.

**B.3.1.3. Materiales.**

B.3.1.3.1. Tubos de ensaye de 16 x 150 mm, o equivalente.

B.3.1.3.2. Pipetas graduadas de 10 mL.

B.3.1.3.3. Agitadores de vidrio.

B.3.1.3.4. Embudos de filtración.

B.3.1.3.5. Papel filtro.

B.3.1.3.6. Baño de hielo.

**B.3.1.4. Reactivos.**

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y por agua debe entenderse agua destilada.

B.3.1.4.1. Yoduro de potasio (KI). Solución al 7%.

B.3.1.4.2. Ácido clorhídrico (HCl) diluido 1:2. A 100 mL de ácido clorhídrico agregar 200 mL de agua.

B.3.1.4.3. Solución de almidón ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>n</sub>. Suspender 1g de almidón en un poco de agua fría, homogeneizar y agregarlo a 100 mL de agua hirviendo, agitar hasta disolución completa, enfriar antes de usar. Utilizar solución recientemente preparada.

**B.3.1.5. Procedimiento.**

B.3.1.5.1. En un tubo de ensaye poner 5 mL de leche y agregarle 1,5 mL de solución de yoduro de potasio al 7%, agregar 4 mL de HCl diluido y mezclar perfectamente con una varilla de vidrio. Incluir una muestra control.

B.3.1.5.2. Colocar los tubos en un baño de agua a 85°C y dejar reposar 10 min. Sacar los tubos, enfriarlos rápidamente y colocarlos en baño de hielo. Filtrar, recoger el filtrado en un tubo de ensaye. Agregar al filtrado 0,5 - 1,0 mL de solución de almidón.

**B.3.1.6. Interpretación de resultados.**

La aparición de un color azul grisáceo que va desde el azul hasta el azul morado (de acuerdo con la concentración de cloro presente), indica la presencia de cloro.

**B.3.1.7. Expresión de resultados.**

Prueba positiva o negativa
----------------------------

**B.3.2. Sales Cuaternarias de Amonio (prueba cualitativa).****B.3.2.1. Principio del método**

Cuando se hace reaccionar el ion cuaternario de amonio en medio alcalino con un indicador (anaranjado de metilo) se forma un complejo que es extraído con cloroformo, el cual en medio ácido da un color magenta.

**B.3.2.2. Materiales**

- B.3.2.2.1. Matraces Erlenmeyer de 125 mL.
- B.3.2.2.2. Mortero de porcelana de 10 cm de diámetro.
- B.3.2.2.3. Embudos de filtración.
- B.3.2.2.4. Tubos de ensaye.
- B.3.2.2.5. Pipetas graduadas de 10 mL.

**B.3.2.3. Reactivos.**

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y por agua debe entenderse agua destilada.

- B.3.2.3.1. Anaranjado de metilo ( $C_{14}H_{14}N_3NaO_3S$ ). Solución acuosa al 0,15%.
- B.3.2.3.2. Solución acuosa de hidróxido de sodio (NaOH). Disolver 66,5 g de hidróxido de sodio en 100 mL de agua.
- B.3.2.3.3. Cloroformo ( $CHCl_3$ ).
- B.3.2.3.4. Sulfato de sodio anhídrico ( $Na_2SO_4$ ).
- B.3.2.3.5. Ácido clorhídrico (HCl) 2N.

**B.3.2.3.6.** Cloruro de benzalconio [cloruro de n-alquil-(C<sub>12</sub> a C<sub>18</sub>) bencildimetil amonio, con un intervalo de peso molecular de 351-380 y contenido de cadenas de los grupos alquilo con 12 y 16 átomos de carbono], al 0,06%. Para prepararlo considerar la concentración inicial del reporte del fabricante.

**B.3.2.4. Procedimiento.**

**B.3.2.4.1.** Colocar 25 mL de leche en un matraz Erlenmeyer, agregar 0,5 mL de solución acuosa de anaranjado de metilo, 1 mL de solución acuosa de hidróxido de sodio y 20 mL de cloroformo, agitar 3 min.

**B.3.2.4.2.** Pasar la emulsión resultante a un mortero al que previamente se le han agregado 50 g de sulfato de sodio anhídrico, triturar perfectamente, agregar 20 mL de cloroformo y filtrar. Al filtrado agregar 5 mL de ácido clorhídrico 2 N y agitar.

**B.3.2.4.3.** Preparar una solución control de color, colocando en un matraz Erlenmeyer 25 mL de leche y 0,5 mL de la solución de cloruro de benzalconio al 0,06%. Proceder igual que en la muestra.

**B.3.2.5. Interpretación de resultados.**

Un color magenta cereza en la capa acuosa es una prueba positiva de cantidades mayores de 1 mg/kg de sales cuaternarias de amonio.

**B.3.2.6. Expresión de resultados.**

Prueba positiva o negativa.

**B.3.3. Oxidante (prueba cualitativa).****B.3.3.1. Principio del método.**

Está basado en la formación de un compuesto colorido al hacer reaccionar el agente oxidante (peróxido de hidrógeno) que contenga la muestra con pentóxido de vanadio en presencia de ácido sulfúrico al 6% (v/v)

**B.3.3.2. Materiales.**

- B.3.3.2.1. Tubos de ensaye de 15 mL.
- B.3.3.2.2. Pipetas graduadas de 5 y 10 mL.
- B.3.3.2.3. Probetas de 100 mL.

**B.3.3.3. Reactivos.**

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y por agua debe entenderse agua destilada.

**B.3.3.3.1.** Solución de ácido sulfúrico al 6% (v/v)

En un vaso de precipitados medir 94 mL de agua y lentamente resbalando por las paredes, adicionar 6 mL de  $H_2SO_4$  concentrado.

**B.3.3.3.2.** Solución de pentóxido de vanadio ( $V_2O_5$ ).

Disolver 1 g de pentóxido de vanadio en 100 mL de ácido sulfúrico 6 + 94.

**B.3.3.4. Procedimiento.**

En un tubo de ensaye medir 10 mL de leche y agregarle de 0,5 a 1,0 mL del reactivo de pentóxido de vanadio.

**B.3.3.5. Interpretación de Resultados.**

La aparición de un color rosa o rojo, indica la presencia de peróxido de hidrógeno (oxidante).

**B.3.3.6. Expresión de resultados.**

Prueba positiva o negativa.

**B.3.4. Determinación de Formaldehído (prueba cualitativa).****B.3.4.1. Principio del método.**

Se basa en la reacción del formaldehído con la sal disódica del ácido cromotrópico formando una coloración de lila a púrpura.

**B.3.4.2. Equipo.**

B.3.4.2.1 Equipo de destilación Kjeldahl.

**B.3.4.3. Materiales.**

B.3.4.3.1. Matraz Kjeldahl de 800 mL.

B.3.4.3.2. Material común de laboratorio.

**B.3.4.4. Reactivos.**

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

B.3.4.4.1. Ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ).

B.3.4.4.2. Sal disódica del ácido cromotrópico (  $C_{10}H_8Na_2O_6S_2$ ).

B.3.4.4.3. Ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$ ).

B.3.4.4.4. Formaldehído ( $CH_2O$ ) al 37%, densidad = 1,08 g/L.

B.3.4.4.5. Solución de ácido sulfúrico al 72%. Verter 150 mL de ácido sulfúrico en 100 mL de agua y enfriar.

B.3.4.4.6. Solución saturada de sal disódica del ácido cromotrópico. Disolver 500 mg de sal disódica del ácido cromotrópico en 100 mL de solución de ácido sulfúrico al 72%. Enfriar a temperatura ambiente.

B.3.4.4.7. Solución de formaldehído de 40 mg/L. Tomar 1 mL de formaldehído y aforar a 1 L con agua.

**B.3.4.5. Procedimiento.**

B.3.4.5.1. En el matraz de Kjeldahl tomar 100 mL de leche, adicionar 100 mL de agua y acidificar con 2 mL ácido fosfórico adiconando 1 mL de exceso. Destilar 50 mL.

B.3.4.5.2. En un tubo de ensaye poner 1 mL del destilado y 5 mL de solución saturada de sal disódica del ácido cromotrópico, colocarlo en baño maría a ebullición durante 15 minutos. Observar durante este periodo de calentamiento.

B.3.4.5.3. Preparar una solución control de color, colocando en un matraz Kjeldahl, 100 mL de leche y 1 mL de solución de formaldehído. Proceder como se describió en los numerales B.3.4.5.1 y B.3.4.5.2.

**B.3.4.6. Interpretación de resultados.**

La aparición de un color lila hasta púrpura indica la presencia de formaldehído.

**B.3.4.7. Expresión de resultados.**

Prueba positiva o negativa.

**B.3.5. Inhibidores Determinados por Pruebas Microbiológicas (residuos de antibióticos).****B.3.5.1. Principio del método.**

Las substancias inhibidoras del crecimiento bacteriano presentes en la leche, se ponen de manifiesto por halos de inhibición medibles, que se forman cuando se impregnan discos de papel filtro con la muestra y se depositan sobre la superficie de una placa de agar inoculado con esporas de *B. stearothermophilus*.

**B.3.5.2. Equipo.**

B.3.5.2.1. Autoclave.

B.3.5.2.2. Centrifuga (de preferencia refrigerada).

B.3.5.2.3. Balanza granataria, de dos platillos, sensibilidad 0,1 g y capacidad de 1000 g.

B.3.5.2.4. Balanza de precisión o analítica, turbidímetro o uso de estándares de McFarland

B.3.5.2.5. Incubadora con termostato que evite variaciones mayores a 1,0°C.

B.3.5.2.6. Microscopio óptico.

B.3.5.2.7. Nefelómetro de McFarland.

B.3.5.2.8. Equipo para tinción de Gram y esporas.

**B.3.5.3. Materiales.**

B.3.5.3.1. Asa y portaasa bacteriológicas.

B.3.5.3.2. Cajas Petri de vidrio de 100 X 20 mm con tapa de porcelana vidriada en la parte exterior o su equivalente en plástico, colocando un cojinete de papel filtro en la tapa.

B.3.5.3.3. Discos de papel de 12,7 mm de diámetro gruesos, de velocidad media y con alta retención (S&S 740 E o equivalentes en poder de absorción, calidad y pureza).

B.3.5.3.4. Matraces Erlenmeyer de 250 mL.

B.3.5.3.5. Micropipeta con capacidad para medir 90  $\mu$ L.

B.3.5.3.6. Pinzas de disección con punta fina.

B.3.5.3.7. Porta objetos y puente de tinción.

B.3.5.3.8. Tubos de cultivo con rosca de 13 X 100 mm.

B.3.5.3.9. Vernier o medidor de halos

B.3.5.3.10. Frascos con tapón de rosca

**B.3.5.4. Reactivos.**

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y por agua debe entenderse agua destilada.

**B.3.5.4.1.** Subcultivo de *Geobacillus stearothermophilus* ATCC10149 o *Bacillus calidolactis* ATCC 10149.

**B.3.5.4.2. Agar indicador PM.**

Ingredientes	Cantidad (g)
Extracto de carne	3,0
Peptona	5,0
Triptona	1,7
Soytona	0,3
Dextrosa	5,25
Cloruro de sodio	0,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,25
Polisorbato 80	0,06
Púrpura de Bromocresol	0,06
Agar	15,0

## Preparación:

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada. Calentar hasta disolución completa del agar. Ajustar el pH, si es necesario. Esterilizar a 121°C durante 15 min.

pH final 7,8 ± 0,2. Distribuir en placas como se indica en B.3.5.5.5.

**B.3.5.4.3. Caldo soya tripticasa (CST) sin dextrosa.**

Ingredientes	Cantidad (g)
Peptona de caseína	17,0
Peptona de soya	3,0
Cloruro de sodio	5,0
Fosfato dipotásico	2,5

## Preparación:

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada. Ajustar el pH. Distribuir en frascos en cantidades según se requiera. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

pH final 7,3 ± 0,2.

**B.3.5.4.4. Agar Soya Trypticasa (AST).**

Ingredientes	Cantidad (g)
Peptona de caseína	15,0
Peptona de soya	5,0
Cloruro de sodio	5,0
Agar	15,0

## Preparación:

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada. Calentar hasta disolución completa de agar. Ajustar el pH, si es necesario. Esterilizar a 121°C durante 15 min. Enfriar a 50-60°C y distribuir a placas de Petri. pH final 7,3 ± 0,2.

**B.3.5.4.5.** Penicilinasa ( - lactamasa). Se pueden adquirir discos impregnados, de marca comercial que funcionan satisfactoriamente.

**B.3.5.4.6.** Penicilina G (sustancia de referencia).

**B.3.5.4.7.** Solución estéril de NaCl al 0,85% (m/v) (SS).

**B.3.5.4.8.** Solución amortiguadora de fosfatos, pH 6.

**B.3.5.5. Procedimiento****B.3.5.5.1. Preparación de la solución de trabajo de Penicilina G de referencia.**

Pesar 30 mg de Penicilina G de referencia, dentro de una atmósfera de humedad relativa menor a 50%. Disolver en solución amortiguadora de fosfatos para obtener una concentración de 100-1000 Unidades Internacionales/mL. Almacenar en la oscuridad entre 0-4,0°C y usar dentro de los dos días siguientes a su preparación.

**B.3.5.5.2. Preparación del inóculo.**

**B.3.5.5.2.1.** Mantener el cultivo de *B. stearothermophilus* en medio inclinado de AST, haciendo pases semanales. A partir de este cultivo inocular de 3 a 5 placas de AST, incubar a 55°C -64°C de 18-24 h. Cosechar el cultivo de cada placa con 2-3 mL de SS e inocular 3 matraces conteniendo cada uno 150 mL de CST sin dextrosa. Incubar a 55 - 64  $\pm$  2°C.

**B.3.5.5.2.2.** Periódicamente hacer una observación microscópica para determinar el grado de esporulación del cultivo (aproximadamente el 80% del cultivo en 72 h, está en fase esporulada). Centrifugar las células a 5000 rpm durante 15 min.

**B.3.5.5.2.3.** Decantar el sobrenadante y resuspender las células en SS. Repetir el lavado, suspender las células en 30 mL de SS y almacenar entre 0-4,0°C. Esta suspensión puede mantenerse viable durante 6-8 meses. Verificar su viabilidad mediante cultivo en placas de AST.

**B.3.5.5.3 Solución estándar de leche.**

Diluir la solución de trabajo de Penicilina G en leche libre de inhibidores para obtener una concentración de 0,008 UI/mL. Usar recientemente preparado o almacenar entre 0-4,0°C durante no más de 2 días, también se puede distribuir en pequeños volúmenes y congelar durante un tiempo no mayor a 6 meses.

**B.3.5.5.4. Control Negativo.**

Leche fluida con un contenido de grasa de 0,0% a 3,8% y sólidos totales menos del 13%. Comprobar la ausencia de sustancias inhibidoras (comercialmente disponible).

**B.3.5.5.5. Preparación de las placas.**

**B.3.5.5.5.1.** Inocular el medio de agar indicador PM, fundido y enfriado a 55-64°C con una suspensión de esporas (B.3.5.5.2.3.), en cantidad suficiente para obtener  $1 \times 10^6$ /mL de medio (cada laboratorio deberá ajustar el inóculo dependiendo de la concentración de esporas obtenida). De esta suspensión, pasar 7,0 mL a placas de Petri y dejar solidificar sobre una superficie nivelada.

**B.3.5.5.5.2.** Utilizar las placas recientemente preparadas o almacenar entre 0-4,0°C en bolsas de plástico selladas e identificadas con la fecha de preparación. No usar después de 5 días a su preparación.

**B.3.5.5.6. Prueba Preliminar.**

**B.3.5.5.6.1.** Agregar 90  $\mu$ L de la muestra, usando micropipeta, asegurarse de que las puntas estén bien colocadas, en posición vertical y en el centro del disco, evitar la introducción de burbujas o colocar sobre la superficie de la muestra bien mezclada un disco de papel sostenido con las pinzas, hasta que se impregne completamente por capilaridad. Eliminar cualquier exceso de leche, tocar ligeramente la superficie interna de la tapa y colocar el disco inmediatamente sobre la placa de agar. Asegurar un completo contacto del papel filtro con el agar, presionar con las pinzas suavemente (repetir esta operación con todas las muestras).

**B.3.5.5.6.2.** Colocar un disco control en el centro impregnado con el estándar de leche (0,008 UI/mL de Penicilina G). Marcar e identificar los controles y las muestras. Se recomienda no colocar más de 7 discos por placa: 6 en la orilla y uno en el centro.

**B.3.5.5.6.3.** Verificar que todos los discos estén uniformemente absorbidos sin presentar exceso de leche y colocados en forma adecuada. Invertir las placas e incubar a 55-64°C  $\pm$  2°C hasta que se observe una zona de inhibición bien definida (16 - 20 mm) alrededor del disco control.

**B.3.5.5.6.4.** Examinar las zonas de inhibición de las muestras y medir los halos con vernier. Las zonas de inhibición  $\leq$  14 mm se leen como negativo, zonas  $>$  14 mm indican la presencia de inhibidores, lo cual deberá confirmarse.

**B.3.5.5.7. Prueba Confirmatoria.**

Calentar las muestras a 82°C  $\pm$  2 min. Enfriar rápidamente y continuar como se indica en B.3.5.5.5. Colocar también discos impregnados de penicilinasa (comerciales) o agregar 0,05 mL de penicilinasa a 5 mL de muestra e impregnar los discos.

**B.3.5.5.8. Controles**

**B.3.5.5.8.1.** Cuando se aplica este método, el analista debe estar seguro de que cualquier grado de actividad antimicrobiana detectada, proviene de la muestra y nunca de las condiciones ambientales, del equipo o reactivos usados; ni del propio analista.

**B.3.5.5.8.2.** Se requiere, por lo tanto, aplicar las buenas prácticas de laboratorio y los controles adecuados, a lo largo de todo el análisis.

**B.3.5.5.8.3.** El control positivo que contiene solución de referencia de Penicilina G a una concentración de 0,008 UI/mL debe producir zonas de inhibición claras y bien definidas de aproximadamente 17-20 mm de diámetro. Si éstas no se presentan, la prueba no demuestra la sensibilidad adecuada y deberá repetirse.

**B.3.5.5.8.4.** La sensibilidad de este ensayo es normalmente  $\geq$  0,008 UI/mL. El control del diluyente, siempre debe dar resultados negativos.

**B.3.5.5.9. Precauciones al realizar la prueba.**

**B.3.5.5.9.1.** Para colocar los discos, utilizar pinzas limpias y flameadas.

**B.3.5.5.9.2.** Tocar con el disco la superficie de las muestras y permitir que el disco se sature por capilaridad. Las pinzas deben flamearse y enfriarse entre cada muestra.

**B.3.5.5.9.3.** Tocar la boca del recipiente con el disco, para eliminar el exceso de leche.

**B.3.5.5.9.4.** Colocar el disco sobre el agar a una distancia de aproximadamente 9 mm de la orilla hacia adentro y separados entre cada disco, unos 10 mm como mínimo. Presionar el disco suavemente y asegurarse de que hace contacto toda su superficie con el agar.

**B.3.5.5.9.5.** Aplicar el control positivo en el centro de la placa y el control negativo en cualquiera de los seis lugares de la orilla.

**B.3.5.5.9.6.** Incubar las placas en posición invertida, en una cámara húmeda, a la temperatura y el tiempo indicados en la metodología.

**B.3.5.5.10. Precauciones en el uso de la micropipeta.**

**B.3.5.5.10.1.** Homogeneizar la muestra. Fijar la punta a la micropipeta y en posición vertical oprimir el émbolo hasta el primer tope.

**B.3.5.5.10.2.** Introducir la punta 1 cm debajo de la superficie de la muestra. Soltar el émbolo y dejar que la punta se llene.

**B.3.5.5.10.3.** Si el émbolo se suelta rápidamente, el volumen de leche tomado no será uniforme. Si la punta no está llena en forma correcta, después de soltar el émbolo, descartar y repetir la operación.

**B.3.5.6. Interpretación de los Resultados.**

Las pruebas: preliminar y confirmatoria, pueden dar lugar a los siguientes resultados:

**B.3.5.6.1.** Ausencia de zonas de inhibición en la prueba preliminar: la prueba es negativa a sustancias inhibitorias.

**B.3.5.6.2.** Zonas de inhibición alrededor de discos con muestra sin penicilinasa y ausencia de zonas de inhibición alrededor de discos tratados con penicilinasa, en prueba confirmatoria: la prueba es positiva a residuos de -lactámicos.

**B.3.5.6.3.** Presencia de zonas de inhibición de igual tamaño en ambos discos (tratados y no tratados con penicilinasa): prueba positiva a sustancias inhibidoras diferentes a -lactámicos.

**B.3.5.6.4.** Presencia de zonas de inhibición de menor tamaño (4 mm) en discos tratados con penicilinasa que los no tratados, en prueba confirmatoria: prueba positiva a residuos de -lactámicos y a otros inhibidores.

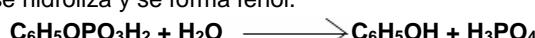
**B.3.5.7. Expresión de Resultados.**

Prueba positiva o negativa.

**B.4. Determinación de Fosfatasa Residual en leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos.**

**B.4.1. Principio del método.**

La muestra se incuba con fenilfosfato en solución reguladora de hidróxido de bario. Si la fosfatasa activa está presente, el fenilfosfato se hidroliza y se forma fenol.



Si la leche utilizada en la elaboración del producto ha sido pasteurizada eficientemente, la fosfatasa se inactiva y no hay hidrólisis.

El fenol formado se determina colorimétricamente haciendo reaccionar con 2,6-dibromoquinonacloroimida (B.Q.C.), obteniéndose un color azul, cuya intensidad se mide espectrofotométricamente a 610 nm.

**B.4.2. Equipo.**

B.4.2.1. Baño de agua con control de temperatura a 37-40°C.

B.4.2.2. Parrilla de calentamiento, de control termostático.

B.4.2.3. Espectrofotómetro de UV-Visible o fotocolorímetro disponible para utilizarse a 610 nm con celdas de 1 cm de paso óptico.

B.4.2.4. Balanza analítica con una precisión de 0,1 mg.

**B.4.3. Materiales.**

Todo el material de vidrio utilizado debe someterse a una temperatura entre 85-90°C durante una hora.

B.4.3.1. Tubos de ensaye de 15 x 150 mm.

B.4.3.2. Tubos de ensaye con graduación de 0 a 10 mL.

B.4.3.3. Pipetas graduadas en 0,1 mL de 1, 5 y 10 mL.

B.4.3.4. Embudos de filtración, tallo corto, de 5 cm de diámetro.

B.4.3.5. Matraces volumétricos de diferentes capacidades.

B.4.3.6. Papel filtro Whatman No. 42 o No. 2 o su equivalente.

B.4.3.7. Perilla de succión

B.4.3.8. Material común de laboratorio.

**B.4.4. Reactivos.**

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico y libres de fenol a menos que se indique otra especificación y por agua debe entenderse agua destilada.

**B.4.4.1.** Hidróxido de bario octahidratado  $[\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}]$ .

**B.4.4.2.** Ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ).

**B.4.4.3.** Metaborato de sodio ( $\text{NaBO}_2$ ).

**B.4.4.4.** Cloruro de sodio (NaCl).

**B.4.4.5.** Borato de sodio decahidratado (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10 H<sub>2</sub>O).

**B.4.4.6.** Fenilfosfato disódico (Na<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O. Cristales libres de fenol. Conservar en congelación o en desecador.

**B.4.4.7.** Alcohol butílico (C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O). Punto de ebullición 116-118°C.

**B.4.4.8.** Sulfato de zinc heptahidratado (Zn SO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O).

**B.4.4.9.** Sulfato de cobre pentahidratado (CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O).

**B.4.4.10.** 2,6 Dibromoquinonacloroimida (BQC) C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>OBr<sub>2</sub>NCI.

**B.4.4.11.** Fenol (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O).

**B.4.4.12. Solución reguladora de hidróxido de bario-borato (pH 10,6 ± 0,15 a 25°C).**

Disolver en agua caliente 25 g de hidróxido de bario octahidratado (fresco, no deteriorado), enfriar y diluir a 500 mL. Por separado, disolver 11 g de ácido bórico y diluir a 500 mL. Calentar cada una de las soluciones a 50°C, mezclarlas, agitar y enfriar aproximadamente a 20°C. Filtrar y conservar el filtrado en recipiente perfectamente tapado y en refrigeración.

Cuando se aplique para leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado, pasteurizados descremados, sin sabor, diluir 500 mL de este regulador con 500 mL de agua.

Cuando se aplique para leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado, pasteurizados con sabor, diluir esta solución reguladora con un cuarto de su volumen de agua (ejemplo 80 mL de este regulador con 20 mL de agua).

Para leche de cabra esta solución reguladora se prepara pesando 26 g de hidróxido de bario octahidratado en lugar de 25 g.

**B.4.4.13. Soluciones reguladoras de trabajo con fenil fosfato disódico.**

**B.4.4.13.1. Para leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado pasteurizados.**

Disolver 0,1 g de fenil fosfato disódico en 100 mL de una mezcla de 50 mL de la solución reguladora de hidróxido de bario-borato (B.4.4.12.). En caso de que el fenil fosfato disódico no esté libre de fenol debe ser purificado de la siguiente manera:

Disolver 0,5 g de la sal en 4,5 mL de agua; agregar 0,5 mL de la solución reguladora de hidróxido de bario-borato (B.4.4.12.) y dos gotas de reactivo B.Q.C. (B.4.4.18); dejar en reposo 30 min. Al cabo de este tiempo agregar 2,5 mL de alcohol butílico y dejar en reposo hasta que se separe el alcohol, con objeto de eliminar el color. Eliminar el alcohol con gotero o pipeta Pasteur y descartar.

Diluir 1 mL de la solución acuosa a 100 mL con el regulador de substrato (B.4.4.12.). Calentar la solución a 85°C por 2 min, tapar inmediatamente y guardar en refrigeración. Esta solución madre debe mantenerse en el refrigerador durante algunos días. Al emplearse, desarrollar el color y eliminarlo por extracción como se ha indicado anteriormente. La solución es estable por un año si se encuentra bien guardada y con mínima exposición al aire. Antes de usar, desarrollar el color y reextraer si es necesario.

**B.4.4.13.2. Para productos con sabor.**

Disolver 0,1 g de fenil fosfato disódico en 100 mL de una mezcla de 80 mL de la solución de hidróxido de bario (B.4.4.12.1) y 20 mL de agua, mezclar bien. Conservar en frasco color ámbar y en refrigeración

**B.4.4.13.3. Para helados y sorbetes.**

Disolver 0,1 g de fenil fosfato disódico en 80 mL de solución de borato-hidróxido de bario (B.4.4.12.) y 20 mL de agua, mezclar bien. Conservar en frasco color ámbar y en refrigeración.

**B.4.4.13.4. Para sorbetes.**

Disolver 0,1 g de fenil fosfato disódico en 50 mL de solución de borato-hidróxido de bario (B.4.4.12) y 50 mL de agua, mezclar bien. Conservar en frasco color ámbar y en refrigeración.

**B.4.4.13.5. Para quesos y cremas pasteurizadas.**

Disolver 0,1 g de fenil fosfato disódico en 50 mL de solución de borato-hidróxido de bario (B.4.4.12) y 50 mL de agua, mezclar bien. Conservar en frasco color ámbar y en refrigeración.

**B.4.4.13.6. Para mantequillas.**

Disolver 0,1 g de fenil fosfato disódico en 100 mL de solución de borato-hidróxido de bario (B.4.4.23) y 50 mL de agua, mezclar bien. Conservar en frasco color ámbar y en refrigeración

**B.4.4.14. Solución reguladora para desarrollo de color (pH 9,8 ± 0,15 a 25°C).**

Disolver 6 g de metaborato de sodio y 20 g de cloruro de sodio en agua y diluir a un litro. Conservar en refrigeración.

**B.4.4.15. Solución reguladora para dilución de color. (Para el caso que la muestra haya salido fuertemente positiva).** Diluir 100 mL de la solución anterior (B.4.4.14) a un litro con agua.

**B.4.4.16. Solución reguladora patrón para calibrar el potenciómetro (0,00996 M, pH 9,18 a 25°C).**

Disolver 3,80 g de borato de sodio decahidratado en agua y diluir a un litro (en ningún caso debe secarse esta sal en el horno, antes de emplearse).

Para evitar contaminación con CO<sub>2</sub> mantener perfectamente tapado el recipiente o protegerlo con un tubo de cal soda.

Esta solución reguladora debe utilizarse dentro de los 10 min siguientes a su extracción del frasco.

**B.4.4.17. Reactivo precipitante de proteínas zinc-cobre.****B.4.4.17.1. Para leche, fórmula láctea o producto lácteo combinado pasteurizados sin sabor y sorbetes.**

Disolver 3 g de sulfato de zinc heptahidratado y 0,6 g de sulfato de cobre pentahidratado en agua y diluir a 100 mL.

**B.4.4.17.2. Para leche, fórmula láctea o producto lácteo combinado, pasteurizados con sabor, helados y sorbetes.**

Disolver 4,5 g de sulfato de zinc heptahidratado y 0,1 g de sulfato de cobre pentahidratado en agua y llevar a un volumen de 100 mL.

**B.4.4.17.3. Para quesos**

Disolver 6,0 g de sulfato de zinc heptahidratado en agua y diluir a 100 mL.

**B.4.4.17.4. Para crema pasteurizada.**

Disolver 3,0 g de sulfato de zinc heptahidratado y 0,6 g de sulfato de cobre pentahidratado en agua y llevar a un volumen de 100 mL.

**B.4.4.17.5. Para mantequillas.**

Disolver 4,5 g de sulfato de zinc heptahidratado y 0,1 g de sulfato de cobre pentahidratado en agua y llevar a un volumen de 100 mL. En caso de que la mantequilla esté ácida, sustituir esta solución por la preparada en B.4.4.17.3.

**B.4.4.18. Solución de 2,6-dibromoquinonacloroimida (B.Q.C.) ( $C_6H_2OBr_2NCI$ ).**

Disolver 40 mg de polvo de BQC en 10 mL de alcohol etílico y conservar esta solución en frasco gotero ámbar. Guardar en refrigeración. La solución es estable durante una semana. Desechar si se torna color café.

Antes de usarse los nuevos frascos de BQC deberán ser comprobados preparando curvas patrón con fenol y comparados con los de la solución en buen estado; hacer esta comprobación cuando menos dos veces por año.

**B.4.4.19. Solución de sulfato de cobre para patrones al 0,05%.**

Disolver 0,05 g de sulfato de cobre pentahidratado en 100 mL de agua.

**B.4.4.20. Solución de alcohol butílico.**

Para ajustar su pH, mezclar un litro de éste, con 50 mL de la solución reguladora para desarrollo de color (B.4.4.15). Conservar en frasco de tapón de vidrio esmerilado.

**B.4.4.21. Solución madre de fenol de 1 mg/mL.**

Pesar exactamente 1,0 g de fenol, transferir a un matraz volumétrico de un litro y llevar al volumen con agua. Mezclar perfectamente. Esta solución es estable durante varios meses mantenida en refrigeración.

**B.4.4.22. Solución patrón de fenol de 10  $\mu$ g/mL o 10 unidades/mL (solución de trabajo).**

Diluir 10 mL de la solución madre (B.4.4.21) a un litro con agua y mezclar perfectamente.

Para preparar soluciones patrón más diluidas, diluir 5, 10, 30 y 50 mL de esta solución en 100 mL para que respectivamente contengan 0,5; 1,0; 3,0 y 5,0  $\mu$ g o unidades de fenol por mL. Estas soluciones patrón mantenidas en refrigeración no se deben emplear después de una semana.

De manera semejante preparar las soluciones patrón que contengan 20, 30 y 40 unidades por mL. Guardar en refrigeración y permitir que esté a la temperatura ambiente en el momento de su uso.

**B.4.4.23. Solución reguladora de borato-hidróxido de bario (18:8 m/v). únicamente para mantequillas.**

Disolver en agua caliente 18 g de hidróxido de bario octahidratado (fresco, no deteriorado) y diluir a 500 mL. Por separado, disolver 8 g de ácido bórico en agua caliente, enfriar y diluir a 500 mL. Calentar cada una de las soluciones a 50°C, mezclarlas, agitar y enfriar aproximadamente a 20°C. Filtrar y conservar el filtrado en recipiente perfectamente tapado y en refrigeración.

**B.4.4.24. Solución reguladora de sustrato (para valorar la pasteurización).**

Disolver 0,10 g de fenilfosfato disódico en 100 mL de una mezcla de 50 mL de la solución reguladora de hidróxido de bario-borato (B.4.4.12) en 50 mL de agua. En caso de no obtener esta sal libre de fenol, debe ser purificada como sigue:

Disolver 0,5 g de la sal en 4,5 mL de agua; agregar 0,5 mL de la solución reguladora de hidróxido de bario-borato (B.4.4.12) y dos gotas de reactivo B.Q.C. (B.4.4.18); dejar en reposo 30 min. Al cabo de este tiempo agregar 2,5 mL de alcohol butílico y dejar en reposo hasta que se separe el alcohol, con objeto de eliminar el color. Eliminar el alcohol con gotero o pipeta Pasteur.

Diluir 1 mL de la solución acuosa a 100 mL con el regulador de sustrato (B.4.4.12.). Calentar la solución a 85°C por 2 min, tapar inmediatamente y guardar en el refrigerador. Esta solución madre debe mantenerse en el refrigerador durante algunos días. Al emplearse, desarrollar el color y eliminarlo por extracción como se ha indicado anteriormente. La solución es estable por un año si se encuentra bien guardada y con mínima exposición al aire. Antes de usar, desarrollar el color y reextraer si es necesario.

**B.4.5. Procedimiento****B.4.5.1. Preparación de la curva patrón de comparación.**

**B.4.5.1.1.** En series de tubos (de preferencia graduados en 5 y 10 mL), medir volúmenes adecuados de la solución patrón de trabajo, a fin de obtener un margen favorable de patrones según las necesidades. Se recomienda incluir 0,0 (testigo), 0,5; 5,0; 1,0; 3,0; 10,0; 20,0; 30,0 y 40,0 unidades.

**B.4.5.1.2.** Con objeto de aumentar la intensidad del color azul y la estabilidad de los patrones agregar a cada tubo 1 mL de la solución de sulfato de cobre al 0,05% (4.4.19) y a continuación 5 mL de la solución reguladora para dilución de color (B.4.4.15). Llevar a un volumen de 10 mL con agua. Agregar 4 gotas de la solución B.Q.C. (B.4.4.18.) mezclar y dejar en reposo 30 min, a temperatura ambiente para desarrollo de color.

**B.4.5.1.3.** En caso de emplear el procedimiento de extracción con alcohol butílico normal, proceder como se indica más adelante.

**B.4.5.1.4.** Hacer la lectura de la intensidad del color con un espectrofotómetro a 610 nanómetros, restar el valor que alcanza la lectura del testigo a la de cada una de las soluciones patrones de fenol; finalmente construir una curva de calibración la cual debe ajustarse mediante el método de mínimos cuadrados (regresión lineal).

**B.4.5.1.5.** Si se pretende efectuar una comparación visual de los patrones, se conservan en refrigeración y se prepara una nueva serie cada semana.

**B.4.5.1.6.** Para el caso de la determinación de fosfatasa en leche, fórmula láctea o producto lácteo combinado, es fundamental la homogenización antes de desarrollar la técnica. Colocar varios millilitros en un tubo de ensaye pequeño, tapar y guardar en el refrigerador; si es necesario el empleo de un conservador agregar cloroformo en concentraciones de 1-3 mL por cada 100 mL de leche, fórmula láctea o producto lácteo combinado.

**B.4.5.2. Preparación de la Muestra.****B.4.5.2.1. Leche fórmula láctea o producto lácteo combinado.**

**B.4.5.2.1.1.** Medir con pipeta 1 mL de muestra preparada de leche en 2 o 3 tubos (se necesita un tubo como testigo y se recomienda preparar dos o más tubos para determinaciones por duplicado); en caso de la leche de cabra emplear 3,0 mL de la muestra.

**B.4.5.2.1.2.** Agregar a cada tubo 10 mL de la solución reguladora de trabajo con fenil fosfato disódico (B.4.4.13.1.) o para las determinaciones cuantitativas en leche cruda; tapar los tubos y mezclar (pH 10,0 ± 0,15).

**B.4.5.2.1.3.** Calentar el tubo testigo en un baño de agua a ebullición cubierto durante 1 min (la temperatura interna del tubo debe estar entre 85-90°C). Dejar enfriar a temperatura ambiente y mezclar de nuevo con el agitador.

**B.4.5.2.2. Productos saborizados, helados y sorbetes.**

**B.4.5.2.2.1.** Pesar 1,0 g de muestra (de preferencia por duplicado), colocar en un tubo (si la muestra es pegajosa, pesar en papel encerado de 2,5 x 2,5 cm e insertar el papel con la muestra dentro del tubo). De la misma forma pesar otra cantidad igual que servirá de muestra testigo.

**B.4.5.2.2.2.** Calentar el tubo testigo en un baño de agua a ebullición cubierto durante 1 min (la temperatura interna del tubo debe estar entre 85-90°C). Dejar enfriar a temperatura ambiente y mezclar de nuevo con el agitador.

**B.4.5.2.2.3.** Agregar a los tubos con muestra 1 mL de la solución reguladora de trabajo correspondiente (B.4.4.13.), mezclar con el agitador de vidrio. A partir de esta etapa manejar de igual forma el testigo y las muestras.

**B.4.5.2.2.4.** Agregar 10 mL de la solución reguladora correspondiente:

Para productos saborizados (B.4.4.13.2).

Para helados y sorbetes (B.4.4.13.3).

Para sorbetes (B.4.4.13.4).

**B.4.5.2.3. Mantequilla.**

**B.4.5.2.3.1.** Pesar 1,0 g de muestra (de preferencia por duplicado) en piezas de papel encerado de 2,5 cm, insertar el papel con la muestra dentro de un tubo de ensaye. De la misma forma pesar otra cantidad de muestra que servirá de testigo.

**B.4.5.2.3.2.** Calentar el tubo con la muestra testigo en un baño de agua a ebullición y cubierto, durante un minuto (la temperatura interna del tubo debe estar entre 85 y 90°C), y dejar enfriar a temperatura ambiente. A partir de esta etapa manejar de igual manera el testigo y las muestras.

Agregar a cada tubo 10 mL de la solución reguladora de trabajo (B.4.4.13.6), tapar los tubos y mezclar.

**B.4.5.2.4. Quesos y crema pasteurizada.**

**B.4.5.2.4.1.** Pesar 0,5 g de queso o 1,0 g de crema (de preferencia por duplicado), colocar en tubo (si la muestra es pegajosa, pesar en papel encerado de 2,5 x 2,5 cm e insertar el papel con la muestra dentro del tubo). De la misma forma, pesar otra cantidad de la muestra que servirá como testigo.

**B.4.5.2.4.2.** Agregar al tubo que contiene la muestra testigo 1 mL de solución reguladora de borato-hidróxido de bario. Calentar en un baño a ebullición y cubierto, durante un minuto.

**B.4.5.2.4.3.** Agregar a los tubos con muestra, 10 mL de la solución reguladora de trabajo correspondiente (B.4.4.13.7), mezclar con el agitador de vidrio. A partir de esta etapa manejar de igual forma que el testigo y las muestras (excepto para crema vieja o ligeramente agria en donde se agregan 7 mL de la solución reguladora de trabajo y 2 mL de agua) para hacer un volumen total de 10 mL.

**B.4.5.2.4.4.** Mezclar (el agitador de vidrio puede quedarse durante la incubación o retirarse en este paso). Si se retira, enrollar una pieza de 2,5 x 2,5 cm de papel filtro apretado alrededor del agitador y secarlo por rotación mientras se retira el tubo. Introducir el papel en el tubo.

**Nota:** La temperatura interna del tubo que contiene la muestra testigo que debe estar entre 85-90°C, es controlada con un termómetro sumergido en un tubo de tamaño y volumen igual al de las pruebas.

**B.4.5.3. Determinación de Fosfatasa Residual** (Esta parte del procedimiento es común a todos los derivados lácteos).

**B.4.5.3.1.** Inmediatamente después de agregar la solución de substrato, incubar los tubos en baño de agua durante una hora a 37-38°C agitando ocasionalmente durante este tiempo. Trasladar los tubos a un recipiente con agua a ebullición durante 1 min. Dejar enfriar los tubos a la temperatura ambiente por inmersión en un recipiente de agua fría.

**B.4.5.3.2.** Agregar con una pipeta 1 mL de la solución precipitante de proteínas zinc-cobre correspondiente (B.4.4.17) a los tubos de la siguiente manera:

- a)** Para leche, fórmula láctea o producto lácteo combinado, sin sabor y sorbetes adicionar la solución (B.4.4.17.1).
- b)** Para leche, fórmula láctea o producto lácteo combinado, pasteurizados con sabor, helados y sorbetes, adicionar la solución (B.4.4.17.2).
- c)** Para quesos adicionar la solución (B.4.4.17.3).
- d)** Para cremas adicionar la solución (B.4.4.17.4).
- e)** Para mantequillas adicionar la solución (B.4.4.17.5).

**B.4.5.3.3.** Mezclar perfectamente el contenido de los tubos. El pH de la mezcla debe estar entre 9,0-9,1; filtrar (empleando embudos de 5 cm de diámetro y papel filtro No. 42 de 9 cm de diámetro o bien el No. 2 o su equivalente). Recoger 5 mL del filtrado en un tubo, de preferencia graduado en 5 y 10 mL.

**B.4.5.3.4.** Agregar 5 mL de solución reguladora para desarrollo de color (B.4.4.14). El pH de la mezcla debe estar entre 9,3-9,4.

**B.4.5.3.5** Agregar 4 gotas del reactivo B.Q.C. (B.4.4.18), mezclar y dejar a temperatura ambiente durante 30 min para desarrollo de color. En los casos en que se investigue pasteurización deficiente se agregan 2 gotas del reactivo de B.Q.C.

**B.4.5.3.6. Determinar la Intensidad del color azul con cualquiera de los siguientes métodos:**

**a) Método espectrofotométrico.**

Leer las intensidades de color del tubo testigo y de las muestras a 610 nm, restar la lectura del testigo de la lectura del tubo de la muestra y convertir el resultado a unidades de fenol, utilizando la curva patrón (B.4.5.1).

Ordinariamente se hace innecesaria la extracción con alcohol butílico cuando se emplea el espectrofotómetro. En los casos en que se emplee la extracción con este alcohol, purificar el reactivo como se señala en la valoración de la pasteurización (B.4.4.13.1), centrifugar la muestra durante 5 min a fin de romper la emulsión y remover el agua suspendida en la capa alcohólica. Despues de centrifugar, con una pipeta capilar provista de bulbo de hule, separar todo el alcohol butílico. Filtrar y recoger el filtrado en la celda del espectrofotómetro y leer a 610 nm.

**b) Método visual con escala de patrones.**

Comparar los colores de las muestras que dan más de 5 unidades con los tubos de color que contienen patrones de fenol (B.4.5.1).

Para obtener resultados cuantitativos en aquellos casos en que haya variaciones entre 0,5 y 5 unidades de color, hacer la extracción con alcohol butílico, agregando 5 mL de alcohol e invirtiendo lentamente varias veces; centrifugar como se señala en el método anterior, si fuera necesario, para aumentar la claridad de la capa alcohólica y comparar el color con los patrones tratados en igual forma.

En aquellas pruebas en las que durante el desarrollo de color se obtengan resultados fuertemente positivos (por ejemplo con 20 unidades o más) y en las cuales no sean suficientes 4 gotas del reactivo de B.Q.C. (B.4.4.18) para reaccionar con todo el fenol, hacer diluciones colocando nuevos tubos con volúmenes conocidos que se diluyen a 10 mL con la solución reguladora de dilución de color (B.4.4.15) y agregar 2 o más gotas del reactivo B.Q.C. En cada una de estas pruebas diluir el testigo y tratarlo directamente.

De la misma manera en aquellos casos en los que estas nuevas diluciones produzcan nuevamente reacciones fuertemente positivas, todavía será necesario volver a preparar otras diluciones más, hasta que el color quede comprendido entre los de la escala o de la curva del espectrofotómetro.

Para hacer la lectura final, dejar transcurrir 30 min a partir del momento de la adición del reactivo B.Q.C a fin de que se desarrolle totalmente su color. Multiplicar las lecturas de las diluciones por el factor de dilución por 2 en el caso de haber diluido 5 mL; por 10, para aquella dilución inicial 1+9 mL y por 50, en caso de una dilución inicial 1+9 mL, seguida de otra de 2+8 mL.

**B.4.6. Cálculos.**

**B.4.6.1. Para leche, fórmula láctea o producto lácteo combinado, pasteurizados u otros productos lácteos** donde se mide 1 mL de muestra líquida y se adicionan 11 mL de los reactivos (el volumen total del líquido es de 12 mL) y se emplean 5 mL del filtrado.

U. de Fenol/mL = C x 2,4

**B.4.6.2. Para productos saborizados, helados y sorbetes** donde se pesan 1 g de la muestra y se agregan 11 mL de los reactivos (el volumen total del líquido es de 12 mL) y se emplean 5 mL del filtrado.

U. de Fenol/g = C x 2,2

donde:

C = concentración de la muestra obtenida de la gráfica de la curva patrón en unidades fenol/mL.

2,2 y 2,4 = Factores de dilución.

**B.4.6.3. Para mantequilla y crema** donde se pesa 1 g de la muestra y se adicionan 11 mL de los reactivos (el volumen total del líquido es de 12 mL) y se emplean 5 mL del filtrado.

U. de Fenol/g = C x 2,4

**B.4.6.4. Para queso** donde se pesa 0,5 g de muestra y se agregan 11 mL de los reactivos (el volumen total del líquido es de 12 mL) y se emplean 5 mL del filtrado.

U. de Fenol/g = C x 4,4

donde:

C = concentración de la muestra obtenida de la gráfica de la curva patrón en unidades fenol/mL.

2,2 y 4,4 = Factores de dilución con respecto a los diferentes productos.

**B.4.7. Expresión de resultados.**

Unidades de fenol / mL o g.

**B.5. Determinación de Materia Extraña en leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado, dulces de leche, helados, mantequilla y cremas.****B.5.1. Principio del método.**

Los insectos enteros, fragmentos de los mismos, pelos de roedor o alguna materia extraña se separan de la muestra por filtración para su identificación al microscopio.

**B.5.2. Equipo**

B.5.2.1. Balanza analítica con 0,1 mg de sensibilidad.

B.5.2.2. Equipo de filtración al vacío.

B.5.2.3. Microscopio binocular estereoscópico con objetivos que pueden ser de 3, 6, 7 y 10 X, oculares apareados de amplio campo visual de 10, 30 y 100 X, respectivamente.

B.5.2.4. Lámpara para el microscopio o luz natural equivalente.

**B.5.3. Materiales.**

B.5.3.1. Embudo Büchner.

B.5.3.2. Matraz Kitazato.

B.5.3.3. Vasos de precipitados de 1000 mL

B.5.3.4. Caja Petri.

B.5.3.5. Papel de filtración rápida para conteo con líneas paralelas de aproximadamente 5 mm de separación.

B.5.3.6. Material común de laboratorio.

**B.5.4. Reactivos.**

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y por agua debe entenderse agua destilada.

B.5.4.1. Mezcla de glicerina:etanol 1:3 (v/v) (opcional).

**B.5.5. Procedimiento.****B.5.5.1. Preparación de la muestra.****B.5.5.1.1. Productos líquidos.**

Mezclar bien todo el contenido de la muestra.

**B.5.5.1.2. Productos deshidratados.**

Pesar por duplicado 50 g de leche descremada o 65 g de leche entera y reconstituir ajustando el volumen a 500 mL con agua a 40°C.

**B.5.5.2. Determinación.**

B.5.5.2.1. Filtrar toda la muestra sobre un embudo de succión preparado con papel filtro para conteo, tratando de vertirlo uniformemente.

**B.5.5.2.2.** Durante la filtración lavar continuamente el papel filtro con agua a 80°C aproximadamente, para evitar la acumulación de partículas que tapen los poros del papel.

**B.5.5.2.3.** Pasar el papel filtro a una caja Petri y humedecerla con la mezcla glicerina-etanol (opcional). Examinar al microscopio utilizando una luz suficientemente fuerte que muestre los detalles en el papel filtro.

**B.5.5.2.4.** Contar con una aguja de disección sobre toda la superficie del papel, línea por línea y explorar cada pieza del material dado que algunos fragmentos son irreconocibles a menos que se muevan.

**B.5.6** Expresión de resultados.

**B.5.6.1. Productos deshidratados.**

Presencia o ausencia de insectos enteros, fragmentos de insectos, pelos de roedor y cualquier materia extraña que se encuentre en 50 g o 65 g de muestra.

**B.5.6.2. Productos líquidos.**

Presencia o ausencia de insectos enteros, fragmentos de insectos, pelos de roedor y cualquier materia extraña que se encuentre en la cantidad de mL que contenga el envase analizado.

**B.6. Determinación de materia extraña en quesos. Método de filtración.**

**B.6.1. Principio del método.**

La materia extraña debe separarse por sedimentación y posteriormente filtrarse para su observación al microscopio.

**B.6.2. Equipo**

B.6.2.1. Parrilla de calentamiento con agitación magnética.

B.6.2.2. Equipo de filtración al vacío.

B.6.2.3. Microscopio binocular estereoscópico con objetivo que pueden ser de 3,6,7 y 10x y oculares apareados de amplio campo visual de 10, 30 y 100 x respectivamente.

**B.6.3. Materiales**

B.6.3.1. Cuchillo

B.6.3.2. Vaso de precipitados de 2 L

B.6.3.3. Termómetro graduado de 0°C a 100°C

B.6.3.4. Embudo Buchner

B.6.3.5. Matraz Kitasato de 1 L

B.6.3.6. Papel filtro Whatman # 1 de diámetro igual al tamaño del embudo

B.6.3.7 Barra magnética

B.6.3.8. Material común de laboratorio

**B.6.4. Reactivos.**

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

**B.6.4.1. Ácido fosfórico 1:40 ( $H_3PO_4$ ).**

Mezclar un volumen de ácido fosfórico en 40 volúmenes de agua.

**B.6.4.2. Solución de hidróxido de sodio al 5% (Na OH).**

Disolver 5 gramos de hidróxido de sodio en agua y diluir a 100 mL.

**B.6.4.2. Etanol ( $C_2H_5O$ )**

**B.6.5. Procedimiento.**

**B.6.5.1.** Cortar 50 g del producto en cubos, de aproximadamente 6 mm y pasarlos a un vaso de 2 L, adicionar de 800 a 1000 mL de solución hirviendo de ácido fosfórico (1:40) y con un agitador magnético, agitar continuamente a baja velocidad aproximadamente 20 min. o hasta que la muestra se haya dispersado.

**B.6.5.2.** Filtrar sin permitir que la muestra se acumule en el papel y para evitar que el filtro se obstruya lavar continuamente con porciones de agua casi a ebullición. En caso de obstrucción agregar al agua de lavado, una solución alcalina diluida (Hidróxido de sodio al 5% o ácido fosfórico 1:40 o alcohol caliente), hasta que el filtro quede limpio, entonces adicionar la muestra en suspensión remanente en el vaso y agua. Examinar el papel filtro al microscopio.

**B.6.6. Informe de la Prueba.**

Presencia o ausencia de insectos enteros, fragmentos de insectos, pelos de roedor, excretas o cualquier materia extraña en 50 g de producto.

**B.7. Determinación de Arsénico, Plomo, Mercurio y Estaño.****B.7.1. Fundamento**

El método de absorción atómica se basa en hacer pasar un haz de luz monocromática de una frecuencia tal que puede ser absorbido por el analito que se encuentra presente en forma de vapor atómico. La medida de intensidad luminosa antes y después de su paso por el vapor atómico permite determinar el por ciento de absorción.

La cantidad de absorción aumenta con la concentración de átomos en el medio absorbente, es decir, la media de la absorción aumenta con la concentración del elemento de la muestra, ya sea que esté en su condición original o sujeta a pretratamiento.

**B.7.2. Materiales**

- B.7.2.1.** Matraces Kjeldahl de 500 mL y 800 mL.
- B.7.2.2.** Sistema de reflujo con refrigerante.
- B.7.2.3.** Crisoles Vycor de 40 a 50 mL de capacidad.
- B.7.2.4.** Crisoles de platino de 40 a 50 mL de capacidad.
- B.7.2.5.** Matraces Erlenmeyer de diferentes capacidades.
- B.7.2.6.** Matraces volumétricos de diferentes capacidades.
- B.7.2.7.** Matraces redondos de fondo plano de 50 mL.
- B.7.2.8.** Bombas Parr.
- B.7.2.9.** Micropipetas o pipetas de Eppendorf de diferentes capacidades.
- B.7.2.10.** Puntas de plástico para micropipetas.
- B.7.2.11.** Papel filtro Whatman No. 2.
- B.7.2.12.** Perlas de ebullición.
- B.7.2.13.** Varillas de plástico.
- B.7.2.14.** Tubos de ensayo graduados de propilen o propileno de 15 mL.
- B.7.2.15.** Recipientes de propilen o propileno.
- B.7.2.16.** Embudos de filtración de diferentes capacidades.
- B.7.2.17.** Material común de laboratorio.

**B.7.2.18. Todo el material utilizado debe someterse a lavado de acuerdo con las siguientes instrucciones:**

- B.7.2.18.1.** El jabón que se use debe ser de preferencia neutro.
- B.7.2.18.2.** Enjuagar perfectamente con agua corriente.
- B.7.2.18.3.** Sumergir el material de vidrio o plástico en un recipiente (de preferencia plástico) que contenga una solución de ácido nítrico grado RA al 30 %.
- B.7.2.18.4.** Dejarlo tapado y reposando por un lapso de 24 horas.
- B.7.2.18.5.** Quitar el exceso de ácido nítrico con varios enjuagues (5 o 6 veces) con agua deionizada.
- B.7.2.18.6.** Dejar escurrir y secar.
- B.7.2.18.7.** Guardar en cuanto esté seco para evitar contaminación por partículas en el aire.

**B.7.3. Equipo**

**B.7.3.1.** Lámparas de cátodo hueco o de descarga sin electrodos para determinar arsénico, cadmio, cobre, estaño, fierro, mercurio, plomo y zinc.

**B.7.3.2.** Fuente de radiofrecuencia en caso de usar lámparas de descarga.

**B.7.3.3.** Automuestreador y recirculador de agua.

**B.7.3.4.** Placa de calentamiento con regulador que alcance una temperatura de 400 a 450 °C.

**B.7.3.5.** Horno de microondas.

**B.7.3.6.** Autoclave que alcance  $121 \pm 5^\circ\text{C}$  o 15 lb de presión.

**B.7.3.7.** Centrífuga de laboratorio capaz de mantener 1600 rpm.

**B.7.3.8.** Espectrómetro de absorción atómica equipado con los accesorios para flama, horno de grafito, generador de hidruros o vapor frío, dependiendo del método a seguir.

**B.7.3.9.** Balanza analítica con sensibilidad de 0,1 mg.

**B.7.3.10.** Mufa capaz de mantener una temperatura de  $550 \pm 10^\circ\text{C}$ .

**B.7.3.11.** Horno de calentamiento (estufa) con intervalo de temperatura de  $120 \pm 5^\circ\text{C}$ .

**B.7.3.12.** Los instrumentos que a continuación se indican deben estar calibrados y ajustados antes de su operación.

**B.7.4. Reactivos**

**B.7.4.1.** Soluciones estándares de referencia certificadas de cada uno de los metales. Agua, debe ser destilada deionizada, con un grado máximo de conductividad de 1  $\mu\text{mho}/\text{cm}$  a  $25^\circ\text{C}$ .

**B.7.4.2.** Ácido nítrico (densidad específica 1,41), grado suprapuro o de alta pureza para el análisis de metales o equivalente

**B.7.4.3.** Ácido nítrico (densidad específica 1,41), contenido de mercurio muy bajo.

- B.7.4.4.** Acido perclórico (densidad específica 1,67), grado suprapuro, o de alta pureza para el análisis de metales o equivalente
- B.7.4.5.** Acido clorhídrico (densidad específica 1,19), grado suprapuro, o de alta pureza para el análisis de metales o equivalente
- B.7.4.6.** Acido sulfúrico (densidad específica 1,84), grado suprapuro, o de alta pureza para el análisis de metales o equivalente
- B.7.4.7** Acido sulfúrico 1 N a partir de la solución grado suprapuro, o de alta pureza para el análisis de metales o equivalente
- B.7.4.8** Acido nítrico 65% v/v grado RA.
- B.7.4.9** Peróxido de hidrógeno (densidad específica 1,12).
- B.7.4.10** Hidróxido de sodio granalla reactivo RA.
- B.7.4.11** Aire comprimido seco y limpio.
- B.7.4.12** Gases: acetileno, óxido nitroso, argón y nitrógeno, grado absorción atómica.
- B.7.4.13** Solución de Nitrato de Magnesio hexahidratado al 7% p/v. Disolver 70 g de Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O en 1000 mL de HCl 1N.
- B.7.4.14** Acido clorhídrico 1 N. Diluir 8,3 mL de HCl y llevar a 100 mL de agua.
- B.7.4.15** Acido nítrico al 50% v/v. Diluir 50 mL de HNO<sub>3</sub> al 65% v/v grado suprapuro en 50 mL de agua.
- B.7.4.16** Acido clorhídrico 8 M. Diluir 66,0 mL de HCl y llevar a 100 mL con agua.
- B.7.4.17** Acido clorhídrico 0,5 N. Diluir 4,15 mL de HCl y llevar a 100 mL con agua.
- B.7.4.18** Solución de Yoduro de Potasio al 15% p/v. Disolver 15 g de KI en 100 mL de agua (esta solución debe prepararse en el momento de usarse).
- B.7.4.19** Solución de Yoduro de Potasio al 20% p/v. Disolver 20 g de KI en 100 mL de agua (esta solución debe prepararse en el momento de usarse).
- B.7.4.20** Solución de Cloruro de Potasio (10 mg/mL de K). Disolver 1,91 g de KCl en agua y diluir a 100 mL con agua.
- B.7.4.21** Solución de Nitrato de Magnesio al 50% p/v. Disolver 50 g de Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O en 100 mL de agua.
- B.7.4.22** Solución de ácido clorhídrico al 1,5% p/v. Diluir 1,5 mL de HCl en 100 mL de agua destilada deionizada.
- B.7.4.23** Solución de hidróxido de sodio al 1% p/v. Pesar 1 g de hidróxido de sodio y diluir a 100 mL con agua destilada deionizada.
- B.7.4.24** Solución de borohidruro de sodio al 4% p/v en solución de hidróxido de sodio al 1% p/v. Pesar 4 g de borohidruro de sodio en 100 mL de una solución de hidróxido de sodio al 1% p/v. Filtrar al vacío.
- B.7.4.25** Solución reductora para mercurio. Mezclar 50 mL de ácido sulfúrico concentrado con aproximadamente 300 mL de agua. Enfriar a temperatura ambiente y disolver 15 g de cloruro de sodio, 15 g de sulfato o cloruro de hidroxilamina y 25 g de cloruro o sulfato estanoso en solución. Diluir a 500 mL.
- B.7.4.26** Solución de dilución para mercurio. En un matraz de 1 l, conteniendo de 300 a 500 mL de agua destilada deionizada, agregar 58 mL de ácido nítrico concentrado de muy baja concentración de mercurio y 67 mL de ácido sulfúrico concentrado. Diluir al volumen con agua.
- B.7.4.27** Solución de trabajo de As de 1 µg/mL. Diluir 1 mL de la solución patrón de 1000 µg/mL a 1 l con ácido sulfúrico 1N preparada a partir de la solución grado suprapuro. Preparar fresca cada día.
- B.7.5 Preparación de la Muestra**
- B.7.5.1 Digestión por Vía Húmeda para la determinación de Pb.**
- B.7.5.1.1** Pesar con precisión de  $\pm 0,1$  mg, una cantidad apropiada de muestra.
- Para la determinación por el método de absorción por flama pesar como máximo 40 g de líquidos, 20 g de alimentos que contengan del 50 al 75% de agua y 10 g de alimentos sólidos o semisólidos. Limite el contenido de grasa o aceite a un máximo de 4 g y el total de materia orgánica a 5 g.
- B.7.5.1.2** Añadir 10 mL de ácido nítrico concentrado y dejar reposar toda la noche o iniciar directamente la digestión.
- B.7.5.1.3** Usar matraz de Kjeldhal o matraz conectado al sistema de refrigerantes.
- B.7.5.1.4** Calentar suavemente.
- B.7.5.1.5** Digerir la muestra 3 horas o más tiempo si es necesario (algunas muestras requieren la adición de mayor cantidad de ácido nítrico) hasta la aparición del color translúcido, si queda ámbar, adicionar peróxido de hidrógeno gota a gota con agitación continua (reacción exotérmica).
- B.7.5.1.6** Enfriar.
- B.7.5.1.7** Recuperar, filtrar y llevar a un volumen conocido en matraz volumétrico. Se pueden hacer tantas diluciones sean necesarias de acuerdo a la cantidad contenido del metal.
- B.7.5.1.8.** Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.
- B.7.5.1.9** Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica por flama u horno de grafito).

**B.7.5.2 Digestión por Vía Seca para la determinación de Pb.**

**B.7.5.2.1** Pesar con precisión de  $\pm 0,1$  mg, una cantidad apropiada de muestra.

**B.7.5.2.2** Para la determinación por el método de absorción por flama pesar como máximo 40 g de jugo o bebida, 20 g de alimentos que contengan del 50 al 75% de agua y 10 g de alimentos sólidos y semisólidos. Límite el contenido de grasa o aceite a un máximo de 4 g y el total de materia orgánica a 5g.

**B.7.5.2.3** Añadir 10 mL de ácido nítrico concentrado y dejar reposar toda la noche o iniciar directamente la digestión. En productos con alta concentración de proteínas adicionar una solución de nitrato de magnesio al 7,0% p/v y mezclar completamente, llevar a sequedad aproximadamente durante 6 horas en estufa a una temperatura de 90 a 95°C.

**B.7.5.2.4** Colocar la muestra en una mufla y elevar la temperatura lentamente de 2 a 4°C por minuto hasta 350°C. Mantener la temperatura hasta que cesen los humos.

**B.7.5.2.5** Elevar gradualmente la temperatura de 500 a 550°C para evitar que la muestra se incinere y mantener esa temperatura durante 16 horas o toda la noche.

**B.7.5.2.6** Apagar la mufla y dejar enfriar.

**B.7.5.2.7** Un segundo paso de calcinación puede ser requerido para remover algunos residuos de carbón, mediante el siguiente procedimiento: Lavar las paredes del crisol con 2 mL de ácido nítrico al 50%. Colocar la muestra en una placa de calentamiento puesta a 120°C para remover el exceso de ácido. Colocar la muestra en una mufla fría y elevar la temperatura gradualmente de 500 a 550°C, manteniéndola por el tiempo necesario. Repetir este procedimiento cuantas veces sea necesario hasta que quede libre de carbón remanente.

**B.7.5.2.8** Disolver las cenizas completamente en 5 mL de ácido clorhídrico 1N, transferir la muestra disuelta a un tubo de propileno o a un matraz de volumen conocido, enjuagar el crisol con dos alícuotas de 5 mL de ácido clorhídrico 1 N y transferir al mismo tubo o matraz para obtener un volumen de 15 mL en el primero y llevar al aforo en el segundo, tapar y mezclar, si existe presencia de partículas o materia insoluble, filtrar en papel Whatman No. 2, antes de la determinación. Se pueden hacer tantas diluciones sean necesarias de acuerdo a la cantidad contenido del metal.

**B.7.5.2.9** Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

**B.7.5.2.10** Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica: flama u horno de grafito).

**B.7.5.3 Digestión por Vía Húmeda para la determinación de Sn**

**B.7.5.3.1** Proceder igual que en el punto B.7.5.1.1.

**B.7.5.3.2** No adicionar ácido nítrico si no se lleva cabo la digestión total en el mismo día.

**B.7.5.3.3** Adicionar 30 mL de ácido nítrico concentrado al matraz y calentar suavemente por 15 minutos en campana para iniciar la digestión, evitando una excesiva producción de espuma.

**B.7.5.3.4** Hervir suavemente hasta tener un remanente de 3 a 6 mL o hasta que la muestra empiece a secarse en el fondo. No dejar que la muestra se calcine.

**B.7.5.3.5** Retirar la muestra del calor.

**B.7.5.3.6** Al mismo tiempo correr dos blancos de reactivos.

**B.7.5.3.7** Adicionar 25 mL de ácido clorhídrico concentrado, calentar suavemente durante aproximadamente 15 minutos, hasta que todo el cloro sea liberado. Aumentar la temperatura gradualmente hasta ebullición.

**B.7.5.3.8** Evaporar hasta obtener de 10 a 15 mL usando un matraz similar con 15 mL de agua como patrón de volumen.

**B.7.5.3.9** Adicionar aproximadamente 40 mL de agua.

**B.7.5.3.10** Agitar y pasar a un matraz de 100 mL y enjuagar con 10 mL de agua.

**B.7.5.3.11** Cuando el ácido clorhídrico está presente en la digestión, las muestras se pueden quedar toda la noche o por más tiempo.

**B.7.5.3.12** Agregar 1 mL de solución de cloruro de potasio en cada matraz.

**B.7.5.3.13** Enfriar a temperatura ambiente.

**B.7.5.3.14** Diluir con agua y agregar más agua para compensar el volumen de grasa en el matraz.

**B.7.5.3.15** Mezclar perfectamente y filtrar de 30 a 50 mL a través de un papel filtro Whatman No. 2 y recoger el filtrado en un recipiente de propileno, polipropileno o polietileno.

**B.7.5.3.16** No filtrar los blancos. Tapar las botellas durante el análisis. Las soluciones son estables por varios meses.

**B.7.5.3.17** Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

**B.7.5.3.18** Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica: flama u horno de grafito).

**B.7.5.4 Digestión por Vía Húmeda para la determinación de Hg.****B.7.5.4.1 Sistema de Reflujo.**

**B.7.5.4.1.1** Pesar como máximo 40g de líquidos, 20g de alimentos que contengan del 50 al 75% de agua y 10g de alimentos sólidos o semisólidos. Límite el contenido de grasa o aceite a un máximo de 4g y el total de la materia orgánica a 5g

- B.7.5.4.1.2** Conectar el matraz al sistema de reflujo y agregar poco a poco la cantidad necesaria de ácido nítrico concentrado y calentar durante media hora o hasta que no se observen cambios en la digestión.
- B.7.5.4.1.3** Dejar enfriar y agregar una mezcla de ácido nítrico y ácido sulfúrico concentrados (1 + 1).
- B.7.5.4.1.4** Calentar y agregar más ácido nítrico gota a gota sobre las paredes del recipiente, hasta que el color oscuro de la solución desaparezca.
- B.7.5.4.1.5** Enfriar.
- B.7.5.4.1.6** Si existe grasa o cera filtrar la solución. Se pueden hacer tantas diluciones sean necesarias de acuerdo a la cantidad contenido del metal.
- B.7.5.4.1.7** Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.
- B.7.5.4.1.8** Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica de vapor frío).
- B.7.5.4.2 Sistema Cerrado.**
- B.7.5.4.2.1** Pesar con precisión de  $\pm 0,1$  mg, la cantidad apropiada de muestra, dependiendo el tipo de ésta, en el recipiente de digestión.
- B.7.5.4.2.2** Agregar la cantidad necesaria de ácido nítrico concentrado.
- B.7.5.4.2.3** Tapar y sellar perfectamente el recipiente de digestión.
- B.7.5.4.2.4** Si el recipiente de digestión es un matraz Erlenmeyer, colocar éste en una autoclave a 15lb por 30 minutos. Si se utiliza bomba Parr, calentar en parrilla controlando la temperatura a un máximo de 300°C por 30 minutos.
- B.7.5.4.2.5** Enfriar a temperatura ambiente.
- B.7.5.4.2.6** En caso de que la digestión no sea completa adicionar peróxido de hidrógeno y repetir la digestión.
- B.7.5.4.2.7** Filtrar en caso de que exista grasa o cera y analizar el contenido de Hg.
- B.7.5.4.2.8** Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.
- B.7.5.4.2.9** Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica de vapor frío).
- B.7.5.5 Digestión por Vía Húmeda-Seca para la determinación de As.**
- B.7.5.5.1** Proceder como en el punto B.7.4.4.2 hasta que la digestión sea completa y posteriormente continuar con los siguientes pasos.
- B.7.5.5.2** Con una pipeta tomar una alícuota de la solución de muestra digerida y colocarla en un crisol Vycor
- B.7.5.5.3** Añadir 1 mL de solución de nitrato de magnesio al 7% p/v y calentar en una parrilla a temperatura baja, hasta sequedad.
- B.7.5.5.4** Incrementar el calor de la placa a un máximo de 375°C.
- B.7.5.5.5** Colocar el matraz en la mufla a 450°C para oxidar cualquier residuo de carbón y descomponer el exceso de nitrato de magnesio, por un tiempo mayor o igual a 30 minutos.
- B.7.5.5.6** Enfriar y disolver el residuo en 2,0 mL de ácido clorhídrico 8 M.
- B.7.5.5.7** Añadir 0,1 mL de yoduro de potasio al 20% p/v para reducir el As(V) a As(III).
- B.7.5.5.8** Dejar reposar por un tiempo mayor a 2 minutos y transferir a un matraz y llevar al aforo con agua.
- B.7.5.5.9** Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.
- B.7.5.5.10** Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica con adaptación para horno de grafito o generador de hidruros).
- B.7.5.6 Digestión por Vía Seca para la determinación de As.**
- B.7.5.6.1** Pesar como máximo 40g de líquidos, 20g de alimentos que contengan del 50 al 75% de agua y 10g de alimentos sólidos o semisólidos. Limite el contenido de grasa o aceite a un máximo de 4g y el total de la materia orgánica a 5g
- B.7.5.6.2** Añadir el volumen necesario de nitrato de magnesio al 50% p/v.
- B.7.5.6.3** Homogeneizar con una varilla limpia de plástico extendiendo la mezcla en el crisol.
- B.7.5.6.4** Colocar la muestra en una mufla subiendo gradualmente la temperatura hasta 300°C por 2 horas. Posteriormente subir gradualmente la temperatura hasta 500°C por 16 horas o durante toda la noche.
- B.7.5.6.5** Enfriar a temperatura ambiente y humedecer las cenizas con ácido nítrico al 50% v/v.
- B.7.5.6.6** Calentar en parrilla hasta la eliminación del ácido.
- B.7.5.6.7** Llevar los crisoles a una mufla elevando gradualmente la temperatura de 23 a 500°C, manteniendo ésta 30 min hasta evaporación total.
- B.7.5.6.8** Transferir las cenizas del crisol a un matraz aforado usando una porción de 10 mL de ácido clorhídrico 0,5 N.
- B.7.5.6.9** Enjuagar los crisoles con 5 mL de agua destilada y transferir al matraz, añadir 1 mL de solución de yoduro de potasio al 15% y mezclar.
- B.7.5.6.10** Dejar reposar durante 15 minutos y llevar al aforo.
- B.7.5.6.11** Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.
- B.7.5.6.12** Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica con adaptación para horno de grafito o generador de hidruros).

**B.7.5.7 Digestión para la determinación de As, Pb, Sn, y Hg por horno de microondas.**

**B.7.5.7.1** Pesar con precisión de  $\pm 0,1$  mg, 0,500 g como máximo de muestra, añadir 6 mL de ácido nítrico concentrado y 2 mL de agua oxigenada al 30%, cerrar perfectamente el envase de reacción y proceder según el manual del fabricante.

**B.7.6 Procedimiento****B.7.6.1 Espectrometría de Absorción Atómica por Flama.****B.7.6.1.1 Calibración.**

**B.7.6.1.1.1** Es necesario comprobar que se tiene una calibración inicial y periódica aceptable.

**B.7.6.1.1.2** Se inicia la configuración operacional del instrumento y en el sistema de adquisición de datos. Permitir un periodo no menor a 30 minutos para el calentamiento de las lámparas de descarga sin electrodos.

**B.7.6.1.1.3** Se debe verificar la estabilidad del instrumento mediante el análisis de una solución estándar 20 veces más concentrada que el límite de detección del instrumento (LDI) para el analito, leída un mínimo de cinco veces y calculando la desviación estándar resultante, la cual debe ser menor al 5%.

**B.7.6.1.1.4** El instrumento debe calibrarse para el analito a determinar usando el blanco de calibración y los estándares de calibración preparados a 3 o 4 niveles de concentración dentro del intervalo dinámico de concentración del analito.

**B.7.6.1.1.5** Ajustar el instrumento a 0 con el blanco de calibración. Introducir los estándares de calibración del analito de menor a mayor concentración y registrar al menos tres réplicas de la absorbancia de cada uno.

**B.7.6.1.1.6** Elaborar una curva de calibración graficando absorbancia en función de la concentración. Lo anterior puede llevarse a cabo en equipos que se programan directamente, en los cuales sólo es necesario introducir los estándares y marcar su concentración teórica.

**B.7.6.1.2 Operación del Instrumento.**

**B.7.6.1.2.1** El desempeño del instrumento se verifica mediante el empleo de blancos de calibración, estándares de calibración y una muestra de control de calidad (MCC).

**B.7.6.1.2.2** Despues de que se ha realizado la calibración, se debe verificar que el instrumento trabaje adecuadamente para el analito. Para ello se analiza una muestra de control de calidad. Si las mediciones varían en  $\pm 10\%$  o más, al valor establecido para la MCC, el análisis debe interrumpirse y buscar la posible causa de error, el instrumento se debe recalibrar y verificar la nueva calibración.

**B.7.6.1.2.3** Para verificar que el instrumento no presenta deriva, por cada 10 análisis se debe analizar el blanco de calibración. Si el valor verdadero del analito difiere  $\pm 10\%$  o más, el instrumento debe recalibrarse. Si el error persiste debe identificarse el problema y corregirse. Si la matriz de la muestra es responsable de la deriva o afecta la respuesta del analito puede ser necesario trabajar por adiciones estándar.

**B.7.6.1.2.4** La demostración de la operatividad inicial del instrumento se hace estableciendo los límites de detección del método (LDM) para el analito y el intervalo de calibración lineal. Para determinar el LDM se usa un blanco de reactivos fortificado con una concentración del analito equivalente de 2 a 5 veces el límite de detección estimado. Se hacen al menos 4 réplicas de lectura de absorbancia del blanco de reactivos fortificado procesado a través de todo el método analítico. Los LDM se calculan de acuerdo a:

$$LDM = t \times s$$

$t$  = valor de la "T" de Student a un intervalo de confianza de 99% y una desviación estándar estimada para  $n-1$  grados de libertad.  $t = 3,14$  para 7 réplicas.

$s$  = desviación estándar de las réplicas del análisis.

El intervalo lineal de calibración se establece a partir de por lo menos 4 estándares de diferente concentración, uno de los cuales debe estar próximo al límite superior del intervalo lineal.

**B.7.6.1.3 Determinación.**

**B.7.6.1.3.1** Ajustar el instrumento de absorción atómica en las condiciones adecuadas para la determinación del analito de acuerdo a las indicaciones del manual del instrumento.

**B.7.6.1.3.2** Introducir el blanco de reactivos y la muestra a analizar y registrar los valores de absorbancia. Se debe analizar al menos un blanco de reactivos con cada grupo de muestras. Los valores obtenidos ponen de manifiesto la calidad de los reactivos usados y el grado de contaminación del laboratorio.

**B.7.6.1.3.3** En los equipos que pueden programarse, la lectura obtenida da directamente la concentración del elemento en las unidades de concentración utilizadas.

**B.7.6.1.3.4** Se debe analizar al menos un blanco de reactivos fortificado para cada grupo de muestras. Se calcula la exactitud como el por ciento de recuperación (de acuerdo al apartado B.7.5.1.2.4).

**B.7.6.1.3.5** Se debe fortificar al menos una muestra por grupo o el 10% de ellas lo que resulte mayor. La concentración añadida debe ser de aproximadamente 0,1 unidades de absorbancia.

**B.7.6.1.3.6** Se debe calcular el por ciento de recuperación para el analito, de acuerdo a:

$$R = \frac{CM - C}{CA} \times 100$$

$R$  = % recuperación

CM = Concentración de la muestra fortificada

C = Concentración de la muestra

CA = Concentración equivalente de analito añadido a la muestra.

**B.7.6.1.3.7** Si la recuperación del analito en la muestra fortificada está fuera del intervalo previamente establecido y el blanco de reactivos fortificado está correcto, puede existir un problema relacionado con la matriz de la muestra. Los datos se deben verificar por el método de las adiciones estándar.

**B.7.6.2 Espectrometría de Absorción Atómica por Horno de Grafito.**

**B.7.6.2.1 Calibración.**

**B.7.6.2.1.1** Proceder de acuerdo a los puntos B.7.5.1

**B.7.6.2.1.2** Elaborar una curva de calibración graficando área de pico o altura máxima contra concentración del analito.

**B.7.6.2.1.3** La calibración mediante el uso de una computadora o una calculadora basada en el ajuste sobre los datos de concentración respuesta es aceptada.

Lo anterior puede llevarse a cabo en equipos que se programan directamente, en los cuales sólo es necesario introducir los estándares y marcar su concentración teórica.

**B.7.6.2.2 Operación del Instrumento.**

**B.7.6.2.2.1** Proceder de acuerdo a B.7.5.1

**B.7.6.2.3 Determinación.**

**B.7.6.2.3.1** Ajustar el instrumento de absorción atómica en las condiciones adecuadas para la determinación del analito, de acuerdo a las recomendaciones del manual del instrumento.

El programa de temperaturas para el horno de grafito puede variar dependiendo de la matriz de la muestra. En el caso de existir interferencias no específicas (absorción molecular o dispersión de la luz), se recomienda consultar la bibliografía existente en cuanto a los métodos disponibles para eliminarlas, así como en el caso de interferencias de matriz.

**B.7.6.3 Espectrometría de Absorción Atómica por Generador de Hidruros.**

**B.7.6.3.1 Calibración.**

**B.7.6.3.1.1** Proceder de acuerdo a los puntos B.7.5.1

**B.7.6.3.1.2** A partir de la solución estándar de As de 1000 mg/l, preparar una solución de As de 1 mg/l en ácido clorhídrico de concentración apropiada al método. Trazar una curva de calibración de absorbancia (máximo de la altura de pico) en función de la concentración del analito para un intervalo de concentración de 0 a 10 µg/l de As bajo las mismas condiciones de la matriz de la muestra.

**B.7.6.3.2 Operación del Instrumento.**

**B.7.6.3.2.1** Proceder de acuerdo a B.7.5.1

**B.7.6.3.3 Determinación.**

**B.7.6.3.3.1** Ajustar el instrumento de absorción atómica en las condiciones adecuadas para la determinación de As: longitud de onda de 193,7 nm y lámpara de descarga sin electrodos. Colocar y ajustar la celda de absorción de acuerdo al manual del fabricante. Ajustar el flujo de gas (nitrógeno o argón).

**B.7.6.3.3.2** Ajustar a 0 de absorbancia con el blanco de calibración de ácido clorhídrico al 1,5% siguiendo las instrucciones del manual del fabricante.

**B.7.6.3.3.3** Optimizar con un estándar de calibración la respuesta del instrumento al analito (por lo general, 10 mL de una solución de 5 µg/l de As da una absorbancia de 0,2), ajustando el tiempo de purga I, el tiempo de reacción y el tiempo de purga II.

**B.7.6.3.3.4** Tomar un volumen conocido de la muestra dirigida y seguir el mismo procedimiento que con los estándares de calibración.

**B.7.6.4 Espectrometría de Absorción Atómica por Vapor Frío.**

**B.7.6.4.1 Calibración.**

**B.7.6.4.1.1** Proceder de acuerdo a los puntos B.7.5.1

**B.7.6.4.1.2** A partir de la solución de trabajo de 1 µg/mL preparar estándares de calibración que contengan 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 y 1,0 µg de Hg a frascos de reacción. A cada frasco agregar 100 mL de la solución de dilución y 20 mL de la solución de reducción. Trazar la curva de calibración de absorbancia (altura máxima de pico) en función de la concentración del analito.

**B.7.6.4.2 Operación del Instrumento.**

**B.7.6.4.2.1** Proceder de acuerdo a B.7.5.1

**B.7.6.4.3 Determinación.**

**B.7.6.4.3.1** Ajustar el instrumento de absorción atómica en las condiciones adecuadas para la determinación de Hg: longitud de onda de 253,6 nm, slit 0,7 nm y lámpara de cátodo hueco. Colocar y ajustar la celda de absorción de acuerdo al manual del fabricante. Ajustar el flujo de gas (nitrógeno o argón).

**B.7.6.4.3.2** Ajustar a 0 de absorbancia con el blanco de calibración (solución de dilución y de reducción) siguiendo las instrucciones del manual del fabricante.

**B.7.6.4.3.3** Optimizar con un estándar de calibración la respuesta del instrumento al analito.

**B.7.6.4.3.4** Tomar 25 mL de la muestra digerida y seguir el mismo procedimiento que con los estándares de calibración.

**B.7.7 Expresión de Resultados****B.7.7.1. Método de Cálculo.**

Interpolar los valores de absorbancia o altura de pico de la muestra analizada en la curva de calibración y obtener los mg/kg del elemento en la muestra y realizar los cálculos empleando la siguiente fórmula:

$$\text{mg/ kg} = \frac{A \times B}{C}$$

en donde:

A = Concentración en mg/kg de la muestra a interpolar en la curva de calibración.

B = Volumen final al que se llevó la muestra (mL).

C = Peso de la muestra (g) o volumen de la muestra (mL) en el caso de agua.

En los equipos que pueden programarse, la lectura obtenida da directamente la concentración del elemento en mg/kg o µg/kg.

**B.7.8 Informe de la Prueba**

Los resultados se informarán en mg/kg o µg/kg del elemento a determinar.

**B.8. Determinación de AFM<sub>1</sub> en leche, fórmula láctea o producto lácteo combinado por columna de inmunoafinidad- HPLC.****B.8.1 Principio del Método.**

La AFM<sub>1</sub> es extraída por aplicación de la porción de prueba (leche líquida o leche deshidratada reconstituida) a una columna de inmunoafinidad, la cual contiene anticuerpos monoclonales específicos ligados a un material de soporte sólido. Así como la muestra pasa a través de la columna, los anticuerpos selectivamente se ligan a la AFM<sub>1</sub> presente para formar un complejo antígeno-anticuerpo. Los otros componentes de la matriz de la muestra son removidos de la columna con agua destilada. La AFM<sub>1</sub> es eluida de la columna con acetonitrilo y cuantificada por HPLC en fase reversa con detección de fluorescencia.

**B.8.2 Equipo.**

B.8.2.1 Sistema HPLC, que incluye:

B.8.2.2 Bomba

B.8.2.3 Inyector automático o manual de muestras.

B.8.2.4 Columna HPLC C<sub>18</sub> de 4.6 x 250 mm, 5 µm de tamaño partícula.

B.8.2.5 Detector de fluorescencia

B.8.2.6 Integrador de datos o computadora personal con el software adecuado para el control del equipo y procesamiento de datos

B.8.2.7 Bomba manual (cuerpo de jeringa de vidrio de 50 mL unida a través de un conector de plástico a un suministro de aire) o manifold para extracción por vacío en fase sólida.

B.8.2.8 Centrífuga a 2000 rpm.

B.8.2.9 Mezclador tipo vórtex.

B.8.2.10 Balanza analítica de lectura 0,1 mg.

B.8.2.11 Espectrofotómetro capaz de hacer mediciones de 200 a 400 nm.

B.8.2.12 Equipo de filtración Millipore o similar.

B.8.2.13 Sistema de evaporación de muestras multipuesto en baño seco con bomba de vacío.

B.8.2.14 Extractor en fase sólida o Vaccum manifold

B.8.2.15 Bomba de vacío

**B.8.3. Materiales**

B.8.3.1 Columnas de inmunoafinidad. Se sugiere adquirir columnas con una capacidad de carga de no menos de 100ng de AFM1.

B.8.3.2 Tubos de centrífuga.

B.8.3.3 Vasos de precipitados de 100 mL.

B.8.3.4 Pipetas volumétricas de 50 mL.

B.8.3.5 Pipetas graduadas de 10 mL.

B.8.3.6 Auxiliar de macropipeteado.

B.8.3.7 Jeringas de vidrio o desechables de 50 mL.

B.8.3.8 Micropipetas de 10 a 100 µL; 100 a 1000 µL y 1 a 5 mL.

B.8.3.9 Puntas para micropipeta.

B.8.3.10 Filtros para solventes orgánicos de 47 mm de diámetro y poro de 0,45 µm.

B.8.3.11 Filtros para solventes acuosos de 47 mm de diámetro y poro de 0,2 µm.

B.8.3.12 Filtros para muestras de politetrafluoretileno de 13 mm y poro de 0,45 µm.

B.8.3.13 Matraces aforados color ámbar de 5, 25 y 100 mL.

B.8.3.14 Jeringas desechables de 5 mL sin aguja.

B.8.3.15 Frascos vial color ámbar de 5 mL con tapón.

B.8.3.16 Matraces Erlenmeyer de 250 mL.

B.8.3.17 Celdas de cuarzo para espectofotómetro de 1 cm de paso de luz.

B.8.3.18 Pipetas Pasteur.

B.8.3.19 Papel filtro Whatman No. 4 o equivalente.

B.8.3.20 Adaptadores o acoples de apilamiento para unir columnas de inmunoafinidad (adaptors starcking 1,3 or 5 mL part N<sup>o</sup> 5185-57-94 Agilent o similar)

B.8.3.21 Embudos

#### **B.8.4 Reactivos.**

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser de grado analítico y por agua debe entenderse agua estilada.

**B.8.4.1** Acetonitrilo (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N) grado HPLC.

**B.8.4.2** 2-Propanol (isopropanol) grado HPLC.

**B.8.4.3** Agua (H<sub>2</sub>O) destilada y grado HPLC.

**B.8.4.4** Ácido sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

**B.8.4.5** Patrón certificado de 50 µg AFM<sub>1</sub> en película.

**B.8.4.6** Tripsina (proteasa pancreática), 2000 FIP-U/g.

**B.8.4.7** Dicromato de potasio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>).

**B.8.4.8** Solución de ácido sulfúrico 0,018 N. Disolver 1 mL de ácido sulfúrico concentrado y aforar a 2 L con agua destilada.

**B.8.4.9** Soluciones patrón de dicromato de potasio.

**B.8.4.9.1** Aproximadamente 0,25 mM.

Pesar exactamente 78 mg de dicromato de potasio previamente secado en estufa a 100-105°C durante 2 h, y aforar a 1 L con ácido sulfúrico 0,018 M.

**B.8.4.9.2** Aproximadamente 0,125 mM.

Diluir 25 mL de la solución de 0,25 mM a 50 mL con ácido sulfúrico 0,018 M.

**B.8.4.9.3** Aproximadamente 0,0625 mM

Diluir 25 mL de la solución de 0,125 mM a 50 mL con ácido sulfúrico 0,018 M.

**B.8.4.10** Fase móvil para HPLC. Agua-Acetonitrilo (75:25). Filtrar a través de filtro de membrana de 0,45 µm y degasificar. Es recomendable si el sistema cuenta con una bomba binaria o cualquier otra, no se realice la mezcla por medio de ésta, debido a la facilidad con que se generan burbujas

**B.8.4.11** Cloruro de sodio

**B.8.4.12** Fosfato disódico dihidratado

**B.8.4.13** Cloruro de potasio

**B.8.4.14** Hidróxido de sodio

**B.8.4.15** Solución salina amortiguadora de fosfatos para lavado de columna de inmunoafinidad (pesar 8 g NaCl, 1,16 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2g KCl, disolver en 1L de agua destilada y ajustar a pH 7,4 con NaOH o HCl)

#### **B.8.5 Procedimiento.**

##### **B.8.5.1 Preparación de la Muestra.**

###### **B.8.5.1.1 Productos Líquidos.**

Calentar las muestras de leche entre 35 -37°C en baño de agua termostaizada y a continuación homogenizar suavemente, con barra magnética para dispersar la grasa. Centrifugar un volumen de muestra (2000g-15 min) para separar la grasa y eliminar la capa superior. Filtrar la porción restante del tubo con papel Whatman N<sup>o</sup> 4 (o similar) y transferir 50 mL cuantitativamente medidos al reservorio de la columna de inmunoafinidad, la cual previamente, se encuentra a temperatura ambiente.

Para el análisis de productos esterilizados, es recomendable diluir volumen a volumen con agua destilada previo calentamiento y filtración o producir preparado. Para el análisis de productos esterilizados, es recomendable diluir volumen a volumen con agua destilada previo al calentamiento y filtración o centrifugación.

###### **B.8.5.1.2 Productos Deshidratados.**

Reconstituir con agua de acuerdo con las instrucciones señaladas en la etiqueta o 130 g del producto llevados a 1 L con agua a 50°C. Disolver y agitar la muestra a fin de homogeneizarla por completo. Colectar al menos 50 mL de la leche preparada.

Nota: Para el análisis de caseinatos de sodio, calcio y potasio, es necesario efectuar una hidrólisis enzimática de la porción de prueba previo a la filtración o centrifugación. Para este propósito, proceder de igual forma que con los productos deshidratados, pero adicionando 2 g de tripsina a la porción de prueba antes de colocar el matraz en el baño de agua por 30 minutos.

**B.8.5.2 Calibración del Espectrofotómetro:**

**B.8.5.2.1** Determinar la absorbancia (A) de las tres soluciones de  $K_2Cr_2O_7$  0,25, 0,125 y 0,0625 mM en ácido sulfúrico, a su máximo de absorción cerca de 350 nm, usando como blanco la solución de ácido sulfúrico 0,018 N.

**B.8.5.2.2** Calcular la absorbitividad molar ( $\epsilon$ ) de cada concentración con la siguiente fórmula:

$$(\epsilon) = \frac{A \times 1000}{\text{Conc. (mM)}}$$

**B.8.5.2.3** Si los tres valores varían, revisar la técnica o el instrumento, promediar los 3 valores para obtener el valor de ( $\epsilon$ ).

**B.8.5.2.4** Determinar el factor de corrección (FC) para cada instrumento y celdas en particular, sustituyendo en la siguiente ecuación:

$$FC = \frac{3160}{(\epsilon)}$$

Donde: 3160 = Valor de ( $\epsilon$ ) de las soluciones de  $K_2Cr_2O_7$

**B.8.5.2.5** Si el valor de FC es < 0,95 o > 1,05 revisar el instrumento o técnicas, para determinar o eliminar la causa (usar el mismo juego de celdas en la calibración y determinación de la pureza).

**B.8.5.3 Preparación de Soluciones Patrón de AFM<sub>1</sub>.****B.8.5.3.1 Solución Patrón de 2 ng/μL.**

**B.8.5.3.1.1** Por medio de una jeringa, introducir aproximadamente 2 mL de acetonitrilo dentro del vial sellado que contiene el patrón certificado de AFM<sub>1</sub>. Agitar vigorosamente durante 1 minuto en mezclador tipo vórtex y transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 mL usando pequeñas porciones de acetonitrilo. Diluir al volumen con acetonitrilo y mezclar bien.

**B.8.5.3.1.2** Transferir una alícuota de 2-3 mL de esta solución a una celda de cuarzo y registrar el espectro ultravioleta entre 330 y 370 nm, usando acetonitrilo en la celda de referencia. Medir la absorbancia de la solución a la longitud de onda de máxima absorción (la cual es cercana a 325 nm). Determinar la concentración exacta de esta solución empleando la siguiente ecuación:

$$\text{ng AFM}_1/\mu\text{L} = \frac{A \times PM \times 1000 \times F.C.}{\epsilon}$$

En donde:

A= absorbancia a 350 nm.

PM= Peso molecular para AFM<sub>1</sub>= 328.

$\epsilon$  = coeficiente de extinción para AFM<sub>1</sub>= 19,850.

FC= Factor de corrección (calculado en B.9.5.2.4).

**B.8.5.3.1.3** Regresar la solución de AFM<sub>1</sub> al frasco original. Almacenar esta solución en el congelador por un máximo de 2 años, pero verificar su concentración cada 6 meses. Antes de usar esta solución permitir que alcance la temperatura ambiente. Debe mantenerse lejos de la luz directa

**B.8.5.3.2 Solución Patrón de 0,5 μg/mL.**

Medir un volumen apropiado de solución patrón (B.8.5.3.1.) en un matraz volumétrico de 5 mL, dado que se transfieran exactamente 500 μg de AFM<sub>1</sub>. Diluir al volumen con acetonitrilo y mezclar vigorosamente en vortex. Esta solución es estable por 2 meses si es almacenada en refrigeración (4°C).

**B.8.5.3.3 Soluciones Patrón de Trabajo.**

Preparar una serie de soluciones estándares calibrantes con el objeto de inyectar masas de aflatoxina M1 de 0,5, 1,0, 5,0 y 10 ng cada una presente en 50 μL de inyección AFM1. Para ello medir el volumen apropiado de solución (B.8.5.3.2) en un vial color ámbar y evaporar, con flujo de nitrógeno. Diluir al volumen necesario con fase móvil del inciso 8.4.10. Preparándose en el día de su uso.

**B.8.5.4 Extracción de la AFM<sub>1</sub> por medio de Columnas de Inmunoafinidad.**

**B.8.5.4.1** Firmemente conectar una columna de inmunoafinidad a la punta de una jeringa de vidrio o desechable utilizada como reservorio por medio de acoples y colocar en el extractor de fase sólida (manifold de vacío).

**B.8.5.4.2** Medir 50 mL de la muestra en el depósito de la jeringa y pasarla a través de la columna de inmunoafinidad a un flujo aproximado de 2-3 mL/min.

**B.8.5.4.3** Lavar la columna con 20 mL de buffer a un flujo aproximado de 2-3 mL/min. Descartar los lavados. Pasar de 2-3 mL de aire o suave flujo de nitrógeno para secar el material de empaque.

**B.8.5.4.4** Eluir lentamente la aflatoxina con 4mL de acetonitrilo. Dejar el acetonitrilo en contacto con la columna por lo menos 3 minutos para asegurar la completa remoción de la toxina ligada. Esto se logra reflujiendo el acetonitrilo de dos a tres veces. Colectar el eluido en un vial de 5 mL.

**B.8.5.4.5** Evaporar a sequedad a 40°C bajo una corriente de nitrógeno. Adicionar al residuo 200 L de fase móvil (B.8.4.10). Agitar y filtrar a través de un filtro de membrana de 0,45 μm y proceder con la cuantificación por HPLC.

**B.8.5.5 Cuantificación por HPLC.**

**B.8.5.5.1** Encender todos los componentes del sistema de cromatografía.

**B.8.5.5.2** Fijar los siguientes parámetros cromatográficos de acuerdo con las instrucciones de operación del equipo:

Fase móvil:	Agua:Acetonitrilo (B.8.4.10).
Flujo:	0,8 mL/min.
Volumen de inyección:	50 $\mu$ L (equivalente a 12,5 mL de producto fluido o 1,25 g de producto deshidratado).
Detector de fluorescencia	Excitación: 365 nm. Emisión: 435 nm.

**B.8.5.5.3** Purgar las bombas del sistema con cada uno de los componentes de la fase móvil.

**B.8.5.5.4** Correr la fase móvil a través de todo el sistema a un flujo de 0,8mL/min, hasta obtener una línea base estable.

**B.8.5.5.5** Inyectar 50  $\mu$ L de la solución de trabajo de AFM<sub>1</sub> de la mayor concentración (B.8.5.3.2) y ajustar los controles del detector de fluorescencia para dar al menos un 80% de respuesta del registrador. Repetir las inyecciones 2-3 veces hasta que las áreas del pico son constantes. La aflatoxina eluye en un tiempo aproximado de 11 minutos.

**B.8.5.5.6** El día del análisis, inyectar en secuencia, volúmenes de 50  $\mu$ L de cada solución patrón de trabajo y preparar una curva de calibración graficando el área del pico contra la concentración de AFM<sub>1</sub> inyectada. Ajustar la curva por método de mínimos cuadrados (Regresión Lineal).

**B.8.5.5.7** Inyectar del mismo modo 50  $\mu$ L de cada una de las muestras y determinar la cantidad de AFM<sub>1</sub> en la muestra utilizando la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración como sigue:

$$Y = m x + b$$

En donde:

Y = Área del pico correspondiente a la AFM<sub>1</sub> en la muestra.

m = pendiente.

x = concentración en ng/ $\mu$ L de AFM<sub>1</sub> en la muestra.

b = ordenada al origen.

Despejar x, para obtener los ng/ $\mu$ L de AFM<sub>1</sub> en la muestra.

X= concentración en ng de AFM1 en la muestra.

Despejar X, para obtener los ng de AFM1 en la muestra

**B.8.5.5.8** Si el área del pico obtenido para la muestra es mayor que la obtenida para la solución patrón de la mayor concentración, preparar una solución adecuada diluyendo con Fase móvil B.8.4.10 y volver a inyectar.

**B.8.5.6 Determinación de la Eficiencia de las Columnas de Inmunoafinidad.**

**B.8.5.6.1** Realizar los cálculos necesarios para la fortificación de una muestra por triplicado, con el punto medio de la curva y prosiguiendo como describe B.8.5.4.2 a B.8.5.4.5.

**B.8.5.6.2** Eluir la AFM<sub>1</sub> con 4 mL de acetonitrilo y evaporar a sequedad a 40°C con la ayuda de nitrógeno. Reconstituir con 1 mL de agua acetonitrilo (7:3).

**B.8.5.6.3** Inyectar 50  $\mu$ L al sistema HPLC bajo las condiciones descritas anteriormente. El lote de columnas de inmunoafinidad es adecuado si la recuperación de AFM<sub>1</sub> es > 80%.

**B.8.6 Cálculos:**

Calcular la concentración de AFM<sub>1</sub> en la porción de prueba, usando las siguientes fórmulas:

$$\text{ng AFM}_1 / \text{mL} = \mu\text{g AFM}_1 / \text{L} = \frac{\text{ng de AFM}_1 \text{ en la muestra obtenidos de la curva}}{50 \text{ mL} \times (50 \mu\text{L}/200\mu\text{L})}$$

$$\text{ng AFM}_1 / \text{mL} = \mu\text{g AFM}_1 / \text{L} = \frac{\text{ng de AFM}_1 \text{ en la muestra obtenidos de la curva}}{12.5}$$

Esta fórmula es aplicable sólo cuando ninguna dilución ha sido efectuada. El factor de dilución correspondiente debe ser tomado en cuenta (por ejemplo en el análisis de productos esterilizados o cuando la muestra se sale del intervalo de la curva de calibración).

**B.8.7 Expresión de Resultados.**

$$\boxed{\mu\text{g de AFM}_1 / \text{L}}$$

**B.8.6 Preparación y Dilución de Muestras para su Análisis Microbiológico.****B.9.1 Fundamento**

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

**B.9.2 Materiales y Equipo**

B.9.2.1 Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 mL (o si es necesario de 1 mL y 2 mL), con tapón de algodón. Las pipetas pueden ser graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total.

B.9.2.2 Frascos de vidrio de 250 mL con tapón de rosca.

B.9.2.3 Tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca.

B.9.2.4 Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc.

B.9.2.5 Todo el material e instrumentos que tengan contacto con las muestras bajo estudio deberán esterilizarse mediante: Horno, durante 2 h a 170 a 175°C o 1 h a 180°C o Autoclave, durante 15 minutos como mínimo a  $121 \pm 1,0^\circ\text{C}$ .

B.9.2.6 El material de vidrio puede sustituirse por material desechable que cumpla con las especificaciones deseadas. No debe usarse material de vidrio dañado por esterilización repetida y éste debe ser químicamente inerte.

B.9.2.7 Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de  $170^\circ\text{C}$ .

B.9.2.8 Autoclave con termómetro y manómetro, calibrada con termómetro de máximas y mínimas.

B.9.2.9 Baño de agua con control de temperatura y circulación mecánica, provista con termómetro calibrado con divisiones de  $0,1^\circ\text{C}$  y que mantenga la temperatura a  $45 \pm 0,5^\circ\text{C}$ .

B.9.2.10 Licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato o bien un homogeneizador peristáltico (Stomacher).

B.9.2.11 Vasos para licuadora con tapa esterilizables o bolsas estériles para homogeneizador peristáltico.

B.9.2.12 Balanza granataria con sensibilidad de 0,1 g

B.9.2.13 Vórtex para la agitación de las diluciones.

B.9.2.14 Perilla.

B.9.2.15 Frascos de vidrio con capacidad de 125 a 250 mL.

**B.9.3 Reactivos**

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

**B.9.3.1 Solución de Hidróxido de Sodio 1,0 N**

## FÓRMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Hidróxido de sodio	4,0 g
Agua	100 mL

Preparación:

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

**B.9.3.2 Soluciones Diluyentes****B.9.3.2.1 Solución Reguladora de Fosfatos (solución concentrada).**

## FÓRMULA

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 1,0N. 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. Despues de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deberán ser iguales a los iniciales.

**B.9.3.2.2 Agua Peptonada**

## FÓRMULA

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 1,0N. 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  $5^{\circ}\text{C}$  por un tiempo no mayor de un mes, en condiciones tales que no alteren su volumen o composición.

**B.9.4 Procedimiento****B.9.4.1 Preparación de la Dilución Primaria.****B.9.4.1.1 A partir de muestras líquidas:**

Para muestras líquidas no viscosas 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  $45^{\circ}\text{C}$  un tiempo máximo de 15 minutos y homogeneizar agitando vigorosamente puede utilizarse el Vortex.

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

**B.9.4.1.1.1** Agitar la muestra manualmente con 25 movimientos de arriba a abajo en un arco de 30cm 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. Considerar el uso de vórtex para la agitación de los tubos.

**B.9.4.1.1.2** Siempre que la cantidad de muestra lo permita, tomar alícuotas mayores, por ejemplo volúmenes de 10 u 11 mL, diluidos con 90 o 99 mL, de la misma forma que se describió anteriormente.

**B.9.4.1.2 A partir de muestras sólidas o semisólidas.**

**B.9.4.1.2.1** Las muestras sólidas y semisólidas congeladas, deben descongelarse en refrigeración de 4 a  $8^{\circ}\text{C}$  durante 18 horas y no más de 24 horas antes de proceder a su análisis.

**B.9.4.1.2.2** Pesar una cantidad de 10 u 11 g de la muestra por analizar en un recipiente o bolsa plástica estériles de tamaño adecuado.

**B.9.4.1.2.3** Adicionar un volumen de 90 a 99 mL del diluyente llevado a una temperatura similar a la de la muestra.

**B.9.4.1.2.4** Operar la licuadora o el homogeneizador peristáltico de 1 a 2 minutos hasta obtener una suspensión completa y homogénea según se indique en la técnica correspondiente para cada alimento. Aun en los equipos más lentos, este tiempo no debe exceder de 2,5 minutos.

**B.9.4.1.2.5** Permitir que las partículas grandes se sedimenten, y transferir la cantidad deseada tomando de las capas superiores de la suspensión. Cuando la dilución primaria es muy viscosa o pegajosa, adicionar más diluyente, lo cual debe tomarse en cuenta para las operaciones subsecuentes o expresión de resultados. El homogeneizador peristáltico (Stomacher) puede no ser adecuado para algunos productos (por ejemplo, aquellos con partículas agudas o constituyentes que no se dispersen fácilmente). Debe ser utilizado sólo cuando exista evidencia (publicada o por ensayos comparativos) de que los resultados obtenidos no difieren significativamente con aquellos obtenidos con licuadora.

**B.9.4.2 Preparación de las Diluciones Decimales Adicionales.**

**B.9.4.2.1** Transferir 1 mL o un múltiplo, por ejemplo, 10 u 11 mL de la dilución primaria 1 + 9 (10-1), en otro recipiente conteniendo nueve veces el volumen del diluyente estéril a la temperatura apropiada, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente.

**B.9.4.2.2** Mezclar cuidadosamente cada botella de diluyente siempre de la misma manera que se describe en B.9.4.1.1.1.

**B.9.4.2.3** La selección de las diluciones que se vayan a preparar y de aquellas que se van a inocular, dependen del número esperado de microorganismos en la muestra, con base a los resultados de análisis previos y de la información que se obtenga del personal de inspección que la haya colectado. En ausencia total de información, trabajar con las diluciones de la primera a la sexta.

**B.9.4.2.4** Utilizar pipetas diferentes para cada dilución inoculando simultáneamente las cajas que se hayan seleccionado. El volumen que se transfiera nunca debe ser menor al 10% de la capacidad total de la pipeta.

**B.9.4.2.5** Si la pipeta es terminal y se transfiere un volumen de líquido equivalente a su capacidad total, escurrir aplicando la punta de la pipeta una sola vez en un área de la caja Petri sin líquido.

**B.9.4.2.6** Mientras se afora el líquido de la pipeta, la punta de ésta debe apoyarse en el interior del cuello del frasco y mantenerla en posición vertical, para lo cual este último debe inclinarse lo necesario.

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

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

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

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

#### **B.9.4.3 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.

### **B.10 Método para la Cuenta de Microorganismos Coliformes Totales en Placa.**

#### **B.10.1 Fundamento del método**

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

#### **B.10.2 Materiales**

B.10.2.1 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.

B.10.2.2 Frascos de vidrio de 250 mL con tapón de rosca.

B.10.2.3 Tubos de 16 X 150 mm con tapón de rosca.

B.10.2.4 Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc.

B.10.2.5 Cajas Petri.

B.10.2.6 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  $121 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ .

B.10.2.7 El material de vidrio puede sustituirse por material desechable que cumpla con las especificaciones deseadas. No debe usarse material de vidrio dañado por las esterilizaciones repetidas y éste debe ser químicamente inerte.

#### **B.10.3 Aparatos e instrumentos**

B.10.3.1 Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de  $170^{\circ}\text{C}$ .

B.10.3.2 Autoclave con termómetro y manómetro, calibrada con termómetro de máximas y mínimas.

B.10.3.3 Baño de agua con control de temperatura y circulación mecánica, provista con termómetro calibrado con divisiones de  $0,1^{\circ}\text{C}$  y que mantenga la temperatura a  $45 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ .

B.10.3.4 Licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato o bien un homogeneizador peristáltico (Stomacher).

B.10.3.5 Vasos para licuadora con tapa esterilizables o bolsas estériles para homogeneizador peristáltico.

B.10.3.6 Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de  $\pm 1,0^{\circ}\text{C}$ , provista con termómetro calibrado.

B.10.3.7 Contador de colonias de campo oscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadriculada y lente amplificador.

B.10.3.8 Registrador mecánico o electrónico.

B.10.3.9 Microscopio óptico.

B.10.3.10 Potenciómetro con una escala mínima de 0,1 unidades de pH a  $25^{\circ}\text{C}$ .

#### **B.10.4 Reactivos**

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

##### **B.10.4.1 Soluciones Diluyentes**

###### **B.10.4.1.1 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 1,0N. 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  $121 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ . Despues de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

**B.10.4.1.2 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  $121 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ . Despues 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  $5^{\circ}\text{C}$  por un tiempo no mayor de un mes, en condiciones tales que no alteren su volumen o composición.

**B.10.4.2 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
Aqua	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  $25^{\circ}\text{C}$ , 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  $45^{\circ}\text{C}$ . Evitar el sobrecalentamiento del medio. No debe esterilizarse en autoclave. Usar el medio dentro de las tres primeras horas después de su preparación. En el caso de utilizar medio de cultivo deshidratado, seguir las instrucciones del fabricante.

**B.10.5 Preparación de la Muestra**

La preparación de la muestra debe ser de acuerdo a lo establecido en el numeral 9 de este apéndice normativo.

**B.10.6 Procedimiento**

**B.10.6.1** Colocar en cajas Petri por duplicado 1 mL de la muestra líquida directa o de la dilución primaria, utilizando para tal propósito una pipeta estéril.

**B.10.6.2** Repetir el procedimiento tantas veces como diluciones decimales se requiera sembrar, utilizando una pipeta estéril diferente para cada dilución.

**B.10.6.3** Vertir de 15 a 20 mL del medio RVBA fundido y mantenido a  $45 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$  en baño de agua. En el caso de utilizar cajas de Petri de plástico se vierte de 10 a 15 mL del medio. El tiempo transcurrido entre la preparación de la dilución primaria y el momento en que se vierte el medio de cultivo, no debe exceder de 20 minutos.

**B.10.6.4** Mezclar cuidadosamente el inóculo con el medio con seis movimientos de derecha a izquierda, seis movimientos en el sentido de las manecillas del reloj, seis movimientos en el sentido contrario al de las manecillas del reloj y seis de atrás para adelante, sobre una superficie lisa y nivelada. Permitir que la mezcla solidifique dejando las cajas Petri reposar sobre una superficie horizontal fría.

**B.10.6.5** Preparar una caja control con 15 mL de medio para verificar la esterilidad. Incluir un control adicional que considere la esterilidad de la solución diluyente adicionando 1 mL directo de esta solución en el mismo medio de cultivo.

**B.10.6.6** Despues de que está el medio completamente solidificado en la caja, verter aproximadamente 4 mL del medio RVBA a  $45 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$  en la superficie del medio inoculado. Dejar que solidifique.

**B.10.6.7** Invertir las placas y colocarlas en la incubadora a  $35^{\circ}\text{C}$ , durante  $24 \pm 2$  horas.

**B.10.6.8** Despues del periodo especificado para la incubación, contar las colonias con el contador de colonias.

**B.10.6.9** Seleccionar las placas que contengan entre 15 y 150 colonias. Las colonias típicas son de color rojo oscuro, generalmente se encuentran rodeadas de un halo de precipitación debido a las sales biliares, el cual es de color rojo claro o rosa, la morfología colonial es semejante a lentes biconvexos con un diámetro de 0,5 a 2,0 mm.

**B.10.6.10** Para el caso de polvos, inocular 5 placas con 2 mL de la dilución 1:10, contar las colonias encontradas en cada placa y reportar la suma de UFC/g

#### **B.10.7 Expresión de los Resultados**

##### **B.10.7.1 Cálculo del Método**

**B.10.7.1.1** 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 millilitro o por gramo de producto, multiplicando el número de colonias por el inverso de la dilución correspondiente, tomando los criterios de la NOM-092-SSA1-1994. Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa.

**B.10.7.1.2** Placas que contienen menos de 15 colonias características.

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

**B.10.7.1.3** Placas con colonias no características.

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

#### **B.10.8 Informe de la Prueba**

Informar: UFC/g o mL en placa de agar rojo violeta bilis, incubados a 35°C durante 24 ± 2 h. En caso de emplear diluciones y no observar crecimiento, informar utilizando como referencia la dilución más baja utilizada, por ejemplo dilución 10-1. En caso de no observar crecimiento en la muestra sin diluir se informa: "no desarrollo de coliformes por mL".

### **B.11 Determinación de *Staphylococcus aureus***

#### **B.11.1 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 esperan más de 100 células de *Staphylococcus aureus* por g.

#### **B.11.2 Materiales y Equipo**

Todos los instrumentos que se utilicen para trabajar la muestra deben esterilizarse mediante horno, durante 2 h de 170-175°C o como alternativa en autoclave durante 15 min como mínimo a 121°C ±1.

B.11.2.1 Cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas y separador de huevo.

B.11.2.2 Tubos de cultivo de 16 mm x 150 mm o frascos de 125 a 250 mL de capacidad, con tapón de rosca.

B.11.2.3 Tubos de cultivo de 10 mm x 75 mm, con tapón de rosca.

B.11.2.4 Cajas Petri de 90 a 100 mm de diámetro.

B.11.2.5 Pipetas bacteriológicas de 1 mL y 10 mL de capacidad graduadas en 0,1 mL y 1 mL respectivamente y diámetro de 2 a 3 mm.

B.11.2.6 Pipetas Pasteur.

B.11.2.7 Probetas.

B.11.2.8 Varillas de vidrio de 3,5 mm de diámetro aproximadamente y 20 cm de largo dobladas en ángulo recto, o varillas de plástico estériles desechables.

B.11.2.9 Matraz Erlenmeyer con perlas de vidrio

B.11.2.10 Cámara húmeda: consiste en una caja Petri en la cual se coloca una varilla de vidrio en forma de "V" rodeada de algodón humedecido con agua.

B.11.2.11 Horno para esterilizar que alcance 180°C.

B.11.2.12 Autoclave con termómetro.

B.11.2.13 Baño de agua con regulador de temperatura de 35 ± 0,5°C.

B.11.2.14 Baño de agua con regulador de temperatura de 45 ± 0,5°C.

B.11.2.15 Balanza con capacidad no mayor de 2,500 g y sensibilidad de 0,1 g.

B.11.2.16 Incubadora a 35 ± 1°C.

#### **B.11.3 Reactivos**

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

Cuando se mencione agua debe entenderse que se trata de "agua destilada".

Los reactivos a emplear en el método objeto de esta norma deben ser grado analítico.

**B.11.3.1 Soluciones Diluyentes****B.11.3.1.1 Solución Reguladora de Fosfatos (Solución concentrada)**

## FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Fosfato monopotásico	34,0 g
Aqua	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, aforar con agua a 1 l. Esterilizar durante 15 min a 121°C ±1, conservar en refrigeración (solución concentrada). Tomar 1,25 mL de la solución concentrada y llevar a 1 l con agua (solución de trabajo). Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 mL según se requiera. Esterilizar a 121°C ±1 durante 15 min. Después de la esterilización, los volúmenes finales y el pH de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

**B.11.3.1.2 Agua Peptonada**

## FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Peptona	1,0 g
Cloruro de sodio	8,5 g
Aqua	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.

**B.11.3.2 Medios de Cultivo****B.11.3.2.1 Medio de Baird-Parker**

## FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Medio base (11.3.2.2)	95,0 mL
Solución de telurito de potasio (11.3.2.3)	1,0 mL
Emulsión de yema de huevo (11.3.2.4)	5,0 mL

## Preparación

Cuando el medio base esté a 45°C, agregar los demás ingredientes y mezclar. Colocar de 15 a 20 mL del medio completo, enfriar y dejar solidificar. Las placas pueden almacenarse por 48 h a temperatura de 0 a 5°C.

**B.11.3.2.2 Medio base de Baird-Parker**

## FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
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
Aqua	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.

En el caso de usar medio base deshidratado, seguir las indicaciones del fabricante.

**B.11.3.2.3 Solución de Telurito**

## FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Telurito de potasio	1,0 g
Aqua	100,0 mL

## Preparación

Disolver el telurito de potasio en agua y esterilizar. La solución puede ser almacenada por varios meses a temperatura de 0 a 5°C.

**B.11.3.2.4 Emulsión de Yema de huevo****Preparación**

Lavar con agua y jabón los huevos frescos que sean necesarios y limpiarlos con una solución de tintura de yodo (solución alcohólica al 2%) o sumergirlos en solución de cloruro mercúrico (1:1000). Enjuagar con agua estéril y secar con gasa estéril. En campana de flujo laminar o en condiciones asépticas, abrir los huevos y vaciarlos en un separador de claras estéril. Transferir las yemas a una probeta hasta un volumen de 60 mL y completar a 90 mL con solución salina isotónica. Verter la emulsión a un matraz Erlenmeyer con perlas de vidrio estéril y agitar fuertemente para formar la emulsión. Filtrar a través de gasa. Las placas deben utilizarse dentro de las 48 h siguientes a su preparación.

**B.11.3.2.5 Solución Salina fisiológica****FORMULA**

INGREDIENTES	CANTIDADES
Cloruro de sodio	0,85 g
Agua	100,0 mL

**Preparación**

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

**B.11.3.2.6 Caldo de Infusión cerebro-corazón (BHI)****FORMULA**

INGREDIENTES	CANTIDADES
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°C ±1.

**B.11.3.2.7 Ácido Desoxirribonucleico helicoidal de timo de ternera.****FORMULA**

INGREDIENTES	CANTIDADES
Ácido desoxirribonucleico helicoidal de timo de ternera o equivalente	0,03 g
Agar	1,00 g
Cloruro de calcio anhídrico (Solución 0,01 M) (11.3.2.8)	0,10 mL
Cloruro de sodio	1,00 g
Azul de toluidina (Solución 0,1 M) (11.3.2.9)	0,30 mL
Tris-(hidroximetil-aminometano) (Tris solución 0,05 M, pH 9) (11.3.2.10)	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 porta objetos limpio y agregar 3 mL del medio fundido esparciéndolo por la superficie. Cuando el agar solidifique, hacer orificios con la punta de una pipeta Pasteur. Conservar en refrigeración para evitar la deshidratación.

**B.11.3.2.8 Solución de Cloruro de calcio anhídrico 0,01 M**

Cloruro de calcio PM = 110,99

Disolver 0,1199 g de cloruro de calcio en 100 mL de agua.

**B.11.3.2.9 Solución de Azul de toluidina 0,1 M**

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

**B.11.3.2.10 Solución Amortiguadora 0,05 M Tris-(hidroximetilaminometano)**

(Tris pH 9) PM = 121,1

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

**B.11.3.2.11 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.

**B.11.4 Preparación de la Muestra**

La preparación de la muestra debe ser de acuerdo a lo establecido en el numeral 9 de este apéndice normativo.

**B.11.5 Procedimiento**

**B.11.5.1** Utilizando diferentes pipetas de 1 mL para cada dilución, depositar 0,1 mL sobre la superficie de las placas de agar Baird-Parker.

**B.11.5.2** Distribuir el inóculo sobre la superficie del agar con varillas estériles de vidrio en ángulo recto, utilizando una para cada dilución.

**B.11.5.3** Mantener las placas en su posición hasta que el inóculo sea absorbido por el agar.

**B.11.5.4** Invertir las placas e incubar de 45 a 48 h a 35°C.

**B.11.5.5** 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.

**B.11.5.6** Cuando las placas tengan menos de 15 colonias típicas también pueden ser utilizadas y al informe se debe agregar la nota de "valor estimado".

**B.11.5.7** Las colonias típicas son negras, circulares, brillantes, convexas, lisas, de diámetro de 1 a 2mm y muestran una zona opaca y un halo claro alrededor de la colonia.

**B.11.5.8** Seleccionar las colonias de acuerdo con el siguiente cuadro para realizar las pruebas de coagulasa y termonucleasa:

CUADRO

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

**B.11.5.9** Seleccionar el número de colonias y sembrar cada una en tubos con 0,5 mL de caldo de infusión cerebro-corazón.

**B.11.5.10** Incubar a 35°C durante 24 h.

**B.11.5.11** Inocular en la misma forma cepas conocidas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* como testigos positivo y negativo.

**B.11.5.12** Despues del periodo de incubación pasar con una pipeta de 1 mL, 0,3 mL de cada cultivo a otro tubo de 10 mm x 75 mm y conservarlo para la prueba de termonucleasa. El resto del cultivo se usa para la prueba de coagulasa.

**B.11.5.13 Prueba de Coagulasa**

**B.11.5.13.1** Agregar a los 0,2 mL del cultivo anterior, 0,2 mL de plasma de conejo diluido volumen a volumen con solución salina estéril.

**B.11.5.13.2** 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.

**B.11.5.13.3** Para comprobar la coagulabilidad del plasma de conejo se añade una gota de cloruro de calcio al 5% a 0,5 mL de plasma reconstituido empleado, formándose un coágulo en 10-15 seg.

**B.11.5.14 Prueba de Termonucleasa**

**B.11.5.14.1** Calentar durante 15 min, 0,3 mL de cultivo en caldo de infusión cerebro-corazón en baño de agua hirviendo.

**B.11.5.14.2** Pasar una gota de cada cultivo por medio de una pipeta Pasteur a un orificio del medio, incluye testigo.

**B.11.5.14.3** Incubar a 35°C en cámara húmeda de 4 a 24 h.

**B.11.5.14.4** La aparición de un halo color rosa extendido de por lo menos 1 mm alrededor de la perforación se califica como positiva.

**B.11.6 Cálculo**

Hacer el cálculo del contenido de microorganismos en el producto tomando en cuenta el número de colonias totales, el número de colonias confirmadas, la dilución y el volumen inoculado (0,1 mL).

Ejemplo 1:

Si la caja tiene 80 colonias en la dilución 1:1000

Se toman 5 colonias para la prueba, de éstas dan 4 positivas, el cálculo es:

$$\frac{80 \times 4}{5} = 64 \times 1000 \times 10 = 640\,000$$

Ejemplo 2:

Si la caja tiene 14 colonias en la dilución 1:10

Se toman 3 colonias para la prueba, de éstas dan 2 positivas, el cálculo es:

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

**B.11.7 Expresión de los Resultados**

Según ejemplo 1:

Informar como *Staphylococcus aureus* 640 000 UFC/g

Según ejemplo 2:

Informar como *Staphylococcus aureus* 930 UFC/g valor estimado

Si las pruebas confirmativas resultan negativas en todas las colonias probadas, informar como:

0 UFC/g en muestras directas

-10 UFC/g en muestras de dilución 1:10

-100 UFC/g en muestras de dilución 1:100

En la práctica los resultados pueden variar, esto dependerá del técnico que trabaje el método y el grado de confiabilidad del mismo, que en el 95% de los casos es de  $\pm 16\%$  a  $\pm 52\%$ .

**B.12 Determinación de *Salmonella* spp.****B.12.1 Fundamento**

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

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.

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

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

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

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

**B.12.2 Materiales y Equipo**

**B.12.2.1** Horno para esterilizar que alcance los 180°C

**B.12.2.2** Incubadora con termostato para evitar variaciones mayores de  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$  y termómetro

**B.12.2.3** Autoclave con termómetro o manómetro, probado con termómetro de máximas

**B.12.2.4** Baño maría con termostato y termómetro

**B.12.2.5** Balanza granataria con sensibilidad de 0,1 g, o Balanza de precisión o analítica

**B.12.2.6** Licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato, con vasos esterilizables (vidrio o aluminio)

**B.12.2.7** Mecheros Bunsen o Fisher

**B.12.2.8** Potenciómetro

**B.12.2.9** Matraces Erlenmeyer de 500 mL

**B.12.2.10** Recipientes de boca ancha, de capacidad apropiada para contener las muestras simples y compuestas

**B.12.2.11** Angulos de vidrio

**B.12.2.12** Cucharas, bisturíes, cuchillos y pinzas

**B.12.2.13** Tubos de ensaye de 16 x 150 mm y de 20 x 100 mm

**B.12.2.14** Tubos para serología de 10 x 75 mm o de 13 x 100 mm

**B.12.2.15** Pipetas bacteriológicas de 10,0 y 5,0 mL, graduadas en 0,1 mL y protegidas con tapón de algodón

**B.12.2.16** Pipetas de 1 mL, con graduaciones de 0,01 mL.

**B.12.2.17** Cajas de petri estériles de vidrio o desechables

**B.12.2.18** Rejillas para tubos de ensaye

**B.12.2.19** Asa de platino o nicromel de aproximadamente 3 mm de diámetro

**B.12.2.20** Papel pH (intervalo de 6-8) con graduaciones máximas de 0,4 unidades de pH para cambios de color

**B.12.2.21** 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

**B.12.2.22** Perilla

**B.12.2.23** Vórtex

**B.12.2.24** Estomacher (opcional)

### **B.12.3 Reactivos**

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

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

#### **B.12.3.1 Medios de Pre-enriquecimiento**

##### **B.12.3.1.1 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.

##### **B.12.3.1.2 Caldo Lactosado**

###### FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Extracto de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Lactosa	5,0 g
Agua destilada pH final: 6,9 ± 0,2	1,0 l

###### Preparación

Disolver los ingredientes en agua, calentando a 65°C. Distribuir en porciones de 225 mL, en frascos de 500 mL. Esterilizar durante 15 min a 121°C ± 1°C.

##### **B.12.3.2 Caldo de Enriquecimiento**

###### **B.12.3.2.1 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 pH final: 7,0 ± 0,2 a 25°C	1,00 l

###### Preparación

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

**B.12.3.2.2 Caldo Tetratrationato**

## FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Proteosa peptona o triptona	5,0 g
Sales biliares	1,0 g
Carbonato de calcio	10,0 g
Tiosulfato de sodio pentahidratado	30,0 g
Agua destilada pH final: 7,0 ± 0,1	1,0 l

**Preparación**

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

**B.12.3.2.3 Vassiliadis-Rappaport****Solución A**

## FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Triptona	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**

## FORMULA

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**

## FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
solución A	1000 mL
solución B	100 mL
solución C	10 mL

**Preparación**

Adicionar 1000 mL de la solución A, 100 mL de la solución B y 10 mL de la solución C. Ajustar el pH si es necesario, de tal manera que después de la esterilización sea de 5,2. Distribuir antes de usar dentro de tubos en cantidades de 10 mL. Almacenar en refrigeración.

**B.12.3.2.4 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 pH final: 7,3 ± 0,2	1,0 l

**Preparación**

Disolver los ingredientes en 1 litro de agua destilada, calentando lentamente hasta su disolución completa. Distribuir porciones de 225 mL dentro de matraces de 500 mL y esterilizar en autoclave durante 15 min a 121°C ± 1°C.

**B.12.3.2.5 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.

**B.12.3.2.6 Caldo Soya tripticasa estéril adicionado con sulfito de potasio**

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

**B.12.3.3 Medios de Aislamiento****B.12.3.3.1 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 pH final: 6,9 ± 0,2	1,0000 l

**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°C ± 1°C. El sobrecalentamiento del medio disminuye su selectividad. Enfriar el medio a 50°C y distribuirlo en cajas de petri estériles. El aspecto del medio es oscuro, de color marrón.

**B.12.3.3.2 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 pH final: 7,6 ± 0,2	1,000 l

**Preparación**

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

**B.12.3.3.3 Agar xirosa lisina desoxicolato (XLD)**

## FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Xírosa	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 ± 0,2	

**Preparación**

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

**B.12.3.3.4 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 ± 0,2	

**Preparación**

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

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

**B.12.3.3.5 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.

**B.12.3.4 Medios para Pruebas Bioquímicas****B.12.3.4.1 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 pH final: 7,3 ± 0,2	100,0 mL

**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.

Nota: Las peptonas se pueden sustituir por 2 g de polipeptona.

**B.12.3.4.2 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 pH final: 6,7 ± 0,2	100,0 mL

**Preparación**

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

**B.12.3.4.3 Agar Nutritivo**

## FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Extracto de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada pH final: 6,8 ± 0,2	1,0 l

**Preparación**

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

**B.12.3.4.4. Medio de SIM (para Sulfuro, Indol y Movilidad)**

## FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Extracto de carne	3,000 g
Peptona	30,000 g
Hierro peptonizado	0,200 g
Tiosulfato de sodio	0,025 g
Agua destilada pH final: 7,3 ± 0,2	1,000 l

**Preparación**

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

**B.12.3.4.5 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 pH final: 6,8 ± 0,2	1,00 l

**Preparación**

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

**B.12.3.4.6 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 pH final: 6,9 ± 0,2	1,0 l

**Preparación**

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

**B.12.3.4.7 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 pH final: 7,4 ± 0,2	1,000 l

**Preparación**

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

**B.12.3.4.8 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.

**B.12.3.4.9 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.

**B.12.3.4.10 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 ± 0,2	

**Preparación**

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

**B.12.3.4.11 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 ± 0,2	

**Preparación**

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

**B.12.3.5 Soluciones****B.12.3.5.1 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.

**B.12.3.5.2 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.

**B.12.3.5.3 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.

**B.12.3.5.4 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.

**B.12.3.5.5 Reactivo de Kovac**

## FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
p-dimetil-aminobenzaldehído 5,0 g	5,0 g
Alcohol amílico 75,0 mL	75,0 mL
Ácido clorhídrico concentrado 25,0 mL	25,0 mL

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

**B.12.3.5.6 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.

**B.12.3.5.7 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.

**B.12.3.5.8 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 100,0 mL.

**B.12.3.5.9 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.

**B.12.3.6 Antisueros****Antisuero polivalente somático (O)****Antisuero polivalente flagelar (H)****Antisuero Vi****B.12.4 Procedimiento****B.12.4.1 Preparación de los alimentos para el aislamiento de *Salmonella*.**

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

**B.12.4.1.1 Procedimiento general para la preparación de muestras.**

Pesar asepticamente 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 asepticamente 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  $\pm$  2 h a 35°C. Continuar como se indica en B.12.4.1.2.

**B.12.4.1.2 Procedimiento específico para la preparación de muestra según el producto.****B.12.4.1.2.1 Leche en polvo, entera, semidescremada o descremada.**

Seguir el procedimiento general para el pesado de la muestra y adicionarla lentamente a un matraz Erlenmeyer con 1 lt de agua estéril, 2 mL al 1% de verde brillante, procurando que el polvo quede en la superficie del líquido y se hidrate suavemente. De esta solución se toman 225 mL para disolver la muestra. Dejar la mezcla en reposo por 60 min, e incubar como se indica en B.12.4.1.1.

**B.12.4.1.2.2 Queso**

Proceder igual que en B.12.4.1.1 utilizando agua de peptona tamponada como medio de preenriquecimiento.

**B.12.4.1.2.3 Productos procesados térmicamente y productos secos.**

Se sigue el procedimiento señalado en B.12.4.1.1 hasta la homogeneización. 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, adicionar hasta un máximo de 2,25 mL de Tergitol aniónico 7 estéril ( $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}/15$  min) y mezclar bien. Puede utilizarse Triton X-100 estéril. Usar la cantidad necesaria de estos detergentes utilizando el volumen mínimo para que se inicie la formación de espuma. Puede ser, para el Triton X-100 de 2 a 3 gotas. La cantidad de los mismos dependerá en gran medida de la composición del alimento. Los detergentes no serán necesarios en los productos glandulares en polvo. Incubar las muestras como se indica en B.12.4.1.1.

**B.12.4.1.2.4 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 tetratrationato (sin verde brillante) a cada muestra analítica. Licuar por dos min y pasar asepticamente a matraces Erlenmeyer de 500 mL. Dejar reposar y ajustar el pH como se indica en B.12.4.1.1. 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 tetratrationato. Homogeneizar e incubar. Continuar como se indica en B.12.4.2.1.

**B.12.4.1.2.5 Dulces y dulces cubiertos**

Pesar asepticamente 25 g de la muestra en un vaso para licuadora agregando 225 mL de leche descremada reconstituida. Licuar por dos min. Manejar igual que en B.12.4.1.1 hasta después de ajustar el pH. Adicionar 0,45 mL de la solución verde brillante al 0,1% y mezclar bien. Incubar como se indica en B.12.4.1.1.

**B.12.4.2 Aislamiento de *Salmonella* spp.**

**B.12.4.2.1** 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 tetratrationato y a otro con 10 mL de caldo selenito cistina. Como alternativa, en sustitución del caldo tetratrationato puede emplearse el medio Vassiliadis-Rappaport.

**B.12.4.2.2** Incubar de 18 a 24 h a 35°C o, para alimentos fuertemente contaminados a 42°C por el mismo periodo. Estriar los productos que fueron directamente enriquecidos en medios selectivos.

**B.12.4.2.3** 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 tetratrationato. Incubar las placas 24 ± 2 h a 35°C.

**B.12.4.2.4** 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 cafés, grises o negras; con o sin brillo metálico. Generalmente el medio circundante (halo) es café, tornándose posteriormente negro.

Algunas cepas producen colonias verdes sin la formación del halo oscuro. Si las placas no muestran colonias típicas o no se observa crecimiento, incubar 24 h adicionales.

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

**B.12.4.3 Identificación Bioquímica**

**B.12.4.3.1** 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 si es necesario retomar más colonias.

**B.12.4.3.2** Observar el crecimiento en los tubos y considerar presuntivamente positivas para *Salmonella* las colonias que den las siguientes reacciones:

**B.12.4.3.2.1** 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 sulfihídrico.

**B.12.4.3.2.2** 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 sulfihídrico en este medio con ennegrecimiento a lo largo de la punción.

**B.12.4.3.2.3** Retener todos los cultivos que muestren las reacciones características de *Salmonella* en los medios TSI y LIA para las pruebas adicionales, indicadas en B.12.4.3.3.

**B.12.4.3.3** Los cultivos con TSI que no parecen de *Salmonella* spp. pero que presentan reacciones en LIA típicas, deben trabajarse como cultivos presuntivos positivos, ya que en estos casos, el medio LIA permitirá detectar *S. arizona* y cepas atípicas de *Salmonella* que utilicen lactosa o sacarosa. Descartar solamente los cultivos que muestren reacciones atípicas en ambos medios.

**B.12.4.3.4** Continuar el análisis a partir de los tubos de TSI con reacciones típicas. Si el cultivo presenta reacciones atípicas en este medio, tomar colonias adicionales de las placas de donde se obtuvo el cultivo atípico anterior y sembrar las pruebas bioquímicas nuevamente.

**B.12.4.3.5** Continuar la identificación bioquímica y serológica a partir de los cultivos recuperados de TSI. Se recomienda trabajar seis cultivos por cada 25 g de unidad analítica seleccionando colonias procedentes de ambos medios de enriquecimiento.

**B.12.4.3.6 Prueba de Ureasa**

**B.12.4.3.6.1 Prueba de Ureasa (convencional).** Con un asa estéril, tomar crecimiento del cultivo presumiblemente positivo de cada tubo de medio TSI e inocular tubos de caldo urea. Utilizar un control de medio para comparar el vire púrpura de las reacciones positivas con el color del medio original. Incubar 24 ± 2 h a 35°C.

**B.12.4.3.6.2 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 ± 0,5°C en baño de agua. Descartar todos los cultivos que den ureasa positiva. Retener los cultivos que den la prueba negativa (sin cambio de color del medio).

**B.12.4.4 Identificación Serológica**

**B.12.4.4.1 Ensayo de los Antígenos somáticos de *Salmonella* (Antisuero polivalente O)**

**B.12.4.4.1.1** Colocar con un asa dos gotas separadas de solución salina estéril sobre un portaobjetos o en dos secciones de una placa para aglutinación. Suspender en cada una de las gotas, una porción del cultivo desarrollado en TSI.

**B.12.4.4.1.2** Agregar a una de ellas una gota del antisuero polivalente somático (O) y mezclar con el canto del asa o empleando aplicadores de madera.

**B.12.4.4.1.3** Agitar inclinando la lámina hacia atrás y hacia adelante durante aproximadamente un min. Observar bajo buena iluminación sobre un fondo oscuro.

**B.12.4.4.1.4** Considerar cualquier grado de aglutinación como positiva. La prueba positiva resulta cuando se presenta aglutinación en la gota con el cultivo y el antisuero y no aglutinación en la gota que contiene el cultivo y la solución salina. Si se observa aglutinación en ambas gotas, la prueba no es definitiva y se debe continuar con las pruebas bioquímicas complementarias.

**B.12.4.4.2** Cuando la aglutinación es positiva con el suero polivalente O, puede determinarse el subgrupo empleando antisueros para los diferentes subgrupos (los grupos B, C, D y E, suelen ser los más frecuentes).

**B.12.4.4.2.1** Si la aglutinación con el antisuero O es negativa, utilizar antisuero Vi y efectuar la prueba. Si hay aglutinación con Vi calentar el cultivo a ebullición y repetir la aglutinación con el antisuero polivalente O.

**B.12.4.4.2.2** Si no se cuenta con los sueros grupos específicos, solicitar la tipificación de la cepa al Laboratorio de Enterobacterias del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia de la Secretaría de Salud o al Laboratorio Nacional de Salud Pública.

**B.12.4.4.3** Si se requiere, practicar el ensayo de los antígenos flagelares de *Salmonella* (Antisuero polivalente H).

**B.12.4.4.3.1** 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 tripticaseina e incubar por 24 ± 2 h a 35°C (para ensayo al día siguiente). Adicionar 2,5 mL de solución salina formalizada a 5 mL del cultivo en caldo o al cultivo en agar cerebro corazón (BHI).

**B.12.4.4.3.2** 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.

**B.12.4.5 Pruebas Bioquímicas Complementarias**

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

**B.12.4.5.1** 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. arizona*.

**B.12.4.5.2** Interpretar los cambios en los medios inoculados conforme lo siguiente:

**B.12.4.5.2.1 Agar Citrato de Simmons**

Inocular por estría el tubo. Incubar 96 ± 2 h a 35 ± 2°C.

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

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

**B.12.4.5.2.2 Medio SIM**

Inocular por punción. Incubar 24 h a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Movilidad.

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

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

Producción de ácido sulfhídrico.

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

Prueba negativa: ausencia de color negro.

Producción de indol.

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

Prueba positiva: desarrollo de un anillo de color rojo.

Prueba negativa: sin cambio de color.

**B.12.4.5.2.3 Caldo RM-VP**

Inocular un tubo con el medio.

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

**B.12.4.5.2.4 Prueba de Voges-Proskauer (VP)**

Transferir a un tubo un mL del cultivo de 48 h. Adicionar 0,6 mL de solución de alfa naftol. Adicionar 0,2 mL de solución de hidróxido de potasio 40%. Adicionar algunos cristales de creatinina (opcional). Interpretar los resultados después de incubar 2 h a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  o 4 h a temperatura ambiente.

Prueba positiva: desarrollo de color rojo ladrillo.

Prueba negativa: sin cambio de color.

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

**B.12.4.5.2.5 Prueba de Rojo de metilo (RM)**

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

Prueba positiva: desarrollo de color rojo.

Prueba negativa: desarrollo de color amarillo.

**B.12.4.5.2.6 Caldo Malonato**

Inocular un tubo conteniendo el medio. Incubar  $40 \pm 2$  h a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Prueba positiva: desarrollo de color azul.

Prueba negativa: sin cambio de color.

**B.12.4.5.2.7 Caldo Manitol**

Inocular un tubo conteniendo el medio. Incubar  $24 \pm 2$  h a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Prueba positiva: desarrollo de color amarillo.

Prueba negativa: sin cambio de color.

**B.12.4.5.3 Consultar los resultados obtenidos en el cuadro 2 para la identificación de los géneros de las bacterias investigadas.**

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

**B.12.4.6 Cálculo y Expresión de Resultados****B.12.4.6.1 Interpretación de reacciones bioquímicas y serológicas.****CUADRO 1**

Reacciones bioquímicas	Reacciones serológicas	Interpretación
Típica	Antígeno O Vi o H positivo	Cepas consideradas como <i>Salmonella</i> spp.
Típica	Todas las reacciones negativas	
Típica	No probada	Puede ser <i>Salmonella</i> spp.
Reacciones atípicas	Antígeno O, Vi o H positivo	
Reacciones atípicas	Todas las reacciones negativas	No debe ser considerada <i>Salmonella</i> spp.

**Nota:** Ver imagen 1 al final del método.

B.12.4.6.2 Reacciones Bioquímicas y Serológicas de *Salmonella* spp.

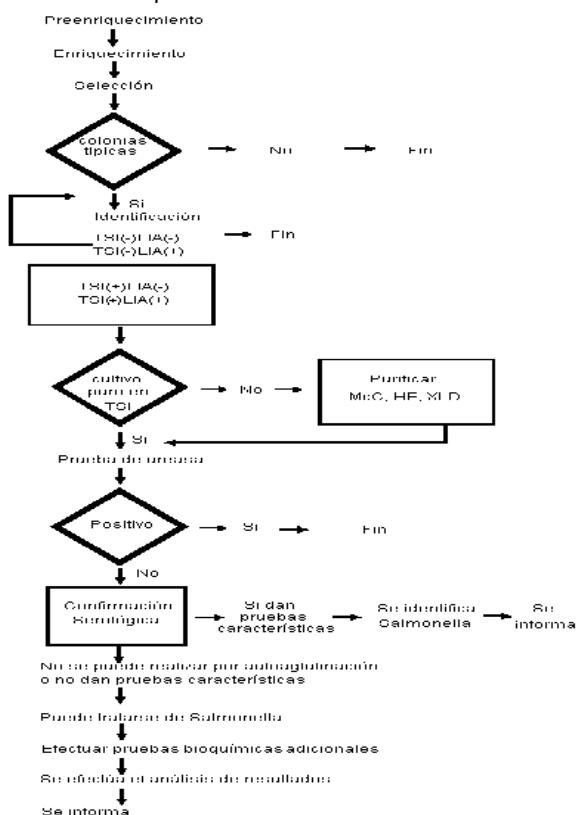
CUADRO 2

Prueba o sustrato	Positivo	Negativo	Reacción
Glucosa (TSI)	amarillo	rojo	+
Lisina descarboxilasa(LIA)	púrpura	amarillo	+
H2S (TSI y LIA)	negro	no negro	+
Ureasa	rojo-púrpura	no hay cambio de color	-
Caldo de lisina descarboxilasa	púrpura	amarillo	+
Caldo dulcitol rojo de fenol	amarillo o gas	no hay cambio de color ni gas	+ <sup>b</sup>
Caldo KCN	crecimiento	no hay crecimiento	-
Caldo malonato	azul	no hay cambio de color	- <sup>c</sup>
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	- <sup>c</sup>
Caldo sacarosa rojo fenol	amarillo o gas	no hay cambio de color ni gas	-
Prueba Voges- Proskauer	de rosa a rojo	no hay cambio de color	-
Prueba rojo de metilo	rojo difuso	amarillo difuso	+
Citrato de Simmons	crecimiento color azul	no hay crecimiento, no hay cambio de color	v

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

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

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

IMAGEN 1. Diagrama de Flujo para la determinación de *Salmonella* spp.

**B.12.4.7 Informe de Resultados**

Informar: Presencia o Ausencia de *Salmonella* en \_\_\_\_\_ g o \_\_\_\_\_ mL de muestra.

**B.13 Determinación de *Listeria monocytogenes*.****B.13.1 Fundamento**

El método para detectar la presencia de *L. monocytogenes* se basa en el aislamiento y la diferenciación de especies de *Listeria* spp., principalmente por la fermentación de carbohidratos y la actividad hemolítica de los miembros de este género.

**B.13.2 Materiales y Equipo**

**B.13.2.1** Aceite de inmersión

**B.13.2.2** Asas bacteriológicas

**B.13.2.3** Cajas Petri

**B.13.2.4** Cobreobjetos

**B.13.2.5** Matraces Erlenmeyer de 500 mL

**B.13.2.6** Lámpara de luz blanca

**B.13.2.7** Lápiz graso o marcador

**B.13.2.8** Lupa de bajo aumento

**B.13.2.9** Pipetas volumétricas de 25, 10 y 1,0 mL

**B.13.2.10** Portaobjetos escavado

**B.13.2.11** Portaasas

**B.13.2.12** Tubos de 16 x 125 mm

**B.13.2.13** Tubos de 13 x 100 mm u otros con tapón de rosca

**B.13.2.14** Sistema de filtración con membranas con un tamaño de poro de 0,45  $\mu$ m

**B.13.2.15** Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de 170°C.

**B.13.2.16** Autoclave con termómetro y manómetro, calibrada con termómetro de máximas y mínimas.

**B.13.2.17** 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  $45 \pm 0,5^\circ\text{C}$ .

**B.13.2.18** Licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato o bien un homogeneizador peristáltico (Stomacher).

**B.13.2.19** Vasos para licuadora con tapa esterilizables o bolsas estériles para homogeneizador peristáltico.

**B.13.2.20** Balanza granataria con sensibilidad de 0,1 g.

**B.13.2.21** Incubadoras con termostato que evite variaciones mayores de  $\pm 1,0^\circ\text{C}$ , provista con termómetro calibrado.

**B.13.2.22** Microscopio de contraste de fases con objetivo de inmersión en aceite (100 X) o microscopio de campo oscuro.

**B.13.3 Reactivos**

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

Cuando se indica agua, debe entenderse que se trata de agua destilada.

**B.13.3.1** Ácido acético 5 N

**B.13.3.2** Ácido clorhídrico 1 M

**B.13.3.3** Ácido sulfanílico (cristales)

**B.13.3.4** Alfa-naftilamina

**B.13.3.5** Alfa-naftol 5% en etanol absoluto

**B.13.3.6** Etanol absoluto

**B.13.3.7** Granalla de zinc

**B.13.3.8** Hidróxido de sodio 1 M

**B.13.3.9** Lactamato de glicil-glicina (anhídrido de glicina)

**B.13.3.10** Regulador de fosfatos glicerinado con pH  $9,0 \pm 0,2$

**B.13.3.11** Sangre de carnero desfibrinada

**B.13.3.12** Solución al 3% de peróxido de hidrógeno

**B.13.3.13** Solución salina fisiológica 0,85% estéril

**B.13.3.14** Sueros comerciales para tipificación de *Listeria* spp

**B.13.3.15** Sulfato de cadmio al 20%

**B.13.3.16** Zinc pulverizado

**B.13.3.17 Reactivos para Tinción de Gram****B.13.3.17.1 Alcohol-acetona**

Ingredientes	Cantidad
Etanol (95%)	700,0 mL
Acetona	300,0 mL

Mezclar ambos líquidos.

**B.13.3.17.2 Cristal Violeta****Solución A**

Ingredientes	Cantidad
Cristal violeta	2,0 g
Etanol (95%)	20,0 mL

Disolver el cristal violeta en el etanol.

**Solución B**

Ingredientes	Cantidad
Oxalato de amonio	0,8 g
Agua	80,0 mL

Disolver el oxalato de amonio en el agua.

Después de preparar las soluciones A y B, verter una en la otra y agitar hasta que se mezclen perfectamente.

**B.13.3.17.3 Solución de Yodo**

Ingredientes	Cantidad
Yodo	1,0 g
Yoduro de potasio	2,0 g
Agua	300,0 mL

Triturar finamente el yodo y el yoduro de potasio en un mortero, de ser posible en una campana de extracción. Añadir una pequeña cantidad de agua para lavar el material, agregar el resto del agua y agitar.

**Nota:** ¡Evitar el contacto de los reactivos con la piel!

**B.13.3.17.4 Solución de Safranina**

Ingredientes	Cantidad
Safranina	0,25 g
Etanol (95%)	10,00 mL
Aqua	100,00 mL

Disolver la safranina en el etanol, mezclar, agregar el agua y volver a agitar. Filtrar la solución con papel filtro.

**B.13.3.18 Reactivos para la Determinación de Nitritos****B.13.3.18.1 Reactivo A**

Ingredientes	Cantidad
Alfa-naftilamina	0,5 g
Ácido acético 5N	100,0 mL

**B.13.3.18.2 Reactivo B**

Ingredientes	Cantidad
Ácido sulfanílico	1,0 g
Ácido acético 5N	125,0 mL

**B.13.3.18.3 Reactivo C**

Ingredientes	Cantidad
Ácido acético 5N	200,0 mL

**B.13.3.18.4 Solución de Sulfato de cadmio al 20%**

Colocar granillas de zinc en solución de sulfato de cadmio al 20% de 4 a 6 h. Disolver el precipitado de cadmio, adicionando ácido clorhídrico 1N.

**B.13.4 Medios de Cultivo**

A continuación se presentan las fórmulas y los procedimientos para preparar los medios empleados en este análisis microbiológico. En caso de disponer de fórmulas comerciales deshidratadas se deben seguir las instrucciones del fabricante para su preparación.

**B.13.4.1 Caldo soya tripticaseína con 0,6 % de extracto de levadura (CSTEL)**

Ingredientes	Cantidad
Caldo soya tripticaseína	30,0 g
Extracto de levadura	6,0 g
Agua	1000,0 mL

Agitar hasta disolver los ingredientes. Esterilizar a  $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 15 min. El pH final de la solución debe ser  $7,3 \pm 0,2$ .

**B.13.4.2 Caldo de Enriquecimiento (EB) pH 7,3**

Un litro de caldo soya tripticaseína con extracto de levadura (CSTEL) debe contener los siguientes suplementos:

Suplementos	Cantidad
Clorhidrato de acriflavina	15,0 mg
Ácido nalidíxico (sal sódica)	40,0 mg
Cicloheximida	50,0 mg
Ácido pirúvico (sal sódica) solución al 10 % (p/v) *	11,1 mL

\* Utilizar solamente cuando se sospeche que las células de *Listeria* estén dañadas. (Ver el punto B.13.6.1)

Preparar los suplementos de acriflavina y nalidíxico a partir de una solución al 0,5 % (p/v) con agua. El suplemento de cicloheximida prepararlo como una solución al 1,0 % (p/v) en una solución al 40 % (v/v) de etanol en agua. Esterilizar por filtración los suplementos. Agregar en condiciones asépticas los suplementos al medio CSTEL previamente esterilizado, justo antes de su uso. Para la preparación de un litro del medio CSTEL se debe partir de las soluciones anteriores, agregando las siguientes cantidades: 3,0 mL de acriflavina, 8,0 mL de ácido nalidíxico y 5,0 mL de solución de cicloheximida.

**Precaución:** ¡La cicloheximida es una sustancia química altamente tóxica, durante su manejo deben emplearse guantes, lentes de protección y lavarse las manos inmediatamente después de usarla!

**B.13.4.3 Medio de Cloruro de litio feniletanol -moxolactam (LMP)**

Ingredientes	Cantidad
Agar fenil etanol	35,5 g
Glicina anhídrica	10,0 g
Cloruro de litio	5,0 g
Solución de moxolactam al 1 % en amortiguador de fosfatos pH 6,0	2,0 mL
Agua	1000,0 mL

Esterilizar el medio (sin moxolactam) en autoclave a  $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 15 min. Enfriar de 48 a  $50^{\circ}\text{C}$  y agregar la solución de moxolactam previamente esterilizada por filtración. Distribuir volúmenes de 12 a 15 mL del medio en cajas de Petri estériles. Las placas delgadas facilitan la observación de las colonias.

**B.13.4.4 Medio Oxford****B.13.4.4.1 Medio Base Oxford (OXA)**

Ingredientes	Cantidad
Base de agar Columbia	39,0 g
Esculina	1,0 g
Citrato férrico amónico	0,5 g
Cloruro de litio	15,0 g
Agua	1000,0 mL

Agregar los ingredientes a un litro de agua y llevar a ebullición hasta disolución completa. Esterilizar en autoclave a  $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 15 min. Enfriar a  $50^{\circ}\text{C}$  el medio base y en condiciones asépticas agregar los suplementos.

Un litro de medio Oxford debe contener los siguientes suplementos:

Suplementos	Cantidad
Cicloheximida	400 mg
Sulfato de colistina	20 mg
Acriflavina	5 mg
Cefotetán	2 mg
Fosfomicina	10 mg

Disolver la cicloheximida, el sulfato de colestina, acriflavina, cefotetán y la fosfomicina en 10 mL de una mezcla 1:1 de etanol: agua. Esterilizar por filtración antes de agregar al medio base. Mezclar y vaciar en cajas Petri estériles. Las placas del medio Oxford se pueden almacenar como máximo dos semanas.

**B.13.4.5 Agar Soya tripticaseína con 0,6% de extracto de levadura (ASTEL)**

Ingredientes	Cantidad
Agar soya tripticaseína	40,0 g
Extracto de levadura	6,0 g
Agua	1000,0 mL

Agitar y calentar a ebullición hasta disolver el agar. Esterilizar a  $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 15 min. pH final  $7,3 \pm 0,2$ .

**B.13.4.6 Agar Sangre de carnero**

Ingredientes	Cantidad
Base de agar sangre	95,0 mL
Sangre de carnero desfibrinada	5,0 mL

Preparar el agar base de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Enfriar a  $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y agregar asépticamente la sangre de carnero, la cual previamente se debe encontrar a temperatura ambiente ( $20 - 25^{\circ}\text{C}$ ). Homogeneizar el medio y verter en las cajas Petri estériles de 12 a 15 mL para la prueba de CAMP y de 15 a 20 mL para la prueba de hemólisis.

**B.13.4.7 Caldo Nitratos**

Ingredientes	Cantidad
Nitrato de potasio	1,0 g
Cloruro de sodio	0,5 g
Peptona	2,0 g
Agua	1000,0 mL

Agregar los ingredientes a un litro de agua, agitar hasta disolución completa. Verter en tubos de 13 x 100 mm con tapón de rosca. Esterilizar en autoclave a  $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 15 min.

**B.13.4.8 Medios para la Prueba de Movilidad**

**B.13.4.8.1 Medio de SIM**

Ingredientes	Cantidad
Peptona de caseína	20,0 g
Peptona de carne	6,1 g
Sulfato de fierro y amonio	0,2 g
Tiosulfato de sodio	0,2 g
Agar	3,5 g
Agua	1000,0 mL

Agitar y calentar a ebullición hasta disolver el agar. Envasar en porciones de 4 mL en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar en autoclave a  $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 15 min. pH final  $7,3 \pm 0,2$ .

**B.13.4.8.2 Medio MTM**

Ingredientes	Cantidad
Extracto de carne	3,0 g
Peptona	10,0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5,0 g
Agar	4,0 g
Agua	1000,0 mL

Agitar y calentar a ebullición hasta disolver el agar. Envasar en porciones de 4 mL en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar en autoclave a  $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 15 min. pH final  $7,4 \pm 0,2$ .

**B.13.4.9 Caldo Púrpura para fermentación de carbohidratos**

Ingredientes	Cantidad
Proteosa peptona No. 3	10,00 g
Cloruro de sodio	5,00 g
Extracto de carne	1,00 g
Púrpura de bromocresol	0,02 g
Agua	1000,00 mL

Calentar si es necesario para disolver los ingredientes. Esterilizar en autoclave durante 15 min. A  $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$  pH final  $6,8 \pm 0,2$ . Agregar la solución del carbohidrato, previamente esterilizada, por filtración en cantidad suficiente para obtener una concentración final de 0,5 %.

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

**B.13.5 Preparación de la Muestra**

Para la preparación de la muestra seguir con lo establecido en el numeral 9 de este apéndice.

**B.13.6 Procedimiento**

Este método debe realizarlo un microbiólogo experimentado, en un ambiente controlado, aislado de áreas de producción de alimentos. Se debe tener especial cuidado en la disposición de aquellos materiales y equipo que hayan estado en contacto con alimentos sospechosos, antes de desecharlos o volver a utilizarlos. Esta técnica por ningún motivo debe aplicarla personal inmunocomprometido ya sea por enfermedad o por el uso de medicamentos, mujeres embarazadas o personas de edad avanzada.

**B.13.6.1 Procedimiento de Enriquecimiento**

Tomar una muestra representativa del alimento, tanto de la superficie externa como del interior. Colocar 25 mL o 25 g de la muestra en un recipiente conteniendo 225 mL de medio de enriquecimiento (EB), homogeneizar e incubar por 48 h a  $30^{\circ}\text{C}$ . En el caso de muestras en donde se sospecha que tienen células de *Listeria spp* dañadas, se recomienda la incubación en un caldo de enriquecimiento que contenga piruvato de sodio al 0,1 % (p/v) incubado a  $30^{\circ}\text{C}$  por 6 h sin suplementos. Después de las 6 h de incubación los suplementos deben agregarse y continuar la incubación a  $30^{\circ}\text{C}$  hasta un total de 48 h.

**B.13.6.1.1 Aislamiento**

Después de 24 y 48 h de incubación en el medio EB, resembrar en los medios LMP y OXA. Incubar las placas del medio LMP a  $30^{\circ}\text{C}$  por 24 a 48 h y las de medio OXA a  $35^{\circ}\text{C}$  por el mismo periodo. Observar el crecimiento en las placas del medio LMP con luz blanca en un ángulo de  $45^{\circ}$  (iluminación de Henry), a simple vista o con la ayuda de una lupa. En este medio generalmente aparecen las colonias de color blanco o azul iridiscentes. En el medio OXA las colonias de *Listeria* son negras, con halo negro. Algunas colonias pueden aparecer con un tono café oscuro que se define mejor a los siete días de incubación. Seleccionar cinco o más colonias típicas del medio de OXA o LMP y pasar a placas de medio ASTEL. Este paso es importante debido a que las colonias aparentemente aisladas en los medios OXA y LMP pueden estar contaminadas con flora competitiva parcialmente inhibida, invisible a simple vista. Debido a que puede estar presente más de una especie de *Listeria* en la muestra, deben identificarse como mínimo cinco colonias.

**B.13.6.2 Identificación**

Se deben utilizar cepas de referencia positivas y negativas para cada una de las pruebas. Seleccionar colonias típicas y sembrar en medio ASTEL. Incubar a  $35^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Estos cultivos pueden mantenerse a  $4^{\circ}\text{C}$  y utilizarse como inóculo para realizar las pruebas de identificación.

**B.13.6.2.1 Prueba de Movilidad en Fresco**

Hacer preparaciones en fresco (en gota suspendida o entre porta y cubreobjetos) utilizando solución salina al 0,85%. La suspensión debe ser densa y emulsificarse completamente, y observar con objetivo de inmersión en un microscopio de contraste de fase o microscopio de campo oscuro. Las células de *Listeria spp* son bacilos cortos con movilidad rotatoria o como si brincaran. Los bacilos con movimientos rápidos no son *Listeria spp*.

**B.13.6.2.2 Prueba de Catalasa**

Emulsificar un cultivo puro, con una gota de solución de peróxido al 3%. La formación inmediata de burbujas indica que la prueba es positiva. Las especies de *Listeria* son catalasa positivo. Precauciones, la emulsión debe realizarse con un asa de plástico o palillo de madera estéril evitando el contacto del metal con el reactivo. Si las colonias provienen de agar base con sangre. Cualquier contaminación de eritrocitos puede dar pruebas falsas positivas!

**B.13.6.2.3 Tinción de Gram**

Hacer una tinción de Gram de cultivos de 16 a 24 h. Todas las especies de *Listeria* son bacilos cortos Grampositivo; sin embargo en cultivos viejos pueden presentarse como formas coccoides. ¡En extensiones delgadas se observan de color pálido y pueden confundirse con *Bacteroides spp.*

**B.13.6.2.4 Prueba de Hemólisis**

Dibujar una cuadrícula de 20 a 25 espacios en el fondo de la placa de agar sangre de carnero al 5%. Inocular por picadura un cuadro por cada cultivo. Incubar por 48 h a 35°C. Al inocular, observar la reacción hemolítica en las placas. *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* producen una zona ligeramente clara alrededor del punto de picadura. Confirmar las reacciones dudosas con la prueba de CAMP.

**B.13.6.2.5 Prueba de Reducción de Nitratos**

Inocular los tubos conteniendo caldo nitratos, incubar a 35°C por 5 días. Para la lectura se debe agregar 0,2 mL del reactivo A y 0,2 mL del reactivo B, un color rojo indica una prueba positiva (presencia de nitritos). Si esta coloración no se observa, adicionar zinc en polvo. El desarrollo de color rojo después de una hora confirma una prueba negativa (presencia de nitratos). En forma alternativa adicionar al cultivo en caldo nitratos 0,2 mL del reactivo B y 0,2 mL del reactivo C. Un color naranja indica una prueba positiva (presencia de nitritos). Si esta coloración no se observa, adicionar 0,2 mL del reactivo de cadmio, el desarrollo de un color naranja confirma una prueba negativa (presencia de nitratos). Este procedimiento alternativo elimina el uso del alfa - naftilamina, que es carcinogénica.

**B.13.6.2.6 Prueba de Movilidad en Agar**

Inocular el medio SIM o MTM, incubar por 7 días a temperatura ambiente (20-25°C), observar diariamente. Las especies de *Listeria* son móviles, dando un crecimiento típico en forma de paraguas.

**B.13.6.2.7 Prueba de Utilización de Carbohidratos**

Inocular tubos de caldo púrpura para fermentación de carbohidratos al 0,5 %: dextrosa, esculina, maltosa, ramnosa, manitol y xilosa. Incubar 7 días a 35°C. Una coloración amarilla indica una prueba positiva. Todas las especies de *Listeria* dan positivas las pruebas para dextrosa, esculina y maltosa. Consultar el cuadro 1 para reacciones con ramnosa, xilosa y manitol. Si la pigmentación prematura del aislamiento en el medio OXA no deja lugar a duda, el ensayo de esculina puede omitirse.

**B.13.6.2.8 Prueba de Cristie-Atkins -Munch-Peterson (CAMP)**

Para la prueba de CAMP se emplean las siguientes cepas de colección de *S. aureus* y *R. equi*:

<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Rhodococcus equi</i>
ATCC 49444	ATCC 6339
NCTC 7428	NCTC 1621
ATCC 25923	
CIP 5710	

Las cepas empleadas en la prueba de CAMP pueden obtenerse de diversas colecciones nacionales e internacionales. En una placa de agar sangre de carnero sembrar una estría de la cepa de *S. aureus* y, paralelamente una de *R. equi*, separadas lo suficiente para que entre éstas se puedan estriar perpendicularmente las cepas sospechosas de *Listeria*, sin que lleguen a tocarse (aproximadamente 5 mm de separación). Despues de 24 y 48 h de incubación a 35°C observar el sinergismo entre las hemolisinas de *S. aureus*, *R. equi* y *Listeria* que se manifiesta como una zona hemolítica más intensa.

La hemólisis de *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* se incrementa cerca de la estría de *S. aureus*, y la hemólisis de *L. ivanovii* se aumenta cerca de la estría de *R. equi*. Las especies restantes no son hemolíticas en esta prueba.

**Prueba de CAMP para *Listeria monocytogenes*:**

Diseño de la inoculación en placas de agar sangre de carnero. Las líneas horizontales representan las estrías de la inoculación de cinco cepas. Las líneas verticales representan las estrías de inoculación de *S. aureus* (S) y *R. equi* (R). Las líneas sombreadas indican el incremento de hemólisis en esas regiones.

**Cuadro 1. Diferenciación de las Especies de *Listeria***

Especies	Hemolítico (beta) a	Reducción nitratos	Producción de ácidos de			CAMP	
			M	R	X	S.a	R.e
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	-	+	-	+	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	-	-	+	-	+
<i>L. innocua</i>	-	-	-	bV	-	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	-	bV	+	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-	-	-	+	+1	-
<i>L. grayic</i>	-	bV	+	bV	-	-	-

a Sangre de carnero desfibrinada

bV Variable

*L. grayi* incluye ahora las cepas de la especie *L. murrayi* reductoras de nitratos y ramnosa variable

M Manitol

R Ramnosa

X Xilosa

S.a *Staphylococcus aureus*

R.e *Rhodococcus equi*

1 Puede haber reacciones débilmente positivas, particularmente a las 48 horas de incubación.

**B.13.6.3 Serología**

La determinación de los tipos serológicos de *Listeria* se aplica cuando las consideraciones epidemiológicas sean cruciales. Inocular en caldo de triptosa por 24 h a 35°C. Transferir a dos tubos de agar inclinado de triptosa e incubar 24 h a 35°C. Para realizar la prueba se pueden utilizar sueros comerciales, siguiendo las instrucciones del fabricante.

**Cuadro 2. Serología de las especies de *Listeria***

Especies	Serotipo
<i>L. monocytogenes</i>	1/2A, 1/2B, 1/2C 3A, 3B, 3C 4A, 4AB, 4B 4C, 4D, 4E, "7"
<i>L. ivanovii</i>	5
<i>L. innocua</i>	4AB, 6A, 6B, Una
<i>L. welshimeri</i>	6A, 6B
<i>L. seeligeri</i>	1/2B, 4C, 4D, 6B, Una

**B.13.7 Expresión de Resultados**

Comparar los resultados obtenidos con el cuadro 1 y determinar el género y especie de las cepas aisladas. La correspondencia de resultados con el cuadro anterior indica la presencia del género *Listeria*.

El único miembro del género *Listeria* de importancia para esta norma es *Listeria monocytogenes*.

**B.13.8 Informe de la Prueba**

Cuando los resultados sean positivos para *L. monocytogenes* informar la presencia en 25 g o 25 mL de muestra. Y si los resultados son negativos informar ausencia en 25 g o 25 mL de muestra.

**B.14 Determinación de *Vibrio cholerae*****B.14.1 Material y Equipo**

**B.14.1.1** Licuadora y vasos de licuadora estériles.

**B.14.1.2** Frascos de vidrio de boca ancha tipo tarro de 500 mL de capacidad con tapa de rosca.

**B.14.1.3** Varilla de vidrio de 3mm de diámetro y 20cm de largo, con un doblez terminal en ángulo recto de 4cm.

**B.14.1.4** Balanza granataria de 2000 g de capacidad y 0,2 g de sensibilidad.

**B.14.1.5** Balanza analítica de 120 g de capacidad y 5 mg de sensibilidad.

- B.14.1.6** Incubadoras de 39-40°C.  
**B.14.1.7** Baño de agua de  $42 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  y 35-37°C.  
**B.14.1.8** Cucharas estériles u otros instrumentos apropiados para transferir muestras de alimentos.  
**B.14.1.9** Cajas Petri estériles de 15 x 100 mm de plástico.  
**B.14.1.10** Pipetas estériles de 1 mL con graduación de 0,01mL, de 5 y 10 mL con graduación de 0,1mL.  
**B.14.1.11** Asas bacteriológicas de 3 mm de diámetro de nicromel o platino.  
**B.14.1.12** Tubos de cultivo o de ensayo de 16 x 150 mm y 20 x 150 mm.  
**B.14.1.13** Tubos para bioquímicas o ensayo de 10 x 75 mm o 13 x 100 mm.  
**B.14.1.14** Tijeras y pinzas estériles.  
**B.14.1.15** Lámpara (para observar reacciones serológicas).  
**B.14.1.16** Mecheros.  
**B.14.1.17** Papel pH (rango 1-14) con un máximo de graduación de 0,4 unidades de pH por cambio de color.  
**B.14.1.18** Potenciómetro.

**B.14.1.19** Bolsas de polietileno de 28 x 37 cm con tapa resellable.

**B.14.1.20** Aparato de filtración y membranas de 0,45 micras.

#### **B.14.2 Medios de Cultivo**

##### **B.14.2.1 Agua Peptonada Alcalina (APW)**

###### FORMULA

Peptona	10 g
Cloruro de sodio	10 g
Aqua destilada	1 000 mL

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

##### **B.14.2.2 Agar Tiosulfato, Citrato, Sales Biliares y Sacarosa (TCBS)**

###### FORMULA

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

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

##### **B.14.2.3 Agar modificado con Celobiosa, Polimixina B y Colistina (mCPC)**

###### **Solución 1:**

###### FORMULA

Peptona	10 g
Extracto de carne	5 g
Cloruro de sodio	20 g
Solución Stock de colorante1 000	1 mL
Agar	15 g
Aqua destilada	900 mL

Ajustar el pH a 7,6. Hierva hasta que se disuelva el agar. Esterilizar por autoclave 15 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$ . Enfrie de  $48-55^{\circ}\text{C}$ .

**Solución stock de colorantes 1 000 X:**

## FORMULA

Azul de bromotimol	4 g
Rojo de cresol	4 g
Etanol al 95%	100 mL

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

**Solución 2:**

## FORMULA

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

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

**B.14.2.4 Agar T1N1 (Agar Triptona y Sal)**

## FORMULA

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

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

**B.14.2.5 Agar Gelatina (GA)**

## FORMULA

Peptona	4 g
Extracto de levadura	1 g
Gelatina	15 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Suspenda los ingredientes y hierva hasta disolución de la gelatina y el agar, ajuste el pH a 7,2 ± 0,2. Esterilice en autoclave 15 minutos a 121°C. Enfíe de 45-50°C y distribuya en cajas Petri estériles.

**B.14.2.6 Agar Gelatina con Sal (GS)**

Preparar agar gelatina (GA), pero adicionando 30 g de cloruro de sodio por cada litro. Suspenda los ingredientes y hierva hasta disolver la gelatina y el agar. Ajuste el pH de 7,2 ± 0,2. Esterilice en autoclave 15 minutos a 121°C. Enfíe de 45-50°C, coloque en cajas Petri. Si es necesario para inhibir la diseminación de Vibrio spp tal como V. alginolyticus, use de 25-30 g de agar por litro.

**B.14.2.7 Caldo Glucosa de Hugh-Leifson**

## FORMULA

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

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

**B.14.2.8 Medio Base de Descarboxilasa (Arginina, Lisina y Ornitina)**

## FORMULA

## BASE

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

Para caldo de arginina, lisina y ornitina, adicione 5 g de L-aminoácido a 1 litro de base. Como control, use base sin suplemento (aminoácido). Para *Vibrio* spp halofílicos, adicionar 15 g de cloruro de sodio por litro. Ajuste el pH de tal manera que después de la esterilización sea de  $6.5 \pm 0.2$ . Distribuya en tubos y esterilice en autoclave 10 minutos a 121°C.

**B.14.2.9 Caldo Triptona y Caldos Triptona Sal T1N0,T1N1,T1N3, T1N6,T1N8 y T1N10**

## FORMULA

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

Disuelva los ingredientes en agua destilada, para T1N0 no agregue cloruro de sodio, para T1N1 use 10g de cloruro de sodio (1% w/v concentración de cloruro de sodio); así respectivamente. Para T1N3 usar 30g de NaCl por litro (3% w/v concentración de cloruro de sodio). Distribuya en tubos de tapón de rosca de 16 x 150 mm, tape los tubos. Esterilice en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Ajuste el pH a  $7.2 \pm 0.2$ .

**B.14.2.10 Caldo Soya Trypticasa (TSB)**

## FORMULA

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

Suspenda los ingredientes en agua destilada y caliente hasta disolución. Distribuya 225 mL en matraces de 500 mL o tubos. Esterilice en autoclave durante 15 minutos a 121°C. El pH final debe ser de  $7.2 \pm 0.2$ .

**B.14.2.11 Agar Soya Trypticasa (TSA)**

## FORMULA

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

Suspenda los ingredientes en agua destilada y hierva durante un minuto hasta disolución del agar. Para *Vibrio* spp halofílicos, agregar 15 g de cloruro de sodio. Distribuya dentro de tubos o matraces. Esterilice en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Deje solidificar los tubos inclinados o deje enfriar de 45-50°C y distribuya en cajas Petri. El pH final debe ser de  $7.3 \pm 0.2$ .

**B.14.2.12 Agar de Hierro Kligler (KIA)**

## FORMULA

Peptona polipeptona	20 g
Lactosa	20 g
Dextrosa	1 g
Cloruro de sodio	5 g
Citrato férrico amoniacial	0,5 g
Tiosulfato de sodio	0,5 g
Rojo de fenol	0,025 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1 000 mL

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

**B.14.2.13 Agar Arginina Glucosa Inclinado (AGS)**

## FORMULA

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

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

**B.14.2.14 Agar Triple Azúcar y Hierro (TSI)**

## FORMULA

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

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

**B.14.2.15 Agar de Hierro y Lisina (LIA)**

## FORMULA

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

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

**B.14.2.16 Caldo Rojo de Metilo y Vogues Proskauer(RM-VP)**

## FORMULA

Peptona	7 g
Glucosa	5 g
Fosfato dipotásico	5 g
Agua destilada	1 000 mL

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

**B.14.2.17 Medio para Prueba de Movilidad (semisólida)**

## FORMULA

Peptona	10 g
Extracto de carne	3 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	4 g
Agua destilada	1 000 mL

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

**B.14.3 Soluciones y Reactivos****B.14.3.1 Prueba de rojo de metilo.****Reactivos**

## FORMULA

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

Disolver el rojo de metilo en el alcohol y diluir con el agua destilada, para llevar a cabo la prueba, añadir 5 gotas de la solución a 5 mL del cultivo problema. Resultados: Un color rojo demuestra un pH menor a 4,5 y la prueba es Positiva. Un color amarillo se reporta como prueba Negativa.

**B.14.3.2 Prueba de Vogues-Proskauer.**

Esta prueba es para comprobar la presencia del diacetilo.

**Reactivos**

## FORMULA

Alfa naftol	5 g
Alcohol etílico absoluto	100 mL

Añadir 0,6 mL de la solución de alfa naftol y 0,2 mL de una solución acuosa al 40% de KOH a 1 mL de cultivo. Resultados: El desarrollo de una coloración roja en 15 minutos constituye una reacción Positiva.

**B.14.3.3 Prueba de oxidasa.****Reactivos****FORMULA**

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

Conservar en frasco oscuro a 5-10°C. El reactivo se conserva durante 14 días. Sembrar en un tubo de base de gelosa para sangre. Incubar 18 horas a 35°C. Agregar 0,3 mL de reactivo. Resultado: La reacción positiva se observa por la producción de un color azul en un minuto.

**B.14.3.4 Reacción de indol.****Reactivos de Kovac****FORMULA**

P-dimetilaminobenzaldehído	5.0 g
Alcohol amílico o alcohol isoamílico	750 mL
Ácido clorhídrico concentrado	25 mL

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

**B.14.4 Procedimiento**

Sembrar un tubo con 5 mL de caldo triptona. Incubar 48 horas a 35°C. Agregar de 0,2 a 0,3 mL del reactivo. El desarrollo de un color intenso constituye una prueba Positiva para indol. Toma de muestra La toma de muestra para análisis microbiológicos se deberá hacer en condiciones asépticas y en recipientes estériles.

**B.14.4.1 Preparación de la Muestra**

Para la preparación de la muestra seguir con lo establecido en el numeral 9 de este apéndice.

Para helados o bases o mezclas para helados y para los quesos, se deben preparar las siguientes diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ . Tomar 25 gramos de helado o bases o mezclas para helados o queso previamente molido e introducirlos en un vaso estéril de licuadora de 500 mL de capacidad que contenga 225 mL de agua peptonada alcalina (APW) y homogeneizar por 2 minutos a la máxima velocidad. Esta es la dilución 1:10. De ésta preparar la dilución, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000 y 1:1000000, en 90 mL de agua peptonada alcalina. Incubar las seis diluciones entre 35°C - 37°C.

**B.14.4.2 Resembrar**

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

**B.14.5 Morfología Colonial.**

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

**a.- Agar TCBS.**

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

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

**b.- Agar mCPC.**

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

**B.14.6 Diferenciación.**

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

**a.- TSI, KIA y agar inclinado de Arginina y Glucosa (AGS).**

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

**b.- Caldo triptona al 3% de NaCl (T1N3).**

Inocular las colonias en los caldos T1N0 y T1N3 e incubar durante 18 a 24 horas de 35-37°C. El *V. cholerae* y el *V. mimicus* crecerán en T1N0 y T1N3. Algunas especies de bacterias que no son vibrios y que presentan reacciones similares a las de *V. cholerae* en medios de TSI y LIA no crecen en T1N3. La mayoría de las especies de *Vibrio* spp, incluyen algunos *V. cholerae* No. 01, crecerán en T1N3 únicamente de la familia *Vibrionaceae* crece solamente en T1N3. Una alternativa consiste en usar agar gelatina (GA) y agar gelatina con 3% de NaCl (GS) para determinar la tolerancia de los cultivos puros a la sal. Dividir las placas en ocho sectores, inocular una línea recta en el centro de un sector de las placas, tanto de GA como de GS con cada cultivo puro. Incubar durante 18 a 24 horas de 35-37°C. *V. cholerae* y el *V. mimicus* crecerán. El *Vibrio* spp halofílico crecerá en ambas placas, porque ellos no requieren de sal. Sólo en la placa con GS. Para leer la reacción de la gelatinasa sostener la placa sobre una superficie negra, observará un halo opaco alrededor de la colonia de los microorganismos gelatinasa positivos.

**c.- Caldo glucosa de Hugh-Leifson.**

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

**d.- Prueba de Oxidasa.**

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

**B.14.7 Identificación y Confirmación de *V. cholerae* 01, *V. cholerae* NO 01 y *V. mimicus*.****a.- Leer los resultados de las prueba bioquímicas de TSI, KIA, AGS, T1N0 y T1N3 o GA y GS, y caldo glucosa de Hugh-Leifson.****b.- Hacer una tinción de Gram a un cultivo de 18 a 24 horas en caldo o agar.**

**Nota:** Los cultivos puros que se someterán a las demás pruebas serológicas y bioquímicas para el *V. cholerae* son sacarosa positivos (amarillo) en agar TCBS y sacarosa negativos (verdes) en el caso de *V. mimicus* o son celobiosa negativos (verde-púrpura) en agar mCPC, crecen en caldo T1N0 o en placas con GA; presentan reacciones características en TSI, KIA y AGS. Son gelatina y oxidasa positivos, son bacilos curvos gram negativos y producen ácido a partir de la glucosa, tanto en la oxidación como en la fermentación, en el caldo de cultivo de Hugh-Leifson.

**c.- Pruebas Bioquímicas.**

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

**d.- Prueba Serológica de Aglutinación.**

Usar antisuero de diagnóstico del grupo 01 y del subgrupo Inaba (factores AC) y Ogawa (Factores AB) para el antígeno del serotipo 01. Usar cultivos de 16 a 24 horas producidos en TSA. Incluir cultivos positivos y negativos, y los controles salinos para cada antisuero usado. Seguir las instrucciones del antisuero.

Como es posible que los antígenos de los antisueros estén relacionados entre sí, hay que realizar pruebas bioquímicas para confirmar que el cultivo puro sea de *V. cholerae* 01 o No. 01.

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

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

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

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

2.- Los cultivos de *V. cholerae* cuya identidad se haya confirmado con métodos bioquímicos y que no aglutinen con el antisuero del grupo 01 son *V. cholerae* 0:1. El suero para la clasificación de *V. cholerae* No 0:1 según el tipo se puede obtener de R.J. Siebeling.

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

#### e. Características mínimas para la identificación de *V. cholerae*.

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

##### 1.- Morfología.

Bacilo o bacilo encorvado, no esporogénico y gram negativo.

##### 2.- Aspecto en TSI.

Estría ácido, picadura ácido, gas negativo y H<sub>2</sub>S negativo.

##### 3.- Prueba de Hugh-Leifson.

Fermentación de la glucosa y oxidación positiva.

##### 4.- Citocromo-oxidasa positivo.

##### 5.- Prueba de la dihidrolasa arginina: negativo.

##### 6.- Prueba de la lisinadescarboxilasa: positivo.

##### 7.- Prueba de VP: Positivo El Tor, negativo Clásico y *V. mimicus*.

##### 8.- Crecimiento a 42°C: positivo.

##### 9.- Prueba de halofilia con NaCl.

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

##### 10.- Fermentación de la sacarosa: positivo para *V. cholerae* (negativo para *V. mimicus*).

##### 11.- Prueba de ONPG: positivo.

##### 12.- Fermentación de la arabinosa: negativo.

##### 13.- 0/129 sensible: sensible para 10 y 150 µg 0/129

#### B.14.8 Reacciones

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

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

\* = Raramente

K = Alcalino

A = Ácido

a = Ligeramente ácido

N = Neutro

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

#### B.15 Determinación de Enterotoxina Estafilocóccica, por el método de Elisa.

##### B.15.1 Principio del Método.

Este método se basa en un inmunoensayo visual el cual proporciona una prueba rápida (4 h), sensible (1,0 ng o más por mL o g), y específica para la identificación de las enterotoxinas A-E estafilocóccicas. Sin embargo, con esta prueba no se identifican los serotipos de enterotoxina, en forma individual. La prueba de Elisa se realiza en configuración de “sandwich”.

**B.15.2 Materiales y Equipo**

- B.15.2.1** Algodón absorbente.
- B.15.2.2** Micropipetas de 50-200  $\mu$ L y 5-20  $\mu$ L.
- B.15.2.3** Puntas de plástico para micropipeta.
- B.15.2.4** Plástico para envolver o sellar recipientes de plástico.
- B.15.2.5** Papel pH (intervalo 0-14).
- B.15.2.6** Frascos de plástico de 500 mL.
- B.15.2.7** Jeringas de plástico de 25 mL.
- B.15.2.8** Tubos para centrífuga.
- B.15.2.9** Tubos de polipropileno de 12 x 75 mm.
- B.15.2.10** Polietilen glicol (PEG, peso molecular de 15,000-20,000).
- B.15.2.11** Tubo de diáisisis (12,000-14,000 peso molecular exclusión).
- B.15.2.12** Vasos de precipitados de 250 mL.
- B.15.2.13** Filtros tipo jeringa (para filtrar los alimentos). Preparar jeringas de plástico desechables (0,25 mL) e insertar suficiente cantidad de algodón absorbente, para hacer un empaque de 0,5 cm. Pasar 5,0 mL de agua destilada, presionar con el émbolo para asegurarse de formar un paquete firme. Preparar inmediatamente antes de filtrar los extractos de alimento, para tratar con el aditivo provisto con el equipo.

**B.15.2.14** Placa de 48 o 96 pozos recubiertos con el grupo de antisueros \*.

**B.15.2.15** Soporte para sostener la placa \*.

**B.15.2.16** Instructivo del método \*.

**B.15.2.17** Comparador de color \*.

**B.15.2.18** Hoja de resultados \*.

**B.15.2.19** Materiales suministrados por el fabricante.

**B.15.2.20** Equipo TECRAT<sup>TM</sup>.

**B.15.2.21** Incubadora a 35-37°C.

**B.15.2.22** Omnimixer, licuadora (o equivalente) para la preparación de los extractos de alimentos.

**B.15.2.23** Centrífuga a 1000 -3000 x g.

**B.15.2.24** Agitador de microplacas (opcional).

**B.15.2.25** Lector de microplacas (opcional).

**B.15.2.26** Balanza.

**B.15.3 Reactivos.**

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y por agua debe entenderse agua destilada.

**B.15.3.1** Solución amortiguadora Tris 0,25 M (30,28 g TRIS/L, pH 8,0).

**B.15.3.2** Solución de hidróxido de sodio 1,0 N (NaOH).

**B.15.3.3** Ácido clorhídrico (HCl).

**B.15.3.4** Agua destilada o deionizada.

**B.15.3.5** Hipoclorito de sodio.

**B.15.3.6** BHI con 0,7% de agar (m/v).

**B.15.3.7** Solución de lavado. Contiene: 1,5 g de tris(hidroximetil) aminometano (Tris), 6g de NaCl, 2,0 g polioxietilen sorbitan monolaurato (Tween 20), y 0,001 g de timerosal en 25,0 mL de H<sub>2</sub>O \*.

**B.15.3.8** Aditivo para la muestra. Es una solución que contiene: 2 g de Tween 20 y 0,001 g de timerosal en 6,0 mL de H<sub>2</sub>O \*.

**B.15.3.9** Control positivo: Diluir 25  $\mu$ L de control positivo concentrado (toxina estafilocóccica tipo B, 0,1 g Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, 0,1 g de NaCl y 0,001 g de timerosal en 4,0 mL de H<sub>2</sub>O), en 2,5 de sol. de lavado (B.15.4.2.1) \*.

**B.15.3.10** Control negativo. Contiene: 0,0072 g de Tris, 0,1 g de NaCl, 0,001 g de timerosal y 0,01 g de Tween 20 en 6,0 mL de H<sub>2</sub>O \*.

**B.15.3.11** Diluyente del Conjugado. Contiene: 0,2 g Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, 0,1 g de NaCl, 0,1 g de gelatina, y 0,001 g de timerosal en 13,5 mL de H<sub>2</sub>O \*.

**B.15.3.12** Conjugado liofilizado. Un frasco que contiene antisuero polivalente (A-E) liofilizado, conjugado; 0,003g de Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, 0,002 g de CaCl<sub>2</sub>, y 0,0001 g de timerosal. Para su uso, agregar al frasco 13 mL del diluyente (B.15.3.11) \*.

**B.15.3.13** Diluyente del Substrato. Cada 26 mL de H<sub>2</sub>O contienen 0,2 g de ácido acético y 0,01 g de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> \*.

**B.15.3.14** Substrato. Un frasco de liofilizado que contiene; 0,01 g de 2,2'-di-azino(sulfonato de 3-etyl benzotiazolin), 0,01 g de EDTA, y 0,1 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Para su uso, agregar al frasco 26 mL del diluyente (B.15.3.13) \*.

**B.15.3.15** Solución para detener la reacción (solución stop). Cada 6,0 mL contienen; 1,5 g de NaF en 6,0 mL de agua \*.

\* Reactivos suministrados por el fabricante

**B.15.4 Procedimiento.**

**B.15.4.1 Preparación de las Muestras.**

**B.15.4.1.1 Productos Fluidos y Productos Deshidratados.**

Pesar 25 g de leche deshidratada y agregar 125 mL de solución Tris 0,25 M pH 8,0 (B.15.3.1). Continuar como se indica para leche fluida. En muestras de 5,0 mL, verificar que el pH esté en un intervalo de 7,0-8,0. Agregar 50  $\mu$ L de aditivo (B.15.3.8). En el caso de extractos más claros, ajustar el pH a 4,0 con HCl concentrado. Para muestras de leche de 50 mL, verificar que el pH esté en un intervalo de 7,0-8,0. Agregar 50  $\mu$ L de aditivo (B.15.3.8). Centrifugar la muestra 10 min a 1000-3000 x g. Decantar el extracto y pasar 5,0 mL aproximadamente, a través de una jeringa empacada con algodón absorbente humedecido previamente, y recibir en un tubo de polipropileno. Ajustar nuevamente el pH a 7,0-8,0 (usar papel pH). Agregar 50  $\mu$ L de aditivo (B.15.3.8) y mezclar.

**B.15.4.1.2 Ingredientes Deshidratados.**

Agregar 125 mL de solución Tris 0,25 M pH 8,0 a 25 g de muestra, homogeneizar en licuadora (a velocidad alta), durante 3 min. Centrifugar la muestra 10 min a 1000-3000 x g y recoger el extracto (sobrenadante). Quitar el émbolo de la jeringa de plástico que contiene el empaque de algodón absorbente humedecido previamente y con cuidado, pasar el extracto a través del empaque y recibir el eluido. Tomar 5,0 mL de eluido y ajustar el pH a 7,0-8,0. Agregar 50  $\mu$ L de aditivo, y mezclar.

**B.15.4.1.3 Quesos.**

Agregar 50 mL de agua a 25 g de muestra y homogeneizar en licuadora durante 3 min a velocidad alta. Ajustar, con HCl concentrado, a pH 4 (usar papel pH). Centrifugar la muestra durante 10 min a 1000-3000 x g. Quitar el émbolo de la jeringa de plástico que contiene el empaque de algodón absorbente humedecido previamente, y pasar 5 mL del extracto a la jeringa. Insertar el émbolo y con cuidado pasar el extracto a través del empaque y recibir el eluido. Tomar 5 mL del eluido, y agregar solución de NaOH para ajustar a pH 7,0-8,0; agregar 50  $\mu$ L de aditivo, y mezclar.

**B.15.4.1.4 Otros Alimentos.**

Agregar 50 mL de solución Tris 0,25 M pH 8,0 a 25 g de muestra, y homogeneizar en licuadora durante 3 min a velocidad alta. Centrifugar la muestra durante 10 min a 1000-3000 x g. Quitar el émbolo de la jeringa de plástico que contiene el empaque de algodón absorbente humedecido previamente, y pasar 5,0 mL de extracto a la jeringa, insertar el émbolo y con cuidado presionar el émbolo y recoger el eluido. Tomar 5 mL del eluido, ajustar a pH 7,0-8,0, si es necesario; agregar 50  $\mu$ L de aditivo, y mezclar.

**Nota 1:** Preparar los extractos de alimentos inmediatamente antes de realizar la prueba.

**Precauciones Generales:**

En caso de alimentos crudos fermentados, procesados o enlatados, con evidentes defectos; o de cultivos fluidos obtenidos en el laboratorio, que pudieran dar como resultado el crecimiento de microorganismos productores de peroxidasa, es necesario, antes de hacer la determinación de toxina, verificar si los extractos de alimentos o preparados a partir del cultivo en el laboratorio, contienen peroxidasa, debido a que esta enzima podría interferir con la interpretación de los resultados.

Para determinar la presencia de peroxidasa, agregar 50  $\mu$ L del substrato (B.15.3.14.), en una placa de microtitulación sin tratar (no contiene anticuerpos para la enterotoxina estafilocócica). Dejar en reposo 10 min. Si el color cambia a azul o azulverdoso, indica que la muestra contiene peroxidasa intrínseca; la cual debe inactivarse. Si la muestra permanece incolora (o con el color original), realizar el análisis de enterotoxina. Para inactivar la peroxidasa intrínseca, preparar una solución al 30% (m/v) de azida de sodio y agregar 1 mL de esta solución a 4 mL de muestra (la concentración final de la azida de sodio es de 6% (m/v). Mezclar y agregar un poco de aditivo (B.15.3.8), dejar en reposo 1-2 min a temperatura del laboratorio (20-25°C). Repetir la prueba para determinar presencia de peroxidasa, como se describió anteriormente. Si la reacción es incolora o presenta el color original, continuar con la prueba.

**Nota 2:** Para alimentos crudos (ejemplo: verduras), seguir las precauciones generales señaladas anteriormente.

**B.15.4.2 Preparación de Reactivos.**

**B.15.4.2.1 Reconstitución de la Solución de Lavado.**

Diluir, en un frasco de reactivos la solución concentrada (como lo indique el fabricante), con agua destilada o deionizada, para obtener 2 L. Utilizar esta "solución de lavado" para lavar los pozos y diluir el control positivo. Es recomendable el uso de pizeta. Almacenar a 4°C, cuando no se use.

**B.15.4.2.2 Preparación del Conjugado.**

Agregar el diluyente del conjugado y rehidratar a temperatura del laboratorio. Mezclar suavemente. Esta preparación es el "Conjugado reconstituido".

**B.15.4.2.3 Preparación del Substrato.**

Disolver el substrato con el diluyente (B.15.3.13), asegurarse que el contenido se haya disuelto completamente. Dejar a la temperatura del laboratorio (20-25°C), antes de su uso.

**B. 15.4.2.4 Precauciones generales:**

◆ Observar la fecha de caducidad del equipo adquirido. Es la última fecha en la cual el producto debe utilizarse. Preparar todos los reactivos con cuidado y anotar la fecha de reconstitución, en la etiqueta externa de la caja. Usar los reactivos dentro de los 65 días a la fecha anotada en la etiqueta. Refrigerar todos los componentes (2-8°C) cuando no estén en uso. **NO CONGELAR.**

◆ El equipo de inmunoensayo visual está preparado para utilizarse como una unidad integral; por tanto, no se deben mezclar los componentes de diferentes lotes.

◆ Utilizar puntas nuevas para cada muestra de alimento. Evitar la contaminación cruzada al llenar los pozos. Si se usan propipetas de plástico para distribuir el conjugado y el substrato, se deben mantener siempre por separado. Asegurarse de no confundir las tapas de los reactivos.

◆ Usar controles positivos y negativos en cada prueba.

◆ Preparar recipientes con solución al 2% de hipoclorito de sodio para desechar todas las muestras y materiales que contengan toxina.

◆ Mantener los pozos removibles que no se usen dentro del paquete y volver a sellar con cinta, después de cada uso.

**B.15.4.3 Determinación de la Enterotoxina.****B.15.4.3.1 Preparación de los pozos.**

Tomar del paquete el número necesario de pozos; uno para cada muestra, uno para control positivo y uno para control negativo. Si se requiere, pueden utilizarse pozos adicionales (control positivo y negativo en alimento).

**B.15.4.3.2 Prelavado.**

Con la ayuda de una pizeta llenar cada pozo con solución de lavado y dejar en reposo durante 10 minutos a la temperatura de laboratorio (20-25°C). Vaciar los pozos por inversión rápida del soporte (placa); eliminar completamente todo residuo de líquido, golpeando varias veces, firmemente hacia abajo la placa, sobre una toalla de papel absorbente.

**B.15.4.3.3 Colocación de las Muestras.**

Pasar alícuotas de 200 µL de los controles y muestras (extractos de alimento o de cultivos) dentro de pozos individuales. Registrar la posición de cada muestra en la hoja de registro específica. Golpear suavemente la placa para asegurarse de la distribución homogénea y del contacto de las muestras con las paredes de los pozos; el uso de un agitador de microplacas durante 30 segundos, es opcional. Cubrir los pozos con una película plástica, estirable, autoadherible o sello especial de microplacas; para evitar la evaporación. Incubar 2 hrs. a 35-37°C.

**B.15.4.3.4 Segundo Lavado.**

Presionar firmemente los pozos en la placa e invertir rápidamente. Vaciar el contenido de los pozos en el recipiente de desecho (con hipoclorito de sodio al 2%). Eliminar el residuo de líquido golpeando energicamente, varias veces la placa invertida, sobre una toalla de papel absorbente; llenar completamente los pozos con solución de lavado, y repetir el lavado en la misma forma, de 2 a 3 veces más y finalmente vaciar los pozos.

**Nota 3:** El lavado profundo de los pozos es un paso crítico y asegurará una clara interpretación de los resultados.

**B.15.4.3.5 Adición de Conjunto.**

Agregar 200 µL del conjugado reconstituido (enzima) a cada pozo. Volver a cubrir la placa e incubar 1 h a temperatura de laboratorio (20-25°C). Vaciar las placas y lavar profundamente, 5 veces, como se describió anteriormente (B.16.4.3.4).

**B.15.4.3.6 Adición del Substrato.**

Agregar, a cada pozo, 200 µL del substrato reconstituido. Dejar a temperatura del laboratorio (20-25°C) durante 30 min, como mínimo, hasta que el control positivo alcance la máxima absorbancia (mayor a 1,0) o al color más intenso que el número 4 del comparador de color. El desarrollo de color tiende a concentrarse alrededor de las orillas de los pozos. Para obtener resultados más precisos, golpee con suavidad los extremos de la placa, con el propósito de que el contenido de los pozos se mezcle bien antes de la lectura. Agregar a cada pozo 20 µL de solución stop; golpear con suavidad, para mezclar los contenidos.

**B.15.4.3.7 Determinar los Resultados visualmente o mediante un Lector de Microtitulación.****B.15.5 Interpretación de los Resultados:**

**B.15.5.1** Colocar la placa que sostiene los pozos sobre un fondo blanco. Comparar el color de cada pozo con el comparador de color. El control positivo de toxina (y el control positivo de alimento, si se usó) deben dar un color verde intenso, lo que indica que todos los reactivos han funcionado. Si el control negativo es significativamente más oscuro que el representado en comparador de color, significa que hubo, probablemente, un lavado inadecuado y la prueba debe repetirse.

**B.15.5.2** La muestra se considera **positiva**, si cumple los siguientes criterios:

- El control negativo está dentro del intervalo de color negativo, representado en el comparador de color, y
- Las muestras presentan un color verde o azul más oscuro que el intervalo negativo representado en el comparador de color.

**B.15.5.3** La prueba de enterotoxina se considera **negativa**, si se cumplen los siguientes criterios:

- El control negativo está dentro del intervalo de color negativo, representado en el comparador de color, y
- La muestra es incolora o tiene el color dentro del intervalo negativo, representado en el comparador de color.

**B.15.6 Expresión de Resultados.**

Prueba positiva o negativa para enterotoxina estafilocócica

Cuando se obtengan resultados positivos, éstos tendrán que ser confirmados por el método de doble difusión en gel en laminilla, establecido en el numeral 11 de este apéndice.

**B.16. Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa.**

**B.16.1 Introducción**

Cuando se requiere investigar el contenido de microorganismos viables en un alimento, la técnica comúnmente utilizada es la cuenta en placa. En realidad esta técnica no pretende poner en evidencia todos los microorganismos presentes. La variedad de especies y tipos diferenciables por sus necesidades nutricionales, temperatura requerida para su crecimiento, oxígeno disponible, etc., hacen que el número de colonias contadas constituyan una estimación de la cifra realmente presente y la misma refleja si el manejo sanitario del producto ha sido el adecuado.

Por otra parte el recuento de termofílicos, psicrofílicos y psicotróficos es importante para predecir la estabilidad del producto bajo diferentes condiciones de almacenamiento.

Para obtener resultados reproducibles y por lo tanto significativos, es de suma importancia seguir fielmente y controlar cuidadosamente las condiciones.

Esta técnica puede aplicarse para la estimación de microorganismos viables en una amplia variedad de alimentos.

**B.16.2 Fundamento**

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

**B.16.3 Reactivos**

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

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

**B.16.4 Medio de Cultivo.**

**B.16.4.1 Agar Triptona-Extracto de Levadura (agar para cuenta estándar).**

Fórmula

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

**Preparación del Medio de Cultivo.**

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

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

Si el medio de cultivo es utilizado inmediatamente, enfriar a  $45^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$  en baño de agua y mantenerlo a esta temperatura hasta antes de su uso. El medio no debe de fundirse más de una vez.

En caso de medios deshidratados seguir las instrucciones del fabricante.

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

**B.16.5 Materiales**

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

Se requiere, los materiales mencionados numeral 9, Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

**B.16.6 Aparatos e Instrumentos**

B.16.6.1 Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de  $\pm 1,0^{\circ}\text{C}$ , provista con termómetro calibrado.

B.16.6.2 Contador de colonias de campo oscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadrículada y lente amplificador.

B.16.6.3 Registrador mecánico o electrónico.

B.16.6.4 Microscopio óptico.

B.16.6.5 Baño de agua con o sin circulación mecánica, provista con termómetro calibrado con divisiones de hasta  $1,0^{\circ}\text{C}$  y que mantenga la temperatura a  $45 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ .

**B.16.7 Preparación de la Muestra**

Para la preparación de la muestra seguir numeral 9, Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

**B.16.8 Procedimiento**

B.16.8.1 Distribuir las cajas estériles en la mesa de trabajo de manera que la inoculación; la adición de medio de cultivo y homogenización, se puedan realizar cómoda y libremente. Marcar las cajas en sus tapas con los datos pertinentes previamente a su inoculación y correr por duplicado.

B.16.8.2 Despues de inocular las diluciones de las muestras preparadas según en B.5.1 Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico, en las cajas Petri, agregar de 12 a 15 mL del medio preparado, mezclarlo mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio; cuidar que el medio no moje la cubierta de las cajas. Dejar solidificar.

B.16.8.3 Incluir una caja sin inóculo por cada lote de medio y diluyente preparado como testigo de esterilidad.

B.16.8.4 El tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra se incorpora al diluyente hasta que finalmente se adiciona el medio de cultivo a las cajas, no debe exceder de 20 minutos.

B.16.8.5 Incubar las cajas en posición invertida (la tapa hacia abajo) por el tiempo y la temperatura que se requieran, según el tipo de alimento y microorganismo de que se trate, véase el cuadro 1.

**CUADRO 1**

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

B.16.8.6 En la lectura seleccionar aquellas placas donde aparezcan entre 25 a 250 UFC, para disminuir el error en la cuenta.

B.16.8.7 Contar todas las colonias desarrolladas en las placas seleccionadas (excepto las de mohos y levaduras), incluyendo las colonias puntiformes. Hacer uso del microscopio para resolver los casos en los que no se pueden distinguir las colonias de las pequeñas partículas de alimento.

**B.16.9 Expresión de Resultados****B.16.9.1 Cálculo del Método.**

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

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

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

iv) Placas con menos de 25 colonias.- Cuando las placas corridas para la menor dilución muestran cuentas de menos de 25 colonias, contar el número de colonias presentes en dicha dilución, promediar el número de colonias y multiplicar por el factor de dilución para obtener el valor estimado de cuenta en placa. Aclarar en su informe esta situación agregando la leyenda "valor estimado", véase el cuadro 2, ejemplo 3.

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

- vi)** Colonias extendidas.- Las colonias extendidas pueden presentarse en las siguientes formas:
- vii)** Cadenas de colonias no separadas claramente entre sí, que parecen ser causadas por la desintegración de un cúmulo de bacterias.
- viii)** Colonias que se desarrollan en película entre el agar y el fondo de la caja.
- ix)** Colonias que se desarrollan en película en la orilla de la caja sobre la superficie del agar.
- x)** Colonias de crecimiento extendido y en algunas ocasiones acompañadas de inhibición del crecimiento, que en conjunto exceden el 50% de la caja o represión del crecimiento que por sí mismo excede el 25% de la superficie de la caja.
- xi)** Cuando es necesario contar en cajas que contienen colonias extendidas que no están incluidas en punto x) del numeral **B.4.2.7.1**, contar cualquiera de los tipos vii), viii) o ix) del numeral **B.4.2.7.1**, como provenientes de una sola fuente. En el caso de las colonias del tipo vii) del numeral B.4.2.7.1, si la caja contiene una sola cadena, contar como una sola colonia, si la caja contiene varias cadenas que parecen originarse de fuentes separadas, contar cada cadena como colonia individual. No contar cada colonia de la cadena individualmente. Las colonias del tipo vii) y ix) del numeral **B.4.2.7.1**, generalmente se observan como crecimiento diferenciable de otras colonias y se cuentan como tales. Los crecimientos tipo x) del numeral **B.4.2.7.1**, reportarlos como crecimiento extendido. En caso de que una dilución se encuentre dentro del rango y otra dilución presente colonias de crecimiento extendido, reportar la dilución en la que se pueden contar las colonias, véase el cuadro 2, ejemplo 5
- xii)** Placas sin colonias.- Cuando las placas de todas las diluciones no muestran colonias, reportar la cuenta en placa como menor que una vez el valor de la dilución más baja usada, véase el cuadro 2, ejemplo 6.
- xiii)** Placas corridas por duplicado, una con crecimiento dentro del intervalo adecuado y otra con más de 250 colonias.- Cuando una placa tiene entre 25 y 250 colonias y su duplicado más de 250 colonias, contar ambas placas incluyendo la que está fuera del intervalo para determinar la cuenta en placa, véase el cuadro 2, ejemplo 7.
- xiv)** Placas corridas por duplicado, una placa de cada dilución dentro del intervalo de 25 a 250 colonias.- Cuando una placa dentro de diferentes diluciones contiene el número de colonias especificadas en el intervalo, contar el número de colonias de las cuatro placas para calcular la cuenta en placa, véase el cuadro 2, ejemplo 8.
- xv)** Placas corridas por duplicado, ambas placas de una dilución dentro del intervalo de 25 a 250 y sólo una de la otra dilución dentro del mismo. Contar las cuatro cajas incluyendo aquélla con menos de 25 o más de 250 colonias, para calcular la cuenta en placa, véase el cuadro 2, ejemplo 9.

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

#### B.16.10 Informe de la Prueba

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

#### CUADRO 2

Cálculo de los valores de la cuenta en placa  
(ensayos por duplicado)

Ejemplo		Colonias contadas		UFC/ g o mL
número	1:100	1:1,000	1:10,000	
1	>250	178	16	180,000
	>250	190	17	
2	>250	220	25	250,000
3	18	2	0	1,600
	14	0	0	
4	>250	>250	512	5,000,000
	>250	>250	495	
5	>250	235	Crecimiento extendido	
6	0	0	0	<100
7	>250	240	24	250,000
	>250	268	19	
8	>250	216	23	280,000
	>250	262	42	
9	>250	215	20	23,000
	>250	235	26	
	>250	275	32	270,000
	>250	225	26	

**B.17 Método para la Cuenta de Mohos y Levaduras en Alimento.****B.17.1 Fundamento**

El método se basa en inocular una cantidad conocida de muestra de prueba en un medio selectivo específico, acidificado a un pH 3,5 e incubado a una temperatura de  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , dando como resultado el crecimiento de colonias características para este tipo de microorganismos.

**B.17.2 Reactivos y materiales****B.17.2.1 Reactivos**

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

**i) Medios de cultivo.****Agar papa - dextrosa, comercialmente disponible en forma deshidratada.**

Preparación del medio de cultivo.

Seguir instrucciones del fabricante y después de esterilizar, enfriar en baño de agua a  $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , acidificar a un pH de  $3,5 \pm 0,1$  con ácido tartárico estéril al 10% (aproximadamente 1,4 mL de ácido tartárico por 100 mL de medio). Después de adicionar la solución, mezclar y medir el pH con potenciómetro. Dejar solidificar una porción del medio. Hacer esto en cada lote de medio preparado. A fin de preservar las propiedades gelificantes del medio, no calentar después de agregar el ácido tartárico.

**B.17.2.1.1 Soluciones.****i) Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada)**

Fórmula	
Ingredientes	Cantidades
Fosfato de potasio 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 hidróxido de sodio 1 N.

Llevar a 1,0 l de agua.

Esterilizar a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Conservar en refrigeración (solución concentrada).

Tomar 1,25 mL de la solución concentrada y llevar a 1,0 l con agua (solución de trabajo).

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

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

**ii) Solución estéril de ácido tartárico al 10%**

Fórmula	
Ingredientes	Cantidades
Ácido tartárico	10 g
Agua destilada	100, mL

Preparación:

Disolver el ácido en el agua y esterilizar a  $121 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos o por filtración a través de membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ .

**B.17.2.2 Materiales.**

B.17.2.2.1 Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 mL (o si es necesario de 1 mL y 2 mL), con tapón de algodón. Pueden utilizarse pipetas graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total.

B.17.2.2.2 Cajas Petri.

B.17.2.2.3 Frascos de vidrio de 250 mL con tapón de rosca.

B.17.2.2.4 Tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca.

B.17.2.2.5 Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc.

B.17.2.2.6 Todo el material e instrumentos que tengan contacto con las muestras bajo estudio, deben esterilizarse mediante:

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

**B.17.2.3 Aparatos e Instrumentos**

B.17.2.3.1 Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de 170°C.

B.17.2.3.2 Incubadora con termostato que pueda ser mantenido a  $25 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$  provista con termómetro calibrado.

B.17.2.3.3 Autoclave que alcance una temperatura mínima de  $121 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ .

B.17.2.3.4 Baño de agua con control de temperatura y circulación mecánica, provista con termómetro calibrado con divisiones de  $0,1^{\circ}\text{C}$  y que mantenga la temperatura a  $45 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ .

B.17.2.3.5 Contador de colonias de campo oscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadriculada y lente amplificador.

B.17.2.3.6 Registrador mecánico o electrónico.

B.17.2.3.7 Microscopio óptico.

B.17.2.3.8 Potenciómetro con una escala mínima de 0,1 unidades de pH a  $25^{\circ}\text{C}$ .

**B.17.3 Preparación de la Muestra**

La preparación de la muestra debe ser de acuerdo a lo señalado en el numeral B.4.1 (Procedimiento para la preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico) de este apéndice normativo

**B.17.3.1 Procedimiento**

**B.17.3.1.1** Colocar por duplicado en cajas Petri 1 mL de la muestra líquida directa o de la dilución primaria, utilizando para tal propósito una pipeta estéril.

**B.17.3.1.2** Repetir el procedimiento tantas veces como diluciones decimales se requiera sembrar, utilizando una pipeta estéril diferente para cada dilución.

**B.17.3.1.3** Verter de 15 a 20 mL de agar papa dextrosa acidificado, fundido y mantenido a  $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$  en un baño de agua. El tiempo transcurrido entre la preparación de la dilución primaria y el momento en que es vertido el medio de cultivo, no debe exceder de 20 minutos.

**B.17.3.1.4** Mezclar cuidadosamente el medio con seis movimientos de derecha a izquierda, seis en el sentido de las manecillas del reloj, seis en el sentido contrario y seis de atrás para adelante, sobre una superficie lisa. Permitir que la mezcla se solidifique dejando las cajas Petri reposar sobre una superficie horizontal fría.

**B.17.3.1.5** Preparar una caja control con 15 mL de medio, para verificar la esterilidad.

**B.17.3.1.6** Invertir las cajas y colocarlas en la incubadora a  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

**B.17.3.1.7** Contar las colonias de cada placa después de 3, 4 y 5 días de incubación. Después de 5 días, seleccionar aquellas placas que contengan entre 10 y 150 colonias. Si alguna parte de la caja muestra crecimiento extendido de mohos o si es difícil contar colonias bien aisladas, considerar los conteos de 4 días de incubación y aun de 3 días. En este caso, informar el periodo de incubación de 3 o 4 días en los resultados del análisis.

**B.17.3.1.8** Si es necesario, cuando la morfología colonial no sea suficiente, examinar microscópicamente para distinguir las colonias de levaduras y mohos de las bacterias.

**B.17.4 Expresión de Resultados**

## Cálculo del Método

Considerar las cuentas de placas con 10 a 150 colonias como las adecuadas para el informe.

Multiplicar por el inverso de la dilución, tomando en consideración los criterios del numeral B.4.2 de este apéndice (Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa), para la expresión de resultados.

**B.17.5 Informe de la Prueba**

## Informar:

Unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro (UFC/g o mL) de mohos en agar papa – dextrosa acidificado, incubadas a  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 5 días.

Unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro (UFC/g o mL) de levaduras en agar papadextrosa acidificado, incubadas a  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 5 días.

**B.18. Estimación de la Densidad Microbiana por la Técnica del Número Mas Probable de Bacterias Coliformes, Coliformes fecales y *Escherichia coli*, por la Técnica de Diluciones en Tubo Múltiple.**

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.).

**B.18.1 Fundamento.**

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

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

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

- Las bacterias se encuentran como entidades no agrupadas.

- Los microorganismos presentes en la muestra crecerán en el medio, cuando son incubados y se mantengan en las condiciones adecuadas para su desarrollo.

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

#### **B.18.2 Equipo, Materiales y Reactivos.**

No aplica.

#### **B.18.3 Procedimientos.**

##### **B.18.3.1 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. Despues 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:

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

Para calcular el NMP/100 g multiplicar por 100.

##### **B.18.3.2 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:  $\text{NMP/g} = \frac{P}{(N T)^{1/2}}$

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:  $P = (5 + 4 + 2 + 1) = 12$ ;  $\underline{N} = (8 \times 0) + (4 \times 1) + (2 \times 3) + (1 \times 5) + (0,5 \times 4) + (0,25 \times 5) = 18,25$ ; y  $\underline{T} = 5 (8+4+2+1+0,5+0,25) = 78,75$

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

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

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

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 ( $n_j$ ) 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 ( $n_j$ ).

La media armónica se define como:

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

k es el número de diluciones. Por ejemplo: Suponiendo que el resultado de 3 diluciones en  $n_j$  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  $(-0,76) = 0,17/\text{g o } 17/100 \text{ g}$  y el límite superior es el antilogaritmo  $(-0,23) = 0,59/\text{g o } 59/100 \text{ g}$ . Cuando se compara con las tablas el NMP podría ser 0,31/g con límites de confianza de 0,16/g y 0,57/g.

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

No. de tubos positivos			NMP/g (mL) <sup>b</sup>	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	-	-

<sup>a</sup> 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.

<sup>b</sup> 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<sup>a</sup>.**

No. de tubos positivos			NMP/g (mL) <sup>b</sup>	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	-	-

<sup>a</sup> 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.

<sup>b</sup> 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<sup>a</sup>.**

No. de tubos positivos			NMP/g (mL) <sup>b</sup>	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	-	-

<sup>a</sup> 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.

<sup>b</sup> Multiplicar todos los valores de NMP/g (mL) por 100 para expresarlos como NMP/100 g (mL).

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

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

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

No. de Tubos Positivos																				
10 1 0,1				10 1 0,1				10 1 0,1				10 1 0,1				10 1 0,1				
mL	mL	mL	N M P																	
0	0	0		1	0	0	2	2	0	0	4,5	3	0	0	7,8	4	0	0	13	5
0	0	1	1,8	1	0	1	4	2	0	1	6,8	3	0	1	11	4	0	1	17	5
0	0	2	3,6	1	0	2	6	2	0	2	9,1	3	0	2	13	4	0	2	21	5
0	0	3	5,4	1	0	3	8	2	0	3	12	3	0	3	16	4	0	3	25	5
0	0	4	7,2	1	0	4	10	2	0	4	14	3	0	4	20	4	0	4	30	5
0	0	5	9,0	1	0	5	12	2	0	5	16	3	0	5	23	4	0	5	36	5
0	1	0	1,8	1	1	0	4	2	1	0	6,8	3	1	0	11	4	1	0	17	5
0	1	1	3,6	1	1	1	6,1	2	1	1	9,2	3	1	1	14	4	1	1	21	5
0	1	2	5,5	1	1	2	8,1	2	1	2	12	3	1	2	17	4	1	2	26	5
0	1	3	7,3	1	1	3	10	2	1	3	14	3	1	3	20	4	1	3	31	5
0	1	4	9,1	1	1	4	12	2	1	4	17	3	1	4	23	4	1	4	35	5
0	1	5	11	1	1	5	14	2	1	5	19	3	1	5	27	4	1	5	42	5
0	2	0	3,7	1	2	0	6,1	2	2	0	9,3	3	2	0	14	4	2	0	22	5
0	2	1	5,5	1	2	1	8,2	2	2	1	12	3	2	1	17	4	2	1	26	5
0	2	2	7,4	1	2	2	10	2	2	2	14	3	2	2	20	4	2	2	32	5
0	2	3	9,2	1	2	3	12	2	2	3	17	3	2	3	24	4	2	3	38	5
0	2	4	11	1	2	4	15	2	2	4	19	3	2	4	27	4	2	4	44	5
0	2	5	13	1	2	5	17	2	2	5	22	3	2	5	31	4	2	5	50	5
0	3	0	5,6	1	3	0	8,3	2	3	0	12	3	3	0	17	4	3	0	27	5
0	3	1	7,4	1	3	1	10	2	3	1	14	3	3	1	21	4	3	1	33	5
0	3	2	9,3	1	3	2	13	2	3	2	17	3	3	2	24	4	3	2	39	5
0	3	3	11	1	3	3	15	2	3	3	20	3	3	3	28	4	3	3	45	5
0	3	4	13	1	3	4	17	2	3	4	22	3	3	4	31	4	3	4	52	5
0	3	5	15	1	3	5	19	2	3	5	25	3	3	5	35	4	3	5	59	5
0	4	0	7,5	1	4	0	11	2	4	0	15	3	4	0	21	4	4	0	34	5
0	4	1	9,4	1	4	1	13	2	4	1	17	3	4	1	24	4	4	1	40	5
0	4	2	11	1	4	2	15	2	4	2	20	3	4	2	28	4	4	2	47	5
0	4	3	13	1	4	3	17	2	4	3	23	3	4	3	32	4	4	3	54	5
0	4	4	15	1	4	4	19	2	4	4	25	3	4	4	36	4	4	4	62	5
0	4	5	17	1	4	5	22	2	4	5	28	3	4	5	40	4	4	5	69	5
0	5	0	9,4	1	5	0	13	2	5	0	17	3	5	0	25	4	5	0	41	5
0	5	1	11	1	5	1	15	2	5	1	20	3	5	1	29	4	5	1	48	5
0	5	2	13	1	5	2	17	2	5	2	23	3	5	2	32	4	5	2	56	5
0	5	3	15	1	5	3	19	2	5	3	26	3	5	3	37	4	5	3	64	5
0	5	4	17	1	5	4	22	2	5	4	29	3	5	4	41	4	5	4	72	5
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) <sup>a</sup>					Valores positivos reportados	NMP estimado/g o mL <sup>b</sup>
Ejemplo	0,10	,001	0,001	0,0001	0,00001		
A	3/3	3/3	2/3	0/3	0/3	3-2-0	930
B	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3	3-2-0	9300
C	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0-1-0	30
D	3/3	3/3	2/3	1/3	1/3	3-2-2	2100
E	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3-3-3	110000

<sup>a</sup> Numerador/denominador = número de tubos positivos/número de tubos inoculados.<sup>b</sup> 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) <sup>a</sup>					Valores positivos	NMP estimado/g o mL <sup>b</sup>
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

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

### B.18.3.3 Determinación de Bacterias Coliformes, Coliformes fecales y *Escherichia coli* por la Técnica de Diluciones en Tubo Múltiple.

#### B.18.3.3.1 Fundamento

Este método se basa en la propiedad de los microorganismos coliformes para producir gas a partir de glucosa y fermentación de lactosa dentro de las 48 horas de incubación a 35,0,5°C (coliformes) y 44,50,2°C (coliformes fecales y *E. coli*).

#### B.18.3.3.2 Equipo y Materiales

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

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

**B.18.3.3.3 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 121C.
6. Antes de abrir el autoclave, dejar bajar la temperatura a 75C 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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	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 <sub>4</sub> HPO <sub>4</sub> •4H <sub>2</sub> O	1,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (monobásico)	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,2 g
Citrato de sodio •2H <sub>2</sub> O	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.

**B.18.3.3.4 Reactivos****Reactivos 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.

**Reactivos 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

**B.18.3.3.4.1 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.

**B.18.3.3.4.2 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

**B.18.3.3.4.3 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.

**B.18.3.3.4.4 lodo de Gram**

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

1. Colocar el KI en un mortero.
2. Adicionar el yodo.
3. Triturar con el pistilo por 5-10 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.

**B.18.3.3.4.5 Colorante de contraste (solución concentrada)**

Ingredientes:	
Safranina O	2,5 g
Etanol al 95%	100 mL

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

**B.18.3.3.4.6 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.

**B.18.3.3.4.7 Procedimiento****B.18.3.3.4.8 Agua y hielo****B.18.3.3.4.9 Prueba presuntiva**

**B.18.3.3.3.4.10** Agitar la muestra y transferir volúmenes de 10 mL a cada uno de 5 tubos con 20 mL de caldo lauril sulfato triptosa de doble concentración, 5 tubos con 1 mL y 5 tubos con 0,1 mL de caldo lauril sulfato triptosa de concentración sencilla o las siguientes porciones: 10 tubos con 10 mL de muestra; 5 tubos con 20 mL de muestra o una porción de 100 mL; consultar la tabla del inciso 2 en la preparación del "caldo lauril triptosa" para la concentración de caldo lauril triptosa requerido. Los tubos deben contener una campana de fermentación (Durham).

**B.18.3.3.4.11** Incubar los tubos a 35 0,5°C. Examinar los tubos a las 24 horas y observar si hay formación de gas; si la formación de gas no se observa, incubar 24 horas más.

**B.18.3.3.4.12 Prueba confirmativa**

**B.18.3.3.4.13** De cada tubo que muestre formación de gas, tomar una asada y sembrar en un número igual de tubos con medio de confirmación, para la determinación de bacterias coliformes referirse al método de Determinación de bacterias coliformes. Técnica del Número más probable, para la determinación de bacterias coliformes fecales, sembrar en caldo EC. Inocular a dos tubos con caldo EC una cepa de *E. coli* como control positivo y una de *Enterobacter aerogenes* como control negativo e incubar con las muestras.

**B.18.3.3.4.14** Para la determinación de coliformes fecales incubar los tubos a 44,5 0,2°C en baño de agua con agitación durante 24 horas, observar si hay formación de gas; si la formación de gas no se observa, continuar la incubación 24 horas más, hacer la lectura. Utilizar estos resultados para calcular el número más probable (NMP) de coliformes fecales.

**B.18.3.3.5 Prueba confirmativa para *Escherichia coli* (por identificación bioquímica)**

**B.18.3.3.5.1** Tomar una asada de cada uno de los tubos positivos y sembrar por estría cruzada en agar EMB-L para su aislamiento.

**B.18.3.3.5.2** Incubar las placas invertidas a 35°C por 18-24 horas.

**B.18.3.3.5.3** Seleccionar dos colonias de cada placa con la siguiente morfología colonial: Colonias con centro negro, planas con o sin brillo metálico y sembrarlas en agar cuenta estándar para realizar las pruebas de morfología microscópica y pruebas bioquímicas. Incubar las placas a 35°C por 18-24 horas.

**B.18.3.3.5.4** Si no hay colonias con morfología típica, probar una o más colonias lo más parecido *E. coli* de cada placa.

**B.18.3.3.5.5** Hacer un frotis y teñirlo por Gram. Observar al microscopio la presencia de bacilos cortos o cocobacilos Gram-negativos.

**B.18.3.3.6 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.

**B.18.3.3.7 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-metilumbelliferon (MU), que al ser expuesto a una fuente de luz ultravioleta (UV) de onda larga (365 nm) produce una fluorescencia azul, fácil de observar. Cuando el MUG es incorporado al caldo EC se puede identificar *E. coli*.

**B.18.3.3.8 Seguir lo indicado para Prueba Presuntiva****B.18.3.3.9 Prueba Confirmativa**

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

**B.18.3.3.10 Alimentos****B.18.3.3.10.1 Prueba Presuntiva.**

**B.18.3.3.10.2** Preparar la muestra como se indica en el método Preparación y dilución de muestras de alimentos para análisis microbiológico; y de acuerdo con el tipo de producto, utilizar las diluciones apropiadas, según se indica en el procedimiento de la densidad microbiana por la técnica del número más probable.

Utilizar como medio de enriquecimiento caldo lauril triptosa y continuar como anteriormente

**B.18.3.3.10.3 Prueba Confirmativa.** Continuar como anteriormente**B.18.3.3.10.4 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 anteriormente. Hacer tinción de Gram para observación de la morfología de las colonias.

**B.18.3.3.11 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.

**B.18.3.3.12 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

**B.19 Determinación de Humedad en leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado, sometidos a deshidratación.**

**B.19.1 Principio del Método.**

Este método se basa en la pérdida de peso debido a la evaporación del agua bajo condiciones establecidas.

**B.19.2 Equipo.**

**B.19.2.1** Balanza analítica con sensibilidad de 0,1 mg.

**B.19.2.2** Estufa eléctrica con regulador de temperatura a 100 – 102º C.

**B.19.3 Materiales.**

**B.19.3.1** Desecador de vidrio con sílica gel con indicador de humedad u otro desecante activo.

**B.19.3.2** Cápsulas de vidrio, acero inoxidable, níquel o aluminio de 50 a 90 mm de diámetro y de 12 a 25 mm de altura provistos de tapa que cierre herméticamente.

**B.19.3.3** Pinzas metálicas especiales para las cápsulas.

**B.19.4 Procedimiento.****B.19.4.1 Preparación de la Muestra.**

**B.19.4.1.1** Cuando se tome la muestra operar tan rápido como sea posible. Evitar la absorción de humedad del medio ambiente durante la preparación de la muestra. Mezclar el producto transfiriéndolo a un frasco seco y bien tapado con capacidad aproximada al doble del tamaño de la muestra. Mezclar cuidadosamente agitando e invirtiendo repetidamente.

**B.19.4.1.2** Sólo para muestras que presentan grumos o terrones, tamizar la muestra a través de una malla número 20 y si es necesario frotar el material a través de la malla y golpear vigorosamente.

**B.19.4.2 Preparación de las Cápsulas.**

Secar las cápsulas destapadas en una estufa controlada a 100-102°C por una hora. Taparlas e introducirlas en un desecador y dejarlas enfriar a temperatura ambiente. Pesarlas con una precisión de 0,1 mg.

**B.19.4.3 Secado de las Muestras.**

En las cápsulas previamente secadas y pesadas, pesar con exactitud y distribuir homogéneamente de 1 a 3 g de muestra. Secar en estufa (100-102°C) durante 4 horas consecutivas, dejando las cápsulas descubiertas, pero manteniendo las tapas correspondientes identificadas cerca de ellas. Al término del periodo, cubrir las cápsulas con sus respectivas tapas e introducirlas en el desecador. Enfriar a temperatura ambiente y pesar.

**B.19.5 Cálculos.**

$$\% \text{ de Humedad} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

En donde:

$m_0$  = masa en gramos de la cápsula y la tapa.

$m_1$  = masa en gramos de la cápsula y tapa con la muestra antes de secar.

$m_2$  = masa en gramos de la cápsula y la tapa con la muestra después de secar.

**B.19.6 Expresión de Resultados.**

% Humedad

**B.20. Determinación de *Clostridium botulinum* y sus Toxinas en Alimentos y Muestras Clínicas**

**B.20.1 Fundamento**

Demostrar la presencia de toxina botulínica por inyección a ratones con extractos de alimentos o muestras clínicas y observar el efecto letal. Comprobar con el antisuero específico la neutralización de la toxina. La determinación de *C botulinum* se basa en el cultivo de muestras de alimentos y clínicas en condiciones de anaerobiosis en medios específicos y la subsecuente demostración de la toxina.

20.2 Toma y manejo de muestras

**B.20.2. Alimentos**

Las muestras pueden tomarse de sobrantes de los alimentos sospechosos o de recipientes cerrados. Cuando están involucrados alimentos comerciales, es importante observar la etiqueta, número de lote del fabricante, o cualquier dato relevante que pueda identificar el origen de la muestra.

**B.20.2.2 Clínicas**

Las muestras clínicas para el análisis incluyen: materia fecal, aproximadamente 10 g, contenido gástrico (ajustar aproximadamente a pH 6 con hidróxido de sodio 0,1) y suero (colectado de 20 mL de sangre ANTES DE ADMINISTRAR LA ANTITOXINA). Cuando se sospecha de botulismo infantil es importante analizar las heces. Si fuera necesario, las manchas o partes sólidas de los pañales.

**B.20.3 Envío de muestras**

**B.20.3.1** Para un envío seguro, el interior de los empaques deben contener:

- (i) Un primer recipiente impermeable al agua.
- (ii) Un segundo recipiente impermeable al agua.

(iii) Material absorbente (por ejemplo unisel) entre los dos contenedores, suficiente para absorber el contenido entero del primer recipiente.

**B.20.3.2** De preferencia enviar el material en refrigeración en paquetes que contengan recipientes con gel congelado. Para una máxima preservación de la toxina el recipiente secundario debe empacarse en una caja de unisel con recipientes de gel congelado. Sin embargo, si se sospecha retraso en el envío, el material debe congelarse y empacarse con hielo seco.

**B.20.4 Materiales, Equipo y Reactivos**

B.20.4.1 Flujo laminar

B.20.4.2 Propipeta o bulbo

B.20.4.3 Lentes de seguridad

B.20.4.4 Guantes de cirujano

B.20.4.5 Tubos de centrífuga de 40 mL de capacidad

B.20.4.6 Centrífuga refrigerada con capacidad de 15 000 x g

B.20.4.7 Jeringas desechables de 19 x 15.

- B.20.4.8 Filtros desechables de 0,45 µm.
- B.20.4.9 Vortex
- B.20.4.10 Licuadora
- B.20.4.11 Potenciómetro
- B.20.4.12 Incubadora 30º, 35ºC
- B.20.4.13 Balanza
- B.20.4.14 Tubos de ensayo de 13 x 100 mm
- B.20.4.15 Jeringas para tuberculina
- B.20.4.16 Equipo para tinción de Gram
- B.20.4.17 Ratones de preferencia hembras de 20 a 30 g cepa CFI o NIH
- B.20.4.18 Antisuero trivalente ABE
- B.20.4.19 Antisuero monovalente A,B,E y F
- B.20.4.20 Tripsina al 1% p/v
- B.20.4.21 Tripsina al 1,4%
- B.20.4.22 Solución reguladora de fosfatos con gelatina
- B.20.4.23 Solución de tetraciclina al 0,2%
- B.20.4.24 0,1 N NaOH o NaHCO<sub>3</sub> saturado para limpiar posibles derrames.
- B.20.4.25 Tripsina al 1% p/v
- B.20.4.26 Tripsina al 1,4%
- B.20.4.27 Medio carne cocida (CMM)
- B.20.4.28 Caldo tripticasa peptona glucosa extracto de levadura (TPGY).
- B.20.4.29 Caldo tripticasa peptona glucosa extracto de levadura (TPGYT) con tripsina
- B.20.4.30 Agar aislamiento *Clostridium botulinum* (CBI)
- B.20.4.31 Agar hígado de ternera yema de huevo
- B.20.4.32 Agar esporulación de Eklund
- B.20.4.33 Baño de agua (75-100ºC)
- B.20.4.34 Etanol al 50% o absoluto
- B.20.4.35 Jarras y sistema de anaerobiosis
- B.20.5 Preparación de Medios de Cultivo**
- B.20.5.1 Medio de la Carne cocida (CMM).**

**FORMULA**

Corazón de res 454 g  
Proteosa peptona 20 g  
Bactodextrosa 2 g  
Cloruro de sodio 5 g  
Extracto de corazón de res 1000 mL

Picar el corazón de res, sumergir en agua y calentar hasta ebullición durante 1 h. Enfriar, ajustar el pH a 7,0, y hervir 10 minutos. Filtrar a través de muselina y presionar para drenar el exceso de líquido de la carne. Guardar la carne cocida. Agregar los ingredientes al filtrado y ajustar a pH 7,0, agregar agua hasta hacer 1000 mL. Filtrar a través de papel filtro poroso. Se puede conservar el caldo y la carne en congelación por separado. Agregar el corazón cocido y picado a tubos de ensayo de 18 x 150 mm o 20 x 150 mm a una altura de 1,2 a 2,5 cm del tubo y adicionar de 10 a 12 mL del caldo. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121ºC. Si este medio se almacena por más de 12 h después de su preparación, debe calentarse a ebullición por 10 minutos y enfriar antes de su uso.

**B.20.5.2 Caldo Trypticase Peptona Glucosa Extracto de Levadura (TPGY).**

**FORMULA**

Tripticase 50 g  
Peptona 5 g  
Glucosa 4 g  
Extracto de levadura 20 g  
Tioglicolato de sodio 1 g  
Agua destilada 1000 mL

Disolver los ingredientes en agua caliente, enfriar y ajustar a pH 7,2. Distribuir en volúmenes de 21 mL en tubos de 20 x 150 mm con tapón de rosca. Esterilizar a 121±1ºC/15 min, enfriar a la temperatura ambiente y almacenar a 4ºC hasta 6 semanas. Si se almacena más de 12 h, tratarlos con calor como se indica en B.19.9.1.

**B.20.5.3 Caldo Trypticasa Peptona Glucosa Extracto de Levadura adicionado con Tripsina (TPGYT).**

## FORMULA

Trypticasa 50 g

Peptona 5 g

Glucosa 4 g

Extracto de levadura 20 g

Tioglicolato de sodio 1 g

Agua destilada 1000 mL

Disolver los ingredientes en agua caliente, enfriar y ajustar a pH 7,2. Distribuir en volúmenes de 21 mL en tubos de 20 x 150 mm con tapón de rosca. Esterilizar a 121±1°C/15 min, enfriar a la temperatura ambiente, y almacenar a 4°C hasta 6 semanas. Si se almacena más de 12 h tratarlo con calor como se indica en B.20.9.1. Agregar 1,5 mL de solución de tripsina al 1,4% por cada tubo con 21 mL del medio TPGY. Mezclar muy suavemente. Este medio no se puede almacenar.

**B.20.5.4 Agar Hígado de Ternera Yema de huevo.****a) Agar Hígado de ternera.**

## FORMULA

Infusión de hígado 50 g

Infusión de ternera 500 g

Proteosa peptona 20 g

Neopeptona 1,3 g

Triptona 1,3 g

Dextrosa 5,0 g

Almidón soluble 10,0 g

Caseína isoeléctrica 2,0 g

Cloruro de sodio 5,0 g

Nitrato de sodio 2,0 g

Gelatina 20,0 g

Agar 15,0 g

Agua destilada 1000 mL

Calentar con agitación constante hasta dilución completa. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C, pH final 7,3 ± 0,2. Agregar por cada 500 mL del medio base fundido 40 mL de la suspensión salina de yema de huevo. Mezclar y vaciar a cajas de Petri estériles de 15 x 100 mm (aproximadamente 15 – 20 mL). Secar las placas a temperatura del laboratorio por 2 días o a 35°C por 24 horas. Verificar esterilidad de las placas. Almacenar en refrigeración.

**b) Emulsión al 50% de Yema de huevo.**

Lavar los huevos con un cepillo suave y dejar escurrir. Sumergirlos por 1 hora en solución de cloruro mercuríco al 0,1%, escurrir. Sumergir en una solución de etanol al 70% y dejar durante 30 minutos, escurrir. Abrir los huevos en condiciones asépticas y descartar las claras. Colocar las yemas en un recipiente estéril y mezclar con igual volumen de solución salina fisiológica (0,85%) estéril. Guardar en refrigeración hasta su uso.

**B.20.5.5 Agar para Asilamiento de *C. botulinum* (CBI).**

El agar CBI es una modificación del medio agar McClung Toabe para el aislamiento selectivo y diferencial de *C. botulinum*, el cual puede aislarse de los cultivos toxigénicos de CMM, provenientes de muestras de heces, líquido gástrico o alimentos. El medio de agar CBI contiene: Cicloserina 250 µg/ mL, sulfametoxazol 76 µg/ mL y trimetropirim 4 µg/ mL en la base del medio agar McClung Toabe yema de huevo.

Agar McClung Toabe

## FORMULA

Proteosa peptona 40 g

Bacto dextrosa 2 g

Fosfato de sodio dibásico 5 g

Fosfato de potasio monobásico 1 g

Cloruro de sodio 2 g

Sulfato de magnesio 0,1 g

Agar 25 g

Agua destilada 1000 mL

pH final 7,6 ± 0,2 a 25°C

Extracto de levadura 5 g

Suspensión de yema de huevo 100 mL

**SOLUCION DE ANTIBIOTICOS**

Cicloserina 250 mg o 25 mL de una solución al 1,0%

Sufametoxasol 76 mg o 4 mL de una solución al 1,9%

Disolver el sulfametoxazol en solución 2 N de NaOH.

Lactato de Trimetroprim 4 mg o 4 mL de una solución al 0,1% por cada 100 mL de medio base

Esterilizar por filtración.

Preparación:

Agregar el extracto de levadura y los ingredientes del agar McClug Toabe a un matraz de 2 L con 900 mL de agua destilada, mezclar y calentar hasta disolución. Ajustar a pH 7,5. Esterilizar 15 minutos a 121°C en autoclave. Enfriar a 55°C en baño de agua y en condiciones asépticas agregar 100 mL de la suspensión al 50% de yema de huevo. Agregar los volúmenes necesarios para conservar la concentración de antibióticos por litro de medio base. Mezclar y distribuir en cajas de Petri estériles de 15 x 100 mm aproximadamente 15-20 mL por placa. Dejar solidificar y colocar en bolsas de plástico. Guardar en refrigeración hasta su uso. Estas placas pueden almacenarse hasta 1 mes aproximadamente.

**B.20.5.6 Agar para Esporulación de Eklund.**

FORMULA

Tripticasa 4 g

Peptona 1 g

Glucosa 0,1 g

Extracto de levadura 1 g

Agar 4 g

Agua destilada 200 mL

Disolver los ingredientes en agua caliente, excepto el agar, ajustar a pH 7,8, agregar el agar. Esterilizar a 121±1°C/15 min. y enfriar a 50°C. Agregar 2 mL de solución al 10% de clorhidrato de cisteína, esterilizada por filtración; 12 mL de emulsión de yema de huevo y 2 mL de sangre citratada de bovino o borrego. Preparar las placas. Este medio es particularmente adecuado para la esporulación de *C. botulinum* del grupo II.

**B.20.6 Diluyentes y Reactivos****B.20.6.1 Solución Amortiguadora de Fosfatos con Gelatina**

FORMULA

Gelatina 2 g

Na2HPO4 4 g

Agua destilada 1000 mL

Ajustar a pH 6,2 con solución de ácido clorhídrico 4N. Distribuir en frascos con tapón de rosca, esterilizar por vapor, enfriar a la temperatura ambiente y almacenar a 4°C.

**B.20.6.2 Solución de Tetraciclina al 0,2%.**

Disolver 50 mg en 25 mL del diluyente fosfato de gelatina, mantener a 4°C hasta 4 días. Si se requiere almacenar por más tiempo, congelar en pequeñas porciones. Evitar la recongelación.

**B.20.6.3 Solución de Tripsina (1:250).**

a) Solución al 1%

Disolver 200 mg en 20 mL de agua destilada. No almacenar.

b) Solución al 1,4%.

Disolver 280 mg en 20 mL del diluyente fosfato de gelatina, filtrar a través de membrana de 0,45 µm. Usar vacío para obtener efecto parcial de deaireación del filtrado.

**B.20.6.4 Antisueros**

A, B, E; A, B; A, B, E, C\*, D\*, F.

Investigación de sospecha de botulismo en animales.

**B.20.7 Procedimiento****B.20.7.1 Examen Microscópico de los Alimentos Sospechosos**

Este examen no es esencial para la detección de *C. botulinum*, pero facilita la selección de los alimentos sospechosos para el análisis. Preparar frotis directos y hacer tinción de Gram. Si el alimento contiene exceso de grasa, sumergir los portaobjetos fijados al calor por 1-2 minutos en xilol antes de teñir.

**B.20.7.2 Preparación del Material para el Análisis de las Toxinas.****B.20.7.2.1 Alimentos Líquidos:**

Centrifugar aproximadamente 20 mL a 15000 x g durante 20 minutos. Decantar cuidadosamente el sobrenadante o extraer con una jeringa desechable de 19 x 25 mm. Cubrir el tubo y conservar a 4°C para hacer el cultivo del sedimento posteriormente. Repetir la centrifugación, si el sobrenadante aún no está claro. Esterilizar el sobrenadante por filtración a través de la membrana de 0,45 µm adaptada a una jeringa desechable. Ocasionalmente puede requerirse una prefiltración durante el proceso de filtración. El propósito de la esterilización es prevenir una infección y a su vez una muerte inespecífica de los ratones inoculados.

**B.20.7.2.2 Alimentos Semilíquidos:**

Colocar 10-15 g en tubos de centrífuga de 40 mL, agregar igual volumen de solución reguladora de fosfatos con gelatina y homogenizar en vortex.

Centrifugar y proceder como en B.20.7.2.1.

**B.20.7.2.3 Alimentos Sólidos:**

Colocar 10-20 g en un vaso de licuadora o mortero. Agregar suficiente solución reguladora de fosfatos con gelatina para obtener cuando menos 10 mL de sobrenadante después de la centrifugación. La dilución del alimento deberá estar entre 1:1 a 1:3. Licuar a velocidad alta por 1-2 minutos. Los vasos de licuadora deberán cerrarse herméticamente para prevenir la formación de aerosoles. Centrifugar y proceder como en B.20.7.2.1, B.20.7.2.2 y B.20.7.2.3.

**B.20.7.2.4 Alimentos Enlatados:**

Lavar y secar la superficie de la lata. Cubrir la tapa con etanol al 96%, dejar por 2 minutos; decantar y flamear el alcohol residual. Colocar la lata en una bolsa de plástico para prevenir la dispersión de aerosoles y abrir con un abrelatas estéril. Proceder como en B.20.7.2.1, B.20.7.2.2 y B.20.7.2.3.

**B.20.7.2.5 Suero**

Idealmente debe obtenerse 10 mL de suero. El suero usado sirve sólo antes del tratamiento con el antisuero. Si está turbio, centrifugar a 15,000 x g durante 20 minutos, decantar el sobrenadante.

**B.20.7.2.6 Heces**

Colocar 10 g en un tubo de centrífuga de 40 mL de capacidad, agregar suficiente cantidad de solución reguladora de fosfatos con gelatina para obtener al menos 10 mL de sobrenadante después de la centrifugación. Mezclar en vortex durante 2-3 minutos. Conservar la mezcla a 4°C por 2 h. Homogeneizar en vortex. Centrifugar y proceder como en B.20.7.2.7. La muestras líquidas, enemas y el contenido intestinal se pueden centrifugar directamente con poco o sin la adición de la solución reguladora de fosfatos con gelatina.

Ocasionalmente, los sobrenadantes de muestras clínicas no se pueden filtrar, en estos casos, agregar 1 mL de una solución al 0,2% de tetraciclina por cada 9 mL del sobrenadante.

**B.20.7.2.8 Contenido Gástrico**

Medir el pH y ajustar, si es necesario, a 5,5-6,5 con una solución 1N de NaOH. Evitar que el valor de pH sea mayor a 7,0. Centrifugar y proceder como en B.20.7.2.1.

**B.20.7.2.9 Otras Muestras Clínicas.**

Tratar las muestras semilíquidas y sólidas como en B.20.7.2.2 y B.20.7.2.3.

**B.20.8 Análisis de las toxinas****B.20.8.1 Procedimiento General** (se aplica cuando no se sospecha de alguna toxina en particular).

**B.20.8.1.1** Si se dispone de suficiente material, distribuir el filtrado en volúmenes de 1,2 mL dentro de 6 tubos de ensayo de 13 x 100 mm, marcados del 1-6. A los tubos marcados 2-5, agregar 0,12 mL de los siguientes antisueros: monovalente A, B o E y trivalente ABE. Mezclar en vortex y dejar reposar a temperatura ambiente por 45 minutos.

**B.20.8.1.2** Al tubo 6, agregar 0,12 mL de una solución de tripsina al 1%. Incubar a 35°C por 60 minutos. El tubo 1 no se adiciona. Ver tabla No. 2.

**B.20.8.1.3** Si el volumen de material es insuficiente para completar la prueba, se puede omitir el tubo No. 6.

**B.20.8.1.4** Inyectar dos ratones (20-30 g) intraperitonealmente por tubo, con los volúmenes siguientes: 0,5 mL del tubo 1,0 y 0,55 mL de los tubos 2-6. Observar a los ratones por 72 h. Los síntomas típicos de botulismo son: pelo erizado, estrechamiento de cintura, dificultad para respirar, parálisis de los miembros posteriores y parálisis general antes de la muerte. Si estos síntomas se presentan después de 72 h, observar a los animales por otras 24 h hasta completar un total de 4 días.

**B.20.8.1.5** Si mueren 1 o 2 ratones repetir la inyección. Una muestra se considera positiva para la toxina si 2/2 o > o = 2/4 ratones mueren, si se presenta la muerte de los animales dentro de las 2 primeras horas se pueden considerar que son debidas a otras causas diferentes a toxina botulínica.

**B.20.8.1.6** Si solamente mueren los ratones inoculados con las muestras tratadas con tripsina, indica la presencia de toxina de grupo II y continuar como se indica en el punto B.20.8.3.

**B.20.8.1.7** Si no se neutralizara la toxina con los antisueros A, B y E, indica

**a)** la presencia de toxinas no relacionadas en especial cuando se presentan síntomas atípicos;

**b)** Cantidad insuficiente de antisuero en presencia de altos niveles de toxina (difícil en caso de muestras clínicas y en la mayoría de los alimentos tóxicos; o

**c)** incluido un serotipo no común. Si la muestra probada produce síntomas típicos de botulismo y sin embargo no es neutralizada con los antisueros, proceder de la forma siguiente:

**i)** En casos de muy alta toxicidad, diluir la muestra 1:10 con solución amortiguadora de fosfatos gelatina y repetir la prueba de neutralización.

**ii)** Incluir el antisuero F en la prueba de neutralización.

**B.20.8.2 Muestras Sospechosas de contener Toxina Grupo V (A o B).**

Proceder como se indica anteriormente omitiendo el tubo No. 6.

**B.20.8.3 Muestras Sospechosas de contener Toxina Grupo II (B o E).**

Distribuir en cada uno de los tubos marcados del 1 al 4, 1,2 mL del filtrado. A cada tubo agregar 0,12 mL de una solución de tripsina al 1%, incubar a 35°C por 60 minutos. A los tubos marcados del 2 al 4 agregar 0,12 mL de uno de los siguientes antisueros monovalente B o E y trivalente A, B y E. Mezclar y continuar como se indica anteriormente Inyectar 0,5 mL del tubo No. 1 y 0,6 mL de los tubos 2 al 4.

Si no hubiese material disponible suficiente, omitir los tubos con los antisueros monovalentes B y E.

**B.20.8.4 Determinación de la Dosis Letal en ratón (DLR)**

Si se quiere titular la toxina, hacer diluciones decimales de los sobrenadantes tratados, y no tratados con tripsina, generalmente se hacen hasta 1:1000 dependiendo del nivel de toxina esperado, pero nunca excediendo 1:10000. Inyectar 2 ratones por dilución. La recíproca de la dilución más alta que causa la muerte multiplicada por 2, es la DLR. Ejemplo: si la muerte ocurre a una dilución de 1:100 pero no de 1:1000, el nivel de toxina es de 200 a 2000 DLR por mL.

**B.20.9 Identificación de *Clostridium botulinum*.**

**B.20.9.1** Quitar el exceso de aire disuelto en los tubos preparados con medio caldo carne cocida (CMM) y caldo glucosa peptona tripticasa extracto de levadura (TPGY), mediante calentamiento en baño de agua a ebullición por 10 minutos y enfriar antes de usarlos. Asegurarse de que las tapas de los tubos estén flojas al hacer este proceso.

**B.20.9.2** Agregar a los tubos de TPGY 1,5 mL de una solución de tripsina al 1,4% y mezclar suavemente y marcar con una T (TPGYT). A los tubos de CMM marcarlos con 1 y 2; y 3 y 4 a los tubos con TPGYT. Ver tabla No. 3.

**B.20.9.3** Cualquier tipo de muestra incluyendo los sedimentos, pueden servir como inóculo; éstos además tienen la ventaja de que no contienen inhibidores potenciales, los cuales se han eliminado junto con el sobrenadante, de aquí que los sedimentos pueden contener grandes cantidades de microorganismos por unidad de volumen.

**B.20.9.4** Colocar aproximadamente 1 g de inóculo a cada uno de los tubos 1 a 3, calentar el tubo No. 2 en baño de agua a 75°C por 20 minutos para seleccionar esporas resistentes al calor.

**B.20.9.5** Para seleccionar esporas sensibles o resistentes al calor, suspender aproximadamente 1 g del inóculo en un volumen de 10 a 20 mL de solución de etanol al 50%, o mezclar el inóculo, cuando la muestra es líquida 1:1 con etanol absoluto o de 96%. Mantener las suspensiones o mezclas a temperatura ambiente por 60 minutos, centrifugar a 14000 x g durante 15 minutos, y pasar el sedimento al tubo No. 4.

**B.20.9.6** Incubar los tubos a 35°C por 24 horas y a 30°C por 4 días. Centrifugar aproximadamente 10 mL de cultivo a 15000 x g durante 20 minutos. Esterilizar el sobrenadante por filtración a través de membranas de 0,45 μ m, con ayuda de una jeringa desechable. Diluir el filtrado 1:5 con solución amortiguadora de fosfatos con gelatina. Continuar como se indica en B.20.6.1 para el ensayo de toxina pero omitiendo el tubo No. 6.

**B.20.9.7** Si fuera necesario neutralizar con antisuero tipo F, el cual es relativamente débil, determinar la toxicidad y diluir con solución amortiguadora de fosfatos de gelatina el sobrenadante a aproximadamente 10 DLR/mL. Mezclar volúmenes de 1,25 mL con 0,25 mL de antisuero F. Inyectar 0,5 mL sin antisuero y 0,6 mL con antisuero.

**B.20.10 Aislamiento de *Clostridium botulinum* a partir de Cultivos Toxigénicos.**

**B.20.10.1** El aislamiento de cepas productoras de botulismo, se facilita si se dan todas las condiciones para la producción de toxina. Si los cultivos de los tubos Nos. 2 o 4 son toxigénicos, uno de éstos debe seleccionarse. Sembrar directamente en agar hígado de ternera yema de huevo o en agar para el aislamiento de *Clostridium botulinum* (CBI), en estos medios no se ha observado un enmascaramiento por microflora atípica. En el caso de que predominara flora atípica combinada con la presencia de algunas esporas de *C. botulinum*, el inóculo debe hacerse previo tratamiento con etanol. En el caso de ausencia de esporas, reincubar los tubos de enriquecimiento o pasar al medio de esporulación (Eklund).

**B.20.10.2 Aislamiento de *C. botulinum* de Cultivos con Presencia Moderada de Microorganismos Atípicos.**

**B.20.10.2.1** Hacer una tinción de Gram de los cultivos tóxicos. Si los cultivos 2 y 4 son tóxicos, pueden excluirse los tubos 1 y 3. Seleccionar los cultivos sobre las siguientes bases:

i) Bacilos gram positivos atípicos.

ii) Número de bacilos gram positivos con esporas. Si en la tinción se observa un mínimo de 10% de bacilos gram positivos, inocular una asada en agar hígado de ternera-yema de huevo y en agar CBI. Incubar en anaerobiosis a 30°C por 48 horas.

NOTA: Es importante tomar en cuenta que cultivos viejos de *C. botulinum* pueden aparecer como Gram negativos.

**B.20.10.2.2** Seleccionar 5 colonias bien aisladas sobre el agar hígado de ternera yema de huevo que presenten un halo opaco indicativo de lipólisis y pasarlas a caldo TPGY. Seleccionar otras 5 colonias del medio agar para el aislamiento de *C. botulinum* rodeadas de un halo opaco con brillo aperlado y pasar a caldo TPGY. Incubar a 30°C durante 5 días. Hacer pruebas para determinar las toxinas como se indica en B.4.6, inocular por duplicado los cultivos toxigénicos en agar hígado de ternera yema de huevo, incubar una placa en anaerobiosis y otra en aerobiosis para asegurar pureza. Nota: Es necesario inocular un gran número de colonias, debido a que *C. botulinum* puede enmascararse por otros clostridium que presentan características coloniales similares.

**B.20.10.3 Aislamiento de *C. botulinum* de Cultivos con Grandes Cantidades de Microorganismos Atípicos.**

**B.20.10.3.1** Si en la tinción de Gram se observan bacilos gram positivos con esporas, mezclar 2 mL del cultivo, con 2 mL de etanol al 96%, y dejar a temperatura ambiente por 60 minutos. Inocular una asada en agar hígado de ternera yema de huevo y en agar aislamiento de *C. botulinum*, y continuar como se indica en B.20.10.1

**B.20.10.3.2** Si no se presenta esporulación en el medio de enriquecimiento, reincubar por otra semana a 30°C o extender 0,1 mL del cultivo en agar de esporulación de Eklund, e incubar las placas en anaerobiosis a 30°C hasta que las esporas estén presentes en cantidades significativas (generalmente se requieren de 5 a 10 días. Suspender una asada del cultivo en aproximadamente 2 mL de etanol al 50%, dejar a temperatura ambiente por 60 minutos, e inocular en agar hígado de ternera yema de huevo y en agar CBI. Continuar como se indica en B.20.10.1.

**TABLA No. 1 ALGUNAS CARACTERISTICAS DE *C. BOTULINUM* GRUPOS I Y II**

GRUPO CRECIMIENTO POR ABAJO DE 10°C	TEMPERATURA PARA CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE TOXINA				
I	A,B, Fb	±	+	-	30 - 37°C
II	Bc,E,F b	+	-	+	26 - 30°C

\* Algunas cepas de los tipos A y B pueden presentar subtipos A-B, A-F, B-A, B-F, cada una produce una toxina en mayor cantidad (representada por la primera letra del subtipo).

**b** No común

**c** No común en Norteamérica

**TABLA No. 2 PRUEBA DE NEUTRALIZACION Y TOXICIDAD EN RATON**

TUBO No.	Volumen de muestra (mL)	Antisuero	Volumen del Antisuero (mL)	Volumen iunoculado (mL)
1	1,2	-	-	0,5
2	1,2	AntiA	0,12	0,55
3	1,2	AntiB	0,12	0,55
4	1,2	AntiE	0,12	0,55
5	1,2	Anti A,B,E	0,12	0,55
6	1,2	Tripsina	0,12	0,55

**TABLA No 3 ENRIQUECIMIENTO**

TUBO No.	MEDIO	TRATAMIENTO
1	CMM	NINGUNO
2	CMM	CALOR
3	TPGYT	NINGUNO
4	TPGYT	ALCOHOL

**B.21. Determinación de Acidez en Cremas y Productos Lácteos Fermentados y Acidificados**

**B.21.1 Principio del Método.**

La acidez se mide con base a una titulación alcalimétrica con NaOH 0.1 N utilizando fenolftaleína como indicador.

**B.21.2 Equipo.**

**B.21.2.1** Potenciómetro (opcional)

**B.21.2.2** Balanza analítica con una precisión de 0,1 mg.

**B.21.2.3** Agitador magnético

**B.21.3 Materiales.**

B.21.3.1 Probeta graduada de 100 mL.

B.21.3.2 Pipeta volumétrica de 9 mL (estándar para crema).

B.21.3.3 Matraz Erlenmeyer de 125 mL

B.21.3.4 Bureta de 25 o 50 mL graduada en 0.1 mL.

B.21.3.5 Barra magnética (opcional).

**B.21.4 Reactivos.**

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

**B.21.4.1** Solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N valorada.

**B.21.4.2** Solución indicadora de fenolftaleína ( $C_{29}H_{14}O_4$ ) al 1%.

**B.21.5 Procedimiento.**

**B.21.5.1** Medir 9 mL (si se emplea la pipeta estándar de crema) o pesar 18 g de muestra perfectamente mezclada en un matraz Erlenmeyer o una cápsula de porcelana. Si la muestra es medida volumétricamente, enjuagar la pipeta con veces su volumen de agua y adicionar los enjuagues al matraz o cápsula y mezclar bien.

**B.21.5.2** Si la muestra es pesada, añadir 2 veces el peso de la misma en agua y mezclar bien.

**B.21.5.3** Adicionar 0.5 mL de indicador de fenolftaleína y titular con solución de hidróxido de sodio 0.1 N hasta la aparición de un color rosa permanente por lo menos 30 segundos (se recomienda emplear siempre una cantidad constante de indicador ya que su concentración puede influir en los resultados).

**B.21.5.4** Si la muestra es obscura o colorida, será necesario después de agregar agua, titular con ayuda de un potenciómetro a un pH de 8.3.

**B.21.5. Cálculos**

%Acidez(expresada como ácido láctico) =  $(V \times N \times 9) / M$

donde:

V = mL de NaOH 0.1 N gastados en la titulación.

N = Normalidad de la solución de NaOH

M = Volumen o peso de la muestra.

**B.21.7 Expresión de resultados.**

% Acidez titulable expresada como ácido láctico

**B.22. Determinación de Vitamina A por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC en fase reversa).****B.22.1 Principio del método.**

Los lípidos son ésteres que en presencia de un álcali cáustico se hidrolizan liberando el material insaponificable, el cual es extraído con un disolvente orgánico. Posteriormente la vitamina A contenida en este material, es cuantificada por medio de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

**B.22.2 Equipo.****B.22.2.1. Sistema de HPLC que incluye:**

B.22.2.1.1 Bomba binaria LC. ( se puede contar con una trinaria o cuaternaria)

B.22.2.1.2 Inyector automático o manual de muestras.

B.22.2.1.3 Detector espectrofotométrico de longitud de onda variable UV-Visible LC.

B.22.2.1.4 Integrador computarizado LC.

B.22.2.1.5 Columna Octadecil ODS (20), tamaño de partícula 5, longitud 250 mm x diámetro interno 4,6 mm.

B.22.2.1.6 Balanza analítica, con capacidad de 160 g, lectura 0,1 mg.

B.22.2.1.7 Placas de agitación con calentamiento.

B.22.2.1.8 Cilindro para gas comprimido de nitrógeno pureza 95%.

B.22.2.1.9 Cilindro para gas comprimido de helio pureza 95%.

B.22.2.1.10 Evaporador rotatorio con elevador rápido y baño maría.

B.22.2.1.11 Equipo de filtración para la preparación de la fase móvil.

B.22.2.1.12 Cronómetro o reloj.

**B.22.3 Materiales.**

B.22.3.1 Matraces volumétricos actínicos o de color marrón con tapón de vidrio o teflón de 50 y 100 mL.

B.22.3.2 Matraces actínicos o de color marrón de fondo plano, cuello corto de 250 mL.

B.22.3.3 Matraces, en forma de pera actínicos o de color marrón, de cuello corto y boca esmerilada de 500 mL (que embone en el rotavapor). Si no se contaran con estos, se pueden utilizar matraces de fondo plano.

B.22.3.4 Matraces volumétricos actínicos o de color marrón de 10 mL.

B.22.3.5 Vasos de precipitados de 500 mL.

B.22.3.6 Embudo de separación cónico, actínicos o de color marrón, con llave de teflón 500 mL.

B.22.3.7 Embudo tallo corto diámetro 12 cm.

B.22.3.8 Tapones de teflón huecos hexagonales o actínicos o de color marrón.

B.22.3.9 Refrigerante con macho y hembra, manguito 300 mL, de 50 cm de longitud aproximadamente.

B.22.3.10 Manguera de látex.

B.22.3.11 Papel filtro mediano No. 1 con diámetro de 18,5 cm., O también se podrán utilizar diámetros de 11 y 12.5 cm

B.22.3.12 Pipetas volumétricas con marca de 5 y 4 mL.

B.22.3.13 Jeringa de vidrio sin aguja desechable de 10 mL. Se pueden utilizar jeringas plásticas sin aguja desechables de 10 mL.

B.22.3.14 Filtros para jeringa (acrodiscos para HPLC) de 0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y diámetro de 25 mm, para solventes orgánicos y fase móvil.

B.22.3.15 Membranas de filtración de fluoruro de polivinilideno, utilizada para fases móviles (solventes orgánicos y acuosos), cuyos extractables sean de absorción en UV, u otro filtro para fines similares.

B.22.3.16 Magnetos para placa de agitación.

#### **B.22.4 Reactivos.**

B.22.4.1 Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico y por agua debe entenderse agua destilada.

B.22.4.2 Estándar de retinol (vitamina A) cristalizada ( $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}$ ) all trans RETINOL con certificado de pureza.

B.22.4.3 Hidróxido de potasio en lentejas (KOH).

B.22.4.4 Alcohol etílico absoluto ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ).

B.22.4.5 Eter de petróleo intervalo de ebullición 40 - 60°C.

B.22.4.6 Fenolftaleína en solución etanólica al 1%, indicador ( $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$ ).

B.22.4.7 Metanol grado HPLC ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ).

B.22.4.8 Agua destilada filtrada, grado HPLC (sólo para la preparación de fase móvil).

B.22.4.9 Agua destilada que se utilizará en los lavados del saponificado (verificar que el valor de pH no sea mayor de 6,0).

B.22.4.10 Sulfato de sodio anhídrico ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ).

B.22.4.11 Ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ).

B.22.4.12 Fase móvil metanol: agua (95:5) para HPLC.

Pasar agua destilada a través de una membrana de filtración para soluciones acuosas. Pasar metanol a través de una membrana de filtración para solventes orgánicos. Posteriormente mezclar 50 mL de agua destilada en 950 mL de metanol (fase móvil). Degasificar la fase móvil pasando una ligera corriente de gas helio o por ultrasonido 15 minutos a temperatura ambiente. Si el equipo cuenta con desgasificador integrado, permitir que la mezcla la realice el mismo.

**B.22.4.12 Soluciones Patrón de Vitamina A.** Siempre y cuando se garantice la estabilidad de la misma, a través de un controlado en un Gráfico de Factor de Respuesta.

**B.22.4.12.1 Solución Concentrada** (150  $\mu\text{g}$  equivalentes de retinol).

Justo antes de emplearse, pesar 15 mg de retinol cristalizado (A - OH) y registrar el peso exacto. Colocar el estándar pesado en un matraz volumétrico de 100 mL. Disolver con metanol y llevar al volumen.

**B.22.4.12.2 Solución Intermedia** (15  $\mu\text{g}$  equivalentes de retinol).

Diluir 5 mL de la solución concentrada a 50 mL con el mismo metanol para obtener una solución de aproximadamente 50 UI/mL.

**B.22.4.12.3 Solución de Trabajo** (6  $\mu\text{g}$  equivalentes de retinol).

Añadir 4 mL de la solución estándar intermedia al matraz marcado como estándar y adicionar los reactivos al igual que al blanco y muestra como se indica en el apartado de saponificación. Esta solución tendrá aproximadamente 20 UI/mL de vitamina A, al final del proceso de recuperación, en el matraz volumétrico de 10 mL.

**Nota 1:** Si el certificado de % de pureza en el estándar es inferior al 85% no debe prepararse la solución patrón, siendo necesario un nuevo estándar de otro lote con una pureza superior a la antes indicada.

**Nota 2:** La vitamina A-OH (A-alcohol) se oxida con gran rapidez y es muy sensible a la luz. Al abrir una ampolla nueva de vitamina A-cristalizada, pesar la cantidad de estándar requerida y guardar la ampolla bajo atmósfera de nitrógeno o en condiciones similares.

#### **B.22.5 Procedimiento**

**Nota 3:** La vitamina A es sensible a la luz. Utilizar material actínico o de color marrón o bien, proteger el material con papel aluminio. Por otra parte, efectuar las evaporaciones con rotavapor a una temperatura máxima de 40°C. Evaporar a sequedad y romper el vacío e inmediatamente introducir nitrógeno al sistema o al matraz, para evaporar los últimos mililitros mediante una corriente de nitrógeno.

##### **B.22.5.1 Toma de Muestra.**

En el caso de productos deshidratados, reconstituir con agua, de acuerdo con las instrucciones señaladas en la etiqueta o 130 g del producto llevados a 1 L con agua. Disolver y agitar la muestra a fin de homogeneizarla por completo.

Medir de preferencia por duplicado una cantidad de muestra tal, que contenga de 30 a 90  $\mu\text{g}$  equivalentes de retinol (100 a 300 UI de vitamina A) o la cantidad correspondiente a lo declarado en la etiqueta de la muestra. En caso de no contar con esta información no es conveniente realizar el análisis.

**B.22.5.2 Saponificación.**

**B.22.5.2.1** Marcar 4 matraces actínicos de cuello corto y esmerilado con fondo plano de 250 mL (cuando la muestra se trabaje por duplicado) de la siguiente manera: blanco, estándar y muestra.

**B.22.5.2.2** Añadir los siguientes reactivos a cada uno de los matraces antes mencionados: 7 g de hidróxido de potasio y a continuación añadir 60 mL de alcohol absoluto. Mezclar para disolver. Agregar 0,5 g de ácido ascórbico así como una barra magnética. Adicionar una ligera corriente de nitrógeno a cada uno de los matraces.

**B.22.5.2.3** Montar un sistema de reflujo y calentar durante 30 minutos en placas de calentamiento o baño de agua en ebullición con agitación constante.

**Nota 4:** Durante la saponificación, asegurar una buena agitación del medio de reacción.

**B.22.5.3 Extracción del Insaponificable.**

**B.22.5.3.1** Una vez concluido el tiempo de saponificación, enjuagar con máximo 30 mL de agua destilada (evitar el exceso de agua para prevenir la formación de emulsiones) por las paredes internas del refrigerante sin quitar el matraz del saponificado. Enfriar el matraz aun instalado al refrigerante sumergiéndolo parcialmente en un vaso de precipitados que contenga agua fría, lo anterior con la finalidad de llevarlo a temperatura ambiente, evitando enfriarlo demasiado. Trasvasar la suspensión a un embudo de separación de 500 mL.

**B.22.5.3.2** Enseguida enjuagar el matraz con 100 mL de éter de petróleo que se añaden al embudo de separación. Extraer la vitamina A agitando ligeramente. Dejar separar las fases. Vaciar la fase acuosa a otro embudo de 500 mL. Recoger la fase orgánica a un tercer embudo de separación de 500 mL. Repetir la operación dos veces más, enjuagando el matraz con dos porciones de 100 mL de éter cada una.

**B.22.5.3.3** Efectuar esta extracción 3 veces en total (un lavado de 50 mL y 2 lavados de 100 mL). Hacer las agitaciones con mucho cuidado para evitar emulsiones.

**B.22.5.3.4** Lavar la solución orgánica con porciones de 100 mL de agua adicionándola por las paredes del embudo, agitando suavemente, hasta que el agua del lavado ya no dé reacción colorida con la fenolftaleína. Despues del último lavado, esperar de 15 a 30 minutos antes de vaciar la fase acuosa y volver a revisar con el indicador que no exista reacción colorida.

**B.22.5.3.5** Filtrar la solución lavada en continuo a través de un filtro que contiene aproximadamente 10 g de sulfato de sodio anhídrico y recoger el filtrado en un matraz de pera de 500 mL, sin dejar secar el filtro. Al final enjuagar el sulfato de sodio contenido en el filtro con 50 mL de éter de petróleo.

**B.22.5.3.6** Evaporar el disolvente en un rotavapor a 40°C y dejar un remanente de aproximadamente 6 mL. Tratar de reducir esta cantidad del disolvente a un volumen de 2 mL aproximadamente mediante una corriente de nitrógeno.

**B.22.5.3.7** Disolver el remanente obtenido con 3 mL de la fase móvil y recolectar cuantitativamente la solución con una jeringa de vidrio. Filtrar la solución a través de un filtro acrodisco de 0,45 µm a un matraz actínico de 10 mL. Lavar el matraz pera con porciones de 2 mL de fase móvil y repetir el mismo procedimiento hasta llegar al aforo del matraz. Hacer lo mismo para cada filtro de blanco, estándar y probar por duplicado.

**Nota 5:** Se recomienda acondicionar el acrodisco de 0,45 µm con metanol antes de utilizarlo en la filtración del recuperado.

**B.22.5.4 Condiciones Cromatográficas.**

**B.22.5.4.1** Fijar los siguientes parámetros de acuerdo con las instrucciones de operación del cromatógrafo.

Columna Octadecil ODS (20), tamaño de partícula 5 µm, longitud 250 mm x diámetro interno 4,6 mm.

Loop de inyección: 20 µL.

Fase móvil: metanol: agua 95:5.

Flujo: 1 mL/min.

Detector: Longitud de onda ajustada a 325 nm.

Registrador: 5 mm/min.

**B.22.5.5 Determinación de Vitamina A.**

Inyectar dos veces los siguientes analitos: primero 20 µL del blanco, después 20 µL de la solución estándar para HPLC (20 UI/mL aprox.) y por último 20 µL de la muestra (del saponificado).

**B.22.5.5.1** En el cromatograma, identificar el pico y tiempo de retención de la vitamina A correspondiente al estándar. Con estos datos, identificar el pico y tiempo de retención de la vitamina A contenida en la muestra.

**B.22.5.5.2** Calcular el área o la altura del pico de la solución patrón y de las muestras en los chromatogramas obtenidos.

**B.22.6 Cálculos.**

El contenido de vitamina A, expresado en Unidades Internacionales por L de producto es igual a:

$$\text{UI vitamina A/L} = \frac{h_p \times C \times V \times 1000}{h_s \times m}$$

En donde:

$m$  = toma de ensayo en g o mL.

$h_p$  = altura del pico de la muestra, en mm.

$h_S$  = altura del pico de la solución estándar final, en mm.

$C$  = concentración de la solución estándar final inyectada, en UI/mL para la vitamina A.

$V$  = volumen de solución estándar final, en el cual ha sido diluido el remanente antes de la cromatografía.

Los resultados deben reportarse como  $\mu\text{g}$  equivalentes de retinol.

#### B.22.7 Expresión de Resultados.

$\mu\text{g}$  equivalentes de retinol/ L

1 UI = 0,3  $\mu\text{g}$  equivalentes de retinol (todos los retinolos trans)

### B.23 Determinación de Vitamina D<sub>3</sub> – HPLC

#### B.23.1 Fundamento

Saponificación alcalina de la muestra; extracción con éter de compuestos insaponificables; evaporación del éter; solución del residuo seco en hexano e inyección de una alícuota en columna preparativa de HPLC (fase normal, Silice). Colección del eluato que contiene la fracción de vitamina D; evaporación de esta fracción a sequedad, disolución en la fase móvil de HPLC (Analítica, Acetonitrilo: Cloruro de metileno: Isopropanol), inyección en HPLC (fase reversa C18) y determinación de la vitamina D con el pico máximo a 264 nm por calibración del estándar externo.

#### B.23.2 Preparación de la muestra.

En el caso de productos deshidratados reconstituir con agua, de acuerdo con las instrucciones señaladas en la etiqueta o 130 g de producto llevado a 1 L con agua. Disolver y agitar la muestra a fin de homogeneizarla por completo. Medir de preferencia por duplicado una cantidad de muestra que contenga de 0,5 a 1  $\text{mg}$  de vitamina D<sub>3</sub> (20 a 40 UI).

#### B.23.3 Material

B.23.3.1 Instalación HPLC isocrática

B.23.3.2 Uno o dos registradores

B.23.3.3 Balanza analítica, con capacidad de 160 g, lectura 0,1 mg

B.23.3.4 Balanza de precisión, con capacidad de 1600 g, lectura 0,01 g

B.23.3.5 Estufa de laboratorio (para productos con almidón)

B.23.3.6 Baño de agua con agitadores magnéticos, 4 plazas

B.23.3.7 Evaporador rotatorio con elevador rápido y baño

B.23.3.8 Matraces aforados, vidrio marrón, tapón de vidrio de 5, 50 y 100 mL

B.23.3.9 Matraz de fondo plano, cuello corto, vidrio marrón de 250 mL

B.23.3.10 Matraces, en forma de pera, vidrio marrón de 10 y 500 mL

B.23.3.11 Embudo de separación cónico, vidrio marrón, con llave de 500 mL

B.23.3.12 Embudo, vidrio marrón, diámetro 12 cm

B.23.3.13 Tapones huecos hexagonales, vidrio marrón

B.23.3.14 Refrigerante con macho y hembra, manguito 300 mm

B.23.3.15 Alargadera para introducción de gas

B.23.3.16 Filtro plisado mediano con diámetro de 18,5 cm

B.23.3.17 Pipeta aforada, con una marca de 2 mL

B.23.3.18 Jeringuillas de 1 y 5 mL

B.23.3.19 Aguja para jeringuillas

B.23.3.20 Cilindro para gas comprimido, nitrógeno

B.23.3.21 Monodetentor para gas comprimido, N<sub>2</sub>

B.23.3.22 Filtro de 0,45  $\mu$  de diámetro

B.23.3.23 2 Columnas de 5  $\mu$ , 4,6 X 250

B.23.3.24 Aparato de filtración

B.23.3.25 Filtro 0,5  $\mu$

#### B.23.4 Reactivos

B.23.4.1 Colecalciferol, vitamina D<sub>3</sub>, cristalizada para fines bioquímicos (C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O)

B.23.4.2 Hidróxido de potasio en lentejas para análisis (KOH)

B.23.4.3 Alcohol etílico absoluto, para análisis (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)

B.23.4.4 Hidroquinona (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(OH)<sub>2</sub>)

B.23.4.5 Eter de petróleo para análisis intervalo de ebullición 40 -60°C

B.23.4.6 Fenolftaleína en solución etanólica al 1%, indicador (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OH)<sub>2</sub>COC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CO)

B.23.4.7 Diastasa (para productos de almidón)

- B.23.4.7 2-propanol ( $\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$
- B.23.4.8 n-hexano  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$
- B.23.4.9 Acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ )
- B.23.4.10 Diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_{12}$ )
- B.23.4.11 Sulfato de sodio anhídrico para análisis ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )
- B.23.4.12 Nitrógeno ( $\text{N}_2$ )
- B.23.4.13 Ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ )

**B.23.4.14 Fase Móvil para HPLC Preparativa**, 2-propanol al 1% en n-hexano

Degasificar el n-hexano bajo presión reducida y pasar a través un filtro. Mezclar 100 mL de diclorometano con 900 mL de acetonitrilo degasificado.

**B.23.4.15 Fase Móvil Analítica**, diclorometano: acetonitriloisopropano (10: 89: 1) para HPLC analítica

Degasificar 1 l de acetonitrilo bajo presión reducida y pasar a través de un filtro. Mezclar 100 mL de diclorometano con 890 mL de acetonitrilo degasificado y 10 mL de 2-propanol.

**Nota:** La proporción diclorometano/acetonitrilo debe adaptarse de modo que la vitamina D3 dé un tiempo de retención de aproximadamente 8-9 min. Sin embargo no debería rebasar 20:100.

**B.23.4.16 Fase Móvil para lavar la Columna Preparativa**, 2-propanol al 10% en n-hexano

Mezclar 100 mL de 2-propanol con 900 mL de n-hexano degasificado.

**B.23.4.17 Solución Patrón de Vitamina D3 para HPLC preparativa**

En un matraz aforado de 100 mL, pesar exactamente 50,0 mg de colecalciferol (D3) cristalizado, disolver en n-hexano y llevar al volumen con el mismo disolvente (= solución de 20,000 U.I./ mL).

Diluir esta solución 1000 veces con el mismo disolvente para obtener una solución de 20 U.I./ mL. Esta solución permanece estable de 3 a 4 semanas a +4°C.

**B.23.4.18 Solución Patrón de Vitamina D3 para HPLC Analítica**

Evaporar 2 mL de solución patrón de 20 U.I./ mL (B.20.4.4) y tomar el residuo en 2 mL de fase móvil (B.20.4.2).

**B.23.5 Procedimiento**

**Notas:** La vitamina D3 es sensible a la luz. Utilizar material de vidrio marrón o proteger el material corriente con papel aluminio.

Efectuar todas las evaporaciones de disolventes bajo presión reducida a una temperatura máxima de 40°C. No se debe evaporar a sequedad. Romper el vacío introduciendo nitrógeno en el sistema. Evaporar los últimos mL mediante una corriente de nitrógeno.

Al final de la jornada, lavar la columna preparativa durante 15 min con 2-propanol al 10% en n-hexano (B.20.4.3) con un caudal de 2 mL /min.

**B.23.5.1 Toma de Ensayo**

Mezclar o moler la muestra a fin de homogeneizarla por completo. Pesar, con una precisión de 10 mg, una toma de ensayo que contenga 20-40 U.I. de vitamina D3.

**B.23.5.1.1 Productos con Almidón:**

En un matraz redondo de fondo plano de 250 mL con cuello esmerilado, mezclar la toma de ensayo con 10% de su peso de diastasa. Añadir máximo 30 mL de agua destilada a 45-50°C. Mezclar bien para obtener una suspensión homogénea. Eliminar el aire del matraz mediante nitrógeno, tapar y colocar el matraz durante 30 min en una estufa a 45°C.

**B.23.5.1.2 Productos sin Almidón:**

En un matraz redondo de fondo plano de 250 mL con cuello esmerilado, mezclar la toma de ensayo con máximo 30 mL de agua destilada a 45-50°C.

**B.23.5.2 Saponificación**

Añadir 7 g de hidróxido de potasio grado analítico en el matraz (B.23.5.1.1 o B.23.5.1.2), y mezclar para disolver.

A continuación añadir 60 mL de alcohol absoluto y 0,5 g de ácido ascórbico o hidroquinona.

Montar sobre el matraz una alargadera para introducción de un gas refrigerante. Introducir una ligera corriente de gas nitrógeno, y calentar durante 30 min a 70°C en un baño de agua ebulliendo provisto de agitadores magnéticos.

**Nota:** Durante la saponificación, asegurar una buena agitación del medio de reacción.

**B.23.5.3 Extracción del Insaponificable**

Una vez terminada la saponificación, enfriar el matraz a temperatura ambiente y transvasar la suspensión a un embudo de separación de 500 mL.

Enjuagar con máximo 30 mL de agua fría en 3 porciones de 10 mL que se añaden al contenido del embudo de separación. Evitar un exceso de agua, ya que favorece la formación de emulsiones.

En seguida enjuagar el matraz con 50 mL de éter de petróleo (rango de 40-60°C) en varias porciones que se añaden al embudo de separación. Extraer la vitamina D3 agitando ligeramente. Dejar separar las fases.

Vaciar la fase acuosa a otro embudo de separación de 500 mL. Recojer la fase orgánica en un tercer embudo de separación de 500 mL.

Efectuar esta extracción 5 veces en total. Haciendo las agitaciones con mucho cuidado para evitar emulsiones.

Lavar la solución orgánica con porciones de 100 mL de agua adicionándola por las paredes del embudo, sin agitar, hasta que el agua de lavado ya no dé reacción coloreada con fenolftaleína. Despues del último lavado, esperar al menos 15 min antes de vaciar la fase acuosa.

Filtrar la solución lavada en continuo a través de un filtro que contiene aproximadamente 5 g de sulfato de sodio anhídrico o en un papel separador de fases tipo 1 PS, y recoger el filtrado en un matraz en forma de pera de 500 mL, sin dejar secar el filtro. Y al final enjuagar el filtro con 50 mL de éter de petróleo.

Evaporar el disolvente bajo presión reducida en un rotavapor a 40°C, y eliminar los últimos mililitros mediante una corriente de nitrógeno.

Transvasar el residuo cuantitativamente a un matraz aforado de 5 mL, mediante pequeñas porciones de fase móvil (B.20.4.1) llevar al volumen y filtrar la solución inmediatamente a través de un filtro de 0,45 µm de tamaño de poro y adecuado para solventes orgánicos, por ejemplo Acrodisc - CR o equivalente; recoger el filtrado en un matraz en forma de pera. El filtrado debe ser límpido.

La solución está lista para la cromatografía.

#### **B.23.5.4 Cromatografía Preparativa**

Condiciones:

Columna	Spherisorb Si, 5 mcm, 4,6 X 250 mm
Loop de inyección	500 µl
Fase móvil	1% 2-propanol en n-hexano (B.2.3.1)
Caudal	1-3 mL/min (el tiempo de retención de la vitamina D3 debe ser de aproximadamente 5 min)
Detector	espectrofotómetro, longitud de onda variable, ajustada a 264 nm (o eventualmente espectrofotómetro de longitud de onda fija a 254 nm, únicamente utilizable para la etapa preparativa), 0,05 AUFS para el patrón y 0,5 AUFS para el extracto de muestra
Registrador	10 mm/min

Inyectar primero 500 µl de solución patrón de vitamina D3 (B.20.4.4) y determinar el tiempo de retención: debe ser aproximadamente 5 min. Inyectar a continuación la solución de la muestra obtenida bajo el numeral B.20.5.3 y recoger la fracción que contiene la vitamina D3 en un matraz en forma de pera de 10 mL. Comenzando a recoger aproximadamente 1 min antes de la elución de la vitamina D3 y parar aproximadamente 1 min después de la elución de la vitamina D3.

#### **B.23.5.5 Cromatografía Analítica**

Evaporar a seco la fracción recogida bajo 20.5.4, mediante una ligera corriente de nitrógeno.

Enfriar el matraz a fin de evitar errores de volumen a una evaporación eventual de disolvente; luego tomar el residuo en 300 µl de fase móvil (B.20.4.2), agitar ligeramente para disolver bien el residuo.

Condiciones:

Columna	Spherisorb ODS, 5 mcm, 4,6 X 250 mm
Loop de inyección	100 µl
Fase móvil	10% diclorometano, 89% acetonitrilo y 1% de 2-propanol
Caudal	2 mL/min
Detector	espectrofotómetro, longitud de onda variable, ajustada a 264 nm; 0,01 AUFS
Registrador	10 mm/min

Inyectar primero 100 µl de solución patrón (B.20.4.5) y determinar el tiempo de retención: debe ser aproximadamente 8-9 min (adaptar la proporción de diclorometano/acetonitrilo si es necesario). Luego inyectar 100 µl de la fracción obtenida bajo B.20.5.4.

#### **B.23.6 Cálculo, Expresión e Interpretación de los Resultados**

##### **B.23.6.1 Evaluación**

Identificar el pico de la vitamina D3 en el cromatograma de la muestra mediante el tiempo de retención definido por cromatografía de la solución patrón. Medir la altura de los picos obtenidos durante la cromatografía de la solución patrón y de la solución muestra.

El contenido en vitamina D3, expresado en Unidades Internacionales por 100 g de producto, es igual a:

$$\frac{h_p \times C \times V_0 \times V_2 \times 100}{H_s \times m \times V_1}$$

En donde:

$m$  = toma de ensayo, en gramos

$h_p$  = altura del pico de la muestra, en mm

$h_S$  = altura del pico de la solución patrón, en mm

$C$  = concentración de la solución patrón inyectada, en U.I./ mL

$V_0$  = volumen en el cual ha sido diluido el residuo antes de la cromatografía preparativa (20.5.3) (en general 5 mL= matraz aforado)

$V_1$  = volumen del extracto inyectado en la columna preparativa (en general 0,500 mL=volumen del loop de inyección)

$V_2$  = volumen en el cual ha sido diluida la fracción después de la cromatografía preparativa (en general 0,300 mL)

**Nota:** es superfluo un factor de corrección para la isomerización de la vitamina D3, en previtamina D3, ya que este fenómeno es despreciable en las condiciones de saponificación aplicadas.

#### B.23.6.2 Límite de Detección de Acuerdo a la Sensibilidad del Equipo.

Aproximadamente: 20 U.I./100 g

#### B.23.6.3 Repetibilidad

La diferencia entre dos resultados individuales obtenidos con la misma muestra para ensayo, en las mismas condiciones (analista, aparato, laboratorio) en un corto intervalo de tiempo, no debe exceder 10% de la media entre ambos resultados.

Cuando las vitaminas han sido añadidas por mezcla en seco, la repetibilidad está fuertemente influida por el grado de homogeneidad del producto.

### APENDICE INFORMATIVO A A. LISTA DE SUSTANCIAS DESINFECTANTES RECOMENDADAS

No.	Solución acuosa de:	Concentración máx. del ingrediente activo	Condiciones de empleo
1	Hipoclorito cálcico, sódico o potásico, con o sin bromuro cálcico, sódico o potásico.	200 mg/kg de halógeno calculado en cloro.	Escurrir después del tratamiento. No precisa aclarado final
2	Ácido di y tricloroisocianúrico, o sales potásicas o sódicas de estos ácido con o sin bromuro potásico, cálcico o sódico.	100 mg/kg de halógeno calculado en cloro.	Como en 1
3	Yoduro potásico, p-toluenulfloclamida sódica y lauril sulfato sódico.	25 mg/kg de yodo valorable; el nivel de los componentes no debe superar el mínimo preciso para obtener el efecto funcional deseado.	Como en 1
4	yodo butoxi-monoéter de etilenglicol + butoximono-éter de propilenglicol+ butoximonoéter de polialquilenglicol, teniendo un punto de niebla de 90-100°C. en solución al 0.5% y un peso molecular medio de 3,300 y monobutiléter de etilenglicol. Monoethyl-éter de dietilenglicol se puede adicionar como componente opcional.	25 mg/kg de yodo. Los adyuvantes utilizados con el yodo no deben de superar la cantidad mínima necesaria para obtener el efecto funcional deseado.	Como en 1
5	Yodo, ácido hidroxídico alfa- (p-monofenil-W-hidroxipolil (oxietileno) (peso molecular medio 748) y/o polioxietilen-polioxipropileno tipo copolimerización en bloque (peso molecular medio mínimo 1,90). Alcohol isopropílico se puede adicionar como componente opcional.	Como en 4	Como en 1
6	Yodo, yoduro de sodio, dioctilsulfosuccinato de sodio y polioxietilen-polioxipropileno tipo copolimerización en bloque (peso molecular medio mínimo 1,900).	Como en 4	Como en 1
7	Ácido dodecilbencenosulfónico, polioxietilen-polioxipropileno, tipo copolimerización en bloque (peso molecular medio mínimo 2,800).	400 mg/kg de ácido dodecil-bencenosulfónico y 80 mg/kg de polioxietilen-polioxipropileno, tipo copolimerización en bloque (peso molecular medio mínimo 2,800).	Estas soluciones se emplean en la limpieza de equipo y utensilios, así como en botellas y envases para leche; no precisan aclarado final.*

8	Yodo, butoxi-monoéter de etilen glicol+butoxi-monoéter de propilenglicol+butoximono-éter de polialquilenglicol, con un peso molecular medio mínimo de 2,400, y alfa-lauril-W-hidroxipoli (oxietileno) con un promedio de 8-9 moles de óxido de etileno y un peso molecular medio de 400.	Como en 4	Estas soluciones se emplean en la limpieza del equipo y utensilios, así como de envases de leche y otras bebidas. Como aclarado preliminar se puede utilizar agua a la que se ha añadido esta solución. No se debe emplear en el enjuagado final.*
9	Cloruro de n-alquil-(C <sub>12</sub> a C <sub>18</sub> ) bencildimetil-amonio, con un promedio de peso molecular de 351-380 y conteniendo principalmente cadenas de los grupos alquilo con 12 a 16 átomos de carbono, con o sin grupos alquilo de 8 a 10 átomos de carbono, en una proporción máxima de 1% respecto a los de 12-16. Se puede añadir como componente opcional alcohol isopropílico.	200 mg/kg de compuestos de amonio cuaternario activos.	Como en 1
10	Tricloromelamina y lauril sulfato sódico o ácido dodecilbenceno sulfónico.	Tricloromelamina, en cantidad no superior a la necesaria para producir 200 mg/kg de cloro y lauril sulfato sódico, a un nivel que no excede del mínimo requerido para que se presente el efecto funcional deseado o, ácido dodecilbenceno sulfónico en proporción no superior a 4000 mg/kg	Estas soluciones se emplean en la limpieza de envases para bebidas, excepto leche, así como en la higienización del equipo y utensilios y otros materiales, que puedan contactar con alimentos. No precisan aclarado final.*
11	Volúmenes iguales de cloruro de n-alquil (C <sub>12</sub> a C <sub>18</sub> ) bencildimetilamonio y cloruro de n-alquil (C <sub>12</sub> a C <sub>18</sub> ) dimetilbencilamonio, con un peso molecular medio de 384.	200 mg/kg de compuestos de amonio cuaternarios activos.	Estas soluciones se utilizan en el tratamiento de equipo y utensilios, así como las superficies que contactan los alimentos, en establecimientos de comidas públicas. No precisan aclarado final.*
12	Sal sódica del ácido oleico sulfonatado, polioxietileno-polioxipropileno tipo copolimerización en bloque, con un peso molecular medio de 2,000 y con 27 a 31 moles de polioxipropileno.	200 mg/kg de ácido sulfonatado, sal sódica.	Esta solución se utiliza para botellas u otros envases de vidrio para leche, así como para el equipo y utensilios empleados en la elaboración de alimentos. Los artículos tratados con esta solución se deben escurrir durante 15 min antes de ponerlos en contacto con los alimentos. No precisa aclarado final.*
13	Yodo y alquil (C <sub>12</sub> - C <sub>15</sub> ) monoéter de etilen y propilenglicol+ monoéter de polialquilenglicol, con un punto de niebla de 70-77°C en solución acuosa al 1% y con un peso molecular medio de 807.	Como en 4	Como en 1
14	Yodo, butoxi-monoéter de etilen y propilenglicol+butoxi-monoéter de polialquilenglicol, con un punto de niebla de 90-100°C, en solución acuosa al 0,5% y con un peso molecular medio de 3,300 y polioxietileno-polioxipropileno, tipo copolimerización en bloque, con un peso molecular medio mínimo de 2,000.	Como en 4	Como en 1
15	Hipoclorito de litio	290 mg/kg de cloro y 30 mg/kg de litio.	Como en 1

16	Cantidades iguales de cloruro de n-alquil ( $C_{12}$ - $C_{18}$ ) bencil-dimetil-amonio y cloruro de n-alquil ( $C_{12}$ a $C_{14}$ )-dimetil-(etil-bencil)-amonio (con pesos moleculares medios de 377-384). De forma opcional se puede adicionar etilen-diaminote-tracetato tetrasódico y/o $\alpha$ -(p-nonil-fenol)-w-hidroxipoli (oxietileno con un contenido de 11 moles.	200 mg/kg de compuestos de amonio cuaternario activo.	Como en 1
17	Cloruro de di-n-alquil ( $C_8$ - $C_{10}$ )-dimetilamonio y alcohol isopropílico, con un peso molecular medio de 332-361	150 mg/kg de compuestos de amonio cuaternario activo.	Como en 1
18	Cloruro de n-alquil ( $C_{12}$ - $C_{18}$ ) bencil-dimetil-amonio, metaborato sódico, $\alpha$ -terpinol y $\alpha$ - [ p-(1,1,3,3 tetrametilbutil)fenil]-w-hidroxipoli (oxietileno), producido con 1 mol de fenol y 4-14 moles de óxido de etileno	200 mg/kg de compuestos de amonio cuaternario activos y 66 mg/kg de $\alpha$ -[(1,1,3,3 tetrametil-butil)fenil] w-hidroxipoli (oxietileno).	Como en 1
19	Di-cloro-iso-cianurato sódico y etilen-diamino-tetracetato tetrasódico.	100 mg/kg de cloro.	Como en 11
20	o-fenil-fenol, o-bencil-p-cloro fenol, p-amifeno, sulfato de $\alpha$ -alquil- ( $C_{12}$ a $C_{15}$ )-w- hidroxipoli- (oxietileno) y sodio con un contenido medio de polioxietileno de 1 mol, sales potásicas de ácidos grasos de aceite de coco y alcohol isopropílico o hexilenglicol.	800 mg/kg de fenoles activos totales, que comprenden 400 mg/kg de o-fenil-fenol 320 mg/kg de o-bencil-p-clorofenol y 80 mg/kg de p-amifeno terciario.	Unicamente para aplicaciones de un solo uso.
21	Dodecil-benceno-sulfonato sódico.	Entre 25 y 430 mg/kg del producto.	Como en 1

\*En otros países, entre los que no se incluyen Estados Unidos, es obligatorio el aclarado final con agua después de aplicar la solución desinfectante.

Los fabricantes podrán emplear otras sustancias para la limpieza y desinfección de equipo, siempre y cuando se asegure que los productos obtenidos son inocuos para el consumidor.

## APENDICE INFORMATIVO B

### B.1 PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA Y DESCONTAMINACION DEL MATERIAL DE VIDRIO Y AREA DE TRABAJO PARA LA DETERMINACION DE AFLATOXINAS

#### B.1 Objetivo

Por la naturaleza y potencialidades tóxicas de las aflatoxinas es importante establecer directrices para la descontaminación del área de trabajo, material y equipo utilizados, así como los procedimientos a seguir para neutralizar derrames y remanentes de extractos de las muestras.

El trabajo de limpieza y descontaminación será realizado por personal capacitado y que cuente con equipo protector como una bata, guantes impermeables y lentes protectores.

#### B.2 Descontaminación del Material de Laboratorio

Todo el material de vidrio del laboratorio que haya sido utilizado durante el análisis debe sumergirse en una solución de hipoclorito, el cual se prepara diluyendo una parte de solución comercial de hipoclorito de sodio o clarasol (con una concentración entre 5 y 6%) con 10 partes de agua, por ejemplo mezclar 100 mL de blanqueador comercial con 1000 mL de agua.

Después del tratamiento, el material debe enjuagarse abundantemente con agua corriente seguido de agua destilada, secar por escurrimiento o en estufa de 90-100°C.

#### B.3 Descontaminación del Area de Trabajo

La superficie de las mesas de trabajo y las paredes en las que pudiera haberse contaminado de leche con aflatoxinas, deben limpiarse con una toalla desechable impregnada en solución de hipoclorito de sodio o solución blanqueadora comercial después de cada sesión.

#### B.4 Descontaminación de Material Desechable

Todo el material desechar como son las columnas y placas deben sumergirse durante un mínimo de 5 min en una solución de hipoclorito de sodio utilizando una parte de blanqueador comercial y diez partes de agua. La solución descontaminadora ya usada debe eliminarse por el drenaje y los materiales desecharables tratados deben empacarse en una bolsa de plástico sellada para colocarse en el depósito de desechos.

#### B.5 Tratamiento de Derrames

Los derrames de soluciones de aflatoxinas deben tratarse inmediatamente con hipoclorito de sodio o blanqueador doméstico y vertirlo directamente del envase, recoger los líquidos con un papel absorbente, el cual también se colocará en una bolsa de plástico.

#### B.6 Tratamiento de Remanentes de Extracto de Muestras

Una vez que se ha separado una alícuota del extracto de la muestra es frecuente que permanezca un remanente del mismo. Estos restos de extractos deben tratarse con una cantidad de blanqueador equivalente a la unidad del volumen del residuo a tratar. Los líquidos resultantes se deben acumular en un recipiente para desechos líquidos y eliminarse en un lugar destinado especialmente para este propósito.

