DOF: 10/02/2011

NORMA Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y 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 lo dispuesto por el artículo 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 4 de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo; 3 fracción XXIV, 13 apartado A) fracciones I y II, 17 bis fracción III, 194 fracción I, 195, 197, 199, 201, 214 y 215 fracción I de la Ley General de Salud; 47 fracción IV de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 28 del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 2 literal C fracción X, 36 y 37 del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud; 1 fracción IV, 4, 8, 15, 80, 91, 92, 93, 97 y 98 del Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios; 3 fracciones I inciso c y II, 10 fracción IV del Reglamento de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, tengo a bien ordenar la publicación en el Diario Oficial de la Federación, de la Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba.

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 del 2005 al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, el anteproyecto de norma oficial mexicana;

Que con fecha 25 de agosto 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-242-SSA1-2005, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba, en el Diario Oficial de la Federación, a efecto de que dentro de 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, fue publicada en el Diario Oficial de la Federación, la respuesta a los comentarios recibidos por el mencionado Comité, en los términos del artículo 47 fracción III de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización y

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 ordenar la publicación de la

Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009. Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba.

PREFACIO

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

SECRETARIA DE SALUD

Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios

CAMARA NACIONAL DE LAS INDUSTRIAS PESQUERA Y ACUICOLA

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

PESCADOS INDUSTRIALIZADOS, S.A. DE C.V.

AHUMADOS NORUEGOS, S.A. DE C.V.

INDICE

1. Objetivo y campo de aplicación

2. Referencias

3. Definiciones

4. Símbolos y abreviaturas

5. Clasificación

6. Prácticas de higiene y sanidad

7. Especificaciones sanitarias

8. Clasificación de áreas

9. Muestreo

10. Métodos de prueba

11. Etiquetado

12. Envase y embalaje

13. Concordancia con normas internacionales y mexicanas

14. Bibliografía

15. Observancia de la Norma

16. Vigencia

Apéndice Normativo A: Aditivos

Apéndice Normativo B: Métodos de prueba

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta Norma Oficial Mexicana tiene por objeto establecer los requisitos sanitarios para: las áreas de captura de moluscos bivalvos; los establecimientos que procesan productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados, incluyendo las embarcaciones de pesca y recolección, así como las especificaciones sanitarias que deben cumplir dichos productos.

1.2 Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el Territorio Nacional para las personas físicas o morales que se dediquen a la captura, extracción, procesamiento, conservación, almacenamiento, distribución, transporte, venta o importación de productos de la pesca.

2. Referencias

Esta norma se complementa con las siguientes normas oficiales mexicanas o las que las sustituyan:

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

2.2. Norma Oficial Mexicana NOM-084-SCFI-1994. Información comercial-especificaciones de información comercial y sanitaria para productos de atún y bonita preenvasados.

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

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

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

2.6. Norma Oficial Mexicana NOM-128-SSA1-1994. Bienes y servicios. Que establece la aplicación de un sistema de análisis de riesgos y control de puntos críticos en la Planta Industrial Procesadora de Productos de la Pesca.

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

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

3. Definiciones

Para fines 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 Agua de mar limpia, al agua de mar o salobre que no presente contaminación microbiológica, sustancias tóxicas o plancton marino tóxico en cantidades tales que puedan afectar la calidad sanitaria de los productos de la pesca.

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

3.4 Ahumado, procedimiento que consiste en someter el alimento al efecto del humo originado en la combustión de madera no resinosa y/o extractos con sabor a humo.

3.5 Ahumado en caliente, someter el producto a temperaturas y periodos suficientes para lograr la coagulación térmica de la proteína.

3.6 Ahumado en frío, someter el producto a temperaturas a las que no muestre señales de coagulación térmica de la proteína.

3.7 Almacenaje húmedo, al almacenamiento temporal de moluscos bivalvos provenientes de áreas de cultivo con clasificación aprobada o condicionalmente aprobada, ya sea en contenedores o flotantes en cuerpos naturales de agua o en tanques que contengan agua de mar natural o sintética.

3.8 Area aprobada, zona de producción de moluscos bivalvos, en la cual un estudio sanitario elaborado bajo los criterios técnicos establecidos por la autoridad, así como el monitoreo y las actividades de vigilancia, indican que no existe contaminación por materia fecal, microorganismos patógenos, sustancias tóxicas nocivas y/o biotoxinas marinas.

3.9 Area condicionalmente aprobada, zona de producción de moluscos bivalvos que cumple con los criterios para la clasificación aprobada, excepto bajo ciertas condiciones descritas en un estudio sanitario.

3.10 Area condicionalmente restringida, al área de producción de moluscos bivalvos que cumple con los criterios para la clasificación restringida excepto bajo ciertas condiciones descritas en un estudio sanitario, y de la cual los moluscos bivalvos extraídos estarán sujetos a un proceso de tratamiento de reinstalación o depuración, tratamiento térmico u otro proceso que elimine organismos patógenos.

3.11 Area de cultivo, cosecha o producción, a cualquier lugar que sustenta o puede sustentar el crecimiento de moluscos bivalvos, por medios naturales o artificiales, y en la cual hay cantidad suficiente para su comercialización, incluyendo los sitios de acuacultura e instalaciones relacionadas.

3.12 Area prohibida, al área donde no está permitido la recolección de moluscos bivalvos, para cualquier propósito; excepto para la obtención de semilla para acuacultura.

3.13 Area restringida, al área de producción de moluscos bivalvos donde la recolección requiere permiso de la autoridad, y una vez recolectados los moluscos bivalvos, están sujetos a un proceso de tratamiento de reinstalación o depuración, tratamiento térmico u otro proceso que elimine organismos patógenos.

3.14 Biotoxinas marinas, sustancias de estructura molecular, mecanismos de acción y actividad biológica diversa, que pueden clasificarse atendiendo a sus diferentes efectos toxicológicos. Son generadas por especies fitoplanctónicas tóxicas tales como *Alexandrium catenella, Gymnodinium catenatum, Pyrodinium bahamense* en su variedad *compressum, Pseudonitzschia pungens, Gonyaulax,* spp*, Dinophysis* spp*, Karenia brevis,* entre otras especies, así como toxinas de origen natural presentes en algunos peces de interés comercial.

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

3.16 Congelación, al método físico que se efectúa por medio de equipo especial para lograr una reducción de la temperatura de los productos que garantice que su centro térmico esté congelado.

3.17 Depuración, proceso realizado para la reducción de organismos patógenos que pueden estar presentes en los moluscos, mediante la utilización de un ambiente acuático controlado como proceso de tratamiento.

3.18 Distribución, acción de repartir algo (materia prima, producto, etc.) y de llevarlo al punto o lugar en que se ha de utilizar.

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

3.20 Embarcación menor, a la unidad de pesca que no cuenta con maquinaria de cubierta accionada con fuerza electromotriz para el auxilio de las operaciones de pesca, utiliza únicamente hielo para la conservación del producto y tiene una autonomía de 3 días. Las embarcaciones con capacidad hasta 5 toneladas no podrán realizar operaciones de pesca por más de 24 horas.

3.21 Embarcación pesquera, unidad de pesca con motor estacionario y una o más cubiertas con eslora superior a los 10.5 m, que pueden tener o no equipo electrónico de navegación y apoyo a la pesca, que le permite tener una autonomía mayor de 3 días, y los sistemas de pesca pueden ser operados con apoyo de medios mecánicos. Se puede efectuar la congelación de los productos de la pesca, precedida, en caso necesario, de labores de preparación como el sangrado, descabezado, eviscerado y extracción de las aletas, y seguida, si es preciso, del envasado o embalado.

3.22 Embarcación pesquera de mediana altura, a la unidad de pesca con motor estacionario y una cubierta, con eslora de 10 a 27 m; con equipo electrónico de navegación y apoyo a la pesca, que le permite tener una autonomía máxima de 25 días, los sistemas de pesca son operados manualmente o con apoyo de medios mecánicos.

3.23 Enhielado, al método de conservación físico con el cual se mantiene la temperatura interna del producto a un máximo de 4°C, con la utilización de hielo potable.

3.24 Envases herméticamente cerrados, aquellos que se han previsto para proteger el contenido contra la entrada de microorganismos.

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

3.26 Esterilización comercial, al tratamiento térmico que libera al producto de formas viables de microorganismos patógenos (incluyendo esporas) que afecten la salud y causantes de descomposición, así como aquellos capaces de desarrollarse en los alimentos sin refrigeración bajo condiciones normales de almacenamiento y distribución.

3.27 Estudio sanitario, el informe escrito, de la evaluación de todos los factores ambientales, incluyendo las fuentes de contaminación actuales o potenciales, directas o indirectas que pudieran alterar la calidad del agua en un área de cultivo de moluscos bivalvos.

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

3.29 Eviscerado, a la acción de retirar las vísceras.

3.30 Expendio, área o establecimiento donde se exhiben o comercializan los productos objeto de esta norma.

3.31 Inocuo, al que no causa daño a la salud.

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

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

3.34 Marea roja, evento natural de incremento de la biomasa fitoplanctónica en una región en particular, donde la o las especies dominantes son generadoras de biotoxinas marinas. También se denomina Florecimiento de Algas Nocivas (FAN).

3.35 Materia extraña, a la sustancia, resto o desecho orgánico o inorgánico, ajeno al producto, que se presenta por contaminación o por malas prácticas de fabricación e higiene del mismo durante su proceso, considerándose entre otros: excretas, pelos de cualquier especie, huesos, insectos, vidrio, madera, metal o joyería.

3.36 Metal pesado y metaloide, a los elementos químicos que tienen un peso atómico entre 63 y 208 y una gravedad específica mayor de 4,0; que por su naturaleza presenta una gran reactividad y que dependiendo de su concentración, forma química o su acumulación en el organismo, pueden causar efectos indeseables en el metabolismo.

3.37 Métodos de prueba, al procedimiento técnico utilizado para la determinación de parámetros o características de un producto, proceso o servicio.

3.38 Molusco bivalvo, todas las especies de moluscos lamelibranquios que se alimentan por filtración, que cuentan con dos valvas, ejemplo ostiones, mejillones o almejas.

3.39 Parásito, al organismo que vive a expensas de otro organismo vivo, provocándole daño.

3.40 Pasteurización, tratamiento térmico que generalmente se realiza a temperatura por debajo de los 100°C y se aplica para la destrucción de microorganismos patógenos viables y la inactivación de enzimas.

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

3.42 Producto a granel, al producto que debe pesarse, medirse o contarse en presencia del consumidor al momento de su venta.

3.43 Producto de la pesca, a cualquier producto para consumo humano, derivado en parte o su totalidad de los recursos de la flora y fauna acuáticas, sean peces, crustáceos, moluscos, equinodermos.

3.44 Producto de la pesca congelado, a los peces, crustáceos, moluscos, equinodermos, u otros animales y vegetales que han sido objeto de un proceso de disminución de temperatura lo suficientemente bajo para conservar la calidad sanitaria.

3.45 Producto de la pesca fresco refrigerado, es aquel que cumpliendo con las normas microbiológicas e higiénicas establecidas no ha sido sometido a proceso alguno de conservación, excepto la refrigeración mecánica o el enhielado.

3.46 Producto de la pesca procesado, es aquel que ha sido sometido a un proceso tecnológico para su conservación y su consumo posterior, a excepción de los refrigerados y congelados.

3.47 Producto preenvasado, al producto que cuando es colocado en un envase de cualquier naturaleza, no se encuentra presente el consumidor y la cantidad de producto contenido en él no puede ser alterada, a menos que el envase sea abierto o modificado perceptiblemente.

3.48 Rastreabilidad, la capacidad para seguir el desplazamiento de los productos de la pesca a través de una o varias etapas especificadas de su proceso, conocido también como trazabilidad.

3.49 Refrigeración, al método físico de conservación con el cual se mantiene la temperatura interna de un producto a máximo 4°C.

3.50 Reinstalación, proceso utilizado para movilizar moluscos bivalvos cosechados en áreas clasificadas como restringidas o condicionalmente restringidas, a un área de cosecha clasificada como aprobada o condicionalmente aprobada, con el propósito de reducir la presencia de microorganismos patógenos, mismos que se determinan mediante el indicador del grupo coliforme (coliformes fecales o E. coli), utilizando la permanencia en este ambiente como proceso de tratamiento.

3.51 Residuos de medicamentos veterinarios, compuestos químicos que pueden encontrarse en la materia prima, producto en proceso o producto terminado, derivados de su aplicación en la acuicultura, y que representa riesgo a la salud humana.

3.52 Salazón en seco, procedimiento que consiste en mezclar el pescado con sal, azúcar y/u otros ingredientes secos aptos para consumo humano, de manera que los líquidos secretados se eliminen.

3.53 Salmuera, solución de sal en agua, que puede contener azúcar y/u otros ingredientes aptos para consumo humano.

3.54 Sistema PEPS (primeras entradas-primeras salidas), serie de operaciones que consiste en garantizar la rotación de los productos de acuerdo a su fecha de recepción**,** su vida útil o vida de anaquel.

3.55 Subproducto, material generado durante la producción de un producto principal, que se puede utilizar como materia prima para otros productos, los cuales pueden ser apto o no para consumo humano.

3.56 Tratamiento térmico, método físico que consiste en someter a una fuente de calor suficiente por un tiempo apropiado al producto, antes o después de ser envasado en recipientes de cierre hermético con el fin de lograr una estabilidad biológica.

3.57 Transporte, al vehículo, remolque o contenedor, elevadores, montacargas, escaleras mecánicas, bandas u otros en el se trasladan los productos objeto de esta norma.

3.58 Veda sanitaria, medida de seguridad consistente en la prohibición temporal o permanente para captura, comercialización y consumo de productos de la pesca para consumo humano, con el objeto de proteger la salud de la población.

3.59 Zonas de producción y extracción (captura) de los productos de la pesca, zona geográficamente delimitada en la cual la autoridad competente emite un permiso o concesión acuícola, para la explotación comercial de determinadas especies acuáticas.

4. Símbolos y abreviaturas

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

Aw	actividad de agua
BPF	buenas prácticas de fabricación
ºC	grado Celsius
GR	grado reactivo
h	hora
cm	centímetro
g	gramo
HPLC	siglas en inglés de cromatografía de líquidos de alta resolución
kg	kilogramo
L	litro
mg	miligramo
mL	mililitro
ppm	partes por millón
min	minutos
µg	microgramo
N	normalidad
mm	milímetro
NMP	número más probable
No	Número
SO_2	dióxido de azufre
Ton	tonelada
pH	potencial de hidrógeno
P_2O_5	pentóxido de fósforo
PEPS	primeras entradas-primeras salidas
UFC	unidades formadoras de colonias
UR	unidades ratón
V	volumen

l	litro
%	por ciento
±	más menos
-	menos
/	por
>	mayor que
≥	mayor o igual que
<	menor que
=	igual

4.2 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.

Ley, debe entenderse que se trata de la Ley General de Salud.

Reglamento, debe entenderse que se trata del Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios.

5. Clasificación

Los productos objeto de esta norma por el tratamiento al que han sido sometidos se clasifican en:

5.1 Productos de la pesca frescos, refrigerados y congelados; y

5.2 Productos de la pesca procesados, los que a su vez se clasifican en:

5.2.1 Productos cocidos refrigerados y congelados.

5.2.2 Envasados en recipientes de cierre hermético y sometido a tratamiento térmico.

5.2.2.1 Esterilizados comercialmente.

5.2.2.2 Pasteurizados.

5.2.3 Ahumados.

5.2.4 Salados y secos-salados.

5.2.5 Semipreparados.

5.2.6 Crudos o precocidos empanizados o rebozados y congelados.

5.2.7 Crudos marinados o en salmuera.

5.2.8 Emulsionados.

6. Prácticas de higiene y sanidad

Los productos objeto de esta norma, deben de cumplir las siguientes especificaciones:

6.1 En el proceso de los productos objeto de esta norma, se debe cumplir con lo establecido en la NOM-251-SSA1-2009, señalada en el apartado de referencias.

6.2 Todas las materias primas empleadas en la elaboración de los productos deben cumplir con los ordenamientos legales aplicables.

6.3 Control documental del proceso.

6.3.1 Adicionalmente a lo establecido en otros ordenamientos se debe contar con la documentación establecida en la tabla No 1 y cumplir con lo siguiente:

6.3.1.1 Los registros o bitácoras deben estar foliados o numerados,

6.3.1.2 Contar con documentos que demuestren la veracidad de la información

6.3.1.3 Conservarse por lo menos durante el tiempo establecido en la NOM-128-SSA1-1994, señalada en el apartado de referencias.

6.3.1.4 Todos los documentos deben contar con los datos que permitan identificar a la persona que supervisa.

Tabla No. 1. Información adicional de las diferentes etapas del proceso.

REGISTRO DE:	INFORMACION
Recepción de materias primas	- Origen (zona de captura o producción, rastreable por lote de producción, cuando aplique)

materias primas	aplique). - Condiciones de recepción, conservación y transporte, cuando aplique. - El informe de resultados de análisis, además debe incluir: nombre común y científico de la materia prima, condiciones de toma y transporte de muestra (características de la muestra), fecha de análisis.
Almacenamiento del producto	- Control del Sistema PEPS.
Area de proceso	- Temperatura del área. - Temperatura y tiempo, durante la manipulación y el procesamiento del producto. - Determinación de cloro residual en el agua utilizada en el proceso, como mínimo una vez al día al inicio del proceso, incluir hora en que se realiza la determinación. - Informe de resultados de análisis microbiológicos y fisicoquímicos, como mínimo semestralmente.
Distribución de producto terminado	- Condiciones de transporte y comercialización. - Control de destino del producto por lotes que garantice su rastreabilidad.
Control o erradicación de fauna nociva	- Hojas técnicas de las sustancias.
Estado de salud del personal del área de producción y expendio, en su caso	- Tipo de análisis, al menos deben realizarse exudado faríngeo y coproparasitoscópico, es recomendable además realizar reacciones febriles. - Fecha de análisis. - Resultados y en su caso seguimiento. - Laboratorio responsable.
Mantenimiento del equipo	- Tipo de mantenimiento (preventivo o correctivo).

Lo anterior de conformidad con el trámite SSA-04-015. Conservación de información sobre el proceso de producción y con el SSA-04-022. Conservación de registros de los parámetros de operación en establecimientos dedicados al proceso de productos de la pesca y sus derivados.

6.4 Embarcaciones de pesca y recolección.

6.4.1 Las embarcaciones pesqueras deben contar al menos con una bodega exclusiva para la conservación refrigerada o congelada de los productos de captura. Las embarcaciones menores deben tener contenedores empleados exclusivamente para almacenar producto.

6.4.2 Las bodegas deben reunir los siguientes requisitos:

6.4.2.1 Estar aislada térmicamente;

6.4.2.2 Estar revestida interiormente con materiales resistentes a la corrosión, lisos y de fácil limpieza y desinfección.

6.4.2.3 Las bodegas de almacenamiento de productos de la pesca deben estar separadas de las salas de máquinas, de los cuartos de servicio de la tripulación y no podrán ser usados para productos que por su naturaleza puedan contaminarlos.

6.4.2.4 En caso de que los almacenes se utilicen para otro fin el responsable de la embarcación deben

garantizar que cuenten con los utensilios, procedimientos y productos para la limpieza y desinfección que garanticen que los productos de la pesca no puedan contaminarse.

6.4.2.5 Contar con sistemas que garanticen la conservación del producto.

6.4.2.6 Cuando se conserven productos de la pesca enhielados; deben contar con un sistema de drenaje que permita la salida del agua de fusión.

6.4.3 Las embarcaciones pesqueras menores, deben estibar el producto en recipientes con suficiente hielo que garantice su conservación. Este tipo de embarcaciones no deben mantener el producto en estas condiciones por periodos mayores de veinticuatro horas.

6.4.4 Las embarcaciones pesqueras que estén provistas de un sistema de refrigeración no deben mantener el producto en estas condiciones por periodos mayores de veinticinco días.

6.4.5 Las embarcaciones pesqueras de mediana altura y mayores, deben disponer de un sistema de abastecimiento de

6.4.5 Las embarcaciones pesqueras de mediana altura y mayores, deben disponer de un sistema de abastecimiento de agua potable abundante o de agua de mar limpia. Asimismo, deben contar con un sistema de desinfección, con el fin de facilitar el lavado y saneamiento de las áreas de confinación del producto y limpieza general del barco, antes de salir del puerto y después de la descarga.

6.4.6 Las embarcaciones, partes y equipos empleados para la extracción, deben quedar libres de pescados, mariscos o fragmentos de éstos, así como de otras materias orgánicas susceptibles de descomposición que puedan contaminar el producto, en su caso se pueden lavar con agua potable o agua de mar limpia antes o después de cada operación de pesca o por lo menos una vez al día.

6.4.7 La cubierta y todo el equipo de cubierta, inmediatamente después de descargar la captura, debe limpiarse, desinfectarse y, en su caso, enjuagarse.

6.4.8 Los productos de la pesca enhielados o refrigerados deben mantenerse a 4ºC como máximo, y a 7°C en el caso de los productos vivos; mientras que los congelados deben mantenerse a 18ºC como máximo, y para los pescados enteros congelados en salmuera y destinados a la fabricación de conservas, se pueden tolerar temperaturas no superiores a 9ºC.

6.5 Extracción o cosecha de moluscos bivalvos.

6.5.1 La extracción o cosecha y manejo de los moluscos bivalvos debe sujetarse a lo siguiente:

6.5.1.1 Extraerse o cosecharse de áreas aprobadas, aprobadas condicionalmente, condicionalmente restringidas o restringidas bajo vigilancia sanitaria y libres de marea roja.

6.5.1.2 Ser inocuos, o en caso de provenir de áreas condicionalmente restringidas o restringidas, someterse a un proceso de reinstalación, depuración, pasteurización, tratamiento térmico u otro proceso que garantice la eliminación de organismos patógenos. Estos procesos deben llevarse a cabo mediante lineamientos técnicos sujetos a evaluación por parte de la autoridad.

6.5.1.3 Lavarse con agua de mar limpia procedente de área aprobada o con agua potable.

6.5.1.4 Realizar el almacenamiento húmedo en contenedores o flotadores en cuerpos naturales de agua o en tanques que contengan agua de mar natural o sintética. Este proceso debe llevarse a cabo de conformidad con lineamientos técnicos sujetos a evaluación por parte de la autoridad.

6.5.1.5 Almacenarse de tal forma que se eviten abrasiones, en bodegas ventiladas y libres de fauna nociva o doméstica.

6.5.1.6 Lavarse, en caso de separación de la concha, con agua potable y manipularse rápidamente, para su inmediata refrigeración, congelación o venta.

6.5.2 Para la depuración de los moluscos bivalvos, se debe observar lo siguiente:

6.5.2.1 La cantidad de agua que reciban debe ser de mar, limpia, continua y suficiente para el volumen de organismos por depurar, el cual no debe ser superior a la capacidad del centro o área de depuración.

6.5.2.2 El funcionamiento del sistema de depuración debe permitir que los moluscos bivalvos vivos vuelvan a alimentarse por filtración, eliminen los residuos contaminantes y se mantengan con vida en condiciones adecuadas después de la depuración previa a envasado, almacenamiento y transporte anteriores a la puesta en el mercado.

6.5.2.3 Los lotes de organismos no se deben mezclar, a menos que los procesadores cuenten con un

procedimiento de mezclado sujeto a evaluación y vigilancia por parte de la autoridad sanitaria.

6.5.2.4 Independientemente del proceso de depuración empleado, su duración no debe ser inferior a las 48 h.

6.5.3 La duración del proceso de reinstalación debe ser al menos de 15 días, y la eficiencia del proceso estará sujeta a evaluación por parte de la autoridad sanitaria, en términos de las disposiciones jurídicas aplicables.

6.6 Manejo de producto a bordo.

6.6.1 El producto capturado, al ser descargado en la cubierta de las embarcaciones, debe manipularse cuidando que no se golpee o dañe y se evite su contaminación.

6.6.2 En el momento que sea factible y de acuerdo a la naturaleza del producto, se debe lavar y en su caso, extraerle las vísceras, evitando que los desperdicios entren en contacto con los productos destinados al consumo humano. El producto se debe mantener enhielado, en refrigeración o en congelación hasta que sea entregado para su procesamiento.

6.6.3 El producto, una vez libre de vísceras, cabeza o concha, debe lavarse con agua de mar limpia o agua potable; en el caso de los pescados, esto debe hacerse hasta que cese el sangrado.

6.6.4 Para los productos enhielados, la cavidad abdominal del pescado libre de vísceras, debe llenarse con hielo y cubrirse con el mismo al estibarlo. El hielo que haya sido previamente utilizado con algún otro propósito, no debe ser usado para enfriar el producto.

6.6.5 Las vísceras, así como los desechos destinados al consumo animal o al uso industrial no alimentario, deben conservarse en condiciones que eviten su descomposición y separarlos de los de consumo humano.

6.6.6 La descarga debe realizarse en recipientes limpios y en el menor tiempo posible, cuidando que no sea lanzado desde la bodega a la cubierta, a la plataforma del muelle o al medio de transporte.

6.7 Equipo

6.7 Equipo.

6.7.1 Todo el equipo empleado para lavar, manipular, transportar, enfriar y almacenar los productos de la pesca a bordo de las embarcaciones y en los establecimientos debe ser de material resistente, liso e inocuo, que permita su fácil limpieza y desinfección y encontrarse en buen estado de mantenimiento.

6.7.2 Los recipientes, equipo y utensilios que se empleen en la manipulación, almacenamiento o transporte de los productos pesqueros, a bordo de las embarcaciones y en los establecimientos en tierra deben por lo menos limpiarse al final de la jornada y desinfectarse al inicio de la jornada y, en su caso, enjuagarse con agua potable, o agua de mar limpia.

6.8 Establecimientos.

6.8.1 Deben permitir la limpieza y desinfección de las áreas, y el flujo lineal y continuo de los productos desde su recepción hasta su embarque, así como del área personal y de los materiales, de tal forma que se evite la contaminación del producto en todo momento.

6.8.2 Los agentes de limpieza y desinfección no deben estar en las áreas de proceso cuando se realice la manipulación del producto ni emplearse de forma que provoquen su contaminación o adulteración.

6.8.3 Las áreas e instalaciones para lavado y/o desinfección de materias primas, productos, utensilios y equipo y para manos del personal deben estar identificadas

6.8.4 Para las áreas de proceso en donde el producto esté expuesto debe cumplir con lo siguiente:

6.8.4.1 El área de recepción debe estar cubierta, limpia y ser específica para la actividad.

6.8.4.2 Las cámaras de refrigeración y congelación deben estar construidas con materiales resistentes a la corrosión, tener acabados lisos, ser de fácil limpieza y desinfección.

6.8.5 Se debe contar con almacenes específicos para: ingredientes, aditivos y material de empaque.

6.8.6 Se debe contar con depósito de hielo, cámaras frigoríficas o almacén para producto refrigerado o congelado, según el caso.

6.8.7 Después de ser lavados y desinfectados, los equipos y utensilios de trabajo que no se estén utilizando, deben estar protegidos de cualquier forma de contaminación.

6.8.8 Se debe contar con áreas específicas para el lavado y desinfección de botas y mandiles, así como

para el secado y escurrido de éstos, con los correspondientes accesorios.

6.8.9 Se debe contar con un área específica de vestidores que cuente con un lugar para guardar los objetos personales.

6.9 Procesamiento de los productos de la pesca.

6.9.1 Se debe contar con un sistema de potabilización que asegure la calidad sanitaria del agua utilizada en el proceso. El mantenimiento del mismo es responsabilidad del procesador, de acuerdo a las especificaciones establecidas por el fabricante del equipo.

6.9.2 El hielo que se utilice en la conservación y proceso de los productos objeto de esta norma debe cumplir con lo establecido en la NOM-201-SSA1-2002, señalada en el apartado de referencias.

6.9.3 La industrialización de los subproductos de la pesca no destinadas a consumo humano debe realizarse en áreas separadas físicamente de aquellas en que se elaboren productos destinados al consumo humano.

6.9.4 La temperatura de las cámaras utilizadas para conservar el producto congelado debe garantizar que la temperatura en el centro térmico de los productos se mantenga a -18°C o inferior.

6.9.5 La temperatura de las cámaras utilizadas para conservar el producto refrigerado debe garantizar que la temperatura del centro térmico de los productos, se mantenga a 4°C o inferior, y de 7°C o inferior en el caso de moluscos bivalvos.

6.9.6 El producto en el que se sospeche la presencia de parásitos debe ser sujeto a un tratamiento previo de congelación a -18°C o menor por un tiempo no inferior a 24 horas.

6.9.7 La temperatura de las cámaras de refrigeración deben leerse y registrarse por lo menos cada 4 horas, o deben utilizarse registros continuos y automáticos. Las cámaras utilizadas para congelar y conservar el producto a esta temperatura deben contar únicamente con registros continuos y automáticos.

6.9.8 Durante el lavado de los productos de la pesca, se debe utilizar agua potable fría o agua de mar limpia, cuando aplique y disponer de instalaciones adecuadas para la manipulación.

6.10 Descongelación.

6.10.1 El método de descongelación aplicado a los productos no debe representar una fuente de contaminación para el mismo. La temperatura interna del producto no debe exceder los 4°C.

6.10.2 La descongelación se debe efectuar en lugares cerrados y en condiciones de higiene.

6.10.3 Cuando se emplee agua como medio de descongelación ésta debe ser potable, y la circulación debe ser suficiente para lograr una descongelación uniforme.

6.11 Manejo de desechos.

6.11.1 Las embarcaciones pesqueras y los establecimientos deben eliminar sus desechos, de conformidad con las

6.11.1 Las embarcaciones pesqueras y los establecimientos deben eliminar sus desechos, de conformidad con las disposiciones aplicables.

6.11.2 Los recipientes para despojos y materiales de desecho, deben ser de material impermeable.

6.12 Personal.

6.12.1 La empresa debe asegurarse que al inicio de cada turno, el personal del proceso cuente con el equipo de trabajo como son los mandiles, guantes, botas y cofias en condiciones higiénicas, batas, cubreboca, pantalón, camisolas, zapatos cerrados, overoles, ropa térmica o cualquier otra indumentaria para la realización de sus actividades.

6.12.2 El personal no podrá usar la indumentaria de trabajo fuera del establecimiento. Así mismo el personal de las áreas sucias no debe ingresar hacia áreas limpias para evitar posibles contaminaciones y si regresara a áreas de proceso debe tomar las medidas de higiene necesarias.

6.13 Transporte.

6.13.1 Los vehículos destinados al transporte de los productos de la pesca deben cumplir con los siguientes requisitos sanitarios, según corresponda:

6.13.1.1 Los acabados del interior de la caja deben ser de material resistente a la corrosión, de fácil

limpieza y desinfección y encontrarse en buen estado de mantenimiento y en su caso, contar con un sistema para el drenaje del agua de deshielo.

6.13.1.2 Los productos no deben entrar en contacto directo con pisos y paredes.

6.13.2 El transporte de los productos de la pesca frescos, con duración máxima de 5 horas, puede efectuarse en vehículos de caja abierta o de plataforma siempre y cuando el producto enhielado se coloque dentro de contenedores cerrados que permitan la salida de agua de fusión.

6.13.3 El enhielado debe hacerse colocando, capas alternas de hielo triturado hasta una altura máxima de un metro; la primera y última capas deben ser de hielo. Para el caso de los moluscos bivalvos, el enhielado debe garantizar que no se altera dicha condición.

6.13.4 El transporte de los productos de la pesca con una duración mayor de más de 5 horas de transportación, debe contar con sistemas de refrigeración o congelación e indicador y registrador de temperatura.

6.13.5 El transporte de los productos de la pesca refrigerados se debe realizar a una temperatura de 4°C como máximo y 7°C en caso de los productos vivos.

6.13.6 El interior de las cajas de los vehículos, los recipientes empleados para el estibado y demás superficies que estén en contacto con el producto, deben lavarse con agua potable y desinfectarse antes y después de cada viaje.

6.14 Expendio.

6.14.1 En las áreas donde se expendan los productos de la pesca frescos refrigerados, no podrán ser utilizadas para elaborar productos de la pesca procesados o alimentos preparados.

6.14.2 Deben contar con un área específica para almacenar los productos, ya sea enhielado, refrigerado o congelado.

6.14.3 Se debe contar con un área específica para productos no aptos para consumo.

6.14.4 El hielo que se emplee debe cumplir con lo siguiente:

6.14.4.1 Ser para consumo humano.

6.14.4.2 Almacenarse de tal forma que se evite su contaminación.

6.14.4.3 El que se haya utilizado para conservar los productos no debe ser reutilizado.

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

6.14.6 La estiba, debe realizarse de manera que se evite el rompimiento y exudación de empaques y envolturas.

6.14.7 Las unidades de refrigeración y congelación, deben contar con termo-registradores con termómetro en lugar visible que permitan monitorear la temperatura.

6.14.8 El importador, distribuidor y comercializador, cada uno en el ámbito de su responsabilidad, deben observar que se mantengan las condiciones de almacenamiento establecidas en este ordenamiento.

6.14.9 Los productos de la pesca que se presenten para su exhibición y venta al público, deben colocarse en mostradores de material resistente, con superficie lisa, y de fácil limpieza y desinfección, con inclinación necesaria para permitir el escurrimiento del agua de deshielo. Si la exhibición y venta se realiza en charolas, éstas deben ser de material inocuo u otro material anticorrosivo que sea de fácil limpieza y desinfección o desechables.

6.14.10 Durante el pesado del producto, se debe evitar el contacto directo con las básculas.

6.14.11 Los utensilios de corte deberán permanecer en solución desinfectante cuando no se estén utilizando.

6.14.12 Las unidades de refrigeración deben mantenerse a una temperatura que permita al producto permanecer a no más de 4ºC en forma constante. Asimismo, las unidades de congelación deben mantenerse a una temperatura que garantice que los productos mantengan una temperatura de -18ºC en el centro térmico. Ambas unidades deben contar con termómetros en lugar visible

en lugar visible.

6.15 Disposiciones específicas.

6.15.1 Productos cocidos refrigerados y congelados.

6.15.1.1 Los productos congelados no envasados, inmediatamente, deben glasearse o empacarse para protegerlos contra la deshidratación y la oxidación, durante su permanencia en el almacén frigorífico.

6.15.1.2 Los productos de la pesca, que se utilicen como materia prima deben conservarse refrigerados o congelados, con la excepción de los moluscos bivalvos vivos, que deben manejarse enhielados o con refrigeración mecánica.

6.15.1.3 La recepción de los productos objeto de este proceso deben ser vivos para langosta, cangrejo o jaibas y moluscos bivalvos, y frescos para camarón.

6.15.1.4 El área de recepción de estos productos podrá contar con estanques para la conservación del producto vivo antes de su proceso, los cuales contarán con equipos para la recirculación de agua de mar limpia.

6.15.1.5 Para el adormecimiento de estos productos se debe emplear agua potable o agua de mar limpia; adicionalmente se podrá utilizar metabisulfito de sodio.

6.15.1.6 El área de cocimiento de los productos debe ser independiente del área destinada a la recepción.

6.15.1.7 Para el cocimiento se debe contar con instalaciones que proporcionen una fuente de calentamiento que no esté en contacto directo con el agua de cocción. En caso de utilizar vapor como fuente de calor se debe contar con instalaciones que eviten que sus residuos contaminen el producto.

6.15.1.8 La temperatura de cocción de los productos debe ser en su centro térmico de 82° a 93°C, y podrá adicionarse hasta 5% de cloruro de sodio.

6.15.1.9 Una vez concluida la cocción se debe iniciar el enfriamiento del producto cocido en agua fría a una temperatura no superior de 4°C por un tiempo suficiente hasta alcanzar una temperatura inferior a 30°C en el centro térmico del mismo. Para el enfriamiento del agua se podrá emplear hielo y/o equipos de refrigeración. El agua empleada para enfriamiento no debe reutilizarse.

6.15.1.10 Seguido del enfriamiento los productos deben someterse a un lavado con agua potable a presión con el fin de eliminar los residuos que se acumulen durante la cocción.

6.15.1.11 Posterior al lavado los productos se deben refrigerar, por un tiempo suficiente para alcanzar una temperatura de 4°C en su centro térmico, de esta operación se deben llevar registros gráficos de tiempo y temperatura. Cuando por exceso de agua se someta el producto a un escurrimiento o estilado previo a la refrigeración, con el fin de eliminar el agua residual, esta operación se debe efectuar en charolas y en un área separada de donde se efectúe la cocción y la recepción. El escurrido no debe ser superior a 4 horas y la temperatura del área debe permanecer entre 15° y 20°C.

6.15.1.12 Posterior a la refrigeración se debe realizar el empaque ya sea de manera individual o en forma colectiva. El área de empaque debe mantenerse a una temperatura entre 15° y 20°C y en ningún momento el producto debe sobrepasar los 4°C en su centro térmico.

6.15.1.13 Una vez empacado, el producto debe congelarse y conservarse a temperatura de 18°C o inferior, y debe contarse con registro gráfico de las temperaturas hasta su embarque.

6.15.1.14 Una vez terminada la cocción y de acuerdo a la naturaleza del producto, se podrá emplear equipo de Congelación Rápida Individual (IQF), siempre y cuando esta operación sea seguida del empaque.

6.15.2 Productos envasados en recipientes de cierre hermético y sometidos a tratamiento térmico.

Los productos envasados en recipientes de cierre hermético sometidos a tratamiento térmico, además de cumplir con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-130-SSA1-1995, señalada en el apartado de referencias, deben cumplir con lo siguiente:

6.15.2.1 Pasteurizados.

6.15.2.1.1 Una vez terminada la etapa de enfriamiento y de acuerdo a la naturaleza del producto, será enviado al área de separación de carne y selección, la cual debe ser un área independiente y con temperatura medio-ambiental de entre 15° y 20°C. El proceso de separación de la carne, limpieza y clasificación no debe superar las 4 horas y durante esta fase el producto no podrá superar una temperatura de 4°C.

6.15.2.1.2 En el caso de que el producto cocido se refrigere para su posterior seleccionado o pelado, el almacenamiento no debe superar las 18 horas hasta su tratamiento térmico posterior.

6.15.2.1.3 Con el fin de eliminar completamente los restos de caparazón o concha de la carne, adicionalmente se podrán inspeccionar con luz negra o luz ultravioleta.

6.15.2.1.4 Una vez separada la carne y de acuerdo a la naturaleza del producto, se procederá al envasado y cerrado en recipientes que estén diseñados para el procesamiento térmico. En el caso de cerrado con sistemas de doble cierre se deben efectuar pruebas periódicas y llevar registros que evalúen la efectividad del mismo.

6.15.2.1.5 Cuando se utilicen materiales para el envasado distintos a los recipientes descritos en el punto anterior, la

6.15.2.1.5 Cuando se utilicen materiales para el envasado distintos a los recipientes descritos en el punto anterior la empresa debe efectuar pruebas para la evaluación de los cierres de dichos envases de acuerdo a las especificaciones del fabricante. En todo momento el material utilizado para el envasado del producto debe garantizar la impermeabilidad del mismo.

6.15.2.1.6 El equipo debe contar entre sus componentes con un sistema para graficar las constantes de temperatura y tiempo como mínimo, así como con un termómetro de mercurio u otro equivalente que pueda ser calibrado y/o certificado.

6.15.2.1.7 Si se utilizan procedimientos de pasteurización con sistemas de inmersión en agua caliente, la tina con el agua de cocimiento debe ser precalentada de acuerdo a las especificaciones del proceso, asimismo la circulación de agua y la temperatura se debe mantener constante durante el tiempo del proceso.

6.15.2.1.8 Una vez pasteurizados los productos deben someterse a enfriamiento con agua potable a una temperatura no superior a 4°C. El proceso de enfriamiento concluirá cuando los productos hayan alcanzado una temperatura de 4°C en su centro térmico, y una vez terminado el enfriamiento deben ser sometidos a refrigeración. Se deben implementar controles de cinta testigo o tinta termosensible que permitan distinguir un producto no pasteurizado de uno pasteurizado.

6.15.2.1.9 Se deben llevar controles gráficos de la temperatura de conservación durante la refrigeración de los productos pasteurizados hasta su distribución.

6.15.2.1.10 Los estudios de penetración de calor deben ser revalidados después de que se efectúen mantenimientos mayores a los equipos o por lo menos cada 2 años de la operación continua del equipo.

6.15.2.2 Esterilizados comercialmente.

6.15.2.2.1 Se debe contar con un estudio de penetración de calor para cada uno de los productos que sean sometidos a tratamiento térmico, el cual debe estar sustentado científicamente.

6.15.2.2.2 No debe existir en una misma carga de la autoclave producto de la pesca envasado en recipientes de cierre hermético de distintos tamaños.

6.15.2.2.3 Durante el manejo del envase se debe cuidar que éste no sufra daño físico y evitar la corrosión.

6.15.2.2.4 Precocción y otros tratamientos previos.

6.15.2.2.4.1 Se debe contar con control de parámetros de tiempo y temperatura por escrito.

6.15.2.2.4.2 Se debe tener cuidado para evitar que las especies susceptibles de desarrollar histamina alcancen una temperatura mayor a 4°C, si esto sucede, el tiempo de exposición no debe ser mayor a cuatro horas, antes de la precocción.

6.15.2.2.4.3 Con la excepción de los productos que se envasan aún calientes, el enfriamiento del producto precocido debe efectuarse con la mayor rapidez posible, con el fin de evitar la proliferación o producción de toxinas, y en condiciones que eviten la contaminación del producto.

6.15.2.2.5 Los establecimientos deben destinar un área de cuarentena, para el control interno de una muestra representativa de los productos con pH > 4,6 con el fin de comprobar que: la manipulación de los ingredientes antes del tratamiento, el tratamiento térmico, el enfriamiento y el cierre del envase fueron los adecuados. Durante este tiempo se realizarán pruebas de incubación de 30 a 37°C durante 10-14 días, para después realizar análisis microbiológicos.

6.15.3 Ahumados.

6.15.3.1 Todos los pescados crudos que van a ser ahumados deben conservarse congelados o en su caso refrigerados, hasta que vayan a ser procesados.

6.15.3.2 En el salado en seco, el producto debe regresarse al área de refrigeración o pasarse a la cámara de ahumado inmediatamente después de la aplicación de la sal.

6.15.3.3 Cuando el proceso de ahumado se lleve a cabo con madera, ésta no debe ser resinosa y debe

estar exenta de polvo y sustancias perjudiciales. No debe emplearse para la producción de humo, madera que haya sido pintada, barnizada o que haya sido expuesta a químicos.

6.15.3.4 Los productos ahumados no deben presentar manchas rojizas o verdosas, de origen micótico o microbiano.

6.15.3.5 El secado después del ahumado debe llevarse a cabo a temperaturas de refrigeración.

6.15.3.6 El producto ahumado debe mantenerse en refrigeración a una temperatura máxima de 4°C o en congelación a una temperatura máxima de -18°C.

6.15.3.7 El pescado sometido al proceso de ahumado en caliente y aquel con sabor a humo, para ser empacado, necesita calentarse continuamente a una temperatura interna de cuando menos 63ºC en todo el pescado, por un mínimo de 30 minutos y salarse, para contener no menos de 3,0 por ciento de sal en base húmeda en el producto terminado. En el caso de ser empacado al vacío en atmósfera modificada y controlada necesita ser salado, para contener no menos de 3,5 por ciento de sal en base húmeda en el producto terminado. El contenido de sal puede disminuir al 3,0 por ciento, siempre y cuando la temperatura a que se someta no sea menor de 82ºC, durante 5 minutos o relación equivalente.

6.15.3.8 El pescado sometido al proceso de ahumado en frío o aquél con sabor ahumado, que no es empacado al vacío, debe ser salado en salmuera o salado en seco, para contener cuando menos 3,5 por ciento de sal en base húmeda en el producto terminado. Sin embargo, cuando dicho pescado contiene no menos de 100 mg/kg de nitrito de sodio debe contener

no menos de 3,0 por ciento de sal en base húmeda en el producto terminado. Cuando este tipo de producto se congela inmediatamente después del ahumado y el enfriamiento, y permanece en ese estado a lo largo de todo el almacenamiento, distribución y comercialización subsecuentes, debe contener no menos de 2,5 por ciento de sal en base húmeda en el producto terminado.

6.15.3.9 El pescado sometido a proceso de ahumado en frío y aquél con sabor a ahumado para ser empacado al vacío, con atmósfera modificada o controlada, debe ser salado en salmuera o salado en seco, para contener cuando menos 3,0 por ciento de sal en base húmeda en el producto terminado y no menos de 100 mg/kg de nitrito de sodio. Si no se utiliza el nitrito de sodio, el contenido de sal en base húmeda en el producto terminado debe ser cuando menos de 3,5 por ciento.

6.15.3.10 Los límites de contenido de sal citados en los puntos 6.15.3.7, 6.15.3.8 y 6.15.3.9 pueden substituirse por cualquier combinación de sal y otros aditivos permitidos que permitan obtener una Aw menor a 0,95 en la temperatura de almacenaje.

6.15.4 Salados y secos-salados.

6.15.4.1 Generales

6.15.4.1.1 El producto no debe presentar las siguientes características: manchas rojizas o rosas, tejido muscular blando, disgregación de su fibra y olor putrefacto.

6.15.4.1.2 Deben almacenarse en un lugar seco, protegido contra la contaminación y bien ventilado.

6.15.4.2 Salado

6.15.4.2.1 Las salmueras utilizadas en los productos deben estar preparadas con agua potable y sal grado alimentario.

6.15.4.2.2 Se debe controlar con regularidad la salmuera con un salinómetro y mantener su concentración al nivel necesario añadiendo sal sólida.

6.15.4.2.3 Si el pescado ha de permanecer en salmuera para alcanzar la maduración, la primera debe conservarse limpia, eliminando la espuma grasa que se forme.

6.15.4.3 Salazón en seco

6.15.4.3.1 Debe efectuarse en una cámara fría a una temperatura inferior de 7°C.

6.15.4.3.2 En el salado en seco, el producto debe regresarse al área de refrigeración inmediatamente después de la aplicación de la sal.

6.15.4.4 Desalazón

Cuando sea necesario desalar el producto debe emplearse agua potable, que se cambiará con la frecuencia necesaria, hasta alcanzar la concentración deseada.

6.15.4.5 Secado

El secado debe prevenir la formación de la toxina de Clostridium botulinum.

7. Especificaciones sanitarias

7.1 Los productos objeto de esta norma, deben ajustarse a las siguientes especificaciones:

7.1.1 Sensoriales.

7.1.1.1 Productos vivos, frescos, refrigerados y congelados, deben presentar las siguientes características:

7.1.1.1.1 Pescados:

7.1.1.1.1.1 La piel debe estar húmeda y brillante, bien adherida a los tejidos subyacentes;

7.1.1.1.1.2 La mucosidad, en las especies que la posean, debe ser acuosa y transparente, sin olor que dé indicios de descomposición;

7.1.1.1.1.3 Las branquias deben presentar un color brillante de rosado al rojo intenso, húmedas y brillantes, que no sufre modificación al tacto, con olor marino salino, suave o neutro, excepto las especies de elasmobranquios, como el tiburón o la raya, donde pueden tener un ligero olor amoniacal;

7.1.1.1.1.4 El abdomen debe ser terso, sin diferencia externa con la línea ventral; al corte, los tejidos deben ofrecer resistencia; con el poro anal cerrado; las vísceras de colores vivos y bien diferenciados; las paredes interiores brillantes, los vasos sanguíneos llenos y resistentes a la presión digital; y con olor marino salino, suave o neutro, excepto las especies de elasmobranquios, como el tiburón o la raya, donde pueden tener un ligero olor amoniacal, y

7.1.1.1.1.5 Los músculos deben presentar elasticidad marcada, firmemente adheridos a los tejidos subyacentes y que no se desprendan de ellos al ejercer presión digital; con el color brillante natural característico, al primer corte.

7.1.1.1.2 Crustáceos frescos:

7.1.1.1.2.1 El exoesqueleto debe estar ligeramente húmedo, brillante y consistente, firmemente adherido en sus secciones;

7.1.1.1.2.2 Los apéndices deben ser resistentes y firmes, firmemente adheridos al cuerpo;

7.1.1.1.2.3 El olor debe ser marino salino, suave o neutro;

7.1.1.1.2.4 La piel debe estar lisa, húmeda y brillante, sin manchas rojizas o extrañas a la especie;

7.1.1.1.2.5 El color debe ser el característico de cada especie, y en algunas ocasiones a la estimulación pudiera cambiar;

7.1.1.1.2.6 El olor debe ser marino salino, suave o neutro, excepto algunas especies como el calamar, que pueden tener un olor ligeramente amoniacal;

7.1.1.1.2.7 Las ventosas deben estar firmemente adheridas al cuerpo, enteras y bien definidas, con succión, y en el caso del calamar deberá estar presente la rádula;

7.1.1.1.2.8 En los productos con vísceras, éstas deben estar completas, firmes y bien adheridas;

7.1.1.1.2.9 Contar con músculos húmedos, bien adheridos a las valvas y tener aspecto esponjoso, de color cenizo claro en los ostiones y amarillento en las almejas y mejillones, los cuales pueden tener variaciones por especie, y

7.1.1.1.2.10 En los gasterópodos el músculo debe estar firmemente adheridos a la concha, la cual debe estar completa y dura.

7.1.2 Físicas.

7.1.2.1 Materia extraña.

Los productos de la pesca frescos, refrigerados y congelados y procesados, deben estar exentos de materia extraña.

7.1.3 Químicas.

7.1.3.1 Productos frescos, refrigerados y congelados (Parte comestible)

ESPECIFICACION	ESPECIES	LIMITE MAXIMO
Nitrógeno amoniacal	Pescados (en músculo)	35 mg/100 g
Dióxido de azufre	Crustáceos	100 mg/kg como SO2
pH	Moluscos: Carne líquido intravalvar	 6,0 6,5 7,0 7,25
Histamina	Peces de las familias: *Clupeidae, Scombridae, Scombresocidae, Pomatomidae y Coryphaenidae.* Tales como atún, bonito, macarela y sardinas.	100 mg/kg

7.1.3.2 Productos de la pesca procesados

ESPECIFICACION	LIMITE MAXIMO (mg/kg)
Histamina *	100

* Para especies de las familias *Scombridae*, *Clupeidae*, *Coryphenidae*, *Scombresocidae* y *Pomatomidae*.

7.1.4 Fisicoquímicas.

7.1.4.1 Productos de la pesca procesados

7.1.4.1.1 Salados y secos-salados

ESPECIFICACIONES	LIMITE MAXIMO (mg/kg)
Aw	0,85
Humedad	40 %
Cloruro de sodio	20 %

7.1.5 Microbiológicas.

7.1.5.1 Productos frescos, refrigerados y congelados (Parte comestible)

ESPECIFICACION	ESPECIES	LIMITE MAXIMO
	Pescados y crustáceos	400 NMP/g

	Pescados y crustáceos	400 NMP/g
Coliformes fecales y/o *E. coli*	Moluscos bivalvos	230 NMP/100 g de carne y líquido valvar
	Moluscos cefalópodos y gasterópodos	230 NMP/100 g de carne
Vibrio cholerae O:1 y no O:1	Moluscos bivalvos	Ausente en 50 g
	Demás productos de la pesca*	Ausente en 50 g
Salmonella spp	Todas	Ausente en 25 g
Vibrio parahaemolyticus *	Moluscos bivalvos y crustáceos	104 NMP/g
Vibrio vulnificus *	Moluscos bivalvos	Ausente en 50 g
*Listeria monocytogenes**	Todas	Ausente en 25 g
*Clostridium botulinum**	Todas (sólo en productos preenvasados al vacío)	Ausente
Staphylococcus aureus	Todas	1000 UFC/g
Enterotoxinas estafilococcicas *	Todas	Negativo

* Bajo situaciones de emergencia sanitaria la Secretaría de Salud sin perjuicio de las atribuciones de otras Dependencias del Ejecutivo Federal, determinará los casos en los que habrá de identificar la presencia del patógeno o la toxina.

7.1.5.2 Productos de la pesca procesados

7.1.5.2.1 Esterilizados comercialmente

ESPECIFICACION	LIMITE MAXIMO
Termófilos anaerobios esporulados	Negativo
Mesófilos anaerobios esporulados	Negativo
Termófilos aerobios esporulados	Negativo
Mesófilos aerobios esporulados	Negativo
Toxina botulínica*	Ausente en todo el contenido del envase
Enterotoxina estafilocóccica*	Ausente en todo el contenido del envase

* Bajo situaciones de emergencia sanitaria la Secretaría de Salud, sin perjuicio de las atribuciones de otras dependencias del Ejecutivo Federal, determinará los casos para identificar la presencia de esta toxina.

7.1.5.2.2 Pasteurizados

ESPECIFICACIONES	LIMITE MAXIMO
Salmonella spp	Ausente en 25 g
Enterotoxina estafilocóccica*	Negativo
Coliformes fecales y/o *E. coli*	< 10 UFC/g
Listeria monocytogenes *	Ausente en 25 g
Clostridium botulinum *	Ausente
Vibrio cholerae O:1 y no O:1*	Ausente en 50 g
*Vibrio parahemolitycus**	Negativo

* Bajo situaciones de emergencia sanitaria la Secretaría de Salud, sin perjuicio de las atribuciones de otras dependencias del Ejecutivo Federal, determinará los casos para identificar la presencia del patógeno o la toxina.

7.1.5.2.3 Ahumados

ESPECIFICACIONES	LIMITE MAXIMO
Coliformes fecales	< 230 NMP/g
Salmonella spp	Ausente en 25 g
Enterotoxina estafilocóccica *	Negativo
Listeria monocytogenes *	Ausente en 25 g

Listeria monocytogenes *	Ausente en 25 g
Clostridium botulinum *	Ausente
Vibrio cholerae O:1*	Ausente en 50 g

* Bajo situaciones de emergencia sanitaria la Secretaría de Salud, sin perjuicio de las atribuciones de otras Dependencias del Ejecutivo Federal, determinará los casos para identificar la presencia del patógeno o la toxina.

7.1.5.2.4 Salados y secos-salados

ESPECIFICACION	LIMITE MAXIMO
Enterotoxina estafilocóccica*	Negativo
Salmonella spp	Ausente en 25 g

* Bajo situaciones de emergencia sanitaria la Secretaría de Salud, sin perjuicio de las atribuciones de otras Dependencias del Ejecutivo Federal, determinará los casos para identificar la presencia de esta toxina.

7.1.5.2.5 Semipreparados

Producto	Enterotoxina estafilocóccica*	*Salmonella* spp	Coliformes fecales	*Vibrio cholerae O:1 y no O:1 toxigénico**
Crudos o precocidos, empanizados o rebozados (capeados), empanadas y congelados	Negativo	Ausente en 25 g	< 230 NMP/g	Ausente en 50 g
Crudos, marinados o en salmuera	Negativo	Ausente en 25 g	< 230 NMP/g	Ausente en 50 g

* Bajo situaciones de emergencia sanitaria la Secretaría de Salud, sin perjuicio de las atribuciones de otras Dependencias del Ejecutivo Federal, determinará los casos para identificar la presencia del patógeno o la toxina.

7.1.5.2.6 Emulsionados

ESPECIFICACION	LIMITE MAXIMO
Enterotoxina estafilocóccica *	Negativo
Salmonella spp	Ausente en 25 g
Coliformes fecales	< 230 NMP/g

* Bajo situaciones de emergencia sanitaria la Secretaría de Salud, sin perjuicio de las atribuciones de otras Dependencias del Ejecutivo Federal, determinará los casos para identificar la presencia de la toxina.

7.1.6 Parásitos.

7.1.6.1 Durante su producción y antes del despacho al consumo humano, los pescados deben ser sometidos a un examen a contraluz para detectar parásitos visibles.

7.1.6.2 Los pescados no deben exceder los siguientes límites:

ESPECIFICACION	LIMITE MAXIMO
Parásitos del género G*nathostoma* y *Paragonimus* (Sólo en peces de agua dulce o salobre)	Ausente
Parásitos con cápsula >3 mm de diámetro	2/kg de unidad de muestra
Parásitos no encapsulados > 10 mm de longitud	1/kg de unidad de muestra

7.1.7 Biotoxinas marinas.

ESPECIFICACION	ESPECIES	LIMITE MAXIMO
Toxina amnésica de moluscos (Acido domoico)*	Moluscos	20 mg/kg en carne
Toxina neurotóxica de moluscos (Brevitoxina)	Moluscos	20 UR /100 g
Toxina paralizante de moluscos (Saxitoxina)	Moluscos	800μg/kg de carne
Toxina diarreíca de Moluscos (Bioensayo en ratón)*	Moluscos	160 μg/kg
Toxina ciguatera (Ciguatoxina)	Peces de zonas tropicales	2,5 UR / 100g

	y subtropicales	

* Bajo situaciones de emergencia sanitaria la Secretaría de Salud sin perjuicio de las atribuciones de otras Dependencias del Ejecutivo Federal, determinará los casos en los que habrá de identificar la presencia de la toxina.

7.1.8 Metales pesados.

7.1.8.1 Productos frescos, refrigerados y congelados (parte comestible)

ESPECIFICACION	ESPECIES	LIMITE MAXIMO
Arsénico total	Crustáceos y Moluscos bivalvos	80 mg/kg
Cadmio (Cd)	Moluscos Otras	2,0 mg/kg 0,5 mg/kg
Metilmercurio	Pescados como atún, marlín, mero, y bonito Otras	1,0 mgkg 0, 5 mg/kg
Plomo (Pb)	Pescados y crustáceos	0,5 mg/kg
	Moluscos	1 mg/kg

7.1.8.2 Productos de la pesca procesados

ESPECIFICACION	LIMITE MAXIMO (mg/kg)
Cadmio (Cd)	0,5
Metilmercurio	1,0 pescados como atún, marlín, mero, y bonito 0,5 otras
Plomo (Pb)	1,0
Estaño (Sn)*	100,0

* Unicamente para los productos enlatados.

7.1.9 Residuos de medicamentos veterinarios.

Los productos objeto de esta Norma deben cumplir con las especificaciones establecidas para medicamentos veterinarios conforme a los ordenamientos aplicables, considerando que en los productos no debe detectarse residuos de cloranfenicol, nitrofuranos y sulfas.

7.1.10 Aditivos para alimentos.

Unicamente se permite el empleo de los aditivos en los niveles y productos establecidos en el apéndice normativo A de esta norma.

8. Clasificación de áreas

8.1 Para efectos de esta Norma las áreas se clasifican de la siguiente manera, la cual debe demostrarse mediante estudios sanitarios:

8.1.1 Area aprobada.

8.1.1.1 Aquélla que cumple con las especificaciones siguientes:

MICROORGANISMOS	LIMITE MAXIMO
Bacterias coliformes fecales	La mediana o el promedio geométrico del NMP del agua, no excede de 14 NMP/100 mL y no mas del 10% de las muestras excede de 43 NMP/100mL para la prueba de dilución decimal de 5 tubos. El promedio geométrico deberá realizarse mediante un muestreo anual de 30 muestras de cada uno de los puntos de monitoreo.

8.1.1.2 El área aprobada no debe encontrarse bajo los casos mencionados en los incisos del 8.1.5.1.1 al 8.1.5.1.4 del numeral 8.1.5.1.

8.1.1.3 Para mantener el estatus de área aprobada, se debe realizar un monitoreo regular anual de agua y producto.

8.1.2 Area aprobada condicionalmente.

8.1.2.1 Aquélla que cumple con el siguiente criterio:

8.1.2.1 Aquella que cumple con el siguiente criterio:

Las áreas de producción que están sujetas a contaminación microbiológica intermitente, son las que se pueden clasificar como aprobadas condicionalmente, esta alternativa se puede utilizar cuando existe interés sobre un área que esté afectada por eventos de contaminación predecibles en tiempo y la cosecha de moluscos bivalvos sea destinada a venta directa en determinadas épocas del año. Así también, la calidad sanitaria del área puede estar afectada por poblaciones estacionales, fuentes de contaminación no puntuales o por el uso esporádico de muelles o de puertos.

8.1.2.2 Por lo anterior, el área debe estar sujeta a un programa de manejo que contenga los siguientes puntos:

8.1.2.2.1 Evaluación de fuentes potenciales de contaminación en términos de sus efectos en el agua y en el área.

8.1.2.2.2 Monitoreo rutinario de agua de mar y de producto.

8.1.2.2.3 Disponibilidad de instalaciones y condiciones de operación para el tratamiento de aguas residuales descargadas directa o indirectamente por el efluente en el área.

8.1.2.2.4 Condiciones para la apertura o clausura. Esta área está sujeta a reaperturas o clausuras, las cuales están determinadas por los resultados de los análisis bacteriológicos establecidos para un área aprobada y prohibida respectivamente.

8.1.3 Area restringida.

8.1.3.1 Aquélla que cumple con las especificaciones siguientes:

MICROORGANISMOS	LIMITE MAXIMO
Bacterias coliformes fecales	La mediana o el promedio geométrico del NMP del agua, no excede de 88 NMP/100 mL y no mas del 10% de las muestras excede de 260 NMP/100mL para la prueba de dilución decimal de 5 tubos. El promedio geométrico deberá realizarse mediante un muestreo anual de 30 muestras de cada uno de los puntos de monitoreo.

8.1.3.2 El área restringida no debe encontrarse bajo los casos mencionados en los incisos del 8.1.5.1.1 al 8.1.5.1.4 del numeral 8.1.5.1.

8.1.3.3 Los moluscos cosechados en áreas restringidas deben ser reinstalados o depurados o sometidos a un tratamiento térmico u otro proceso que elimine organismos patógenos.

8.1.4 Area condicionalmente restringida.

8.1.4.1 Aquella que cumple con:

8.1.4.1.1 Las especificaciones de área restringida cuando se encuentra en condición abierta.

8.1.4.1.2 Las condiciones establecidas para área prohibida cuando está en condición cerrada.

8.1.4.2 Los moluscos bivalvos provenientes de esta área deben reinstalarse o depurarse o ser sometidos a un tratamiento térmico u otro proceso que elimine organismos patógenos.

8.1.5 Area prohibida.

8.1.5.1 Aquella en la cual la calidad del agua rebase los límites máximos establecidos para el área restringida y en los siguientes casos:

8.1.5.1.1 Que estén contaminadas con aguas residuales, domésticas, municipales, industriales, agrícolas, de embarcaciones, plataformas u otras instalaciones lacustres o marinas;

8.1.5.1.2 Que estén afectadas por derrames de materiales que contengan sustancias tóxicas como consecuencias de contingencias;

8.1.5.1.3 Que estén afectadas con residuos de material radiactivo;

8.1.5.1.4 Que estén afectadas por marea roja o biotoxinas naturales, diferentes a las presentes en marea roja;

8.1.5.1.5 Que estén sujetas a veda sanitaria o que estén contaminadas por otras fuentes no contempladas en esta Norma, y

8.1.5.1.6 Que no cuente con un estudio sanitario como el señalado en el numeral 3.27.

8.2 Las áreas de cosecha clasificadas como aprobadas, condicionalmente aprobadas, condicionalmente restringidas y restringidas deberán contar con un programa de monitoreo de fitoplancton y biotoxinas marinas. A partir de los resultados de éste podrá establecerse la aplicación de la veda sanitaria.

9. Muestreo

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

10. Métodos de prueba

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

11. Etiquetado

La información sanitaria que debe figurar en la etiqueta de los productos preenvasados objeto de esta norma, además de cumplir con la NOM-051-SCFI/SSA1-2010, señalada en el apartado de referencias, según corresponda, debe sujetarse a lo siguiente:

11.1 Cuando el producto haya sufrido alguna modificación en su composición nutrimental, la denominación debe corresponder a la establecida en la NOM-086-SSA1-1994, señalada en el apartado de referencias.

11.2 En la lista de ingredientes debe emplearse el nombre específico de los mismos, para el caso de las especies de los productos de la pesca empleadas, debe declararse el nombre común y el nombre científico de la especie de manera que no induzca al consumidor a engaños. Sin interferir con lo establecido en las regulaciones de otras Dependencias excepto los incluidos en la NOM-084-SCFI-1994, señalada en el apartado de referencias.

11.3 Si la identificación del lote corresponde a la fecha de caducidad, se debe anteponer la leyenda: "Lote y fecha de caducidad".

11.4 Los productos refrigerados deben presentar la fecha de caducidad.

11.5 Los productos congelados, deben presentar la fecha de caducidad o de consumo preferente.

11.6 En el caso de los moluscos bivalvos frescos, refrigerados o congelados, debe figurar en la etiqueta la fecha de extracción, área de producción, número de certificado de exportación e importación del producto cuando proceda, día, mes y año de elaboración.

11.7 Leyendas de conservación.

11.7.1 Los productos de la pesca refrigerados, deben incluir el texto "Manténgase en refrigeración a máximo 4ºC" u otra análoga.

11.7.2 Los productos congelados deben incluir el texto "Consérvese en congelación a una temperatura máxima de - 18ºC" y "una vez descongelado, no debe volverse a congelar" u otras análogas.

11.7.3 Para los productos crudos o precocidos, la etiqueta debe contener una leyenda que refiera al consumo del producto cocido, como: "El consumo crudo o poco cocido de productos de la pesca, puede incrementar el riesgo de adquirir una enfermedad alimentaria" o leyenda análoga.

11.8 En el caso de que los productos objeto de esta norma contengan o incluyan productos preenvasados como parte de promociones u obsequios, tales como salsas, aderezos, etc., se debe incluir en el envase del producto de promoción u obsequio, cuando menos la siguiente información: lista de ingredientes, identificación del responsable del proceso, lote y fecha de caducidad, cuando aplique.

11.9 Especificaciones para productos a granel.

11.9.1 Los productos envasados en punto de venta, deben presentar en etiqueta adherida, cuando menos la siguiente información:

11.9.1.1 Nombre o denominación del producto.

11.9.1.2 Fecha de envasado o de caducidad.

11.9.1.3 Leyendas de conservación.

12. Envase y embalaje

12.1 Los productos objeto de esta norma se deben envasar con materiales inocuos y resistentes a distintas etapas del proceso, de tal manera que no alteren las características físicas, químicas y sensoriales de estos últimos.

12.2 Las superficies interiores de los envases no deben reaccionar con el contenido.

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

13. Concordancia con normas internacionales

Esta norma es parcialmente equivalente con las siguientes normas internacionales:

13.1 Codex Alimentarius. ALINORM 01/18. Apéndice V. Anteproyecto de Código Internacional Recomendado de Prácticas para el Pescado y los Productos Pesqueros.

13.2 Codex Alimentarius. ALINORM 01/18. Apéndice III. Anteproyecto de enmienda a la norma de sardinas y productos análogos en conserva.

13.3 Codex Alimentarius. ALINORM 01/18. Apéndice VI. Anteproyecto de norma para el arenque del Atlántico salado y el espadín salado.

13.4 Codex Alimentarius. ALINORM 95/18. Apéndice VII. Proyecto de norma revisada para barritas, porciones y filetes de pescado empanados o rebozados congelados rápidamente

pescado empanados o rebozados congelados rápidamente.

13.5 Codex Alimentarius. ALINORM 95/18. Apéndice IX. Proyecto de norma revisada para la carne de cangrejo en conserva.

13.6 Codex Alimentarius. ALINORM 95/18. Apéndice X. Proyecto de norma revisada para pescados en conserva.

13.7 Codex Alimentarius. ALINORM 95/18. Apéndice XI. Proyecto de norma revisada para el salmón en conserva.

13.8 Codex Alimentarius. ALINORM 95/18. Apéndice XII. Proyecto de norma revisada para las sardinas y productos análogos en conserva.

13.9 Codex Alimentarius. ALINORM 95/18. Apéndice XIII. Proyecto de norma revisada para los camarones en conserva.

13.10 Codex Alimentarius. ALINORM 95/18. Apéndice XIV. Proyecto de norma revisada para el atún y el bonito en conserva.

13.11 Codex Alimentarius. ALINORM 95/18. Apéndice XV. Proyecto de norma revisada para pescado salado y pescado seco salado de la familia gadidae.

14. Bibliografía

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

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

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

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

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

14.6 NOM-Z-13-1997. Guía para la Redacción, Estructuración y Presentación de las Normas Oficiales Mexicanas.

14.7 Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA), 1998. Guía de Peligros y Controles de Pescados y de Productos Pesqueros del FDA, E.U.A.

14.8 AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. 16th Edition. U.S.A.

14.9 Australia New Zealand Food Authority. Standard 1.4.1 Subscribe to Food Standards Code. Contaminants and Natural Toxicants.

14.10 Canadian Food Inspection Agency. 20/07/93. General fresh & frozen finfish product standard, chapter 3, 5, standard 3.

14.11 Comunidades Europeas, 28.9.2001. Decisión de la Comisión de 27 de septiembre de 2001, relativa a determinadas medidas de protección con respecto a determinados productos de la pesca y de la acuicultura destinados al consumo humano y originarios de Indonesia. Diario Oficial de las Comunidades Europeas (2001/705/CE).

14.12 Code of Federal Regulations. 1991. Regulations governing processed fishery products and U.S. standards for grades of fishery products. Revised as October 1. Washington D.C. U.S.A.

14.13 Code of Federal Regulations. 1990. "Fish and Shellfish. Washington D.C. Revised as of April 1.

14.14 Codex Alimentarius. 1981. Proyecto de norma revisada para los camarones en conserva. CODEX Stan 37-1981. Roma, Italia.

14.15 Codex Alimentarius. 1981. Proyecto de norma revisada para la carne de cangrejo en conserva. Codex Stan 90-1981. Roma, Italia.

14.16 Comisión del Codex Alimentarius. 1981. Proyecto de Norma Revisada para las Sardinas y Productos Análogos en Conserva. CODEX STAN 94-1981. Roma, Italia.

14.17 Codex Alimentarius. 1981. Proyecto de norma revisada para pescados en conserva. Codex Stan 119-1981. Roma, Italia.

14.18 Codex Alimentarius. 1981. Proyecto de norma revisada el salmón en conserva. Codex Stan 3-1981. Roma, Italia.

14.19 Codex Alimentarius. 1981. Proyecto de norma revisada para del atún y el bonito en conserva. Codex

Stan 70-1981. Roma, Italia.

14.20 Comisión del Codex Alimentarius. 1989. Norma del Codex para Pescados y Productos Pesqueros STAN.94 Roma, Italia. Miércoles 20 de agosto de 2003 DIARIO OFICIAL 75.

14.21 Comisión del Codex Alimentarius. Informe de la 29a. reunión del Comité del Codex sobre pescado y productos pesqueros. Trondheim, Noruega, 18-23 de febrero de 2008.14.35 Food and Agriculture Organization of the Nations. 1989. Food Safety Regulations Applied to Fish by Major Importing Countries. Roma, Italia.

14.22 Comisión del Codex Alimentarius. Informe de la 29a. reunión del Comité del Codex sobre pescado y productos pesqueros. Trondheim, Noruega, 18-23 de febrero de 2008.

14.23 Directiva por la que se fijan las normas sanitarias aplicables a la producción y a la puesta en el mercado de los productos pesqueros. (91/493/CEE).

14.24 Directrices para emitir aseguramiento de calidad de productos de la pesca. México, D.F. 1992.

14.25 Directrices del Codex para la evaluación sensorial de pescados y los mariscos en laboratorio CAC/GL 31-1999

14.25 Directrices del Codex para la evaluación sensorial de pescados y los moluscos en laboratorio CAC/GL 31-1999

14.26 Epidemiología. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Núm. 3 Vol. 19. México, D.F. 2002.

14.27 Food and Agriculture Organization. 1989. Food Safety Regulations Applied to Fish by Major Importing Countries.

14.28 Food and Agriculture Organization FAO/OMS Comité del Codex Alimentarius 1998. Documento de posición sobre el arsénico. La Haya, Holanda.

14.29 Food and Agriculture Organization. 1989. "Food Safety Regulations Applied to Fish by Major Importing Countries".

14.30 Food and Drug Administration EDRO. 1984. Compliance Guidelines Branch, DFRG Chapter 8-Fish and Sea Food Guide 7108.07 U.S.A.

14.31 Food and Agriculture Organization of the Nations. 1989. Food Safety Regulations Applied to Fish by Major Importing Countries. Roma, Italia.

14.32 Guía Técnica del Programa Mexicano de Moluscos Bivalvos. Secretaría de Salud. México, D.F. 2009.

14.33 Industria de Conservas de Productos de la Pesca. Guía para la aplicación del Sistema de Análisis de Riesgos y Control de Puntos Críticos (ARCPC). Series agroalimentarias. Cuadernos de Calidad. pp. 88-100. AECI e IICA. 1999.

14.34 Manual de Técnicas y Procedimientos para Análisis Microbiológico y Alimentos Enlatados. Laboratorio Nacional de Salud Pública. México, D.F. 1989.

14.35 Normas y métodos de productos de la pesca de la agencia de inspección de alimentos de Canadá y de Estados Unidos de América como los estándares grados de frescura camarón fresco y congelado. indicadores de evaluación sensorial de productos de la pesca.

14.36 Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. Comisión del Codex Alimentarius. Informe de la 24a. Reunión del Comité del Codex sobre Pescado y Productos Pesqueros.

14.37 Reglamento (CE) No. 178/2002 (por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaría, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria)

14.38 Reglamento (CE) No. 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios.

14.39 Reglamento (CE) No. 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal.

14.40 Reglamento /CE) No 854/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano.

14.41 Reglamento (CE) 2406/96 del Consejo por el que se establecen normas comunes para

determinados productos pesqueros.

14.42 Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA). Estándares de calidad para productos marinos. República de Chile.

14.43 Andrés Silvestre Alejandro. 1996. Toxicología de los Alimentos. Editorial Hemisferio Sur. pp. 111-152.

14.44 Andrew R. Et al. 2000. Incidence of foodborne pathogens on European fish. Food Control 12 (2001) 67-71.

14.45 Badui D.S. 1988. Diccionario de Tecnología de los Alimentos. Ed. Alambra Mexicana.

14.46 Brown, L.D. & R. Dorn. 1977. "Fish and Shellfish and Human Health".

14.47 Brownsell, V.L. y col. 1993. Deterioro y Conservación de los Alimentos. En la Ciencia aplicada en el estudio de los Alimentos. Ed. Diana. México, D.F.

14.48 Fernández, E. 2000. Microbiología e inocuidad de los alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro, México.

14.49 Food and Drug Administration. 2007 National Shellfish Sanitation Program. Guide for the control of moluscan shellfish. Revision. U.S.A.

14.50 Hersom A.C. à Hullonded. 1969. Canned Foods 2nd Ed. J & Churchill Ltd. London.

14.51 Kietzwann/Priebe/Reichsteien. 1974. "Inspección Veterinaria de Pescados. Ed. Acribia. Zaragoza, España.

14.52 Lamothe-Argumedo, R. 1997. Hospederos definitivos, intermediarios y paraténicos de Gnathostoma en Veracruz y Oaxaca, México. Cuad. Méx. Zool. 3(1) 22-28, 1997.

14.53 Lamothe-Argumedo, R. et al. 1998. Estado actual de la gnastostomiasis en México, Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. México, Ser. Zool. 69 (1): 23-27.

14.54 Leuger, A. et al. 1999. Marine Toxins. Wien Med. Wochenschr 151 (5-6): 122-5.

14.55 Lipp EK. 1997. The role of seafood in foodborne in the United States of America. Rev. Sci Tech Aug: 16(2): 620-40.

14.56 Ministerio de Salud. 1986. Disposiciones sanitarias sobre productos de la pesca. República de Colombia.

14.57 Rodríguez, A. M. 2001. Gnatostomiasis. Presentación de un caso. Rev. Cent. Dermatol Pascua Vol. 10, Núm. 1, Ene-Abr 2001 pp. 15-17.

Abr 2001 pp: 15-17.

14.58 Ruiz Dur Fernández. 1978. "Recursos Pesqueros de las Costas de México". Ed. Limusa México, D.F.

14.59 Sierra-Beltran, AP et al. 1998. An overview of de marine food poisoning in México. Toxicon Nov.; 36(11): 1493-502.

14.60 Torres Vitela, R. 1999. Agentes patógenos transmitidos por alimentos. Vol. 1 Editor Universidad de Guadalajara.

14.61 Wright JL, et al. 1990. Chemistry, biology, and toxicology of domoic acid and its isomers. Can Dis Wkly Rep sep;16 suppl 1E:21-6.

14.62 Los criterios para la verificación de la venta de productos pesqueros, de Subsecretaría de Regulación y Fomento Sanitario de la Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios.

15. Observancia de la norma

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

16. Vigencia

La presente Norma entrará en vigor a los noventa días naturales contados a partir de la fecha de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

Transitorio

Unico.- Con la entrada en vigor de la presente Norma Oficial Mexicana cancela las siguientes normas:

- Norma Oficial Mexicana NOM-027-SSA1-1993. Bienes y Servicios. Productos de la pesca. Pescados frescos refrigerados y congelados. Especificaciones sanitarias, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 3 de marzo de 1995.
- Norma Oficial Mexicana NOM-028-SSA1-1993. Bienes y Servicios. Productos de la pesca. Pescados en conserva. Especificaciones sanitarias, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 3 de marzo de 1995.
- Norma Oficial Mexicana NOM-029-SSA1-1993. Bienes y Servicios. Productos de la pesca. Crustáceos frescos refrigerados y congelados. Especificaciones sanitarias, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 27 de febrero de 1995.
- Norma Oficial Mexicana NOM-030-SSA1-1993. Bienes y Servicios. Productos de la pesca. Crustáceos en conserva. Especificaciones sanitarias, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 31 de enero de 1995.
- Norma Oficial Mexicana NOM-031-SSA1-1993. Bienes y Servicios. Productos de la pesca. Moluscos bivalvos frescos refrigerados y congelados. Especificaciones sanitarias, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 6 de marzo de 1995.
- Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA1-1993. Bienes y Servicios. Productos de la pesca. Moluscos bivalvos en conserva. Especificaciones sanitarias, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 6 de marzo de 1995.
- Norma Oficial Mexicana NOM-129-SSA1-1995. Bienes y Servicios. Productos de la pesca: secos-salados, ahumados, moluscos cefalópodos y gasterópodos, frescos-refrigerados y congelados. Disposiciones y especificaciones sanitarias, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 10 de diciembre de 1997.

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 3 de noviembre 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

ADITIVOS PERMITIDOS

Se podrán emplear los aditivos enlistados a continuación en los productos y concentraciones establecidas, según corresponda al producto en cuestión.

A.1. Productos de la pesca frescos, refrigerados y congelados

ADITIVO	PRODUCTO	LIMITE MAXIMO (mg/kg)
Ascorbato de potasio Ascorbato de sodio	Pescados y crustáceos	1000 *
Acido cítrico	Crustáceos	BPF
Etilendiamino tetracetato disódico (EDTA)	Crustáceos	250

Fosfato tricálcico	Pescados	5000 **
Metabisulfito de sodio Metabisulfito de potasio	Crustáceos	100
Polifosfato tetrapotásico	Pescados	5000 **
Pirofosfato tetrasódico	Pescados	5000 **
Polifosfato de sodio	Pescados	5000 **
Fosfato monopotásico	Pescados	5000 **
Fosfato monosódico	Pescados	5000 **
Sulfito de sodio Sulfito de potasio	Crustáceos	100
Trifosfato pentapotásico	Pescados	5000 **
Trifosfato pentasódico	Pescados	5000 **

*Expresado como ácido ascórbico.

**Expresado como P2O5 solos o combinados.

A.2. Productos de la pesca procesados

ADITIVO	PRODUCTO	LIMITE MAXIMO (mg/kg)
Acetato de almidón	Pescados	20 g/kg solos o mezclados
	Atún y bonita	20 g/kg solos o mezclados
Acido acético glacial	Pescados	BPF
	Atún y bonita	BPF
Acido algínico	Pescados	20 g/kg solos o mezclados
	Atún y bonita	20 g/kg solos o mezclados
Acido cítrico	Cangrejo	BPF
	Pescados	BPF
	Atún y bonita	BPF
Acido fosfórico	Cangrejo	10 g/kg solos o mezclado expresados como P2O5
	Camarones	850 mg/kg de producto final
Acido láctico	Pescados	BPF
	Atún y bonita	BPF
Adipato acetilado de dialmidón	Pescados	60 g/kg solos o mezclados
	Atún y bonita	60 g/kg solos o mezclados
Agar	Pescados	20 g/kg solos o mezclados
	Atún y bonita	20 g/kg solos o mezclados
Alginato de amonio	Pescados	20 g/kg solos o mezclados
	Atún y bonita	20 g/kg solos o mezclados
Alginato de calcio	Pescados	20 g/kg solos o mezclados
	Atún y bonita	20 g/kg solos o mezclados
Alginato de potasio	Pescados	20 g/kg solos o mezclados
	Atún y bonita	20 g/kg solos o mezclados

Alginato de sodio	Pescados	20 g/kg solos o mezclados
	Atún y bonita	20 g/kg solos o mezclados
Almidón hidroxipropilado	Pescados	20 g/kg solos o mezclados
	Atún y bonita	20 g/kg solos o mezclados
Almidón blanqueado	Atún y bonita	BPF
Butilhidroxitolueno	Atún y bonita	100 ppm
Carboximetilcelulosa sódica	Pescados	2,5 g/kg
	Atún y bonita	2,5 g/kg
Carragenina	Pescados	20 g/kg solos o mezclados
	Atún y bonita	20 g/kg solos o mezclados
Dialmidón glicerol	Pescados	60 g/kg solos o mezclados
	Atún y bonita	60 g/kg solos o mezclados
Dialmidón glicerol hidroxipropilado	Pescados	60 g/kg solos o mezclados
	Atún y bonita	60 g/kg solos o mezclados
Etilendiamino tetracetato disódico-cálcico	Cangrejo	250 mg/kg
Camarones final	250 mg/kg de producto	
Fosfato de dialmidón	Pescados	60 g/kg solos o mezclados
	Atún y bonita	60 g/kg solos o mezclados
Fosfato acetilado de dialmidón	Pescados	60 g/kg solos o mezclados
	Atún y bonita	60 g/kg solos o mezclados
Fosfato de hidroxipropil dialmidón	Pescados	60 g/kg solos o mezclados
	Atún y bonita	60 g/kg solos o mezclados
Fosfato de monoalmidón	Pescados	60 g/kg solos o mezclados
	Atún y bonita	60 g/kg solos o mezclados
Glicerol de dialmidón acetilado	Pescados	60 g/kg solos o mezclados
	Atún y bonita	60 g/kg solos o mezclados
Glutamato monosódico	Cangrejo	500 mg/kg
Goma de algarrobo	Pescados	20 g/kg solos o mezclados
	Atún y bonita	20 g/kg solos o mezclados
Goma guar	Pescados	20 g/kg solos o mezclados
	Atún y bonita	20 g/kg solos o mezclados
Goma tragacanto	Pescados	20 g/kg solos o mezclados
	Atún y bonita	20 g/kg solos o mezclados
Goma xantano	Pescados	20 g/kg solos o mezclados
	Atún y bonita	20 g/kg solos o mezclados
Lactato de sodio	Embutidos, esterilizados comercialmente; Atún y bonita esterilizados comercialmente y en recipientes de cierre hermético y sometidos a tratamiento térmico. Pescados envasados en	BPF

	recipientes de cierre hermético y sometidos a tratamiento térmico.	
Pectinas y las siguientes sales: Pectato de amonio, de calcio, de potasio o de sodio	Pescados Atún y bonita	2,5 g/kg
Pirofosfato disódico Pirofosfato tetrasódico	Cangrejo Atún y bonita	10 g/kg expresados como P2O5 o mezclados
Tartrazina	Camarones	30 mg/kg de producto final, solos o mezclados
Amarillo ocaso FCF	Camarones	30 mg/kg de producto final, solos o mezclados

A.3. Productos de la pesca ahumados

ADITIVO	LIMITE MAXIMO
Bicarbonato de sodio	BPF
Butilhidroxianisol	100 ppm
Dióxido de silicio amorfo	BPF
Eritorbato de sodio	BPF
Nitrito y nitrato de sodio (expresados como nitrito de sodio)	156 mg/kg
Sorbato de potasio	0,1%

A.4. Productos de la pesca salados y secos-salados

ADITIVO	PRODUCTO	LIMITE MAXIMO
Acido sórbico; y las siguientes sales: Sorbato de sodio, potasio y calcio	Pescado salado y pescado seco y salado	200 mg/kg del producto final solos o mezclados, expresados como ácido sórbico.

A.5. Productos de la pesca semipreparados: crudos o precocidos, empanizados o rebozados y congelados

ADITIVO	PRODUCTO	LIMITE MAXIMO
Acetato de almidón	En el rebozado o empanado	BPF
Acido ascórbico o sus sales de sodio o de potasio	En filetes y carne de pescado picada	BPF
Acido cítrico o sus sales de sodio o potasio	Carne de pescado picada En el rebozado o empanado	BPF
Acido láctico	En el rebozado o empanado	BPF
Acido L-glutámico	En el rebozado o empanado	BPF
Adipato acetilado de dialmidón	En el rebozado o empanado	BPF
Alginato de calcio	En filetes y carne de pescado picada	BPF
Alginato de sodio	En el rebozado o empanado	BPF
Almidón hidroxipropilado.	En el rebozado o empanado	BPF

Almidón oxidado	En el rebozado o empanado	BPF
Almidones tratados con ácidos	En el rebozado o empanado	BPF
Almidones tratados con álcalis	En el rebozado o empanado	BPF
Ascorbato de potasio	Embutidos, semipreparados, crudos o precocidos empanizados o rebozados y congelados, crudos marinados o en salmuera, emulsionados, modificados en su composición, y envasados en recipientes de cierre hermético y sometidos a tratamiento térmico.	BPF
Ascorbato de calcio	Embutidos, semipreparados, crudos o precocidos empanizados o rebozados y congelados, crudos marinados o en salmuera, emulsionados, modificados en su composición, y envasados en recipientes de cierre hermético y sometidos a tratamiento térmico.	BPF
Beta caroteno sintético	En el rebozado o empanado	100 mg/kg, solos o en combinación
Beta-apo-8´-carotenal	En el rebozado o empanado	100 mg/kg, solos o en combinación
Carbonato de amonio	En el rebozado o empanado	BPF
Carbonato de potasio	En el rebozado o empanado	BPF
Carbonato de sodio	En el rebozado o empanado	BPF
Carbonato de amonio hidrogenado	En el rebozado o empanado	BPF
Carbonato de potasio hidrogenado	En el rebozado o empanado	BPF
Carbonato de sodio hidrogenado	En el rebozado o empanado	BPF*
Carboximetilcelulosa de sodio	Carne de pescado picada En el rebozado o empanado	BPF
Carragenina	Carne de pescado picada En el rebozado o empanado	BPF
Color Caramelo clase I	En el rebozado o empanado	BPF
Extracto de annato (extracto De semillas de *Bixa orellana*)	En el rebozado o empanado	20 mg/kg expresada como bixina
Fosfato de aluminio y sodio	En el rebozado o empanado	1g/kg, solos o en combinación, expresados como P2O5
Fosfato de dialmidón	En el rebozado o empanado	BPF
Fosfato acetilado de dialmidón	En el rebozado o empanado	BPF
Fosfato de dialmidón fosfatado	En el rebozado o empanado	BPF
Fosfato de hidroxipropil dialmidón	En el rebozado o empanado	BPF
Fosfato de monoalmidón	En el rebozado o empanado	BPF
Fosfato de calcio dihidrogenado	En el rebozado o empanado	1g/kg, solos o en combinación, expresados como P2O5
Fosfato de potasio dihidrogenado	En filetes y carne de pescado picada	10 g/kg solos o mezclados expresados como P2O5 (con inclusión de los fosfatos naturales)

		naturales)
Fosfato de sodio dihidrogenado	En filetes y carne de pescado picada	10 g/kg solos o mezclados expresados como P2O5 (con inclusión de los fosfatos naturales)
Fosfato de calcio hidrogenado	En el rebozado o empanado	1g/kg, solos o en combinación, expresados como P2O5
Glutamato monopotásico	En el rebozado o empanado	BPF
Goma de algarrobo	Carne de pescado picada En el rebozado o empanado	BPF
Goma guar	Carne de pescado picada En el rebozado o empanado	BPF
Goma xantano	Carne de pescado picada En el rebozado o empanado	BPF
Hidroxipropil metil celulosa	En el rebozado o empanado	BPF
Hidroxipropil celulosa	En el rebozado o empanado	BPF
Lecitina	En el rebozado o empanado	BPF
Metil celulosa	Carne de pescado picada En el rebozado o empanado	BPF
Metil etil celulosa	En el rebozado o empanado	BPF
Mono y diglicéridos	En el rebozado o empanado	BPF
Palmitato de ascorbilo	En filetes y carne de pescado picada	1g/kg, expresados como ácido cítrico, solo o en combinación con ácido ascórbico.
Pectinas	Carne de pescado picada En el rebozado o empanado	BPF
Pirofosfato disódico	En el rebozado o empanado	1g/kg, solos o en combinación, expresados como P2O5
Pirofosfato tetrapotásico	En filetes y carne de pescado picada	10 g/kg solos o mezclados expresados como P2O5 (con inclusión de los fosfatos naturales)
Pirofosfato tetrasódico	En filetes y carne de pescado picada	10 g/kg solos o mezclados expresados como P2O5 (con inclusión de los fosfatos naturales)
Polifosfato de sodio	En filetes y carne de pescado picada	10 g/kg solos o mezclados expresados como P2O5 (con inclusión de los fosfatos naturales)
Trifosfato pentapotásico	En filetes y carne de pescado picada	10 g/kg solos o mezclados expresados como P2O5 (con inclusión de los fosfatos naturales)
Trifosfato pentasódico	En filetes y carne de pescado picada	10 g/kg solos o mezclados expresados como P2O5 (con inclusión de los fosfatos naturales)

A.6. Productos de la pesca emulsionados

ADITIVO	LIMITE MAXIMO
Acetato de almidón	BPF

Acetato de almidón	BPF
Acido algínico	BPF
Acido ascórbico y su sal de sodio	BPF
Acido cítrico	BPF
Acido eritórbico	BPF
Acido L-glutámico	BPF
Acido sórbico y sus sales de sodio y potasio	1 g/kg la suma de los conservadores no podrá ser mayor a 1 g/kg
Adipato acetilado de dialmidón	BPF
Agar	BPF
Alginato de amonio	BPF
Alginato de calcio	BPF
Alginato de potasio	BPF
Alginato de sodio	BPF
Almidón hidroxipropilado	BPF
Ascorbato de potasio	BPF
Ascorbato de calcio	BPF
Carragenina	BPF
Dialmidón glicerol Hidroxipropilado	60 g/kg solos o mezclados
Etilendiamino tetracetato disódico cálcico	75 mg/kg en producto final
Fosfato de dialmidón	BPF
Fosfato acetilado de dialmidón	BPF
Fosfato de hidroxipropil dialmidón	BPF
Fosfato de monoalmidón	BPF
Glicerol de dialmidón acetilado	60 g/kg solos o mezclados
Glutamato monosódico	BPF
Goma de algarrobo	BPF
Goma guar	BPF
Goma tragacanto	BPF
Goma xantano	BPF
Nitratos o nitritos de sodio o potasio	0,15 g/kg expresados como nitritos
Pirofosfato disódico	5 g/kg solos o mezclados expresados como P2O5
Pirofosfato tetrasódico	5 g/kg solos o mezclados, expresados como P2O5
Rojo allura AC y sus lacas	100 mg/kg de producto final
Mezcla de tocoferoles concentrados	0,05 g/kg

APENDICE NORMATIVO B

B.1 Precauciones generales de seguridad.

B.1.1 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.

B.1.2 Para la aplicación de los siguientes métodos analíticos se debe cumplir con las Buenas Prácticas de Laboratorio.

B.2 DETERMINACION DE MATERIA EXTRAÑA EN PESCADO (ENLATADO) Y PRODUCTOS DE LA PESCA FRESCOS REFRIGERADOS Y CONGELADOS.

REFRIGERADOS Y CONGELADOS.

B.2.1 Principio del método.

La materia extraña se separa por flotación y posteriormente se filtra para su observación al microscopio.

B.2.2 Equipo.

B.2.2.1 Balanza granataria con una precisión de 0,1 g

B.2.2 Microscopio binocular estereoscópico con objetivos que pueden ser de 3, 6, 7 y 10 X y oculares apareados de amplio campo visual de 10, 30 y 100 X respectivamente.

B.2.2.3 Equipo de filtración al vacío.

B.2.2.4 Lámpara para el microscopio o luz natural equivalente.

B.2.2.5 Parrilla de calentamiento con agitación magnética.

B.2.3 Materiales.

B.2.3.1 Percolador de 2 L.

B.2.3.2 Matraz de 1,5 L

B.2.3.3 Embudo Buchner.

B.2.3.4 Vaso de precipitado de 600 mL.

B.2.3.5 Papel de filtración rápida rayado para conteo con líneas paralelas de aproximadamente 5 mm de separación.

B.2.3.6 Material de uso común en el laboratorio.

B.2.4 Reactivos.

B.2.4.1 Todos los reactivos deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y por agua se entiende agua destilada.

B.2.4.2 Isopropanol (C_3H_8O)

B.2.4.3 Acido clorhídrico (HCl)

B.2.4.4 Aceite mineral. Aceite de parafina, blanco y ligero. Con un peso específico de 0,840-0,860 (25 ºC)

B.2.4.5 Solución detergente al 5%

B.2.5 Procedimiento.

B.2.5.1 Pesar 225 g de muestra y transferir a un matraz de 1,5 L. Romper los grumos con espátula. En el caso de productos enlatados, lavar la lata completamente con pequeñas cantidades de isopropanol y adicionar estos lavados al matraz.

B.2.5.2 Añadir 50 mL de HCl y llevar a un volumen de 800 mL con agua. Agitar magnéticamente y llevar a ebullición durante 20 minutos (si el producto forma espuma adicionar agua ocasionalmente)

B.2.5.3 Adicionar 50 mL de aceite mineral y agitar magnéticamente durante 5 minutos manteniendo la ebullición.

B.2.5.4 Transferir al percolador el cual previamente contiene aproximadamente 250 mL de agua. Mantener el matraz de 1,5 L para llenar el percolador con agua durante los ciclos de rellenado.

B.2.5.5 Llenar el percolador con agua caliente (55-70ºC) a unos 3 cm de la parte superior. Dejar en reposo durante 3 minutos y drenar el contenido a aproximadamente 3 cm de la parte más baja de la capa de aceite (si existen grandes cantidades de sólidos suspendidos, dejar más tiempo en reposo para permitir la separación del aceite)

B.2.5.6 Repetir el drenado y las etapas de rellenado a intervalos de 3 minutos hasta que la fase acuosa esté clara. Finalmente drenar el percolador lentamente a un volumen mínimo de fase acuosa sin perder la fase oleosa.

B.2.5.7 Drenar la fase oleosa a un matraz de 600 mL. Lavar el percolador con agua caliente, con solución detergente al 5%, agua e isopropanol en secuencia, usando aproximadamente 50 mL por cada lavado.

B.2.5.8 Colectar los lavados en el matraz de 600 mL. Filtrar a través del papel y observar al microscopio.

B.2.5.9 Informe de la prueba.

B.3. BIOENSAYO PARA TOXINA PARALIZANTE EN MOLUSCOS BIVALVOS.

B.3.1 Materiales

B.3.1.1 Ratones machos albinos, sanos, cepa Webster Suiza, con un peso de 19 a 21 gramos. Los animales que pesan de 17 a 19 y de 21 a 23 gramos también pueden ser utilizados en ausencia de animales con el intervalo de peso deseado. No reutilizar ratones sobrevivientes.

B.3.1.2 Reactivos

B.3.1.2.1 Solución patrón de saxitoxina de100 µg/mL.

B.3.1.2.2 Solución de referencia de saxitoxina de1 µg/mL

B.3.1.2.3 Medir 1 mL de solución patrón en un matraz volumétrico de 100 mL, y llevar al volumen con agua destilada

acidificada con HCl (pH=3). Esta solución es estable por varias semanas si se almacena a 3 o 4 °C y el pH está entre 2,0 y 4,0.

B.3.1.2.4 Soluciones de ácido clorhídrico 0,5 N y 0,18 N.

B.3.2 Procedimiento

B.3.2.1 Precaución: Usar guantes de hule, cuando se manipulen materiales que puedan contener toxina paralizante de los moluscos.

B.3.2.2 Acondicionamiento del bioensayo.

B.3.2.3 Diluir alícuotas de 10 mL de la solución de referencia con 10, 15, 20, 25 y 30 mL de agua, respectivamente. Posteriormente inyectar 1 mL de cada dilución por vía intraperitoneal a unos cuantos ratones de prueba.

B.3.2.4 La mediana del tiempo de muerte debe estar entre 5 y 7 minutos. El pH de las diluciones debe estar entre 2 y 4 y en ningún caso debe ser mayor a 4,5.

B.3.2.5 Probar diluciones adicionales con incrementos de 1 mL de agua destilada. Por ejemplo, si la alícuota de 10 mL diluidos con 25 mL de agua mata a los ratones en 5 a 7 minutos, preparar soluciones 10 + 24 y 10 + 26.

B.3.2.6 Inyectar a un grupo de 10 ratones con 2 diluciones (de preferencia 3), que estén dentro del tiempo entre 5 a 7 minutos. Aplicar dosis de 1 mL por vía intraperitoneal a cada ratón.

B.3.2.7 Registrar el tiempo de inyección y de muerte lo más aproximado posible a intervalos de 5 segundos. Si se registran 7 segundos, redondear a 5 segundos. Si se registran 8 segundos redondear a 10 segundos. El tiempo de muerte es el tiempo transcurrido entre el término de la inyección y el último jadeo del ratón.

B.3.2.8 Pesar y anotar el peso de los 10 ratones, aproximando hasta 0,5 gramos e inyectar cada uno con 1 mL de 2 o 3 diluciones de preferencia que provoquen la muerte en una mediana de tiempo de 5 a 7 minutos.

B.3.2.9 Anotar los tiempos de muerte. Si más ratones de un grupo de 10 sobrevive a la inyección de una dilución en particular de la solución de referencia, repetir la inyección en un nuevo grupo de 10 ratones.

B.3.2.10 Antes de proceder a realizar la prueba con el segundo grupo, investigar las variables del procedimiento que pudieron haber provocado los resultados iniciales, tales como filtración, derrame de la mezcla inyectada en el ratón o el no haber inyectado el volumen completo de la solución patrón.

B.3.2.11 Cálculo del factor de corrección (FC)

B.3.2.12 Determinar la mediana del tiempo de muerte para cada grupo de 10 ratones usados con cada dilución. Descartar los resultados para cada grupo de 10 ratones que den una mediana de muerte menor de 5 o mayor de 7 minutos. Si cualquier grupo de 10 ratones produce una mediana de tiempo de muerte en el intervalo de tiempo mencionado, incluir todos los grupos de 10 ratones usados para que los cálculos de la dilución subsecuente o algunas muertes estén en el intervalo deseado.

B.3.2.13 Usar los tiempos de muerte por cada ratón y para cada grupo, en el cual la mediana de tiempo de muerte quede entre 5 y 7 minutos. Determinar las Unidades Ratón correspondientes a partir de la tabla de Sommer's.

B.3.2.14 Con el peso de cada ratón se determina el factor de corrección en la tabla de correcciones de

pesos de ratones. Multiplicar las Unidades Ratón por el factor de conversión del peso para determinar los valores para las Unidades Ratón corregidas por mL de las diluciones seleccionadas. Dividir los µg de toxina/mL calculados en las diluciones seleccionadas por las URC asociadas y así obtener el factor de conversión.

B.3.2.15 Calcular el promedio de FC individuales. El valor resultante es útil para verificar los ensayos de rutina. Este valor representa los microgramos de veneno equivalentes a una UR.

B.3.2.16 Los valores individuales del FC obtenidos en el laboratorio, pueden variar significativamente si no existe un control absoluto de la técnica. Por lo regular el uso de patrones de referencia o patrones secundarios, depende del volumen de ejecución del trabajo de ensayo.

B.3.3 Uso de patrones en el ensayo de rutina de Moluscos Bivalvos.

B.3.3.1 Verificar los valores del FC periódicamente como sigue: si los moluscos son analizados menos de una vez a la semana, determinar el valor del FC cada día que el ensayo sea ejecutado. Para ello inocular 5 ratones con una dilución apropiada de la solución patrón. Si los ensayos se realizan durante varios días a la semana, verificar solamente una vez por semana la dilución cuya mediana de tiempo de muerte esté entre 5-7 minutos. El FC así determinando debe quedar dentro de ±20% el FC estándar predeterminado.

B.2.3.2 Si los resultados no concuerdan, verificar el FC sobre una base de 10 ratones formado por la adición de 5 ratones inoculados con la misma dilución de solución patrón de saxitoxina e incluir los resultados a los 5 ratones originales.

B.3.3.3 Inocular un segundo grupo de 10 ratones. El promedio de valores del FC obtenidos de los 6 grupos de 10 ratones representa un nuevo valor de FC.

B.3.3.4 Repetir la verificación de los valores de FC de manera que los resultados sean consistentes dentro del ±20%. Si se encuentran grandes variaciones, investigar la posibilidad de controlar y reconocer otras variables que afectan al método antes de proceder con los análisis de rutina.

B.3.4 Preparación de la muestra

B.3.4.1 Almejas, ostiones y mejillones.

B.3.4.1.1 Lavar los moluscos bivalvos con agua potable retirando la arena y cualquier material extraño. Desconchar la carne con cuidado, sin lesionar el cuerpo del molusco. Colectar aproximadamente 150 g de carne sobre un tamiz del número 10 y dejar escurrir durante 5 minutos. Descartar las conchas, moler la carne en una mezcladora o licuadora hasta su homogenización.

B.3.4.2 Escalopas.

B.3.4.2.1 Separar la porción comestible (músculo aductor) y solamente aplicar la prueba a esta porción. Drenar y moler como se describió anteriormente

B.3.4.3 Extracción de la saxitoxina.

B.3.4.3.1 Pesar 100 gramos de carne homogenizada en un vaso de precipitados tarado.

B.3.4.3.2 Agregar 100 mL de solución de ácido clorhídrico 0,18 N, agitar y verificar el pH, el cual debe estar entre 2 y 4, y de preferencia 3.

B.3.4.3.3 Calentar la mezcla, hervir 5 minutos y dejar enfriar a temperatura ambiente. Ajustar la mezcla enfriada a un pH 2,0-4,0 (nunca mayor a 4,5)

B.3.4.3.4 Verificar el pH con indicador universal BDH, azul de fenol, papel rojo congo o con un potenciometro. Para bajar el pH, agregar solución de HCl 5 N por goteo, agitando constantemente para evitar la destrucción de la toxina.

B.3.4.3.5 Transferir la mezcla a una probeta graduada y diluir a 200 mL. Regresar la mezcla a un vaso de precipitados, agitar para homogenizar y dejar reposar hasta que una parte del sobrenadante sea translúcido y pueda encontrarse libre de partículas sólidas capaces de "tapar" una aguja hipodérmica del número 26.

B.3.4.3.6 Si es necesario centrifugar el sobrenadante 5 minutos a 3000 rpm o filtrar por papel. Filtrar solo la cantidad de líquido necesario para el bioensayo.

B.3.5 Prueba de bioensayo en ratón

B.3.5.1 Pesar 3 ratones, anotando el peso para cada muestra que va a ser analizada. Inyectar por vía intraperitoneal a cada ratón l mL de extracto centrifugado. Este es el punto crítico del bioensayo. Si las inyecciones no se hacen directamente en la cavidad peritoneal el tiempo de muerte no es reproducible.

B.3.5.2 Descartar cualquier ratón en donde se pierda o se filtre más de una gota de extracto. Activar el cronómetro en el momento de la inyección y mantener la observación cuidadosamente, hasta el tiempo de muerte, que se manifiesta por el último jadeo del animal.

B.3.5.3 Registrar el momento de la muerte de cada ratón. Si la mediana de tiempo de muerte es de 5 minutos, diluir el extracto con HCl 0,01 N, e inyectar otro lote de ratones hasta obtener los tiempos de muerte entre 5 y 7 minutos. Si la mediana del tiempo de muerte con el extracto no diluido es mayor a 7 minutos, el dato puede ser utilizado para determinar la toxicidad de la muestra.

B.3.5.4 Determinar la UR/mL de extracto que corresponde a los tiempos de muerte observados de la tabla de corrección de pesos de ratones.

B.3.5.5 Calcular las URC, multiplicando las UR correspondientes al tiempo de muerte de cada ratón por el factor de corrección del peso obtenido en la tabla de corrección de pesos de ratones.

B.3.6 Expresión de resultados.

B.3.6.1 Cálculos

µg saxitoxina/100g carne de molusco = Mediana URC/mL x FC x FD x 200

En donde:

FC = Factor de conversión

FD = Factor de dilución

Tabla de corrección de pesos de ratones.

PESO DEL RATON(G)	UNIDADES RATON
10	0,50
10,5	0,53
11	0,56
11,5	0,59
12	0,62
12,5	0,65

13	0,675
13,5	0,70
14	0,73
14,5	0,76
15	0,785
15,5	0,81
16	0,84
16,5	0,86
17	0,88
17,5	0,905
18	0,93
18,5	0,95
19	0,97
19,5	0,985
20	1,000
20,5	1,015
21	1,03
21,5	1,04
22	1,05
22,5	1,06
23	1,07

B.3.6.2 Tabla de Sommer's.

Tiempo de muerte: relación unidades ratón para toxina paralizante de moluscos. (ácida)

TIEMPO DE MUERTE*	UNIDADES RATON	TIEMPO DE MUERTE	UNIDADES RATON
1:00	100	5:00	1,92
10	66,2	05	1,89
15	38,3	10	1,86
20	26,4	15	1,83
25	20,7	20	1,80
30	16,5	30	1,74
35	13,9	40	1,69
40	11,9	45	1,67
45	10,4	50	1,64
50	9,33	6:00	1,60
55	8,42	15	1,54
2:00	7,67	30	1,48
05	7,04	45	1,43
10	6,52	7:00	1,39
15	6,06	15	1,35
20	5,66	30	1,31
25	5,32	45	1,28
30	5,00	8:00	1,25
35	4,73	15	1,22
40	4,48	30	1,20

45	4,26	45	1,18
50	4,06	9:00	1,16
55	4,88	30	1,13
3:00	3,70	10:00	1,11
05	3,57	30	1,09
10	3,43	11:00	1,075
15	3,31	30	1,06
20	3,19	12:00	1,05
25	3,08	13	1,03
30	2,98	14	1,015
35	2,88	15	1,000
40	2,79	16	0,99
45	2,71	17	0,98
50	2,63	18	0,972
55	2,56	19	0,965
4:00	2,50	20	1,96
05	2,44	21	0,954
10	2,38	22	0,948
15	2,32	23	0,942
20	2,26	24	0,937
25	2,21	25	0,934
30	2,16	30	0,917
35	2,12	40	0,898
40	2,08	60	0,875
45	2,04	50	2,00
	1,96	55	2,22

*Minutos: segundos

B.3.6.3 Informe de la prueba

µg saxitoxina/100g carne de molusco

B.4. DETERMINACION DE ACIDO DOMOICO POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS (HPLC)

B.4.1 Principio del método.

El ácido domoico es extraído del tejido homogenizado por ebullición en HCl 0,1 N durante 5 minutos. La mezcla es enfriada y centrifugada, una alícuota del sobrenadante es diluida, filtrada y analizada por HPLC isocrática y detección ultravioleta a 242 nm.

B.4.2 Equipo.

B.4.2.1 Sistema de cromatógrafo de líquidos:

B.4.2.1.1 Sistema de gasificador por Helio, membrana de vacío o ultrasonido.

B.4.2.1.2 Sistema de bombas capaz de desarrollar un flujo de 0.5 a 1,5 mL/min.

B.4.2.1.3 Inyector manual o automático, compatible para inyectar 20 uL de muestra.

B.4.2.1.4 Detector de ultravioleta de longitud de onda variable a 242 nm.

B.4.2.1.5 Sistema de datos: graficador, integrador o computadora compatible con la salida de voltaje del detector.

B.4.2.2 Centrífuga capaz de desarrollar 3000 rpm usando tubos de 100 mL.

B.4.3 Materiales.

B.4.3.1 Columna HPLC de 15 cm de longitud x 4,6 mm de diámetro interno, empacada con octadecilsilanos (C18) de tamaño de partícula de 5 µm.

B.4.3.2 Filtros de membrana para muestras de 3 cm de diámetro, tamaño de poro de 0,45 µm.

B.4.3.2 Filtros de membrana para muestras, de 3 cm de diámetro y tamaño de poro de 0,45 μm.

B.4.3.3 Jeringas de vidrio o desechables de 5 mL.

B.4.3.4 Tubos para centrífuga de 100 mL.

B.4.3.5 Matraces volumétricos de 50 y 100 mL.

B.4.4 Reactivos.

B.4.4.1 Todos los reactivos deben ser grado analítico a menos que se indique otra especificación y por agua se entiende agua desionizada.

B.4.4.2 Agua grado HPLC (H_2O)

B.4.4.3 Acetonitrilo grado HPLC (C_2H_3N).

B.4.4.4 Acido fosfórico (H_3PO_4)

B.4.4.5 Solución de HCl 0,1 N

B.4.5 Fase móvil.

B.4.5.1 Adicionar 2 mL de solución acuosa de H_3PO_4 a 873 mL de agua desionizada. Mezclar y verificar el pH a aproximadamente 2,5. Adicionar 125 mL de acetonitrilo, mezclar y degasificar.

B.4.5.2 Solución patrón de ácido domoico 1,09 ng/μL.

B.4.5.3 Esta solución está disponible comercialmente. Refrigerar cuando no se use. Llevar a temperatura ambiente antes de su uso.

B.4.6 Procedimiento.

B.4.6.1 Preparación de las muestras.

B.4.6.2 Limpiar completamente el exterior del molusco con agua fresca. Abrir por corte los músculos aductores. Enjuagar el interior con agua fresca para eliminar la tierra u otro material extraño. Quitar la carne de la concha separando los músculos aductores y la conexión del tejido en las valvas (charnela). No usar calor o anestésicos antes de abrir la concha, y no cortar o dañar el cuerpo del molusco en este estado.

B.4.6.3 Colectar aproximadamente de 100-159 g de carne en un plato de vidrio. Tan pronto como sea posible, transferir la carne a un tamiz del No. 10 y dejar drenar por espacio de 5 minutos. Descartar los drenados. Moler en un procesador de alimentos casero hasta obtener una mezcla homogénea.

B.4.6.4 Pesar exactamente 50 g de la muestra homogenizada en un matraz de 250 mL. Adicionar 50 mL de solución de HCl 0,1 N y agitar completamente. Rápidamente calentar la mezcla a ebullición (en aproximadamente 10 minutos) y continuar el calentamiento vigoroso, con agitación, por exactamente 5 minutos.

B.4.6.5 Transferir inmediatamente el matraz y su contenido a un baño de hielo y dejar enfriar a temperatura ambiente (aproximadamente 10 minutos).

B.4.6.6 Llevar la mezcla enfriada a un matraz volumétrico de 100 mL y diluir al volumen con solución de HCl 0,1 N. Mezclar. Transferir una alícuota de 50 mL a un tubo de centrífuga. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos.

B.4.6.7 Transferir con pipeta volumétrica de 1-5 mL del sobrenadante clarificado a un matraz volumétrico de 50 mL (el volumen transferido depende de la concentración de ácido domoico esperada). Diluir al volumen con agua y mezclar.

B.4.6.8 Filtrar un alícuota de 1-2 mL del sobrenadante diluido a través del filtro para muestras y colectar en un frasco vial.

B.4.7 Acondicionamiento del equipo.

B.4.7.1 Fijar los parámetros cromatográficos requeridos en el método de acuerdo con el manual de operación.

B.4.7.2 Bombear fase móvil a través del sistema del cromatógrafo hasta la obtención de una línea base estable.

B.4.7.3 Realizar un análisis preeliminar de la solución de ácido domoico y ajustar la concentración del acetonitrilo en la fase móvil a fin de obtener un tiempo de retención aproximado para el ácido domoico de 8 min.

B.4.8 Determinación.

B.4.8.1 Inyectar varias réplicas 20 μL de solución patrón de ácido domoico hasta que la altura o área de los picos de 3 inyecciones consecutivas no varíen en más del 3%.

B.4.8.2 Inyectar 20 μL de las muestras.

B.4.9 Expresión de resultados.

B.4.9.1 Cálculos.

$$\mu g \text{ Acido domoico/g} = (R/R') \times (W'/W)$$

donde:

R= Area o altura promedio del pico de la muestra.

R′= Area o altura promedio del pico de la solución estándar de ácido domoico.

W= Peso de la muestra inyectada (mg)

W′= Peso de la solución estándar de ácido domoico inyectada (ng)

B.4.10 Informe de la prueba.

μg de ácido domoico/g

B.5. DETERMINACION DE HISTAMINA POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (TLC)

B.5.1 Principio del método.

Se basa en la hidrólisis ácida de las proteínas dejando libres a los aminoácidos. La histamina es extraída con n-butanol y el extracto es analizado por cromatografía en capa fina comparando con una curva de histamina.

B.5.2 Equipo.

B.5.2.1 Cámara cromatográfica.

B.5.2.2 Atomizador de 50 mL para cromatografía.

B.5.3 Materiales.

B.5.3.1 Embudos de separación de 125 mL.

B.5.3.2 Embudo de Buchner.

B.5.3.3 Matraz Kitazato de 500 mL.

B.5.3.4 Cromatofolios AL de sílica gel 60 F 254 (para cromatografía en capa fina de 0,2 mm de espesor).

B.5.3.5 Microjeringa ajustable de 0-200 μL.

B.5.3.6 Material común de laboratorio.

B.5.4 Reactivos.

B.5.4.1 Todos los reactivos deben ser de grado analítico a menos que se indique otra especificación y por agua se entiende agua destilada.

B.5.4.2 Diclorhidrato de histamina ($C_5H_{11}Cl_2N_3$)

B.5.4.3 n-Butanol ($C_4H_{10}O$)

B.5.4.4 Acido clorhídrico (HCl)

B.5.4.5 Hidróxido de calcio ($Ca(OH)_2$)

B.5.4.6 Etanol (C_2H_5OH)

B.5.4.7 Hidróxido de amonio (NH_4OH)

B.5.4.8 Acetona (C_3H_6O)

B.5.4.9 Cloruro de sodio (NaCl)

B.5.4.10 Solución de HCl 1N

B.5.4.10.1 Medir 479,8 mL de HCl y llevar a 1 L con agua.

B.5.4.11 Solución de ninhidrina al 1% (1 mg ninhidrina/mL)

B.5.4.11.1 Pesar 1 g de ninhidrina y disolver en 100 mL de acetona

B.5.4.12 Solución patrón de histamina de 5 μg/μL.

B.5.4.12.1 Mezclar 30,17 mg de diclorhidrato de histamina (equivalente a 10 mg de histamina), 20 mL de n-butanol y 7,0 g de cloruro de sodio con 20 mL de agua destilada. Agitar durante 5 minutos. Adicionar 2,5 g de hidróxido de calcio y agitar durante 2 minutos. Filtrar en embudo Buchner y pasar a un embudo de separación. Dejar reposar y separar la capa de butanol.

B.5.5 Procedimiento.

B.5.5.1 Preparación de la curva patrón.

B.5.5.2 A partir de la solución patrón de histamina preparar las siguientes diluciones de acuerdo con la tabla siguiente:

No. DE TUBO	SOLUCION PATRON DE HISTAMINA (ML)	VOLUMEN FINAL DE N-BUTANOL	MG HISTAMINA/ML.
1	2,20	0,0	5,0
2	2,52	2,8	4,5
3	2,88	3,6	4,0

4	3,29	4,7	3,5
5	3,35	6,7	2,5
6	4,00	10,0	2,0
7	5,61	18,7	1,5
8	6,66	33,3	1,0
9	10,00	100,0	0,5

B.5.5.3 Agitar y dejar reposar para permitir la separación.

B.5.6 Preparación de la muestra.

B.5.6.1 Mezclar 50 g de muestra molida en 100 ml de ácido clorhídrico 1 N por 5 minutos.

B.5.6.2 Filtrar por succión a través de un embudo Buchner con papel filtro grueso.

B.5.6.3 Tomar una alícuota de 20 mL (4 mL del extracto + 16 mL de agua). Adicionar 20 mL de n-butanol. Agregar 7 g de NaCl y agitar durante 5 minutos.

B.5.6.4 Agregar 2,5 g de Ca(OH)2. Agitar durante 2 minutos. Filtrar por succión a través de un embudo Buchner con papel filtro grueso.

B.5.6.5 Separar la capa de butanol.

B.5.6.6 Determinación.

B.5.6.7 Tomar alícuotas de 10 μL de cada una de las soluciones de la curva patrón y muestras y colocarlas en una placa de sílica gel.

B.5.6.8 Desarrollo de la TLC.

B.5.6.9 Poner una mezcla de etanol: hidróxido de amonio: agua (90:6:10) en la cámara para cromatografía y dejar saturar.

B.5.6.10 Meter la placa y dejar eluir hasta que el frente del solvente haya alcanzado los 5 cm. Sacar de la cámara y dejar secar al aire durante 30 min. Aplicar la solución de ninhidrina al 1% por aspersión y calentar a 100 ºC en estufa durante 2 minutos.

B.5.7 Estimación del nivel de histamina.

B.5.7.1 Comparar las muestras con las soluciones patrón de histamina en el intervalo de 5-50 mg (25 a 250 mg de histamina).

B.5.7.2 La cantidad de histamina en la muestra se estima comparando visualmente el desplazamiento de las manchas de la muestra contra el desplazamiento de los patrones de histamina.

B.5.7.3 Para determinar el contenido de histamina en la muestra es suficiente que una de las manchas de muestra tenga un desplazamiento igual al de por lo menos uno de los patrones.

B.5.8 Expresión de resultados.

B.5.8.1 Cálculos.

B.5.8.1.1 Si una de las manchas de las muestras entre 5 y 50 mg equivale al intervalo de 0,5 a 5 μg de los patrones, la cantidad de histamina para 50 g de muestra se calcula como sigue:

$$\text{mg de histamina} = 10\ E$$

donde:

E = μg de histamina estimados en la muestra entre 0,5 y 5 μg

10= μL de muestra colocados en la placa.

Si una mancha de la muestra del intervalo de 25 a 250 mg corresponde al intervalo para el patrón de 0,5 a 5 mg, la cantidad de histamina para 50 g de muestra se calcula como sigue:

$$\text{mg de histamina} = 50\ E$$

donde:

E = μg de histamina estimados en la muestra entre 0,5 y 5 μg

50= μL de muestra colocados en la placa.

B.5.8.1.3 Si el valor obtenido en las muestras analizadas resulta ser mayor de 15 mg/100 g debe analizarse nuevamente haciendo la dilución correspondiente con butanol.

B.5.9 Informe de la prueba.

mg de histamina/kg

B.6. DETERMINACION DE SULFITOS EN ALIMENTOS. METODO OPTIMIZADO DE MONIER-WILLIAMS.

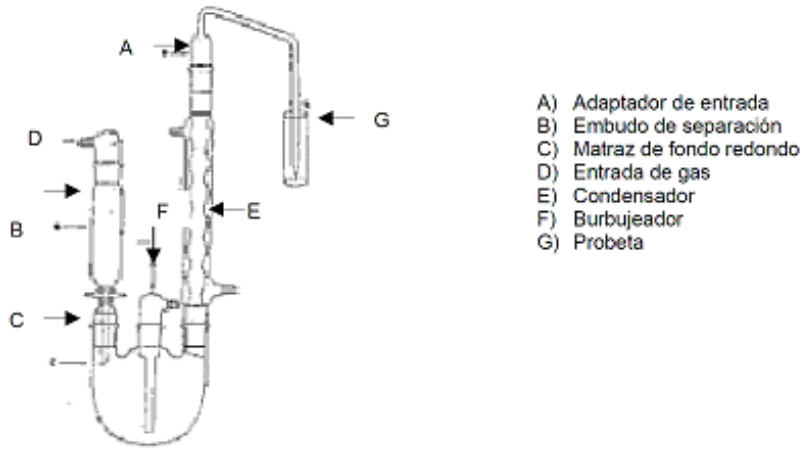
B.6.1 Principio del método.

El método mide sulfitos libres más porciones reproducibles de sulfitos ligados, tales como productos carbonílicos, en alimentos. La muestra es calentada con ácido clorhídrico (HCl) en reflujo para convertir el sulfato a SO_2 (sulfitos). El nitrógeno introducido a la solución arrastra el SO_2 a través del condensador enfriado por agua y pasa a una solución del H_2O_2 al 3% donde el SO_2 se oxida a ácido sulfúrico (H_2SO_4). El contenido de sulfito es directamente relacionado al H_2SO_4 generado, el cual es determinado por titulación con hidróxido de sodio (NaOH) estandarizado. Aplicable para la determinación de ≥ 10 ppm de sulfitos en alimentos. Aplicable en presencia de otros compuestos volátiles de azufre, no aplicable a cebollas secas, puerros y calabazas.

B.6.2 Equipo.

B.6.2.1 Aparato de Destilación (nota: En este método la presión dentro del aparato está limitada a la presión propia de la solución de H_2O_2 al 3% encima del extremo del burbujeador. Mantener la presión baja para evitar la pérdida del SO_2 a través del goteo).

Usar una película delgada de vaselina en las superficies que sellan en todas las juntas, excepto en la junta entre el matraz y el embudo de separación. Poner pinza en cada junta para asegurar que sellen completamente. Ensamblar el aparato según se muestra en la figura siguiente:



B.6.2.2 Bureta de 10 mL con tubo de sobrellenado y conexiones para tubo Ascarita o el equivalente para permitir mantener una atmósfera libre de CO_2 sobre el hidróxido de sodio 0,01N estandarizado.

B.6.3 Reactivos.

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

B.6.3.1 Acido clorhídrico (HCl) acuoso 4N. Para cada análisis, preparar 90 mL de esta solución mezclando 30 mL de HCl y 60 mL de agua desionizada.

B.6.3.2 Indicador de rojo de metilo. Disolver 250 mg de rojo de metilo en 100 mL de etanol.

B.6.3.3 Titulante estandarizado. Hidróxido de sodio (NaOH) 0,010N Estandarizar la solución con estándar de ftalato ácido de potasio.

B.6.3.4 Solución de peróxido de hidrógeno al 3% (H_2O_2).

Para cada análisis, diluir 3 mL de H_2O_2 al 30% con 30 mL de agua desionizada. Justo antes de usarse,

agregar 3 gotas de indicador de rojo de metilo y titular con hidróxido de sodio (NaOH) 0,010N a un punto final amarillo, si el punto final excedió, descartar la solución.

B.6.3.5 Nitrógeno de alta pureza. Usar un regulador para mantener el flujo de 200 mL/min. Para evitar oxígeno en el nitrógeno se usa una trampa tipo cromatografía de gases.

B.6.4 Preparación de la muestra.

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

b) Líquidos. Mezclar 50g de muestra, o la cantidad que contenga de 500 a 1500 μg de SO_2 con 100 mL de la mezcla etanol-agua.

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

B.6.5 Preparación del sistema.

B.6.5.1 Usando el aparato ensamblado y el matraz puesto en la manta de calentamiento, agregar 400 mL de agua al matraz. Cerrar la llave del embudo de separación y agregar 90 mL de HCl 4N. Empezar con el flujo de nitrógeno. Iniciar el flujo en el refrigerante. Colocar el recipiente con 30 mL de H_2O_2, el cual ha sido titulado a punto final amarillo con NaOH 0,010N. Después de 15 min, el aparato y el agua estarán completamente desoxigenadas y la porción de muestras debe ser introducida al sistema.

B.6.5.2 Remover el embudo de separación y cuantitativamente transferir la muestra al matraz. Limpiar la junta y rápidamente aplicar grasa de silicón y regresarlo a su lugar.

B.6.5.3 El flujo de nitrógeno a través de la solución de H_2O_2 al 3% se reanuda tan pronto como se coloca el embudo en la junta del matraz. Examinar cada junta para asegurar que esté sellado. Usar un bulbo con válvula para aplicar presión sobre el HCl. Abrir la llave y dejar pasar el HCl al matraz. Continuar sosteniendo la válvula para mantener la suficiente presión sobre la solución de ácido para forzarla a pasar. Cerrar la llave antes de que los últimos 2-3 mL drenen para evitar que el SO_2 escape hacia el embudo de separación.

B.6.5.4 Calentar la manta al calentamiento y regular para calentar lo suficiente, obteniendo de 80 a 90 gotas/min del condensador.

B.6.5.5 Dejar 1 h 45 min y remover el vaso.

B.6.6 Determinación.

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

B.6.7 Expresión de resultados.

B.6.7.1 Cálculos.

Calcular el contenido de sulfitos, como sigue:

$$\mu g\ SO_2/g = \frac{32{,}03 \times VB \times N \times 1000}{\text{peso de muestra}}$$

donde:

32,03 = peso milequivalente del SO_2

VB = Volumen (Ml) del NaOH

N = Normalidad del NaOH

1000 = Factor para convertir milequivalentes a microequivalentes

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

B.7. DETERMINACION DE SULFITOS POR GRAVIMETRIA (OPCIONAL).

B.7.1 Después de la titulación, llevar el contenido del recipiente a un vaso de 400 mL agregar 4 gotas de HCl 1N y un exceso de solución de $BaCl_2$ al 10% y dejar reposar toda la noche.

B.7.2 Lavar el precipitado por decantación 3 veces con agua caliente a través de un Gooch previamente pesado. Lavar con 20 mL de alcohol etílico y 20 mL de éter. Secar a 105° - 110°C.

B.7.3 Determinar el blanco de reactivos para la titulación y para el método gravimétrico y considerarlo en el cálculo de los resultados.

B.7.4 Preparación del Aparato de Filtración

B.7.4.1 Unir el receptáculo con un filtro de fibra de vidrio.

B.7.4.2 Colocar lo anterior en el matraz kitasato.

B.7.4.3 Lavar el filtro con 10 mL de agua caliente, desionizada y después con 10 mL de etanol usando vacío.

B.7.4.4 Quitar el filtro y secarlo a 110°C durante 12 horas o más. Transferir a desecador para enfriar a temperatura ambiente. Pesar (Wb).

B.7.4.5 Colocar el filtro en el receptáculo de vidrio.

B.7.5 Precipitado de $BaSO_4$

B.7.5.1 Pasar el precipitado por el filtro. Lavar con agua para asegurar que todo ha sido filtrado.

B.7.5.2 Pasar 10 mL de etanol a través del precipitado y filtrar con vacío.

B.7.5.3 Remover el filtro y secar en estufa a 110°C durante toda la noche.

B.7.5.4 Transferir a desecador, enfriar y pesar (Wp).

B.7.6 Expresión de resultados.

B.7.6.1 Cálculos.

Calcular el contenido de sulfitos como sigue:

$$\mu g\ SO_2/g = \frac{[(Wp\ Wb) \times 274{,}46]}{\text{g muestra}}$$

Donde:

Wp = Peso de papel filtro con el precipitado de $BaSO_4$ a peso constante

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

B.7.7 Ensayos de Recuperación.

B.7.7.1 Para familiarizarse y eficientizar el método antes de realizar la rutina, analizar porciones de muestra que contengan cantidades conocidas de sulfitos.

B.7.7.2 Realizar los análisis de manera que se omita cualquier pérdida de sulfitos por oxidación o reacción con los componentes en el alimento.

B.7.7.3 Debido a que los sulfitos son reactivos con el aire y con algunas matrices alimenticias y dado que carecen de estabilidad, se debe fortificar con fuentes estables de sulfitos, no sulfito de sodio o sales similares.

B.7.7.4 El hidroximetil sulfonato de sodio (HMS), el cual es estructuralmente similar a algunas formas combinadas de sulfitos en alimentos, es útil para preparar porciones de prueba fortificada.

B.7.7.5 Para el análisis, transferir 50g de muestra de alimento libre de sulfitos al matraz. Agregar una alícuota de solución de la sal sódica de hidroximetil sulfonato. Analizar inmediatamente.

B.7.7.6 Recuperaciones de > 80% del HMS con matrices alimenticias de 10 ppm son recomendables para asegurar una adecuada exactitud analítica.

B.7.8 Informe de las pruebas.

μg SO_2,/g

B.8. DETERMINACION DE pH.

B.8.1 Fundamento.

Es la medida de la diferencia de potenciales entre un electrodo de vidrio y otro de referencia que se genera en una muestra, medido con un potenciómetro. La fuerza electromotriz producida por el sistema de electrodos es proporcional al pH de la muestra problema.

B.8.2 Materiales y Equipo.

B.8.2.1 Balanza analítica con sensibilidad de 0,1 mg.

B.8.2.2 Molino mecánico para carnes con placa perforada con agujeros de un diámetro no mayor de 4mm.

B.8.2.3 Potenciómetro graduado en unidades de pH de 0,1 o menos y que permita efectuar lecturas con una exactitud entre 0,05 unidades y provista de un sistema de corrección de temperaturas (en caso de no tenerlo, las lecturas deben tomarse en un rango de temperaturas de 20±2°C).

B.8.2.4 Electrodos de referencia.

B.8.2.5 Electrodo de vidrio o sistema de electrodo combinado.

B.8.2.6 Material común de laboratorio.

B.8.2.7 Algodón.

B.8.3 Reactivos.

Todos los reactivos deben ser de grado analítico y cuando se mencione agua debe ser destilada.

B.8.3.1 Etanol al 95% (v/v) C_2H_6O

B.8.3.2 Eter etílico saturado con agua $C_4H_{10}O$

B.8.3.3 Soluciones patrón.

B.8.3.4 Para calibrar el potenciómetro se pueden usar las siguientes soluciones de referencia:

B.8.3.4.1 Soluciones patrón con pH 4,0 a 20°C.

B.8.3.4.2 Pesar con exactitud 10,211g de potasio hidrógeno ftalato ($KHC_6H_4(COO)_2$) previamente secado a 125°C hasta peso constante, disolver en agua y llevar al volumen de 1000 ml.

B.8.3.4.3 El pH de esta solución a 10°C es de 4,01.

B.8.3.4.4 Solución patrón con pH 5,45 a 20°C.

B.8.3.4.5 Mezclar 500 ml de solución 0,2N de ácido cítrico ($C_6H_8O_7$) en agua con 375 ml de solución de hidróxido de sodio (NaOH) en agua. El pH de esta solución a 10°C es de 5,42 y a 30°C es de 5,48.

B.8.3.4.6 Solución patrón con pH 6,88 a 20°C.

B.8.3.4.7 Pesar con exactitud 3,402g de potasio dihidrógeno ortofostato (KH_2PO_4) y 3,549g de disodio hidrógeno ortofosfato (Na_2HPO_4), disolver en agua y llevar al volumen a 1 l.

B.8.3.4.8 El pH de esta solución es 6,92 a 10°C y 6,85 a 30°C.

B.8.3.4.9 En el caso de disponer de producto comercial seguir las indicaciones del fabricante.

B.8.4 Procedimiento:

Se describen dos procedimientos:

B.8.4.1 Para productos que pueden ser homogeneizados.

B.8.4.2 Para productos que no pueden ser homogeneizados.

B.8.4.2 Para productos que no pueden ser homogeneizados.

B.8.4.3 Preparación de la muestra.

B.8.4.3.1 Homogeneizar la muestra y pasarla dos veces a través de un molino y después mezclarla perfectamente.

B.8.4.3.2 En el caso de muestras muy secas para poder homegeneizarlas adicionar una cantidad de agua igual a la masa de muestra tomada para la determinación y mezclarlas perfectamente.

B.8.4.3.3 Tomar una cantidad de muestra suficiente para que los electrodos puedan sumergirse.

B.8.4.4 Calibración del potenciómetro.

B.8.4.5 Calibrar el potenciómetro y usar solución patrón de un pH conocido exactamente y lo más cerca posible del pH que se va a determinar.

B.8.4.6 Si el procedimiento no tiene un sistema de corrección de temperatura, la temperatura de la solución patrón debe estar dentro del rango de 20±2°C.

B.8.5 Medición.

B.8.5.1 Introducir los electrodos en la muestra y fijar el sistema de corrección de temperatura a la temperatura de la muestra, en caso de que no lo tenga, la temperatura de la muestra debe estar dentro del rango de 20±2°C.

B.8.5.2 Efectuar la medición usando el procedimiento descrito en el manual del aparato.

B.8.5.3 Leer el pH directamente en la escala del instrumento, hasta alcanzar un valor estable.

B.8.5.4 Llevar a cabo 3 lecturas de la misma muestra.

B.8.6 Limpieza de los electrodos.

Limpiar los electrodos con trozos de algodón mojados con éter etílico y etanol sucesivamente, finalmente lavarlos con agua y guardarlos de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

B.8.7 Expresión de los resultados.

Tomar como resultado la media aritmética de los valores de las tres lecturas siempre y cuando la diferencia entre los valores extremos resultantes no sea mayor de 0,15 unidades de pH.

B.8.8 Procedimiento para productos que no puedan homogeneizarse.

B.8.8.1 Tomar una porción de muestra suficiente que permita tomar medidas de pH en varios puntos de la misma.

B.8.8.2 Medición.

Si la muestra tiene consistencia firme, hacer un agujero para cada determinación de manera que el electrodo pueda ser introducido cuidadosamente para no quebrarlo.

B.8.8.3 Efectuar las lecturas como se describió anteriormente.

Si se considera importante conocer las diferencias entre los valores del pH tomados en diferentes puntos de la muestra, el número de determinaciones estará en función de la naturaleza y el tamaño de la muestra.

El lavado de los electrodos debe hacerse como se describió en el punto 11.10.6

B.8.8.4 Expresión de resultados.

Tomar como resultado la media aritmética de los valores obtenidos en el mismo punto de la muestra siempre y cuando la variación no sea mayor a 0,15 unidades de pH.

Reportar que el promedio de pH para cada punto al más cercano a 0,1 unidades de pH.

B.8.9 Precauciones.

Determinar el pH de la muestra inmediatamente cuando sea posible o almacenarla de tal manera que el cambio de pH se restrinja al mínimo.

Durante las mediciones el aparato debe estar protegido de cambios de corriente eléctrica externa.

B.9. NITROGENO AMONIACAL (NVT).

B.9.1 Fundamento.

La muestra se destila bajo condiciones establecidas en presencia de óxido de magnesio recibiendo las bases volátiles en un ácido débil de donde son tituladas.

B.9.2 Material y equipo.

B.9.2.1 Bureta de 10 ml graduada en 0,01

B.9.2.2 Matraz de Kjeldahl de 800ml

B.9.2.3 Matraz Erlenmeyer de 500ml

B.9.2.4 Probeta

B.9.2.5 Cuerpos de ebullición

B.9.2.6 Equipo de destilación macro Kjeldahl

B.9.2.7 Balanza analítica con sensibilidad de 0,1mg

B.9.2.8 Agua destilada

B.9.3 Reactivos.

B.9.3.1 Acido bórico H3BO3 al 2% grado reactivo, pesar 20g y diluir con agua destilada a 1 litro.

B.9.3.2 Acido sulfúrico o clorhídrico 0,1N valorado

B.9.3.3 Rojo de metilo

B.9.3.4 Azul de metileno

B.9.3.5 Etanol

B.9.3.6 Oxido de magnesio grado reactivo

B.9.3.7 Antiespumante preparación de silicones o alcohol octílico.

B.9.3.8 Preparación del reactivo de Wesslow.

B.9.3.8.1 En una mezcla 60:40 de etanol-agua, agregar rojo de metilo hasta llegar al 0,2%.

B.9.3.8.2 Preparar una dilución de azul de metileno al 0,2% en agua destilada.

B.9.3.8.3 Mezclar dos partes de la solución de rojo de metilo con una parte de azul de metileno.

B.9.4 Preparación de la muestra.

B.9.4.1 Para prevenir la pérdida de agua durante la preparación y subsecuente manejo no se deben usar muestras pequeñas (la cantidad mínima aceptable es de 500g).

B.9.4.2 Guardar el material molido en recipientes de vidrio o similares con tapas herméticas que lo protejan del aire y del agua.

B.9.4.3 Pasar la muestra rápidamente tres veces a través de un molino de alimentos con placas de aproximadamente 3mm de abertura.

B.9.4.4 Mezclar perfectamente después de cada molienda y comenzar todas las determinaciones lo más rápido posible, si ocurriera cualquier demora, congelar la muestra para inhibir la descomposición (-2 a -4°C).

B.9.5 Procedimiento.

B.9.5.1 Pesar 10g de muestra preparada como se indica en el punto 2.4 transferirla cuantitativamente a un matraz de Kjeldahl 800ml.

B.9.5.2 Agregar 2g de óxido de magnesio, 300 ml de agua destilada y los cuerpos de ebullición (en caso necesario, agregar algún agente antiespumante).

B.9.5.3 Disgregar perfectamente la muestra, por medio de movimientos circulares. Recibir el destilado en un matraz Erlenmeyer de 500ml conteniendo 25ml de ácido bórico y unas gotas del indicador de Wesslow (la parte terminal del tubo debe estar dentro del ácido).

B.9.5.4 Conectar el matraz de Kjeldahl al equipo de destilación y calentar de manera que hierva exactamente durante un periodo de 10 min, mantener la temperatura exactamente durante 25 min.

B.9.5.6 Lavar el refrigerante con agua destilada y titular con ácido sulfúrico o clorhídrico.

B.9.5.7 Titular la solución destilada utilizando el ácido clorhídrico o sulfúrico.

B.9.5.8 Simultáneamente, determinar un blanco.

Nota: Antes de realizar la determinación definir los tiempos y temperaturas con una prueba.

B.9.6 Cálculos.

$$NA = \frac{(v1 - v2)}{PM} * N * 14 * 100$$

El resultado se expresa en mgN/100g

En donde:

v1 = ml de ácido sulfúrico 0,1N requeridos en la titulación de la muestra.

v2 = ml de ácido sulfúrico 0,1N requeridos en la titulación del blanco.

N = Normalidad del ácido sulfúrico o clorhídrico.

PM = Peso de la muestra.

14 = Miliequivalente de Nitrógeno.

B.10. METODO DE PRUEBA PARA LA DETERMINACION DE CADMIO, ARSENICO, PLOMO, ESTAÑO, COBRE, FIERRO, ZINC Y MERCURIO EN ALIMENTOS, AGUA POTABLE Y AGUA PURIFICADA POR ESPECTROMETRIA DE ABSORCION ATOMICA.

B.10.1 Fundamento

El método de absorción atómica se basa en hacer pasar un haz de luz monocromática de una frecuencia tal que puede ser absorbido por el analito que se encuentra presente en forma de vapor atómico. La medida de la intensidad luminosa antes y después de su paso por el vapor atómico permite determinar el porciento de absorción. La cantidad de absorción aumenta con la concentración de los átomos en el medio absorbente, es decir, la medida de la absorción aumenta con la concentración del elemento en la muestra, ya sea que esté en su condición original o sujeta a pretratamiento.

B.10.2 Reactivos y materiales

B.10.2.1 Reactivos

B.10.2.1.1 Soluciones estándares de referencia certificadas de cada uno de los metales.

B.10.2.1.2 Agua, debe ser destilada deionizada, con un grado máximo de conductividad de 1 µmho/cm a 25ºC.

B.10.2.1.3 Acido nítrico (densidad específica 1,41), grado suprapuro.

B.10.2.1.4 Acido nítrico (densidad específica 1,41), contenido de mercurio muy bajo.

B.10.2.1.5 Acido perclórico (densidad específica 1,67), grado suprapuro.

B.10.2.1.6 Acido clorhídrico (densidad específica 1,19), grado suprapuro.

B.10.2.1.7 Acido sulfúrico (densidad específica 1,84), grado suprapuro.

B.10.2.1.8 Acido sulfúrico 1 N a partir de la solución grado suprapuro.

B.10.2.1.9 Acido nítrico 65% v/v grado RA.

B.10.2.1.10 Peróxido de hidrógeno (densidad específica 1,12).

B.10.2.1.11 Hidróxido de sodio granalla reactivo RA.

B.10.2.1.12 Aire comprimido seco y limpio.

B.10.2.1.13 Gases: acetileno, óxido nitroso, argón y nitrógeno, grado absorción atómica.

Solución de Nitrato de Magnesio hexahidratado al 7% p/v. Disolver 70 g de $Mg(NO_3)_2.6H_2O$ en 1000 ml de HCl 1 N.

B.10.2.1.14 Acido clorhídrico 1 N. Diluir 8,3 ml de HCl y llevar a 100 ml de agua.

B.10.2.1.15 Acido nítrico al 50% v/v. Diluir 50 ml de HNO_3 al 65% v/v grado suprapuro en 50 ml de agua.

B.10.2.1.16 Acido clorhídrico 8 M. Diluir 66,0 ml de HCl y llevar a 100 ml con agua.

B.10.2.1.17 Acido clorhídrico 0,5 N. Diluir 4,15 ml de HCl y llevar a 100 ml con agua.

B.10.2.1.18 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.10.2.1.19 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.10.2.1.20 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.10.2.1.21 Solución de Nitrato de Magnesio al 50% p/v. Disolver 50 g de $Mg(NO_3)_2.6H_2O$ en 100 ml de agua.

B.10.2.1.22 Solución de ácido clorhídrico al 1,5% p/v. Diluir 1,5 ml de HCl en 100 ml de agua destilada deionizada.

B.10.2.1.23 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.10.2.1.24 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.10.2.1.25 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.10.2.1.26 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.10.2.1.27 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.10.2.2 Materiales

B.10.2.2.1 Matraces Kjeldahl de 500 ml y 800 ml.

B.10.2.2.2 Sistema de reflujo con refrigerante.

B.10.2.2.3 Crisoles Vycor de 40 a 50 ml de capacidad.

B.10.2.2.4 Crisoles de platino de 40 a 50 ml de capacidad.

B.10.2.2.5 Matraces Erlenmeyer de diferentes capacidades.

B.10.2.2.6 Matraces volumétricos de diferentes capacidades.

B.10.2.2.7 Matraces redondos de fondo plano de 50 ml.

B.10.2.2.8 Bombas Parr.

B.10.2.2.9 Micropipetas o pipetas de Eppendorf de diferentes capacidades.

B.10.2.2.10 Puntas de plástico para micropipetas.

B.10.2.2.11 Papel filtro Whatman No. 2.

B.10.2.2.12 Perlas de ebullición.

B.10.2.2.13 Varillas de plástico.

B.10.2.2.14 Tubos de ensayo graduados de propilen o propileno de 15 ml.

B.10.2.2.15 Recipientes de propilen o propileno.

B.10.2.2.16 Embudos de filtración de diferentes capacidades.

B.10.2.2.17 Material común de laboratorio.

B.10.2.2.18 Todo el material utilizado debe someterse a lavado de acuerdo con las siguientes instrucciones:

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

B.10.3 Aparatos e instrumentos

B.10.3.1 Aparatos

B.10.3.1.1 Lámparas de cátodo hueco o de descarga sin electrodos para determinar arsénico, cadmio, cobre, estaño, fierro, mercurio, plomo y zinc.

B.10.3.1.2 Fuente de radiofrecuencia en caso de usar lámparas de descarga.

B.10.3.1.3 Automuestreador y recirculador de agua.

B.10.3.1.4 Placa de calentamiento con regulador que alcance una temperatura de 400 a 450 ºC.

B.10.3.1.5 Horno de microondas.

B.10.3.1.6 Autoclave que alcance 121 ± 5ºC o 15 lb de presión.

B.10.3.1.7 Centrífuga de laboratorio capaz de mantener 1600 rpm.

B.10.3.2 Instrumentos

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

B.10.3.2.1 Espectrómetro de absorción atómica equipado con los accesorios para flama, horno de grafito, generador de hidruros o vapor frío, dependiendo del método a seguir.

B.10.3.2.2 Balanza analítica con sensibilidad de 0,1 mg.

B.10.3.2.3 Mufla capaz de mantener una temperatura de 550 ± 10ºC.

B.10.3.2.4 Horno de calentamiento (estufa) con intervalo de temperatura de 120 ± 5ºC.

B.10.4 Preparación de la muestra

B.10.4.1 Digestión para la determinación de Cd, Cu, Fe, Pb y Zn.

B.10.4.1.1 Digestión por vía húmeda.

B.10.4.1.1.1 Pesar con precisión de ± 0,1 mg, una cantidad apropiada de muestra.

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

B.10.4.1.1.2 Añadir 10 ml de ácido nítrico concentrado y dejar reposar toda la noche o iniciar directamente la digestión.

B.10.4.1.1.3 Usar matraz de Kjeldhal o matraz conectado al sistema de refrigerantes.

B.10.4.1.1.4 Calentar suavemente.

B.10.4.1.1.5 Digerir la muestra 3 horas o más tiempo si es necesario (algunas muestras requieren la adición de mayor cantidad de ácido nítrico) hasta la aparición del color traslúcido, si queda ámbar, adicionar peróxido de hidrógeno gota a gota con agitación continua (reacción exotérmica).

B.10.4.1.1.6 Enfriar.

B.10.4.1.1.7 Recuperar, filtrar y llevar a un volumen conocido en matraz volumétrico.

B.10.4.1.1.8 Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

B.10.4.1.1.9 Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica por flama u horno de grafito).

B.10.4.1.2 Digestión por vía seca.

B.10.4.1.2.1 Pesar con precisión de ± 0,1 mg, una cantidad apropiada de muestra.

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

B.10.4.1.2.2 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 95ºC.

B.10.4.1.2.3 Colocar la muestra en una mufla y elevar la temperatura lentamente de 2 a 4ºC por minuto hasta 350°C. Mantener la temperatura hasta que cesen los humos.

B.10.4.1.2.4 Elevar gradualmente la temperatura de 500 a 550ºC para evitar que la muestra se incinere y mantener esa temperatura durante 16 horas o toda la noche.

B.10.4.1.2.5 Apagar la mufla y dejar enfriar.

B.10.4.1.2.6 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 120ºC para remover el exceso de ácido. Colocar la muestra en una mufla fría y elevar la temperatura gradualmente de 500 a 550ºC, manteniéndola por el tiempo necesario. Repetir este procedimiento cuantas veces sea necesario hasta que quede libre de carbón remanente.

B.10.4.1.2.7 Disolver las cenizas completamente en 5 ml de ácido clorhídrico 1N, transferir la muestra disuelta a un tubo de propileno o a un matraz de volumen conocido, enjuagar el crisol con dos alícuotas de 5 ml de ácido clorhídrico 1 N y transferir al mismo tubo o matraz para obtener un volumen de 15 ml en el primero y llevar al aforo en el segundo, tapar y mezclar, si existe presencia de partículas o materia insoluble, filtrar en papel Whatman No. 2, antes de la determinación.

B.10.4.1.2.8 Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

B.10.4.1.2.9 Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica: flama u horno de grafito).

B.10.4.2 Digestión por vía húmeda para la determinación de Sn.

B.10.4.2.1 Proceder igual que en el punto B.10 .4.1.1.1.

B.10.4.2.2 No adicionar ácido nítrico si no se lleva cabo la digestión total en el mismo día.

B.10.4.2.3 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.10.4.2.4 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.10.4.2.5 Retirar la muestra del calor.

B.10.4.2.6 Al mismo tiempo correr dos blancos de reactivos.

B.10.4.2.7 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.10.4.2.8 Evaporar hasta obtener de 10 a 15 ml, usando un matraz similar con 15 ml de agua como patrón de volumen.

B.10.4.2.9 Adicionar aproximadamente 40 ml de agua.

B.10.4.2.10 Agitar y pasar a un matraz de 100 ml y enjuagar con 10 ml de agua.

B.10.4.2.11 Cuando el ácido clorhídrico está presente en la digestión, las muestras se pueden quedar toda la noche o por más tiempo.

B.10.4.2.12 Agregar 1 ml de solución de cloruro de potasio en cada matraz.

B.10.4.2.13 Enfriar a temperatura ambiente.

B.10.4.2.14 Diluir con agua y agregar más agua para compensar el volumen de grasa en el matraz.

B.10.4.2.15 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.10.4.2.16 No filtrar los blancos. Tapar las botellas durante el análisis. Las soluciones son estables por varios meses.

B.10.4.2.17 Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

B.10.4.2.18 Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica: flama u horno de grafito).

B.10.4.3 Digestión por vía húmeda para la determinación de Hg.

B.10.4.3.1 Sistema de reflujo.

B.10.4.3.1.1 Pesar con precisión de ± 0,1 mg, la cantidad apropiada de muestra, dependiendo el tipo de ésta, en un matraz de digestión y adicionar perlas de ebullición.

B.10.4.3.1.2 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.10.4.3.1.3 Dejar enfriar y agregar una mezcla de ácido nítrico y ácido sulfúrico concentrados (1 + 1).

B.10.4.3.1.4 Calentar y agregar más ácido nítrico gota a gota sobre las paredes del recipiente, hasta que el color obscuro de la solución desaparezca.

B.10.4.3.1.5 Enfriar.

B.10.4.3.1.6 Si existe grasa o cera filtrar la solución.

B.10.4.3.1.7 Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

B.10.4.3.1.8 Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica de vapor frío).

B.10.4.3.2 Sistema cerrado.

B.10.4.3.2.1 Pesar con precisión de ± 0,1 mg, la cantidad apropiada de muestra, dependiendo el tipo de ésta, en el recipiente de digestión.

B.10.4.3.2.2 Agregar la cantidad necesaria de ácido nítrico concentrado.

B.10.4.3.2.3 Tapar y sellar perfectamente el recipiente de digestión.

B.10.4.3.2.4 Si el recipiente de digestión es un matraz Erlenmeyer, colocar éste en una autoclave a 15 lb por 30 minutos. Si se utiliza bomba Parr, calentar en parrilla controlando la temperatura a un máximo de 300ºC por 30 minutos.

B.10.4.3.2.5 Enfriar a temperatura ambiente.

B.10.4.3.2.6 En caso de que la digestión no sea completa adicionar peróxido de hidrógeno y repetir la digestión.

B.10.4.3.2.7 Filtrar en caso de que exista grasa o cera y analizar el contenido de Hg.

B.10.4.3.2.8 Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

B.10.4.3.2.9 Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica de vapor frío).

B.10.4.4 Digestión para la determinación de As.

B.10.4.4.1 Digestión por vía húmeda-seca.

B.10.4.4.1.1 Proceder como en el punto B.10.4.3.2 hasta que la digestión sea completa y posteriormente continuar con los siguientes pasos.

B.10.4.4.1.2 Con una pipeta tomar una alícuota de la solución de muestra digerida y colocarla en un crisol Vycor o vaso de precipitados.

B.10.4.4.1.3 Añadir 1 ml de solución de nitrato de magnesio al 7% p/v y calentar en una parrilla a temperatura baja, hasta sequedad.

B.10.4.4.1.4 Incrementar el calor de la placa a un máximo de 375ºC.

B.10.4.4.1.5 Colocar el matraz en la mufla a 450ºC para oxidar cualquier residuo de carbón y descomponer el exceso de nitrato de magnesio, por un tiempo mayor o igual a 30 minutos.

B.10.4.4.1.6 Enfriar y disolver el residuo en 2,0 ml de ácido clorhídrico 8 M.

B.10.4.4.1.7 Añadir 0,1 ml de yoduro de potasio al 20% p/v para reducir el As(V) a As(III).

B.10.4.4.1.8 Dejar reposar por un tiempo mayor a 2 minutos y transferir a un matraz y llevar al aforo con agua.

B.10.4.4.1.9 Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

B.10.4.4.1.10 Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica con adaptación para horno de grafito o generador de hidruros).

B.10.4.4.2 Digestión por vía seca.

B.10.4.4.2.1 Pesar con precisión de ± 0,1 mg, la cantidad necesaria de muestra en un crisol Vycor o de platino.

B.10.4.4.2.2 Añadir el volumen necesario de nitrato de magnesio al 50% p/v

B.10.4.4.2.2 Añadir el volumen necesario de nitrato de magnesio al 50% p/v.

B.10.4.4.2.3 Homogeneizar con una varilla limpia de plástico extendiendo la mezcla en el crisol.

B.10.4.4.2.4 Colocar la muestra en una mufla subiendo gradualmente la temperatura hasta 300ºC por 2 horas. Posteriormente subir gradualmente la temperatura hasta 500ºC por 16 horas o durante toda la noche.

B.10.4.4.2.5 Enfriar a temperatura ambiente y humedecer las cenizas con ácido nítrico al 50% v/v.

B.10.4.4.2.6 Calentar en parrilla hasta la eliminación del ácido.

B.10.4.4.2.7 Llevar los crisoles a una mufla elevando gradualmente la temperatura de 23 a 500ºC, manteniendo ésta 30 min hasta evaporación total.

B.10.4.4.2.8 Transferir las cenizas del crisol a un matraz aforado usando una porción de 10 ml de ácido clorhídrico 0,5 N.

B.10.4.4.2.9 Enjuagar los crisoles con 5 ml de agua destilada y transferir al matraz, añadir 1 ml de solución de yoduro de potasio al 15% y mezclar.

B.10.4.4.2.10 Dejar reposar durante 15 minutos y llevar al aforo.

B.10.4.4.2.11 Correr un blanco de reactivos y muestra fortificada por cada serie de digestión.

B.10.4.4.2.12 Leer en el aparato de elección (espectrómetro de absorción atómica con adaptación para horno de grafito o generador de hidruros).

B.10.4.5 Digestión para la determinación de Cd, As, Pb, Sn, Cu, Fe, Zn y Hg por horno de microondas.

Pesar con precisión de ± 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.10.5 Procedimiento

B.10.5.1 Espectrometría de absorción atómica por flama.

B.10.5.1.1 Calibración. Es necesario comprobar que se tiene una calibración inicial y periódica aceptable.

B.10.5.1.1.1 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.10.5.1.1.2 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.10.5.1.1.3 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.10.5.1.1.4 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.10.5.1.1.5 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.10.5.1.2 Operación del instrumento.

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

B.10.5.1.2.1 Después de que se ha realizado la calibración, se debe verificar que el instrumento trabaje adecuadamente para el analito. Para ello se analiza una muestra de control de calidad. Si las mediciones varían en ± 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.10.5.1.2.2 Para verificar que el instrumento no presenta deriva, por cada 10 análisis se debe analizar el blanco de calibración. Si el valor verdadero del analito difiere ± 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.10.5.1.2.3 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 x 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.10.5.1.3 Determinación

B.10.5.1.3.1 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.10.5.1.3.2 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.10.5.1.3.3 En los equipos que pueden programarse, la lectura obtenida da directamente la concentración del elemento en las unidades de concentración utilizadas.

B.10.5.1.3.4 Se debe analizar al menos un blanco de reactivos fortificado para cada grupo de muestras. Se calcula la exactitud como el porciento de recuperación (de acuerdo al apartado B.10.5.1.3.6).

B.10.5.1.3.5 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.10.5.1.3.6 Se debe calcular el porciento de recuperación para el analito, de acuerdo a:

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

R = % recuperación

CM = Concentración de la muestra fortificada

C = Concentración de la muestra

CA = Concentración equivalente de analito añadido a la muestra.

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

B.10.5.2 Espectrometría de absorción atómica por horno de grafito.

B.10.5.2.1 Calibración.

B.10.5.2.1.1 Proceder de acuerdo a los puntos B.10.5.1.1.1 a B.10.5.1.1.4

B.10.5.2.1.2 Elaborar una curva de calibración graficando área de pico o altura máxima contra concentración del analito.

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.10.5.2.2 Operación del instrumento.

B.10.5.2.2.1 Proceder de acuerdo a B.10.5.1.2.1 a B.10.5.1.2.3

B.10.5.2.3 Determinación.

B.10.5.2.3.1 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.10.5.3 Espectrometría de absorción atómica por generador de hidruros.

B.10.5.3.1 Calibración.

B.10.5.3.1.1 Proceder de acuerdo a los puntos B.10.5.1.1.1 a B.10.5.1.1.4

B.10.5.3.1.2 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.10.5.3.2 Operación del instrumento.

B.10.5.3.2 Operación del instrumento.

B.10.5.3.2.1 Proceder de acuerdo a los puntos B.10.5.1.2.1 a B.10.5.1.2.3

B.10.5.3.3 Determinación.

B.10.5.3.3.1 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.10.5.3.3.2 Ajustar a 0 de absorbancia con el blanco de calibración de ácido clorhídrico al 1,5% siguiendo las instrucciones del manual del fabricante.

B.10.5.3.3.3 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.10.5.3.3.4 Tomar un volumen conocido de la muestra dirigida y seguir el mismo procedimiento que con los estándares de calibración.

B.10.5.4 Espectrometría de absorción atómica por vapor frío.

B.10.5.4.1 Calibración.

B.10.5.4.1.1 Proceder igual que en los puntos B.10.5.1.1.1 a B.10.5.1.1.4.

B.10.5.4.1.2 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.10.5.4.2 Operación del instrumento.

B.10.5.4.2.1 Proceder de acuerdo a los puntos B.10.5.1.2.1 a B.10.5.1.2.3.

B.10.5.4.3 Determinación.

B.10.5.4.3.1 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.10.5.4.3.2 Ajustar a 0 de absorbancia con el blanco de calibración (solución de dilución y de reducción) siguiendo las instrucciones del manual del fabricante.

B.10.5.4.3.3 Optimizar con un estándar de calibración la respuesta del instrumento al analito.

B.10.5.4.3.4 Tomar 25 ml de la muestra digerida y seguir el mismo procedimiento que con los estándares de calibración.

B.10.6 Expresión de resultados

B.10.6.1 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:

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

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.10.7 Informe de la prueba

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

B.11. PREPARACION Y DILUCION DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANALISIS MICROBIOLOGICO.

B.11.1 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.11.2 Reactivos y materiales

B.11.2.1 Reactivos

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

como agua destilada.

B.11.2.1.1 Preparación de reactivos

B.11.2.1.1.1 Solución de hidróxido de sodio 1,0 N

FORMULA

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

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

B.11.2.1.1.2 Soluciones diluyentes

B.11.2.1.1.2.1 Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada).

FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Fosfato de Sodio monobásico	34,0 g
Agua	1,0 l

Preparación: Disolver el fosfato en 500 ml de agua y ajustar el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio 1,0 N. Llevar a un litro con agua. Esterilizar durante 15 minutos a 121° ± 1,0 °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° ± 1,0 °C durante 15 minutos. Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deberán ser iguales a los iniciales.

B.11.2.1.1.2.2 Agua peptonada

FORMULA

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

Preparación: Disolver los componentes en un litro de agua. Ajustar el pH a 7 ± O,1 con hidróxido de sodio 1,0 N. Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml o en cualquier volumen múltiplo de nueve según se requiera. Esterilizar a 121 ± 1,0 °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 obscuro a una temperatura entre 0 a 5°C por un tiempo no mayor de un mes, en condiciones tales que no alteren su volumen o composición.

B.11.2.2 Materiales

B.11.2.2.1 Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 ml (o si es necesario de 1 ml y 2 ml), con tapón de algodón. Las pipetas pueden ser graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total.

B.11.2.2.2 Frascos de vidrio de 250 ml con tapón de rosca.

B.11.2.2.3 Tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca.

B.11.2.2.4 Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc.

B.11.2.2.5 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 ± 1,0 °C.

B.11.2.2.6 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.11.3 Aparatos e instrumentos

B.11.3.1 Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de 170°C.

B.11.3.2 Autoclave con termómetro y manómetro, calibrada con termómetro de máximas y mínimas.

B.11.3.3 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 ± 0,5°C.

B.11.3.4 Licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato o bien un homogeneizador peristáltico (Stomacher).

B.11.3.5 Vasos para licuadora con tapa esterilizables o bolsas estériles para homogeneizador peristáltico.

B.11.3.6 Balanza granataria con sensibilidad de 0,1 g.

B.11.4 Procedimiento

B.11.4.1 Preparación de la dilución primaria.

B.11.4.1.1 A partir de muestras líquidas:

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

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

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

B.11.4.1.1.1 Agitar la muestra manualmente con 25 movimientos de arriba a abajo en un arco de 30 cm efectuados en un tiempo de 7 segundos. Tomar 1 ml de la muestra y diluir con 9 ml del diluyente el cual debe

encontrarse a una temperatura similar a ésta, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente.

B.11.4.1.1.2 Siempre que la cantidad de muestra lo permita, tomar alícuotas mayores, por ejemplo volúmenes de 10 u 11 ml, diluídos con 90 o 99 ml, de la misma forma que se describió anteriormente

B.11.4.1.2 A partir de muestras sólidas o semisólidas.

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

B.11.4.1.2.1 Pesar una cantidad de 10 u 11 g de la muestra por analizar en un recipiente o bolsa plástica estériles de tamaño adecuado.

B.11.4.1.2.2 Adicionar un volumen de 90 a 99 ml del diluyente llevado a una temperatura similar a la de la muestra.

B.11.4.1.2.3 Operar la licuadora o el homogeneizador peristáltico de 1 a 2 minutos hasta obtener una suspensión completa y homogénea según se indique en la técnica correspondiente para cada alimento. Aún en los equipos más lentos, este tiempo no debe exceder de 2,5 minutos.

B.11.4.1.2.4 Permitir que las partículas grandes se sedimenten, y transferir la cantidad deseada tomando de las capas superiores de la suspensión.

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

El homogeneizador peristáltico (Stomacher) puede no ser adecuado para algunos productos (por ejemplo, aquellos con

partículas agudas o constituyentes que no se dispersen fácilmente). Debe ser utilizado sólo cuando exista evidencia (publicada o por ensayos comparativos) de que los resultados obtenidos no difieren significativamente con aquellos obtenidos con licuadora.

B.11.4.2 Preparación de las diluciones decimales adicionales.

B.11.4.2.1 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.11.4.2.2 Mezclar cuidadosamente cada botella de diluyente siempre de la misma manera que se describe en B.11.4.1.1.1.

B.11.4.2.3 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.11.4.2.4 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.11.4.2.5 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.11.4.2.6 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

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.11.4.3 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.12. DETERMINACION DE BACTERIAS COLIFORMES. TECNICA DEL NUMERO MAS PROBABLE.

B.12.1 Fundamento

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

B.12.2 Reactivos y materiales

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

B.12.2.1 Reactivos

B.12.2.1.1 Soluciones diluyentes

B.12.2.1.1.1 Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada)

FORMULA

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

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

B.12.2.1.1.2. Agua peptonada

FORMULA

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

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

B.12.2.1.2 Medios de cultivo.

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

Caldo lauril sulfato triptosa (medio de enriquecimiento selectivo).

Caldo lactosa bilis verde brillante (medio de confirmación).

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

B.12.2.1.2.1 Caldo lactosado

B.12.2.1.2.1 Caldo lactosado

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

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

B.12.2.1.2.2 Caldo lauril sulfato triptosa.

Ingrediente	Medio de concentración 1,5	Medio de concentración sencilla
Triptosa	30,0 g	20,0 g
Lactosa	7,5 g	5,0 g
Fosfato dipotásico	4,125 g	2,75 g
Fosfato monopotásico	4,125 g	2,75 g
Cloruro de sodio	7,50 g	5,0 g
Lauril sulfato de sodio	0,15 g	0,1 g
Agua destilada	1000,0 ml	1000,0 ml

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

B.12.2.1.2.3 Lactosa bilis verde brillante

FORMULA

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

Disolver los componentes o el medio completo deshidratado en agua, calentar si es necesario. Ajustar el pH, de tal manera que después de la esterilización éste sea de 7,2 a 25°C. Distribuir el medio en cantidades de 10 ml en tubos de 16 X 160 mm conteniendo campana de fermentación. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ± 1,0°C. Las campanas de fermentación no deben contener burbujas de aire después de la esterilización.

B.12.2.2 Materiales

- Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 ml (o si es necesario de 11 y 2 ml), con tapón de algodón. Las pipetas

- Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 ml (o si es necesario de 11 y 2 ml), con tapón de algodón. Las pipetas pueden ser graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total.
- Frascos de vidrio de 250 ml con tapón de rosca.
- Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc.
- Tubos de cultivo 20 x 200 mm y de 16 x 160 mm con tapones metálicos o de rosca.
- Campanas de fermentación (tubos de Durham).
- Pipetas bacteriológicas graduadas de 10 y 1 ml
- Gradillas.
- Asa de platino o nicromel de aproximadamente 3 mm de diámetro
- Todo el material que tenga contacto con las muestras bajo estudio debe esterilizarse mediante:
- Horno, durante 2 horas a 170 a 175°C o 1 h a 180°C o autoclave, durante 15 minutos como mínimo a 121 ± 1,0°C.
- El material de vidrio puede sustituirse por material desechable que cumpla con las especificaciones deseadas. No debe usarse material de vidrio dañado por las esterilizaciones repetidas y éste debe ser químicamente inerte.

B.12.3 Aparatos e instrumentos

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

B.12.4 Preparación de la muestra

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

B.12.5 Procedimiento

B.12.5.1 Para alimentos.

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

B.12.5.1.1 Prueba presuntiva

B.12.5.1.1.1 Inoculación. Tomar tres tubos de medio de enriquecimiento de mayor concentración. Usar una pipeta estéril para transferir a cada tubo 10 ml de la muestra si es líquida o 10 ml de la dilución primaria inicial, en el caso de otros productos.

B.12.5.1.1.1.1 Tomar tres tubos de concentración sencilla del medio selectivo de enriquecimiento. Usar una pipeta estéril para transferir a cada uno de estos tubos 1 ml de la muestra si es líquida o 1 ml de la dilución primaria en el caso de otros productos.

B.12.5.1.1.1.2 Para las diluciones subsecuentes, continuar como se indica en el párrafo anterior, usando una pipeta diferente para cada dilución. Mezclar suavemente el inóculo con el medio.

B.12.5.2.1.2 Incubación. Incubar los tubos a 35 ± 0,5 °C por 24 ± 2 horas y observar si hay formación de gas, en caso contrario prolongar la incubación hasta 48 ± 2 horas

B.12.5.1.2 Prueba confirmativa

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

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

B.12.6 EXPRESION DE LOS RESULTADOS.

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

El cuadro 3 muestra algunos ejemplos que se pueden presentar.

Ejemplos:

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

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

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

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

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

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

CUADRO3.- Ejemplos de la selección de resultados positivos para el cálculo del NMP.

EJEMPLO	Número de tubos positivos obtenidos de tres Tubos incubados, para las siguientes cantidades de muestra inoculada por tubo							NMP	
	Producto Liquido	(ml)	10	1	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	Producto	Otros
	Otros Productos	(g)	1	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	Liquido	Otros
	Mayor dilución = menor concentración							ml^{-1}	g^{-1}
1			3	3	2	1	0	15 (5)	150 (6)
2			3	3	3	0		24 (5)	240 (6)
3			2	2	1	1	0	7 (6)	70 (7)
4			3	3	0	0	0	2.4 (4)	24 (5)
5			2	2	0	1	0	0,21 (4)	2,1 (5)

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

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

0-0-1	0,03	<0,005	<0,09	0,02	<0,005	0,07
0-1-0	0,03	<0,005	0,13	0,02	<0,005	0,07
0-2-0	---	---	---	0,04	<0,005	0,11
1-0-0	0,04	<0,005	0,20	0,02	<0,005	0,07
1-0-1	0,07	0,01	0,21	0,04	<0,005	0,11
1-1-0	0,07	0,01	0,23	0,04	<0,005	0,11
1-1-1	0,11	0,03	0,36	0,06	<0,005	0,15
1-2-0	0,11	0,03	0,36	0,06	<0,005	0,15
2-0-0	0,09	0,01	0,36	0,05	<0,005	0,13
2-0-1	0,14	0,03	0,37	0,07	0,01	0,17
2-1-0	0,15	0,03	0,44	0,07	0,01	0,17
2-1-1	0,20	0,07	0,89	0,09	0,02	0,21
2-2-0	0,21	0,04	0,47	0,09	0,02	0,21
2-2-1	0,28	0,10	1,50	----	---	---
2-3-0	---	---	---	0,12	0,03	0,28
3-0-0	0,23	0,04	1,20	0,08	0,01	0,19
3-0-1	0,39	0,07	1,3	0,11	0,02	0,25
3-0-2	0,64	0,15	3,80	---	---	---
3-1-0	0,43	0,07	2,1	0,11	0,02	0,25
3-1-1	0,75	0,14	2,3	0,14	0,04	0,34
3-1-2	1,20	0,30	3,8	---	---	---
3-2-0	0,93	0,15	3,80	0,14	0,04	0,34
3-2-1	1,50	0,30	4,40	0,17	0,05	0,46
3-2-2	2,10	0,35	4,70	--	--	--
3-3-0	2,40	0,36	13,0	--	--	--
3-3-1	4,60	0,71	24,0	--	--	--
3-3-2	11,0	1,50	48,0	--	--	--
3-3-3	>11.0	>1,50	>48.0	--	--	--
4-0-0	--	---	---	0,13	0,03	0,31
4-0-1	--	---	---	0,17	0,05	0,46
4-1-0	--	---	---	0,17	0,05	0,46
4-1-1	--	--	---	0,21	0,07	0,63
4-1-2	--	--	---	0,26	0,09	0,78
4-2-0	--	--	---	0,22	0,07	0,67
4-2-1	--	---	---	0,26	0,09	0,78
4-3-0	--	---	---	0,27	0,09	0,80
4-3-1	--	---	---	0,33	0,11	0,93
4-4-0	--	---	---	0,34	0,12	0,93
5-0-0	--	---	---	0,23	0,07	0,70
5-0-1	--	---	---	0,31	0,11	0,89
5-0-2	--	---	---	0,43	0,15	1,14
5-1-0	--	---	---	0,33	0,11	0,93
5-1-1	--	---	----	0,46	0,16	1,2
5-1-2	--	---	---	0,63	0,21	1,5
5-2-0	--	---	---	0,49	0,17	1,3
5-2-1	--	---	---	0,70	0,23	1,70
5-2-2	--	---	---	0,94	0,28	2,2
5-3-0	--	---	---	0,79	0,25	1,9

5-3-1	--	---	---	1,10	0,31	2,5
5-3-2	--	---	---	1,4	0,37	3,4
5-3-3	--	---	---	1,80	0,44	5,0
5-4-0	--	---	---	1,30	0,35	3,0
5-4-1	--	---	---	1,70	0,43	4,9
5-4-2	--	---	---	2,20	0,57	7,0
5-4-3	--	---	---	2,80	0,90	8,5
5-4-4	--	---	---	3,50	1,20	10,0
5-5-0	---	---	---	2,40	0,68	7,5
5-5-1	---	---	---	3,50	1,60	10,0
5-5-2	---	---	---	5,40	1,80	14,0
5-5-3	----	---	---	9,20	3,0	32,0
5-5-4	---	---	---	16,09	6,40	58,0
5-5-5	----	---	---	---	---	---

CUADRO 5. Indice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos. (Diluciones 1,0, 0,1 y 0,01g)

		3 TUBOS POR DILUCION		5 TUBOS POR DILUCION		
Combinación de positivos	Indice del NMP por g	95% Límites de confianza		Indice del NMP por g	95% Límites de confianza	
		bajo	alto		bajo	alto
0-0-0	<0,3	<0,05	<0,9	<0,2	<0,05	<0,7
0-0-1	0,3	<0,05	<0,9	0,2	<0,05	0,7
0-1-0	0,3	<0,05	1,3	0,2	<0,05	0,7
0-2-0	---	---	---	0,4	<0,05	0,11
1-0-0	0,4	<0,05	2,0	0,2	<0,05	0,7
1-0-1	0,7	0,1	2,0	0,4	<0,05	1,1
1-1-0	0,7	0,1	2,3	0,4	<0,05	1,1
1-1-1	1,1	0,3	3,6	0,6	<0,05	1,5
1-2-0	1,1	0,3	3,6	0,6	<0,05	1,5
2-0-0	0,9	0,1	3,6	0,5	<0,05	1,3
2-0-1	1,4	0,3	3,7	0,7	0,1	1,7
2-1-0	1,5	0,3	4,4	0,7	0,1	1,7
2-1-1	2,0	0,7	8,9	0,9	0,2	2,1
2-2-0	2,1	0,4	4,7	0,9	0,2	2,1
2-2-1	2,8	1,0	15,0	---	---	---
2-3-0	---	---	---	1,2	0,3	2,8
3-0-0	2,3	0,4	12,0	0,8	0,1	1,9
3-0-1	3,9	0,7	13,0	1,1	0,2	2,5
3-0-2	6,4	1,5	38,0	--	--	--
3-1-0	4,3	0,7	21,0	1,1	0,2	2,5
3-1-1	7,5	1,4	23,0	1,4	0,4	3,4
3-1-2	12,0	3,0	38,0	--	--	--
3-2-0	9,3	1,5	38,0	1,4	0,4	3,4
3-2-1	15,0	3,0	44,0	1,7	0,5	4,6
3-2-2	21,0	3,5	47,0	--	--	--
3-3-0	24,0	3,6	130,0	--	--	--
3-3-1	46,0	7,1	240,0	--	--	--

3-3-2	110,0	15,0	480,0	--	--	--
3-3-3	>110,0	>15,0	>480,0	--	--	--
4-0-0	--	---	---	1,3	0,3	3,1
4-0-1	--	---	---	1,7	0,5	4,6
4-1-0	--	---	---	1,7	0,5	4,6
4-1-1	--	---	---	2,1	0,7	6,3
4-1-2	--	---	---	2,6	0,9	7,8
4-2-0	--	---	---	2,2	0,7	6,7
4-2-1	--	---	---	2,6	0,9	7,8
4-3-0	--	---	---	2,7	0,9	8,0
4-3-1	--	---	---	3,3	1,1	9,3
4-4-0	--	---	---	3,4	1,2	3,
5-0-0	--	---	---	2,3	0,7	7,0
5-0-1	--	---	---	3,1	1,1	8,9
5-0-2	--	---	---	4,3	1,5	11,4
5-1-0	--	---	---	3,3	1,1	9,3
5-1-1	--	---	---	4,6	1,6	12,0
5-1-2	--	---	---	6,3	2,1	15,0
5-2-0	--	---	---	4,9	1,7	13,0
5-2-1	--	---	---	7,0	2,3	17,0
5-2-2	--	---	---	9,4	2,8	22,0
5-3-0	--	---	---	7,9	2,5	19,0
5-3-1	--	---	---	11,0	3,1	25,0
5-3-2	--	---	---	14,0	3,7	34,0
5-3-3	--	---	---	18,0	4,4	50,0
5-4-0	--	---	---	13,0	3,5	30,0
5-4-1	--	---	---	17,0	4,3	49,0
5-4-2	--	---	---	22,0	5,7	70,0
5-4-3	--	---	---	28,0	9,0	85,0
5-4-4	--	---	---	35,0	12,0	100,0
5-5-0	--	---	---	24,0	6,8	75,0
5-5-1	--	---	---	35,0	12,0	100,0
5-5-2	--	---	---	54,0	18,0	140,0
5-5-3	--	---	---	92,0	30,0	320,0
5-5-4	--	---	---	161,0	64,0	580,0
5-5-5	--	---	---	>161,0	>64,0	>580,0

CUADRO 6. Indice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos. (Diluciones 0,1, 0,001 y 0,0001 g)

		3 TUBOS POR DILUCION		5 TUBOS POR DILUCION		
Combinación de positivos	Indice del NMP por g	95% Límites de confianza		Indice del NMP por g	95% Límites de confianza	
		bajo	Alto		bajo	alto
0-0-0	<3	<0,5	<9	<2	<0,5	<7
0-0-1	3	<0,5	<9	2	<0,5	7
0-1-0	3	<0,5	13	2	<0,5	7
0-2-0	---	---	---	4	<0,5	11
1-0-0	4	<0,5	20	2	<0,5	7

1-0-0	4	<0,5	20	2	<0,5	7
1-0-1	7	1	21	4	<0,5	11
1-1-0	7	1	23	4	<0,5	11
1-1-1	11	3	36	6	<0,5	15
1-2-0	11	3	36	6	<0,5	15
2-0-0	9	1	36	5	<0,5	13
2-0-1	14	3	37	7	1,0	17
2-1-0	15	3	44	7	1,0	17
2-1-1	20	7	89	9	2	21
2-2-0	21	4	47	9	2	21
2-2-1	28	10	150	---	---	---
2-3-0	---	---	---	12	3	28
3-0-0	23	4	120	8	1	19
3-0-1	39	7	13,0	11	2	25
3-0-2	64	15	380	--	--	--
3-1-0	43	7	210	11	2	25
3-1-1	75	14	230	14	4	34
3-1-2	120	30	380	--	--	--
3-2-0	93	15	380	14	4	34
3-2-1	150	30	440	17	5	46
3-2-2	210	35	470	--	--	--
3-3-0	240	36	130,0	--	--	--
3-3-1	460	71	240,0	--	--	--
3-3-2	1100	150	480,0	--	--	--
3-3-3	>1100	>150	>480,0	--	--	--
4-0-0	--	---	---	13	3	31
4-0-1	--	---	---	17	5	46
4-1-0	--	---	---	17	5	46
4-1-1	--	---	---	21	7	63
4-1-2	--	---	---	26	9	78
4-2-0	--	---	---	22	7	67
4-2-1	--	---	---	26	9	78
4-3-0	--	---	---	27	9	80
4-3-1	--	---	---	33	11	93
4-4-0	--	---	---	34	12	93
5-0-0	--	---	---	23	7	7
5-0-1	--	---	---	31	11	89
5-0-2	--	---	---	43	15	114
5-1-0	--	---	---	33	11	93
5-1-1	--	---	---	46	16	120
5-1-2	--	---	---	63	21	150
5-2-0	--	---	---	49	17	130
5-2-1	--	---	---	70	23	170
5-2-2	--	---	---	94	28	220
5-3-0	--	---	---	79	25	190
5-3-1	--	---	---	110	31	250
5-3-2	--	---	---	140	37	340
5-3-3	--	---	---	180	44	500

5-4-0	--	---	---	130	35	300
5-4-1	--	---	---	170	43	490
5-4-2	--	---	---	220	57	700
5-4-3	--	---	---	280	90	850
5-4-4	--	---	---	350	120	1000
5-5-0	--	---	---	240	68	750
5-5-1	--	---	---	350	120	1000
5-5-2	--	---	---	540	180	1400
5-5-3	--	---	---	920	300	3200
5-5-4	--	---	---	1600	640	5800
5-5-5	--	---	---	>1600	>640	>5800

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

		3 TUBOS POR DILUCION		5 TUBOS POR DILUCION		
Combinación de positivos	Indice del NMP por g	95% Límites de confianza		Indice del NMP por g	95% Límites de confianza	
		bajo	Alto		bajo	alto
0-0-0	<30	<5	<90	<20	<5	<70
0-0-1	30	<5	<90	20	<5	70
0-1-0	30	<5	130	20	<5	70
0-2-0	---	---	---	40	<5	110
1-0-0	40	<5	200	20	<5	70
1-0-1	70	10	210	40	<5	110
1-1-0	70	10	230	40	<5	110
1-1-1	110	30	360	60	<5	150
1-2-0	110	30	360	60	<5	150
2-0-0	90	10	360	50	<5	130
2-0-1	140	30	370	70	10	170
2-1-0	150	30	440	70	10	170
2-1-1	200	70	890	90	20	210
2-2-0	210	40	470	90	20	210
2-2-1	280	100	1500	---	---	---
2-3-0	---	---	---	120	30	280
3-0-0	230	40	1200	80	10	190
3-0-1	390	70	1300	110	20	250
3-0-2	640	150	3800	--	--	--
3-1-0	430	70	2100	110	20	250
3-1-1	750	140	2300	140	40	340
3-1-2	1200	300	3800	--	--	--
3-2-0	930	150	3800	140	40	340
3-2-1	1500	300	4400	170	50	460
3-2-2	2100	350	4700	--	--	--
3-3-0	2400	360	13000	--	--	--
3-3-1	4600	710	24000	--	--	--
3-3-2	11000	1500	48000	--	--	--
3-3-3	>11000	>1500	>48000	--	--	--
4-0-0	--	---	---	130	30	310

4-0-1	--	---	---	170	50	460
4-1-0	--	---	---	170	50	460
4-1-1	--	---	---	210	70	630
4-1-2	--	---	---	260	90	780
4-2-0	--	---	---	220	70	670
4-2-1	--	---	---	260	90	780
4-3-0	--	---	---	270	90	800
4-3-1	--	---	---	330	110	930
4-4-0	--	---	---	340	120	930
5-0-0	--	---	---	230	70	700
5-0-1	--	---	---	310	110	890
5-0-2	--	---	---	430	150	1140
5-1-0	--	---	---	330	110	930
5-1-1	--	---	---	460	160	1200
5-1-2	--	---	---	630	210	1500
5-2-0	--	---	---	490	170	1300
5-2-1	--	---	---	700	230	1700
5-2-2	--	---	---	940	280	2200
5-3-0	--	---	---	790	250	1900
5-3-1	--	---	---	1100	310	2500
5-3-2	--	---	---	1400	370	3400
5-3-3	--	---	---	1800	440	5000
5-4-0	--	---	---	1300	350	3000
5-4-1	--	---	---	1700	430	4900
5-4-2	--	---	---	2200	570	7000
5-4-3	--	---	---	2800	900	8500
5-4-4	--	---	---	3500	1200	10000
5-5-0	--	---	---	2400	680	7500
5-5-1	--	---	---	3500	1200	10000
5-5-2	--	---	---	5400	1800	14000
5-5-3	--	---	---	9200	3000	32000
5-5-4	--	---	---	16000	6400	58000
5-5-5	--	---	---	>16000	>6400	>58000

B.12.7 Informe de la prueba

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

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

B.13. METODO PARA LA CUENTA DE MICROORGANISMOS COLIFORMES TOTALES EN PLACA.

B.13.1 Fundamento

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

B.13.2 Reactivos y materiales

B.13.2.1 Reactivos

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

B.13.2.1.1 Soluciones diluyentes

B.13.2.1.1.1 Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada)

FORMULA

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

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

B.13.2.1.1.2 Agua Peptonada

FORMULA

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

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

B.13.2.1.2 Medio de Cultivo

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

FORMULA

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

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

B.13.2.2 Materiales

- Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 ml (o si es necesario de 11 y 2 ml), con tapón de algodón. Las pipetas pueden ser graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total.
- Frascos de vidrio de 250 ml con tapón de rosca.
- Tubos de 16 X 150 mm con tapón de rosca.

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

¡ Cajas Petri.

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

¡ Horno, durante 2 h a 170 - 175°C, o 1 h a 180°C; o en autoclave, durante 15 minutos como mínimo a 121 ± 1,0°C.

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

B.13.3 Aparatos e instrumentos

¡ Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima

¡ de 170°C.

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

¡ Baño de agua con control de temperatura y circulación mecánica, provista con termómetro calibrado con divisiones de 0,1° C y que mantenga la temperatura a 45 ± 1,0°C.

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

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

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

¡ Registrador mecánico o electrónico.

¡ Microscopio óptico.

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

B.13.4 Preparación de la muestra

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

B.13.5 Procedimiento

B.13.5.1 Colocar en cajas Petri por duplicado 1 ml de la muestra líquida directa o de la dilución primaria, utilizando para tal propósito una pipeta estéril.

B.13.5.2 Repetir el procedimiento tantas veces como diluciones decimales se requiera sembrar, utilizando una pipeta estéril diferente para cada dilución.

B.13.5.3 Verter de 15 a 20 ml del medio RVBA fundido y mantenido a 45 ± 1,0°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.13.5.4 Mezclar cuidadosamente el inóculo con el medio con seis movimientos de derecha a izquierda, seis movimientos en el sentido de las manecillas del reloj, seis movimientos en el sentido contrario al de las manecillas del reloj y seis de atrás para adelante, sobre una superficie lisa y nivelada. Permitir que la mezcla solidifique dejando las cajas Petri reposar sobre una superficie horizontal fría.

B.13.5.5 Preparar una caja control con 15 ml de medio para verificar la esterilidad.

B.13.5.6 Después de que está el medio completamente solidificado en la caja, verter aproximadamente 4 ml del medio RVBA a 45 ± 1,0°C en la superficie del medio inoculado. Dejar que solidifique.

B.13.5.7 Invertir las placas y colocarlas en la incubadora a 35°C, durante 24 ± 2 horas.

B.13.5.8 Después del período especificado para la incubación, contar las colonias con el contador de colonias.

B.13.5.9 Seleccionar las placas que contengan entre 15 y 150 colonias. Las colonias típicas son de color rojo oscuro, generalmente se encuentran rodeadas de un halo de precipitación debido a las sales biliares, el cual es de color rojo claro o rosa, la morfología colonial es semejante a lentes biconvexos con un diámetro de 0,5 a 2,0 mm.

B.13.6 Expresión de los resultados

B.13.6.1 Cálculo del Método

B.13.6.1.1 Placas que contienen entre 15 y 150 colonias características.

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

B.13.6.1.2 Placas que contienen menos de 15 colonias características.

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

B.13.6.1.3 Placas con colonias no características.

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

B.13.7 Informe de la prueba

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

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

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

B.14. METODO PARA LA DETERMINACION DE *Salmonella* EN ALIMENTOS.

B.14.1 Fundamento

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

B.14.1.1 Preenriquecimiento, es el paso donde la muestra es enriquecida en un medio nutritivo no selectivo, que permite restaurar las células de *Salmonella* dañadas a una condición fisiológica estable.

B.14.1.2 Enriquecimiento selectivo, empleado con el propósito de incrementar las poblaciones de *Salmonella* e inhibir otros organismos presentes en la muestra.

B.14.1.3 Selección en medios sólidos, en este paso se utilizan medios selectivos que restringen el crecimiento de otros géneros diferentes a *Salmonella* y permite el reconocimiento visual de colonias sospechosas.

B.14.1.4 Identificación bioquímica, este paso permite la identificación génerica de los cultivos de *Salmonella* y la eliminación de cultivos sospechosos falsos.

B.14.1.5 Serotipificación, es una técnica serológica que permite la identificación específica de un cultivo.

B.14.2 Reactivos y materiales

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

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

B.14.2.1 Reactivos

B.14.2.1.1 Medios de pre-enriquecimiento

B.14.2.1.1.1 Agua de peptona tamponada

FORMULA

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

Preparación: Disolver los componentes en agua, calentando si es necesario. Ajustar el pH, si es necesario, después de la esterilización a 7,0. Distribuir en recipientes de vidrio esterilizables con la capacidad necesaria para obtener las porciones necesarias para la prueba. Esterilizar por 20 min a 121 ± 1°C

B.14.2.1.1.2 Caldo lactosado

FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Extracto de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Lactosa	5,0 g

Agua destilada	1,0 l

pH final: 6,9 ± 0,2

Preparación: Disolver los ingredientes en agua, calentando a 65°C. Distribuir en porciones de 225 ml, en frascos de 500 ml.. Esterilizar durante 15 min a 121°C ± 1°C

B.14.2.1.2 Caldo de enriquecimiento

B.14.2.1.2.1 Caldo selenito-cistina

FORMULA

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

pH final: 7,0 ± 0,2 a 25°C

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

B.14.2.1.2.2 Caldo tetrationato

FORMULA

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

pH final: 7,0 ± 0,1

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

B.14.2.1.2.3 Vassiliadis-Rappaport

Solución A

FORMULA

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

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

Solución B

FORMULA

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

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

Solución C

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

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

Medio completo

Ingredientes	Cantidades
solución A	1 000 ml
solución B	100 ml
solución C	10 ml

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

B.14.2.1.2.4 Caldo de Soya Tripticasa

FORMULA

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

pH final: 7,3 ± 0,2

Preparación: Disolver los ingredientes en 1 litro de agua destilada, calentando lentamente hasta su disolución completa. Distribuir porciones de 225 ml dentro de matraces de 500 ml y esterilizar en autoclave durante 15 min a 121°C ± 1°C.

B.14.2.1.2.5 Leche descremada reconstituida

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

B.14.2.1.2.6 Caldo soya tripticasa estéril adicionado con sulfito de potasio.

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

B.14.2.1.3 Medios de Aislamiento

B.14.2.1.3.1 Agar verde brillante (VB)

FORMULA

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

pH final: 6,9 ± 0,2

Preparación: Suspender los ingredientes en un litro de agua destilada y calentar a ebullición, hasta disolución completa. Ajustar el pH. Esterilizar en autoclave por 15 min a 121°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 obscuro, de color marrón.

B.14.2.1.3.2 Agar con sulfito de bismuto

FORMULA

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

pH final: 7,6 ± 0,2

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

B.14.2.1.3.3 Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)

FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Xilosa	3,75g
L-lisina	5,00g
Lactosa	7,50g
Sacarosa	7,50g
Cloruro de sodio	5,00g
Extracto de levadura	3,00g
Rojo de fenol	0,08g
Agar	15,00g
Desoxicolato de sodio	2,50g
Citrato férrico-amónico	0,80g
Tiosulfato de sodio	6,80g

Agua destilada	1,00l

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.14.2.1.3.4 Agar para Salmonella y Shigella (SS)

FORMULA

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

pH final: 7,0 ± 0,2

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

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

B.14.2.1.3.5 Agar entérico Hektoen

FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Proteosa peptona	12,000g
Extracto de levadura	3,000g
Lactosa	12,000g
Sacarosa	12,000g
Salicina	2,000g
Sales biliares	9,000g
Cloruro de sodio	5,000g
Tiosulfato de sodio	5,000g
Citrato amónico férrico	1,500g
Azul de bromotimol	0,064g
Fuscina ácida	0,100g
Agar	13,500g
Agua	1,000l

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.14.2.1.4 Medios para pruebas bioquímicas

B.14.2.1.4.1 Agar de tres azúcares y hierro (TSI)

B.14.2.1.4.1 Agar de tres azúcares y hierro (TSI)

FORMULA

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

pH final: 7,3 ± 0,2

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

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

B.14.2.1.4.2 Agar de hierro y lisina (LIA)

FORMULA

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

pH final: 6,7 ± 0,2

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

El medio ya preparado es de color púrpura.

B.14.2.1.4.3 Agar nutritivo

FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Extracto de carne	3,0g
Peptona	5,0g

Agar	15,0g
Agua destilada	1,0l

pH final: 6,8 ± 0,2

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

B.14.2.1.4.4 Medio de SIM (para Sulfuro, Indol y Movilidad)

FORMULA

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

pH final: 7,3 ± 0,2

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

B.14.2.1.4.5 Agar citrato de Simmons

FORMULA

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

pH final: 6,8 ± 0,2

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

B.14.2.1.4.6 Caldo MR-VP (Rojo de metilo-Voges Proskauer)

FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Peptona	7,0g
Dextrosa	5,0g
Difosfato de potasio	5,0g
Agua destilada	1,0l

pH final: 6,9 ± 0,2

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

B.14.2.1.4.7 Caldo manitol

FORMULA

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

pH final: 7,4 ± 0,2

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

B.14.2.1.4.8 Caldo malonato

FORMULA

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

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.14.2.1.4.9 Caldo Urea

FORMULA

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

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.14.2.1.4.10 Caldo de urea rápido

FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Urea	20,000g

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

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.14.2.1.4.11 Caldo infusión cerebro corazón

FORMULA

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

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.14.2.1.5 Soluciones

B.14.2.1.5.1 Solución verde brillante al 0,1% (1:1000)

FORMULA

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

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

B.14.2.1.5.2 Solución de yodo-yoduro

FORMULA

Ingredientes	Cantidades
Cristales de yodo	6,0g
Yoduro de potasio	6,0g
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.14.2.1.5.3 Solución salina al 0,85%

FORMULA

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

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

B.14.2.1.5.4 Solución salina formalizada

FORMULA

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

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

B.14.2.1.5.5 Reactivo de Kovac

FORMULA

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

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

B.14.2.1.5.6 Solución de alfa-naftol al 5%

FORMULA

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

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

B.14.2.1.5.7 Solución de rojo de metilo

FORMULA

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

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

B.14.2.1.5.8 Solución de hidróxido de potasio al 40%

FORMULA

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

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

B.14.2.1.5.9 Solución de gelatinasa al 5%

FORMULA

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

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

B. 14.2.1.6 Antisueros

¡ Antisuero polivalente somático (O)

¡ Antisuero polivalente flagelar (H)

¡ Antisuero Vi

B.14.2.2 Material

¡ Matraces Erlenmeyer de 500 ml

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

¡ Angulos de vidrio

¡ Cucharas, bisturíes, cuchillos y pinzas

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

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

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

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

¡ Cajas de Petri estériles de vidrio o desechables

¡ Rejillas para tubos de ensaye

¡ Asa de platino o nicromel de aproximadamente 3 mm de diámetro

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

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

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

B.14.3 Equipo

¡ Horno para esterilizar que alcance los 180 °C

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

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

¡ Baño maría con termostato y termómetro.

¡ Balanza granataria con sensibilidad de 0,1 g

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

¡ Mecheros Bunsen o Fisher

¡ Potenciómetro

B.14.4 Procedimiento

B.14.4.1 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.14.4.1.1 Procedimiento general para la preparación de muestras

Pesar asépticamente 25 g de la muestra en un vaso estéril de licuadora o en bolsa estéril para trabajar en homogeneizador peristáltico (stomacher). Adicionar 225 ml del medio de preenriquecimiento estéril

(generalmente caldo lactosado, a menos que se indique otro) y licuar si es necesario durante un min. Transferir asépticamente la mezcla homogeneizada a un recipiente estéril de boca ancha con tapón de rosca y dejar reposar por 60 min a temperatura ambiente con la tapa bien enroscada. Mezclar bien y determinar el pH aproximado con papel pH. Ajustar, si es necesario, a un pH 6,8 ± 0,2 con hidróxido de sodio 1N o ácido clorhídrico 1N estériles. Mezclar y cubrir el recipiente enroscando suavemente la tapa.

Incubar 24 ± 2 h a 35 °C. Continuar como se indica en B.14.4.2.1

B.14.4.1.2 Procedimiento específico para la preparación

B.14.4.1.2.1 Productos que contienen huevo en su formulación (pastas para sopa, rollos chinos, etc.); ensaladas preparadas (jamón, huevos, pollo, atún, pavo); frutas frescas, congeladas o secas; crustáceos (camarones, cangrejos, jaibas, langostinos, langostas) y pescado.

Preferentemente no descongelar la muestra antes de su análisis, si esto es necesario, utilizar caldo lactosado como medio de preenriquecimiento, licuar dos min. Continuar después de la incubación como en B.14.4.2.1

B.14.4.1.2.2 Carnes, sustitutos de carnes, derivados cárnicos, sustancias de origen animal, productos glandulares y harinas (pescado, carne y hueso).

B.14.4.1.2.2.1 Productos procesados térmicamente y productos secos. Se sigue el procedimiento señalado en A.13.4.1.1 hasta la homogenización. Si la muestra es en polvo o molida, el licuado puede omitirse. Después de reposar, mezclar bien y ajustar el pH como se indica en el procedimiento general. Para emulsionar las grasas, agregar los detergentes en las mismas proporciones y con las mismas recomendaciones que para el coco. La cantidad de los mismos dependerá en gran medida de la composición del alimento. Los detergentes no serán necesarios en los productos glandulares en polvo. Incubar las muestras como se indica en B.14.4.1.1.

B.14.4.1.2.2.2 Productos crudos o altamente contaminados. Pesar porciones de 25 g de producto en dos vasos para licuadora. Si la muestra es en polvo o molida, el licuado puede omitirse y el producto puede pesarse directamente en matraces Erlenmeyer estériles de 500 ml. Adicionar 225 ml de caldo selenito cistina o 225 ml de caldo tetrationato (sin verde brillante) a cada muestra analítica. Licuar por dos min y pasar asépticamente a matraces Erlenmeyer de 500 ml. Dejar reposar y ajustar el pH como se indica en B.14.4.1.1

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 tetrationato. Homogenizar e incubar. Continuar como se indica en B.13.4.2.1

B.14.4.2 Aislamiento de *Salmonella*

B.14.4.2.1 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 tetrationato y a otro con 10 ml de caldo selenito cistina. Como alternativa, en sustitución del caldo tetrationato puede emplearse el medio Vassiliadis-Rappaport.

B.14.4.2.2 Incubar de 18 a 24 h a 35°C o, para alimentos fuertemente contaminados a 42°C por el mismo período. Estriar los productos que fueron directamente enriquecidos en medios selectivos.

B.14.4.2.3 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 tetrationato.

Incubar las placas 24 ± 2 h a 35°C.

B.14.4.2.4 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.14.4.3 Identificación bioquímica

B.14.4.3.1 Seleccionar al menos dos colonias típicas de cada medio selectivo, que se encuentren bien aisladas.

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

Incubar por 24 ± 2 h a 35°C.

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

B.14.4.3.2 Observar el crecimiento en los tubos y considerar presuntivamente positivas para *Salmonella* las colonias que den las siguientes reacciones:

B.14.4.3.2.1 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.14.4.3.2.2 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.14.4.3.2.3 Retener todos los cultivos que muestren las reacciones características de *Salmonella* en los medios TSI y LIA para las pruebas adicionales, indicadas en B.14.4.3.3

B.14.4.3.3 Los cultivos con TSI que no parecen de Salmonella pero que presentan reacciones en LIA típicos, deben trabajarse como cultivos presuntivos positivos, ya que en estos casos, el medio LIA permitirá detectar *S. arizonae* y cepas atípicas de *Salmonella* que utilicen lactosa o sacarosa. Descartar solamente los cultivos que muestren reacciones atípicas en ambos medios.

B.14.4.3.4 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.14.4.3.5 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.14.4.3.6 Prueba de ureasa

B.14.4.3.6.1 Prueba de ureasa (convencional). Con una asa estéril, tomar crecimiento del cultivo presumiblemente positivo de cada tubo de medio TSI e inocular tubos de caldo urea. Utilizar un control de medio para comparar el vire púrpura de las reacciones positivas con el color del medio original. Incubar 24 ± 2 h a 35 °C.

B.14.4.3.6.2 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.14.4.4 Identificación serológica

B.14.4.4.1 Ensayo de los antígenos somáticos de *Salmonella* (Antisuero polivalente O).

B.14.4.4.1.1 Colocar con una asa dos gotas separadas de solución salina estéril sobre un portaobjetos o en dos secciones de una placa para aglutinación. Suspender en cada una de las gotas, una porción del cultivo desarrollado en TSI.

B.14.4.4.1.2 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.14.4.4.1.3 Agitar inclinando la lámina hacia atrás y hacia adelante durante aproximadamente un min. Observar bajo buena iluminación sobre un fondo oscuro.

B.14.4.4.1.4 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.14.4.4.2 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.14.4.4.2.1 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.14.4.4.2.2 Si no se cuenta con los sueros grupoespecíficos, 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.14.4.4.3 Si se requiere, practicar el ensayo de los antígenos flagelares de *Salmonella* (Antisuero polivalente H).

B.14.4.4.3.1 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.14.4.4.3.2 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.14.4.5 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.14.4.5.1 Inocular los cultivos positivos provenientes de TSI y LIA en: medio SIM, agar citrato de Simmons, caldo manitol y caldo RM-VP. Usar caldo malonato para confirmar la presencia de la especie *S. arizonae.*

B.14.4.5.2 Interpretar los cambios en los medios inoculados conforme lo siguiente:

B.14.4.5.2.1 Agar citrato Simmons

Inocular por estría el tubo

Incubar 96 ± 2 h a 35 ± 2°C

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

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

B.14.4.5.2.2 Medio SIM

Inocular por punción

Incubar 24 h a 35 ± 2°C

Movilidad

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

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

Producción de ácido sulfihídrico

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.14.4.5.2.3 Caldo RM-VP

Inocular un tubo con el medio

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

B.14.4.5.2.3.1 Prueba de Voges-Proskauer (VP)

Transferir a un tubo un ml del cultivo de 48 h

Adicionar 0,6 ml de solución de alfa naftol

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

Adicionar algunos cristales de creatinina (opcional)

Interpretar los resultados después de incubar 2 h a 35 ± 2°C o 4 h a temperatura ambiente

Prueba positiva: desarrollo de color rojo ladrillo

Prueba negativa: sin cambio de color

Reincubar el resto del medio RM-VP 48 h más a 35 ± 2°C

B.14.4.5.2.3.2 Prueba de rojo de metilo (RM)

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

Interpretar los resultados inmediatamente

Prueba positiva: desarrollo de color rojo

Prueba negativa: desarrollo de color amarillo

B.14.4.5.2.4 Caldo malonato

Inocular un tubo conteniendo el medio

Incubar 40 ± 2 h a 35 ± 2°C

Prueba positiva: desarrollo de color azul

Prueba negativa: sin cambio de color

B.14.4.5.2.5 Caldo manitol

Inocular un tubo conteniendo el medio

Incubar 24 ± 2 h a 35 ± 2°C

Prueba positiva: desarrollo de color amarillo

Prueba negativa: sin cambio de color

B.14.4.5.3 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.14.5 Cálculo y expresión de resultados

B.14.5.1 Interpretación de reacciones bioquímicas y serológicas.

CUADRO 1

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

B.14.5.2 Reacciones bioquímicas y serológicas de *Salmonella*

CUADRO 2

PRUEBA O SUSTRATO	POSITIVO	NEGATIVO	REACCION
Glucosa (TSI)	amarillo	rojo	+
Lisina descarboxilasa(LIA)	púrpura	amarillo	+
H_2S (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	[a] amarillo o gas	no hay [a] cambio de color, ni gas	+[b]
Caldo KCN	crecimiento	no hay crecimiento	-
Caldo malonato	azul	no hay cambio de color	-
Prueba de indol	superficie color violeta	superficie color amarillo	-
Prueba del antígeno flagelar	aglutinación	no hay aglutinación	+
Prueba del antígeno somático	aglutinación	no hay aglutinación	+
Caldo lactosa rojo fenol	amarillo o gas	no hay cambio de color, ni gas	-
Caldo sacarosa rojo fenol	amarillo o gas	no hay cambio de color, ni gas	-
Prueba Voges- Proskauer	de rosa a rojo	no hay cambio de color	-
Prueba rojo de metilo	rojo difuso	amarillo difuso	+
Citrato de Simmons	crecimiento color azul	no hay crecimiento no hay cambio de color	v

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

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

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

B.14.5.3 Informe de Resultados

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

B.15. METODO PARA LA DETERMINACION DE *Staphylococcus aureus* EN ALIMENTOS.

B.15.1 Fundamento

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

B.15.2 Reactivos y materiales

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

Cuando se mencione agua debe entenderse que se trata de "agua destilada".

Los reactivos a emplear en el método objeto de esta norma deben ser grado analítico.

B.15.2.1 Reactivos

B.15.2.1.1 Soluciones diluyentes

B.15.2.1.1.1 Solución reguladora de fosfatos (Solución concentrada)

FORMULA

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

Preparación: Disolver el fosfato en 500 ml de agua y ajustar el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio 1 N, aforar con agua a 1 l. Esterilizar durante 15 min a 121ºC ±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 121ºC ±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.15.2.1.1.2 Agua peptonada

FORMULA

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

Preparación: Disolver los componentes en un litro de agua. Ajustar el pH a 7,0 con solución de hidróxido de sodio 1N. Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml según se requiera. Esterilizar a 121ºC ±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.15.2.1.2 Medios de cultivo

B.15.2.1.2.1 Medio de Baird-Parker

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Medio base (6.1.2.1.1)	95,0 ml
Solución de telurito de potasio (6.1.2.1.2)	1,0 ml
Emulsión de yema de huevo (6.1.2.1.3)	5,0 ml

Preparación: Cuando el medio base esté a 45ºC, 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 5ºC.

B.15.2.1.2.1.1. Medio base de Baird-Parker

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Triptona	10,0 g
Extracto de levadura	1,0 g
Extracto de carne	5,0 g
Glicina	12,0 g
Cloruro de litio	5,0 g
Piruvato de sodio	10,0 g
Agar	20,0 g
Agua	1,0 l

Preparación: Disolver los ingredientes o el agar base en agua y calentar con agitación constante y hervir durante 1 min. Esterilizar a 121ºC ±1 durante 15 min. Enfriar y mantener el medio a 45ºC.

B.15.2.1.2.1.2 Solución de telurito

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Telurito de potasio	1,0 g
Agua	100,0 ml

Preparación: Disolver el telurito de potasio en agua y esterilizar. La solución puede ser almacenada por varios meses a temperatura de 0 a 5ºC.

B.15.2.1.2.1.3 Emulsión de yema de huevo

Preparación. Lavar con agua y jabón los huevos frescos que sean necesarios y limpiarlos con una solución de tintura de yodo (solución alcohólica al 2%) o sumergirlos en solución de cloruro mercúrico (1:1000). Enjuagar con agua estéril y secar con gasa estéril. En campana de flujo laminar o en condiciones asépticas, abrir los huevos y vaciarlos en un separador de claras estéril. Transferir las yemas a una probeta hasta un volumen de 60 ml y completar a 90 ml con solución salina isotónica. Verter la emulsión a un matraz Erlenmeyer con perlas de vidrio estéril y agitar fuertemente para formar la emulsión. Filtrar a través de gasa. Las placas deben utilizarse dentro de las 48 h siguientes a su preparación.

B.15.2.1.2.1.4 Solución salina isotónica

FORMULA

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

Preparación: Disolver el ingrediente en agua y esterilizar a 121ºC ±1 durante 15 min.

B.15.2.1.2.2 Caldo de infusión cerebro-corazón (BHI)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Infusión de cerebro de ternera	200,0 ml
Infusión de corazón de res	250,0 ml
Peptona de gelatina	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Fosfato disódico dodecahidratado	2,5 g
Glucosa	2,0 g
Agua	1,0 l

Preparación: Disolver los ingredientes en agua y calentar ligeramente si es necesario. Distribuir y esterilizar durante 15 min a 121ºC ±1.

B.15.2.1.2.3 Acido desoxirribonucleico helicoidal de timo de ternera.

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Acido desoxirribonucleico helicoi-dal de timo de ternera o equivalente	0,03 g
Agar	1,00 g
Cloruro de calcio anhidro (Solución 0,01 M) (A.7.1.2.3.1)	0,10 ml
Cloruro de sodio	1,00 g
Azul de toluidina (Solución 0,1 M) (6.1.2.3.2)	0,30 ml
Tris-(hidroximetil-aminometano) (Tris solución 0,05 M, pH 9) (A.7.1.2.3.3)	100,00 ml

Preparación: Disolver los ingredientes, excepto el azul de toluidina agitando hasta completar la disolución del ácido desoxirribonucleico y calentar a ebullición. Agregar el azul de toluidina. Distribuir en frascos pequeños con tapón de hule. No es necesario esterilizar. Este medio es estable a temperatura ambiente hasta 4 meses y funciona perfectamente aun después de fundirlo varias veces. Tomar un 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.15.2.1.2.3.1 Solución de cloruro de calcio anhidro 0,01 M

Cloruro de calcio PM = 110,99

Disolver 0,1199 g de cloruro de calcio en 100 ml de agua.

B.15.2.1.2.3.2 Solución de azul de toluidina 0,1 M

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

B.15.2.1.2.3.3 Solución amortiguadora 0,05 M Tris-(hidroximetilaminometano)

(Tris pH 9) PM = 121,1

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

B.15.2.1.3 Reactivo biológico:

Plasma de conejo

Emplear plasma de conejo deshidratado o rehidratado siguiendo las instrucciones del fabricante y agregar ácido etilendiaminotetracético (EDTA) en solución al 0,1% en plasma rehidratado. Si se utiliza plasma deshidratado diluir con agua estéril en proporción de 1:3. Puede emplearse plasma de conejo liofilizado adicionado de EDTA. No debe emplearse sangre citratada.

B.15.2.2 Materiales

Todos los instrumentos que se utilicen para trabajar la muestra deben esterilizarse mediante horno, durante 2 h de 170-175ºC o como alternativa en autoclave durante 15 min como mínimo a 121ºC ±1.

- ¡ Cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas y separador de huevo.
- ¡ Tubos de cultivo de 16 mm x 150 mm o frascos de 125 a 250 ml de capacidad.
- ¡ Tubos de cultivo de 10 mm x 75 mm.
- ¡ Cajas Petri de 90 a 100 mm de diámetro.
- ¡ Pipetas bacteriológicas de 1 ml y 10 ml de capacidad graduadas en 0,1 ml y 1 ml respectivamente y diámetro de 2 a 3 mm.
- ¡ Pipetas Pasteur.
- ¡ Probetas.
- ¡ Varillas de vidrio de 3,5 mm de diámetro aproximadamente y 20 cm de largo dobladas en ángulo recto.
- ¡ Matraz Erlenmeyer con perlas de vidrio
- ¡ Cámara húmeda: consiste en una caja Petri en la cual se coloca una varilla de vidrio en forma de "V" rodeada de algodón humedecido con agua.

B.15.3 Aparatos

- ¡ Horno para esterilizar que alcance 180°C.
- ¡ Autoclave con termómetro.

¡ Baño de agua con regulador de temperatura de 35 ± 0,5ºC.

¡ Baño de agua con regulador de temperatura de 45 ± 0,5ºC.

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

¡ Incubadora a 35 ± 1ºC.

B.15.4 Preparación de la muestra

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

B.15.5 Procedimiento

B.15.5.1 Utilizando diferentes pipetas de 1 ml para cada dilución, depositar 0,1 ml sobre la superficie de las placas de agar Baird-Parker.

B.15.5.2 Distribuir el inóculo sobre la superficie del agar con varillas estériles de vidrio en ángulo recto, utilizando una para cada dilución.

B.15.5.3 Mantener las placas en su posición hasta que el inóculo sea absorbido por el agar.

B.15.5.4 Invertir las placas e incubar de 45 a 48 h a 35ºC.

B.15.5.5 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.15.5.6 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.15.5.7 Las colonias típicas son negras, circulares, brillantes, convexas, lisas, de diámetro de 1 a 2 mm y muestran una zona opaca y un halo claro alrededor de la colonia.

B.15.5.8 Seleccionar las colonias de acuerdo con el siguiente cuadro para realizar las pruebas de coagulasa y termonucleasa:

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

B.15.5.9 Seleccionar el número de colonias y sembrar cada una en tubos con 0,5 ml de caldo de infusión cerebro-corazón.

B.15.5.10 Incubar a 35ºC durante 24 h.

B.15.5.11 Inocular en la misma forma cepas conocidas de Staphylococcus aureus y Staphylococcus epidermidis como testigos positivo y negativo.

B.15.5.12 Después del periodo de incubación pasar con una pipeta de 1 ml, 0,3 ml de cada cultivo a otro tubo de 10 mm x 75 mm y conservarlo para la prueba de termonucleasa. El resto del cultivo se usa para la prueba de coagulasa.

B.15.5.13 Prueba de coagulasa

B.15.5.13.1 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.15.5.13.2 Incubar en baño de agua de 35 a 37ºC y observar durante 6 h a intervalos de 1 h; si no hay formación de coágulo, observar a las 24 h. Considerar positiva la prueba si hay formación de coágulo.

Para comprobar la coagulabilidad del plasma de conejo se añade una gota de cloruro de calcio al 5% a 0,5 ml de plasma reconstituido empleado, formándose un coágulo en 10-15 seg.

B.15.5.14 Prueba de termonucleasa

B.15.5.14.1 Calentar durante 15 min, 0,3 ml de cultivo en caldo de infusión cerebro-corazón en baño de agua hirviendo.

B.15.5.14.2 Pasar una gota de cada cultivo por medio de una pipeta Pasteur a un orificio del medio, incluye testigo.

B.15.5.14.3 Incubar a 35ºC en cámara húmeda de 4 a 24 h.

B.15.5.14.4 La aparición de un halo color rosa extendido de por lo menos 1 mm alrededor de la perforación se califica como positiva.

B.15.6 Cálculo y expresión de resultados

B.15.6.1 Cálculo

Hacer el cálculo del contenido de microorganismos en el producto tomando en cuenta el número de colonias totales, el número de colonias confirmadas, la dilución y el volumen inoculado (0,1 ml).

Ejemplo 1:

Si la caja tiene 80 colonias en la dilución 1:1000

Se toman 5 colonias para la prueba, de éstas dan 4 positivas, el cálculo es:

$\frac{80 \times 4}{5} = 64 \times 1000 \times 10 = 640\,000$

Ejemplo 2:

Si la caja tiene 14 colonias en la dilución 1:10

Se toman 3 colonias para la prueba, de éstas dan 2 positivas, el cálculo es:

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

B.15.6.2 Expresión de los resultados:

Según ejemplo 1:

Informar como *Staphylococcus aureus* 640 000 UFC/g

Según ejemplo 2:

Informar como Staphylococcus aureus 930 UFC/g valor estimado

Si las pruebas confirmativas resultan negativas en todas las colonias probadas, informar como:

0 UFC/g en muestras directas

-10 UFC/g en muestras de dilución 1:10

-100 UFC/g en muestras de dilución 1:100

En la práctica los resultados pueden variar, esto dependerá del técnico que trabaje el método y el grado de confiabilidad del mismo, que en el 95% de los casos es de ± 16% a ± 52%.

B.16. METODO DE PRUEBA MICROBIOLOGICO PARA ALIMENTOS. DETERMINACION DE ***L. monocytogenes*****.**

B.16.1 Fundamento

El método para detectar la presencia de *Listeria 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.16.2 Reactivos

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

Cuando se indica agua, debe entenderse que se trata de agua destilada.

¡ Acido acético 5 N

¡ Acido clorhídrico 1 M

¡ Acido sulfanílico (cristales)

¡ Alfa-naftilamina

¡ Alfa-naftol 5% en etanol absoluto

¡ Etanol absoluto

¡ Granalla de zinc

¡ Hidróxido de sodio 1 M

¡ Lactamato de glicil-glicina (anhídrido de glicina)

¡ Regulador de fosfatos glicerinado con pH 9,0 ± 0,2

¡ Sangre de carnero desfibrinada

¡ Solución al 3% de peróxido de hidrógeno

¡ Solución salina fisiológica 0,85% estéril

¡ Sueros comerciales para tipificación de Listeria spp

¡ Sulfato de cadmio al 20%

¡ Zinc pulverizado

B.16.2.1 Reactivos para Tinción de Gram

B.16.2.1.1 Alcohol-acetona

B.16.2.1.1 Alcohol-acetona

Ingredientes	Cantidad
Etanol (95%)	700,0 ml
Acetona	300,0 ml

Mezclar ambos líquidos.

B.16.2.1.2 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.16.2.1.3 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.16.2.1.4 Solución de Safranina

Ingredientes	Cantidad
Safranina	0,25 g
Etanol (95%)	10,00 ml
Agua	100,00 ml

Disolver la safranina en el etanol, mezclar, agregar el agua y volver a agitar. Filtrar la solución con papel filtro.

B.16.2.2 Reactivos para la determinación de nitritos

B.16.2.2.1 Reactivo A

Ingredientes	Cantidad
Alfa-naftilamina	0,5 g
Acido acético 5N	100,0 ml

B.16.2.2.2 Reactivo B

Ingredientes	Cantidad

Acido sulfanílico	1,0 g
Acido acético 5N	125,0 ml

B.16.2.2.3 Reactivo C

Ingredientes	Cantidad
Alfa-naftol	1,0 g
Acido acético 5N	200,0 ml

B.16.2.2.4 Solución de sulfato de cadmio al 20%

Colocar granallas 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.16.3 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.16.3.1 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 ± 1ºC durante 15 min. El pH final de la solución debe ser 7,3 ± 0,2.

B.16.3.2 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
Acido nalidíxico (sal sódica)	40,0 mg
Cicloheximida	50,0 mg
Acido pirúvico (sal sódica) Solución al 10 % (p/v) *	11,1 ml

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.16.3.3 Medio de cloruro de litio feniletanol-moxolactam (LMP)

Ingredientes	Cantidad
Agar fenil etanol	35,5 g
Glicina anhídra	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 ± 1ºC durante 15 min. Enfriar de 48 a 50ºC 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.16.3.4 Medio Oxford

B.16.3.4.1 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 ± 1ºC durante 15 min. Enfriar a 50ºC 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.16.3.5 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 ± 1ºC durante 15 min. pH final 7,3 ± 0,2.

B.16.3.6 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 ± 2ºC y agregar asépticamente la sangre de carnero, la cual previamente se debe encontrar a temperatura ambiente (20 - 25°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.16.3.7 Caldo nitratos

Ingredientes	Cantidad
Nitrato de potasio	1,0 g

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 ± 1°C durante 15 min.

B.16.3.8 Medios para la prueba de movilidad

B.16.3.8.1 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 ± 1°C durante 15 min. pH final 7,3 ± 0,2.

B.16.3.8.2 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 ± 1ºC durante 15 min. pH final 7,4 ± 0,2.

B.16.3.9 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 ± 1°C pH final 6,8 ± 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.16.4 Materiales

¡ Aceite de inmersión

¡ Asas bacteriológicas

¡ Cajas Petri

¡ Cubreobjetos

¡ Cubreobjetos

¡ Matraces Erlenmeyer de 500 ml

¡ Lámpara de luz blanca

¡ Lápiz graso o marcador

¡ Lupa de bajo aumento

¡ Pipetas volumétricas de 25, 10 y 1,0 ml

¡ Portaobjetos escabado

¡ Portaasas

¡ Tubos de 16 x 125 mm

¡ Tubos de 13 x 100 mm u otros con tapón de rosca

¡ Sistema de filtración con membranas con un tamaño de poro de 0,45 µm

B.16.5 Aparatos e instrumentos

Se requiere además de lo mencionado en el método de Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico, lo siguiente:

¡ Incubadoras con termostato que evite variaciones mayores de ± 1,0ºC, provista con termómetro calibrado.

¡ Microscopio de contraste de fases con objetivo de inmersión en aceite (100 X) o microscopio de campo oscuro.

B.16.6 Preparación de la muestra

Para la preparación de la muestra seguir lo mencionado en el método Preparación y Dilución de muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

B.16.7 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.16.7.1 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 30ºC. 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°C por 6 h sin suplementos. Después de las 6 h de incubación los

suplementos deben agregarse y continuar la incubación a 30ºC hasta un total de 48 h.

B.16.7.1.1 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 30ºC por 24 a 48 h y las de medio OXA a 35ºC por el mismo periodo. Observar el crecimiento en las placas del medio LMP con luz blanca en un ángulo de 45º (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. Ver la figura 1. 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.

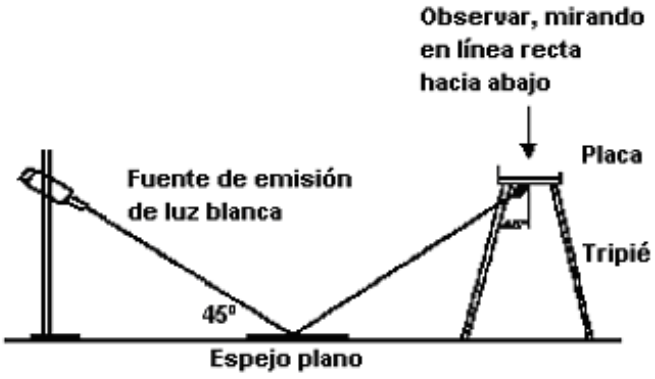
Debido a que puede estar presente más de una especie de *Listeria* en la muestra, deben identificarse como mínimo cinco colonias.

Figura 1

Diagrama para la iluminación de Henry

Observación de placas bajo la iluminación de

Henry para las colonias sospechosas de Listeria.



B.16.7.2 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 35ºC por 24 h. Estos cultivos pueden mantenerse a 4ºC y utilizarse como inóculo para realizar las pruebas de identificación.

B.16.7.2.1 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.16.7.2.2 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 una 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.16.7.2.3 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 cocoides. En extensiones delgadas se observan de color pálido y pueden confundirse con Bacteroides spp.

B.16.7.2.4 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 35ºC. 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.16.7.2.5 Prueba de reducción de nitratos

Inocular los tubos conteniendo caldo nitratos, incubar a 35ºC 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.16.7.2.6 Prueba de movilidad en agar

Inocular el medio SIM o MTM, incubar por 7 días a temperatura ambiente (20-25ºC), observar diariamente. Las especies de *Listeria* son móviles, dando un crecimiento típico en forma de paraguas.

B.16.7.2.7 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 35ºC. 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.16.7.2.8 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:*

Staphylococcus aureus Rhodococcus equi

ATCC 49444 ATCC 6339

NCTC 7428 NCTC 1621

ATCC 25923

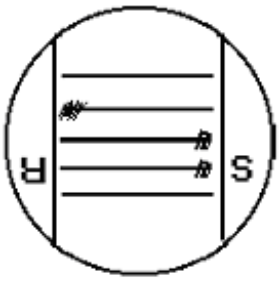
CIP 5710

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). Después 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 figura 2 muestra la disposición de las estrías de los cultivos en una placa para la prueba de CAMP. 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.

Figura 2



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	HEMOLITICO(BETA)A	REDUCCION NITRATOS	PRODUCCION DE ACIDOS			CAMPO	
			M	R	X	S.a	R.e
L. monocytogenes	+	-	-	+	-	+	-
L. ivanovii	+	-	-	-	+	-	+
L. innocua	-	-	-	bV	-	-	-
L. welshimeri	-	-	-	bV	+	-	-
L. seeligeri	+	-	-	-	+	+1	-
L. grayic	-	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

B.16.7.3 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 35ºC. Transferir a dos tubos de agar inclinado de triptosa e incubar 24 h a 35ºC. Para realizar la prueba se pueden utilizar sueros comerciales, siguiendo las instrucciones del fabricante

55 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
L. monocytogenes	1/2A, 1/2B, 1/2C
	3A, 3B, 3C
	4A, 4AB, 4B
	4C, 4D, 4E, "7"
L. ivanovii	5
L. innocua	4AB, 6A, 6B, Un a
L. welshimeri	6A, 6B
L. seeligeri	1/2B, 4C, 4D, 6B, Un a

B.16.8 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.16.9 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.17. DE LA ESTIMACION DE LA DENSIDAD MICROBIANA POR LA TECNICA DEL NUMERO MAS PROBABLE. DETERMINACION DE BACTERIAS COLIFORMES, COLIFORMES FECALES Y *Escherichia coli* POR LA TECNICA DE DILUCIONES EN TUBO MULTIPLE.

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

B.17.1 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.17.2 Equipo, materiales y reactivos.

No aplica.

B.17.3 Procedimientos.

B.17.3.1 Uso de tablas de NMP con 95% de límite de confianza.

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

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

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

diluciones probadas hubiera crecimiento en todos los tubos, seleccionar (si es posible) las primeras tres diluciones consecutivas (volumen de muestra) para que la dilución media contenga resultados positivos (C de tablas 6 y 7).

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

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

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

Para calcular el NMP/100 g multiplicar por 100.

B.17.3.2 Cálculo aproximado del NMP y 95% de límite de confianza.

Debido a la inherente complejidad para calcular los límites de confianza del NMP lo más común es el uso de tablas. Generalmente estas tablas están limitadas al uso de 3, 5 y 10 tubos por dilución, incluso usando un método aceptado, pueden presentarse datos irregulares o accidentes de laboratorio que causan pérdida de 1 o más tubos de dilución. En este caso una serie de diluciones de por ejemplo: 5,4,4 puede dar una lectura de 5-2-0. Para estos casos se puede aplicar una fórmula sencilla, la cual no corresponde exactamente con los resultados obtenidos teóricamente; sin embargo, las desviaciones generalmente son pequeñas, esta fórmula no debe ser aplicada para fines de regulación. La fórmula no restringe el número de tubos o las diluciones y puede aplicarse para todo tipo de pruebas. El cálculo aproximado está dado por la siguiente ecuación: NMP/g = 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; N = (8x0) + (4x1) + (2x3) + (1x5) + (0,5x4) + (0,25x5) = 18,25; y T = 5 (8+4+2+1+0,5+0,25) = 78,75

NPM/g = 12/(18,25 x 78,75)1/2 = 0,32/g o 32/100 g

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

log (NMP/g) 1,08 (log a)/n) 1/²

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

La media armónica se define como:

nH = k / (1/ ni)

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

Por lo tanto n_H = 3/ (1/5) + (1/4) + (1/4) ½ = 3/0,70 = 4,3i

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

log 0,32 (1,08) (log 2)/5) ½

-0,495 0,265

Entonces el límite inferior es el antilogaritmo (-0-76) = 0.17/g o 17/100 g y el límite inferior es el antilogaritmo (-0,23) = 0,59/g o 59/100 g. Cuando se compara con las tablas el NMP podría ser 0,31/g con límites de confianza de 0,16/g y 0,57/g.

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

No. de tubos positivos				95% de límite de confianza	
0,1	0,01	0,001	NMP/g (ml)b	Inferior	Superior
0	0	0	3	-	-
0	1	0	3+	1	17

1	0	0	4	1	21
1	0	1	7+	2	27
1	1	0	7	2	28
1	2	0	11+	4	35
2	0	0	9	2	38
2	0	1	14+	5	48
2	1	0	15	5	50
2	1	1	20+	7	60
2	2	0	21	8	62
3	0	0	23	9	130
3	0	1	39	10	180
3	1	0	43	10	210
3	1	1	75	20	280
3	2	0	93	30	380
3	2	1	150	50	500
3	2	2	210+	80	640
3	3	0	240	90	1400
3	3	1	460	100	2400
3	3	2	1100	300	4800
3	3	3	1100	-	-

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

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

Tabla No. 2 Selección del NMP con un límite de confianza de 95% para la prueba de fermentación utilizando 5 tubos: con porciones de 0,1, 0,01 y0,001 g (ml) de muestra[a].

No. de tubos positivos				95% de límite de confianza	
0,1	0,01	0,001	NMP/g (ml)b	Inferior	Superior
0	0	0	2	-	-
0	0	1	2+	1	10
0	1	0	2	1	10
1	0	0	2	1	11
1	0	1	4+	1	15
1	1	0	4	1	15
1	2	0	6+	2	18
2	0	0	4	1	17
2	0	1	7+	2	20
2	1	0	7	2	21
2	1	1	9+	3	25
2	2	0	9	3	25
3	0	0	8	3	24
3	0	1	11	4	29
3	1	0	11	4	30
3	1	1	14+	6	35
3	2	0	14	6	35

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

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

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

Tabla No. 3 Selección del NMP con un límite de confianza de 95% para la prueba de fermentación utilizando 10 tubos: con porciones de 0,1, 0,01 y 0,001 g (ml) de muestraa.

No. de tubos positivos				95% de límite de confianza	
0,1	0,01	0,001	NMP/g (ml)b	Inferior	Superior
0	0	0	1	-	-
0	0	1	1+	1	5
0	1	0	1	1	5
0	2	0	2+	1	7
1	0	0	1	1	5

1	0	0	1	1	5
1	0	1	2+	1	7
1	1	0	2	1	7
1	2	0	3+	1	8
2	0	0	2	1	7
2	0	1	3+	1	9
2	1	0	3	1	9
2	1	1	4+	1	10
2	2	0	4	2	10
2	3	0	5+	2	12
3	0	0	3	1	9
3	0	1	4	2	11
3	1	0	4	2	11
3	1	1	5+	2	13
3	2	0	5	2	13
3	2	1	6+	3	14
3	3	0	6+	3	14
4	0	0	4	2	12
4	0	1	6	2	13
4	1	0	6	2	14
4	1	1	7	3	15
4	2	0	7	3	15
4	2	1	8	4	17
4	3	0	8	4	17
4	4	0	9+	5	19
5	0	0	6	2	15
5	0	1	7	3	16
5	1	0	7	3	17
5	1	1	9	4	18
5	2	0	9	4	18
5	2	1	10+	5	20
5	3	0	10	5	20
5	3	1	11+	6	22
5	4	0	11+	6	22
6	0	0	8	3	18
6	0	1	9	4	20
6	1	0	9	4	20
6	1	1	11	5	22
6	2	0	11	5	22
6	2	1	12	6	24
6	3	0	12	6	25
6	3	1	14+	7	27
6	4	0	14+	7	27
6	5	0	15+	8	29
7	0	0	10	5	22
7	0	1	12	6	24
7	0	2	13+	7	27
7	1	0	12	6	25
7	1	1	13	7	27
7	1	2	15+	8	30
7	2	0	13	7	27

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

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

10	10	10	2300	-	-

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

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

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

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

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

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

0	1	2	5,5	1	1	2	8,1	2	1	2	12	3	1	2	17	4	1	2	26	5	1	2	64
0	1	3	7,3	1	1	3	10	2	1	3	14	3	1	3	20	4	1	3	31	5	1	3	84
0	1	4	9,1	1	1	4	12	2	1	4	17	3	1	4	23	4	1	4	35	5	1	4	110
0	1	5	11	1	1	5	14	2	1	5	19	3	1	5	27	4	1	5	42	5	1	5	130
0	2	0	3,7	1	2	0	6,1	2	2	0	9,3	3	2	0	14	4	2	0	22	5	2	0	49
0	2	1	5,5	1	2	1	8,2	2	2	1	12	3	2	1	17	4	2	1	26	5	2	1	70
0	2	2	7,4	1	2	2	10	2	2	2	14	3	2	2	20	4	2	2	32	5	2	2	95
0	2	3	9,2	1	2	3	12	2	2	3	17	3	2	3	24	4	2	3	38	5	2	3	120
0	2	4	11	1	2	4	15	2	2	4	19	3	2	4	27	4	2	4	44	5	2	4	150
0	2	5	13	1	2	5	17	2	2	5	22	3	2	5	31	4	2	5	50	5	2	5	180
0	3	0	5,6	1	3	0	8,3	2	3	0	12	3	3	0	17	4	3	0	27	5	3	0	79
0	3	1	7,4	1	3	1	10	2	3	1	14	3	3	1	21	4	3	1	33	5	3	1	110
0	3	2	9,3	1	3	2	13	2	3	2	17	3	3	2	24	4	3	2	39	5	3	2	140
0	3	3	11	1	3	3	15	2	3	3	20	3	3	3	28	4	3	3	45	5	3	3	180
0	3	4	13	1	3	4	17	2	3	4	22	3	3	4	31	4	3	4	52	5	3	4	210
0	3	5	15	1	3	5	19	2	3	5	25	3	3	5	35	4	3	5	59	5	3	5	250
0	4	0	7,5	1	4	0	11	2	4	0	15	3	4	0	21	4	4	0	34	5	4	0	130
0	4	1	9,4	1	4	1	13	2	4	1	17	3	4	1	24	4	4	1	40	5	4	1	170
0	4	2	11	1	4	2	15	2	4	2	20	3	4	2	28	4	4	2	47	5	4	2	220
0	4	3	13	1	4	3	17	2	4	3	23	3	4	3	32	4	4	3	54	5	4	3	280
0	4	4	15	1	4	4	19	2	4	4	25	3	4	4	36	4	4	4	62	5	4	4	350
0	4	5	17	1	4	5	22	2	4	5	28	3	4	5	40	4	4	5	69	5	4	5	430
0	5	0	9,4	1	5	0	13	2	5	0	17	3	5	0	25	4	5	0	41	5	5	0	240
0	5	1	11	1	5	1	15	2	5	1	20	3	5	1	29	4	5	1	48	5	5	1	350
0	5	2	13	1	5	2	17	2	5	2	23	3	5	2	32	4	5	2	56	5	5	2	540
0	5	3	15	1	5	3	19	2	5	3	26	3	5	3	37	4	5	3	64	5	5	3	920
0	5	4	17	1	5	4	22	2	5	4	29	3	5	4	41	4	5	4	72	5	5	4	1600
0	5	5	19	1	5	5	24	2	5	5	32	3	5	5	45	4	5	5	81				

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

	Cantidad de muestra (g o ml)a					Valores positivos reportados	NMP estimado/g o mlb
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

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

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

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

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

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

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

B.17.3.3 Determinación de bacterias coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli* por la técnica de diluciones en tubo múltiple.

B.17.3.3.1 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.17.3.3.2 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.
- 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: Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada. Ajustar el pH. Distribuir en tubos de ensaye con campanas de Durham. Adicionar 10 ml de medio para cada tubo. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121C. 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: Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada y calentar ligeramente para que se disuelva por completo. Ajustar el pH. Distribuir en tubos de ensaye con campanas de Durham. Adicionar 10 ml de medio para cada tubo. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Antes de abrir el autoclave, dejar bajar la temperatura a 75°C para evitar que queden burbujas en las campanas de Durham.

Agar McConkey

Ingredientes:

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

pH final: 7,1 0,2 a 25°C

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

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

Ingredientes:

Peptona	10,0 g
Lactosa	10,0 g
K_2HPO_4	2,0 g

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

pH final: 7,1 0,2

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

a) 5 ml de solución de lactosa al 20%

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

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

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

Caldo triptona al 1% (triptofano)

Ingredientes:

Triptona o tripticasa	10 g
Agua destilada	1000 ml

pH final: 6,9 0,2

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

Caldo MR-VP

Medio 1

Ingredientes:

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

pH final: 6,9 0,2

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

Caldo citrato de Koser

Ingredientes:

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

pH final: 6,7 0,2.

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

Reactivos

Reactivo de Kovacs

Ingredientes:

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

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

Para la prueba de indol

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

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

Reactivo de Voges-Proskauer (VP)

Solución 1

Ingredientes:

alfa-naftol	5 g
Alcohol absoluto	100 g

Solución 2

Ingredientes:

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

Prueba de Voges-Proskauer (VP).

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

El desarrollo de una coloración rosa es una prueba positiva.

Reactivos para la coloración de Gram

Cristal violeta

Solución A

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

Solución B

Oxalato de amonio	0,8 g
Agua destilada	80 ml

Indicador rojo de metilo (R44)

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

Iodo de Gram

Ingredientes:

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

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

Colorante de contraste (solución concentrada)

Ingredientes:

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

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

Procedimiento para la tinción de Gram

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

Medio EC-MUG

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

B.17.3.3.3 Procedimiento

B.17.3.3.3.1 Alimentos

B.17.3.3.3.1.1 Prueba presuntiva.

B.17.3.3.3.1.1.1 Preparar la muestra como se indica en el método Preparación y dilución de muestras de alimentos para análisis microbiológico; y de acuerdo con el tipo de producto, utilizar las diluciones apropiadas, según se indica en el procedimiento de la densidad microbiana por la técnica del número más probable.

. . .

Utilizar como medio de enriquecimiento caldo lauril triptosa y continuar como en el punto B.17.3.3.3.1.1.2

B.17.3.3.3.1.2 Prueba confirmativa. Continuar como en el punto B.17.3.3.3.1.2

B.17.3.3.3.3 Prueba confirmatoria.

Confirmar la presencia de *Escherichia coli* en por lo menos el 10% de las pruebas con resultados positivos a coliformes fecales por cultivo en placas de agar McConkey a partir de los tubos que demostraron la presencia de gas en la prueba confirmativa. Incubar las placas a 35±0,5°C durante 24±2 horas, observar las colonias típicas fermentadoras de color rojo rodeadas de un halo opaco de precipitación de sales biliares. Seleccionar 1 o más colonias aisladas y pasar a tubos de fermentación con caldo lauril triptosa, continuar como se indica en el punto B.16.3.3.3.1.1 Hacer tinción de Gram para observación de la morfología de las colonias.

B.17.3.3.3.3.1 Interpretación de resultados.

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

B.17.3.3.3.4 Cálculos

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

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

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

TABLA 2. 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.18. PREPARACION DE LA MUESTRA PARA LA DETERMINACION DE *VIBRIO CHOLERAE.*

Las submuestras de pescado ahumado en filete deben analizarse individualmente.

B.18.1 Incubación de las muestras a 35-37°C.

De cada submuestra tomar 25 g, cortar en piezas pequeñas e introducirlas en un vaso de licuadora de 500 ml de capacidad que contenga 225 ml de agua peptonada alcalina (APW) y homogeneizar por 2 min a la máxima velocidad. Esta es la dilución 1:10. De esta dilución preparar la dilución 1:100 y 1:1000, en 9 o 90 ml de agua peptonada alcalina.

Incubar las tres diluciones de 35 a 37°C.

B.18.2 Incubación de las muestras de 35-37°C y 42°C.

Si se van a incubar los enriquecimientos a dos temperaturas para una muestra, homogeneizar una porción de 50 g de cada submuestra en 450 ml de agua peptonada alcalina (APW). Esto hace la dilución 1:10. Verter 250 ml (g) de la dilución 1:10 a un segundo recipiente estéril. Prepare dos series de diluciones de 1:100 y 1:1000. Por lo tanto tenemos dos series de 3 diluciones. Incubar una serie de 35 a 37°C y la otra a 42°C. Proseguir con el paso de resiembra marcado en la NOM-031-SSA1-1993. Productos de la pesca. Moluscos bivalvos frescos-refrigerados y congelados. Especificaciones sanitarias.

B.19. TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS PARA LA INVESTIGACION DE *VIBRIO CHOLERAE*

B.19.1 Material y equipo

- Licuadora y vasos de licuadora estériles.
- Frascos de vidrio de boca ancha tipo tarro de 500 ml de capacidad con tapa de rosca.
- Varilla de vidrio de 3 mm de diámetro y 20 cm de largo, con un doblez terminal en ángulo recto de 4 cm.
- Balanza granataria de 2000 g de capacidad y 0,2 g de sensibilidad.
- Balanza analítica de 120 g de capacidad y 5 mg de sensibilidad.
- Incubadoras de 39-40°C.
- Baño de agua de 42 ± 0,2°C y 35-37°C.
- Cucharas estériles u otros instrumentos apropiados para transferir muestras de alimentos.
- Cajas Petri estériles de 15 x 100 mm de plástico.
- Pipetas estériles de 1 ml con graduación de 0,01 ml, de 5 y 10 ml con graduación de 0,1 ml.
- Asas bacteriológicas de 3 mm de diámetro de nicromel o platino.
- Tubos de cultivo o de ensayo de 16 x 150 mm y 20 x 150 mm.
- Tubos para bioquímicas o ensaye de 10 x 75 mm o 13 x 100 mm.
- Tijeras y pinzas estériles.
- Lámpara (para observar reacciones serológicas).
- Mecheros.
- Papel pH (rango 1-14) con un máximo de graduación de 0,4 unidades de pH por cambio de color.
- Potenciómetro.
- Bolsas de polietileno de 28 x 37 cm con tapa resellable.
- Aparato de filtración y membranas de 0,45 micras.

B.19.1.1 Medios de cultivo

Agua Peptonada Alcalina (APW)

FORMULA

Peptona.	10 g
Cloruro de Sodio	10 g
Agua destilada	1 000 ml

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

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

FORMULA

Extracto de levadura	5 g
Proteosa peptona	10 g
Sacarosa	20 g
Tiosulfato de sodio.5H2O	10 g
Citrato de sodio.2H2O	10 g
Sales biliares	3 g
Bilis de buey	5 g
Cloruro de sodio	10 g
Citrato férrico	1 g
Azul de bromotimol	40 mg
Azul de timol	40 mg
Agar	15 g
Agua destilada	1 000 ml

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

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

SOLUCION 1 FORMULA

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

Ajustar el pH a 7,6. Hierva hasta que se disuelva el Agar. Esterilizar por autoclave 15 minutos a 121°C. Enfríe de 48-55°C.

SOLUCION STOCK DE COLORANTES 1 000 X :

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.

SOLUCION 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. Enfríe y agregue los antibióticos. Esterilice por filtración

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

Agar T1N1 (Agar Triptona y Sal)

FORMULA

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

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

Agar Gelatina (GA)

FORMULA

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

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

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. Enfríe 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.

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.

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 ± 0,2. Distribuya en tubos y esterilice en autoclave 10 minutos a 121°C.

Caldo Triptona y Caldos Triptona Sal T1N0,T1N1,T1N3 y 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 10 g de Cloruro desodio (1% w/v concentración de cloruro de sodio); así respectivamente. Para T1N3 usar 30 g de NaCl por litro (3% w/v concentración de cloruro de sodio) Distribuya en tubos de tapón de rosca de 16 x 150 mm, tape los tubos. Esterilice en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Ajuste el pH a 7,2 ± 0,2.

Caldo Soya Tripticasa (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 ± 0,2.

Agar Soya Tripticasa (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 enfríar de 45-50°C y distribuya en cajas Petri. El pH final debe ser de 7,3 ± 0,2.

Agar de Hierro Kligler (KIA)

FORMULA

Peptona polipeptona	20 g
Lactosa	20 g
Dextrosa	1 g
Cloruro de Sodio	5 g
Citrato férrico amoniacal	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.

Agar Arginina Glucosa Inclinado (AGS)

FORMULA

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

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

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. Enfríar a 60°C y ajuste el pH de 7,3 ± 0,1.

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 g

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. Enfríar 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 enfrían en posición inclinada, de tal modo que se obtengan columnas de medio de 3 cm y una parte inclinada de 2 cm.

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, enfríar 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.

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.19.1.2 Soluciones y reactivos

Prueba de Rojo de Metilo.

Reactivo. Fórmula

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.

Prueba de Vogues-Proskauer.

Prueba de Vogues Proskauer

Esta prueba es para comprobar la presencia del Diacetilo.

Reactivo. Fórmula

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.

Prueba de Oxidasa.

Reactivo

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.

Reacción de Indol.

REACTIVO DE KOVAC

FORMULA

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

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

B.19.1.3 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.

B.19.1.4 Toma de muestra

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

B.19.1.4.1 Preparación de la muestra

Las muestras de moluscos bivalvos deberán analizarse en su composición básica de líquido y carne. Para moluscos bivalvos desconchar de 10 a 12 piezas grandes, incluir el líquido. Verter 50 g en 450 ml de agua peptonada alcalina (APW), licúe para homogeneizar durante 2 minutos a alta velocidad. Esta es la dilución 1:10. Colocar 250 g de esta dilución en un segundo recipiente estéril. Preparar dos series de diluciones 1:100 y 1:1000. En este momento deberá tener dos series de tres diluciones. Incubar una serie a 35-37°C y la otra a 42°C.

B.19.1.4.1.1 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.19.1.4.2 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 estria cruzada para aislar en agar T1N1 o en agar soya tripticasa con sal (al 2% de concentración de NaCl) e incubar durante 18-18 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

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* no crecen fácilmente en agar mCPC.

B.19.1.4.3 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 *Vibrio* spp, incluyen algunos *V. cholerae* No. 01, crecerán en T1N3 unicamente 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. El *V. cholerae* y el *V. mimicus* crecerán. El *Vibrio spp* halofílico crecerá en ambas placas, porque ellos no requieren de sal. Sólo en la placa con GS. Para leer la reacción de la gelatinasa sostener la placa sobre una superficie negra, observará un halo opaco alrededor de la colonia de los microorganismos gelatinasa positivos.

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* son oxidasa positivas (excepto el *V. metschnnikovii*).

B.19.2 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 NaC1 como diluyente. Para el *V. cholerae* se puede usar solución salina fisiológica (0,85% de NaC1) 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, esporogénico y gram negativo.

2.- Aspecto en TSI.

Estria ácido, picadura ácido, gas negativo y H_2S 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 sensitiva: sensible para 10 y 150 µg 0/129

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

MICROORGANISMOS	**KIA**		**TSI**		**AGS**	
	ESTRIA	**PICADURA**	**ESTRIA**	**PICADURA**	**ESTRIA**	**PICADURA**
V. cholerae	K	A	A(K)*	A	K	a
V. mimicus	K	A	K(A)*	A	K	A
V .parahemolyticus	K	A	K	A	K	A
V. alginolyticus	K	A	A	A	K	A
V. vulnificus	K o A	A	K(A)*	A	K	A
V. hidrophyla	K o A	A	K o A	A	K	K
V. shigelloides	K o A	A	K o A	A	N	N

* = Raramente

K = Alcalino

A = Acido

a = Ligeramente ácido

N = Neutro

Ninguna de las especies de *Vibrio* 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* pueden producir gas a partir de glucosa en estos medios.

B.20. DETERMINACION DE *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* Y SUS TOXINAS EN ALIMENTOS Y MUESTRAS CLINICAS

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.

B.20.2 Toma y manejo de muestras

B.20.2.1 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 unicel) 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 unicel 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 Material y equipo

¡ 0,1 N NaOH o NaHCO3 saturado para limpiar posibles derrames.

¡ Flujo laminar

¡ Propipeta o bulbo

¡ Lentes de seguridad

¡ Guantes de cirujano

¡ Tubos de centrífuga de 40 ml de capacidad

¡ Centrífuga refrigerada con capacidad de 15 000 x g

¡ Jeringas desechables de 19 x 15.

¡ Filtros desechables de 0,45 m.

¡ Vortex

¡ Licuadora

¡ Solución de tetraciclina al 0,2%

¡ Potenciómetro

¡ Incubadora 30º, 35ºC

¡ Balanza

¡ Equipo para tinción de Gram

- Tubos de ensayo de 13 x 100 mm
- Antisuero monovalente A, B, E y F
- Antisuero trivalente ABE
- Jeringas para tuberculina
- Ratones de preferencia hembras de 20 a 30 g cepa CFI o NIH
- Solución reguladora de fosfatos con gelatina
- Tripsina al 1% p/v
- Tripsina al 1,4%
- Medio carne cocida (CMM)
- Caldo tripticasa peptona glucosa extracto de levadura (TPGY).
- Caldo tripticasa peptona glucosa extracto de levadura (TPGYT) con tripsina
- Agar aislamiento *Clostridium botulinum* (CBI)
- Agar hígado de ternera yema de huevo
- Agar esporulación de Eklund
- Baño de agua (75-100ºC)
- Etanol al 50% o absoluto
- 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 ensaye 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 tripticasa peptona glucosa extracto de levadura (TPGY).

FORMULA	
Tripticasa	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 2 ml en tubos de 20 x 150 mm con tapón de rosca. Esterilizar por vapor fluente, enfriar a la temperatura y almacenar a 4ºC hasta 6 semanas. Si se almacena más de 12 h tratarlos con calor como se indica en 4.5.1. 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

tubo con 21 ml del medio TPGY. Mezclar muy suavemente. Este medio no se puede almacenar.

B.20.5.3 Caldo tripticasa peptona glucosa extracto de levadura adicionado con tripsina (TPGYT).

FORMULA	
Tripticasa	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 2 ml en tubos de 20 x 150 mm con tapón de rosca. Esterilizar por vapor fluente, enfriar a la temperatura y almacenar a 4ºC hasta 6 semanas. Si se almacena más de 12 h tratarlos con calor como se indica en B.5.5.1. 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 121ºC, 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 35ºC 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 mercúrico 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 ú g/ml, sulfametoxazol 76 ú g/ml y trimetroprim 4 ú g/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	1 g
Fosfato de potasio monobásico	1 g
Cloruro de sodio	2 g
Sufato de magnesio	0,1 g
Agar	25 g
Agua destilada	1000 ml
pH final	7,6 0,2 a 25ºC
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 0,1%

¡ Sufametoxasol 76 mg o 4 ml de una solución al 1,9%. Disolver el sulfametoxazol en solución 2 N de NaOH.

¡ Lactato deTrimetroprim 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 121ºC en autoclave. Enfriar a 55ºC 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 por vapor y enfriar a 50ºC. 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 4ºC.

B.20.6.2 Solución de tetraciclina al 0,2%

B.20.6.2 Solución de tetraciclina al 0,2%.

Disolver 50 mg en 25 ml del diluyente fosfato de gelatina, mantener a 4ºC 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 m. Usar vacío para obtener efecto parcial de deareación 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 4ºC 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 ú m 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 4ºC por 2 h. Homogeneizar en vortex. Centrifugar y proceder como en 19.7.2.1. Las 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.20.7.2.7 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.19.7.2.1.

B.20.7.2.8 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 ensaye 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 35ºC 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.19.8.3.

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 en 4.8.1 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 35ºC 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 en 4.8.1 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 75ºC 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 35ºC por 24 horas y a 30ºC 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 ú 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.17.6.1 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 30ºC 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 lipolisis 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 30ºC durante 5 días. Hacer pruebas para determinar las toxinas como se indica en 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 clostridia 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.6.10.1.

B.20.10.3.2 Si no se presenta esporulación en el medio de enriquecimiento, reincubar por otra semana a 30ºC o extender 0,1 ml del cultivo en agar de esporulación de Eklund, e incubar las placas en anaerobiosis a 30ºC 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 10ºC	TEMPERATURA PARA CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE TOXINA				
I		A, B, Fb	±	+	-	30 - 37ºC
II		Bc, E, F b	+	-	+	26 - 30ºC

* 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. DE LAS RECOMENDACIONES PARA EL TRATAMIENTO DE CONGELACION

B.21.1 Para los productos de la pesca con sospecha de contener parásitos y que se destine para ahumar en frío debe ser sometido a un tratamiento previo, conforme a los tiempos y temperaturas que se recomiendan a continuación:

TEMPERATURA	TIEMPO
-20ºC	7 días
-35ºC	15 h

B.22. METODO DE PRUEBA PARA EL ANALISIS MICROBIOLOGICO DE ALIMENTOS ENVASADOS HERMETICAMENTE. ESTERILIZADOS COMERCIALMENTE

B.22.1 Fundamento

B.22.1.1 Examen microbiológico de latas no alteradas

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

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

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

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

Si es necesario efectuar el cultivo o si el producto después de incubarse presenta cualquier cambio, ya sea en apariencia, olor, color, pH, o bien presencia de gas o espuma, proceder como se indica en 5.1 o 5.2, dependiendo del pH del alimento.

B.22.1.2 Examen microbiológico de latas alteradas

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

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

B.22.1.2.1 Alimentos de baja acidez, con pH > 4,6, entre los que se encuentran productos cárnicos, lácteos, marinos, algunos vegetales, guisados, sopas, etcétera.

B.22.1.2.2 Alimentos ácidos, con pH $\leq$ 4, 6, entre los que se encuentran tomates, frutas, jugos de cítricos, encurtidos, entre otros.

B.22.2 Reactivos y materiales

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

disponerse de formulas comerciales deshidratadas equivalentes, se deben seguir las instrucciones del fabricante.

B.22.2.1 Medios de cultivo y soluciones

B.2.2.1.1 Caldo glucosa púrpura de bromocresol (CGPB)

FORMULA

Glucosa	100 g
Extracto de carne	30 g
Peptona (P. Ej. caseína)	50 g
Púrpura de bromocresol	20 ml
(1	6% en etanol)
Agua destilada	1 0000 ml

pH final = 7,0 ± 0,2

Disolver los ingredientes en el agua, ajustar el pH y envasar en tubos de 22 x 175 mm, en volúmenes de 12 a 15 ml. Esterilizar en autoclave a 121 ± 1°C por 15 min.

B.21.2.1.2 Caldo de hígado picado o caldo carne cocida (CH o CCC)

FORMULA

Hígado o carne magra de res	500,0 g
Agua destilada	800,0 ml
Peptona	10,0 g
Fosfato dipotásico	1,0 g
Almidón soluble	1,0 g

pH final = 7,0 ± 0,2

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

B.22.2.1.3 Caldo extracto de malta

FORMULA

Extracto de malta	6,0 g
Maltosa	1,5 g
Glucosa	6,0 g
Extracto de levadura	1,0 g
Agua destilada	1 000,0 ml

pH final = 4,7 ± 0,2

Disolver los ingredientes con agitación constante. Ajustar el pH a 4,7 ± 0,2, envasar en tubos de 22 x 175 mm en volúmenes de 12-15 ml. Esterilizar en autoclave a 121 ± 1°C por 15 min. Exponer al calor el menor tiempo posible.

B.22.2.1.4 Caldo ácido

FORMULA

Proteosa peptona	5,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Glucosa	5,0 g
Fosfato dipotásico	4,0 g

Agua destilada	1 000,0 ml

pH final = 5,0 ± 0,2

Disolver los ingredientes en 1 l de agua y envasar en tubos de 22 x 175 mm en volúmenes de 12 a 15 ml. Esterilizar en autoclave a 121 ± 1°C por 15 min.

B.22.2.1.5 Agar papa dextrosa o dextrosa Sabouraud

B.22.2.1.5.1 Agar papa dextrosa

FORMULA

Infusión de papa	200,0 ml
Glucosa	20,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1 000,0 ml

pH final = 3,5

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

B.22.2.1.5.2 Agar dextrosa Sabouraud

FORMULA

Polipeptona o neopeptona	10,0 g
Dextrosa	40,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1 000,0 ml

pH final = 5,6 ± 0,2

Calentar hasta disolución completa. Esterilizar en autoclave a 118 - 121°C por 15 min, no exceder de 121 ± 1°C.

B.22.2.1.6 Agar hígado de ternera

FORMULA

Infusión de hígado	50,0 g
Infusión de ternera	500,0 g
Proteosa peptona	20,0 g
Neopeptona	1,3 g
Triptona	1,3 g
Glucosa	5,0 g
Almidón soluble	10,0 g
Caseína isoeléctrica	5,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Nitrato de sodio	2,0 g
Grenetina	20,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1 000,0 ml

pH final = 7,3 ± 0,2

pH final = 7,3 ± 0,2

Mezclar los ingredientes con agua destilada y calentar a ebullición hasta su disolución total. Ajustar el pH y esterilizar a 121 ± 1°C por 15 min.

B.22.2.1.7 Agar nutritivo

FORMULA	
Extracto de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1 000,0 ml

pH final = 7,3 ± 0,2

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

B.22.2.1.8 Solución estéril de ácido tartárico al 10%

Disolver 10,0 g de Acido tartárico y llevar a 100 ml con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121 ± 1°C.

B.22.2.1.9 Colorante de azul de metileno

Solución A Azul de metileno (pureza no < 90%) 0,3 g Etanol (95%) 90,0 ml

Solución B Solución 0,01% de hidróxido de 100,0 ml potasio

Mezclar A y B

B.22.2.1.10 Colorante de cristal violeta

Cristal violeta (pureza no < 90%) 2,0 g

Etanol (95%) 20,0 ml

Agua destilada 80,0 ml

B.22.2.1.11 Colorante de Gram

Solución A Cristal violeta (pureza no < 90%) 2,0 g Etanol (95%) 20,0 ml

Solución B Oxalato de amonio 0,8 g Agua destilada 80,0 ml

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

Solución de yodo para Gram

Yodo (cristales) 1,0 g

Yoduro de potasio 2,0 g

Agua destilada 300,0 ml

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

B.22.2.2 Materiales

- Mecheros de Bunsen o Fischer.
- Abrelatas sanitarios.
- Pinzas, espátulas y cucharas.
- Charolas.
- Pipetas serológicas de 10 ml con tapón de algodón.
- Pipetas despuntadas o tubos de 8 mm de diámetro con tapón de algodón.
- Propipeta o bulbo para pipeta.
- Tubos de cultivo de 18 x 150 o de 22 x 175 mm.
- Embudos grandes de tallo corto.
- Portaobjetos.
- Cajas de Petri estériles.
- Punzón para latas.

¡ Asa de platino o nicromel en porta-asas.

¡ Cepillo para lavar las latas.

¡ Toallas o gasas estériles.

¡ Solución de yodo al 4% (en etanol al 70%).

¡ Sistema de anaerobiosis.

¡ Varillas de vidrio de 20 cm de longitud y 3 mm de grueso, dobladas en ángulo recto de 5 cm en uno de sus extremos.

¡ Azul de metileno, cristal violeta o equipo para tinción de Gram.

B.22.3 Aparatos e instrumentos

¡ Autoclave con termómetro o manómetro.

¡ Horno para esterilizar a 180°C.

¡ Incubadoras con termómetro y termostato que evite variaciones > de 0,1°C.

¡ Potenciómetro de escala expandida.

¡ Microscopio compuesto.

B.22.4 Preparación de las muestras

B.22.4.1 Llevar un registro en el laboratorio en donde se anoten:

B.22.4.1.1 El número de lote (o señalar si éste no existe o está incompleto)

B.22.4.1.2 Todos los datos importantes para la identificación del producto que aparezcan en la etiqueta; identificar la muestra en forma indeleble, antes de remover la etiqueta. Conservar el envase y la etiqueta.

B.22.4.1.3 Los defectos físicos que se observen en el envase como abolladuras, golpes que lo deformen, oxidación, derrames, defectos aparentes de las cerraduras, abombamiento, etcétera.

Según su apariencia externa clasificarlas como sigue:

B.22.4.2 Latas

B.22.4.2.1 Latas planas o normales.

B.22.4.2.2 Abombamiento ligero (Flipper), Grado I. Unicamente uno de los extremos de la lata se encuentra ligeramente abombado, pero puede comprimirse fácilmente.

B.22.4.2.3 Abombamiento elástico (Springer), Grado II. Uno de los extremos se encuentra abombado; al presionarle el extremo opuesto se abulta.

B.22.4.2.4 Hinchazón (Soft swell), Grado III. Ambos extremos se encuentran abombados, pero pueden comprimirse o ceden ligeramente a la presión.

B.22.4.2.5 Hinchazón (Hard swell), Grado IV. Ambos extremos se encuentran abombados y no pueden comprimirse: la lata puede reventar.

B.22.4.3 Frascos de vidrio

B.22.4.3.1 Tapa normal

B.22.4.3.2 Tapa abombada

B.22.4.4 Incubación de los envases

B.22.4.4.1 Incubación de productos en envases de apariencia normal.

La prueba más confiable para determinar la esterilidad comercial es la incubación del producto a temperaturas apropiadas y por un tiempo suficiente para que cualquier microorganismo que se encuentre pueda desarrollarse bajo las condiciones del producto envasado, dando origen a manifestaciones ya sea en el envase o en el producto. Incubar de 30 a 35°C por 10 a 14 días.

Observar diariamente los envases. La manifestación de crecimiento es la hinchazón en diferentes grados y en los envases de vidrio se pueden observar los cambios en el alimento o la formación de burbujas. En

cuanto se detecte hinchazón en el producto o cualquier otra desviación suspender la incubación.

Al final del periodo de incubación, abrir las latas para descubrir descomposición ácida (flat sour), por cambios en el color, olor, consistencia y pH del alimento. Preparar extensiones, teñirlas con azul de metileno o tinción de Gram y observarlas microscópicamente. El hallazgo de cualquier anormalidad indica que el producto no está comercialmente estéril y se debe proceder como para los envases alterados.

B.22.4.4.2 Incubación de envases sospechosos o alterados

Analizar de inmediato una o varias unidades de la muestra e incubar el resto de las latas que no presenten alteración evidente o con abombamiento de grado I de 30 a 35°C por 10 a 14 días.

Los envases con abombamiento muy evidente no deben incubarse. Aquellos que se clasifiquen como grado III o IV de no

Los envases con abombamiento muy evidente no deben incubarse. Aquellas que se clasifiquen como grado III o IV de no analizarse en el momento, deberán refrigerarse.

B.22.4.5 Apertura de las latas o envases

B.22.4.5.1 Area de trabajo

Se debe trabajar preferentemente en un gabinete de flujo laminar que proporcione un ambiente ultra-limpio, clase 100*

La desinfección de la superficie de trabajo se puede hacer con alcohol o sales cuaternarias de amonio a la concentración recomendada por el fabricante. Posteriormente se debe poner a trabajar el flujo, 30 min antes de efectuar el trabajo.

Para controlar la eficacia del flujo, se deben poner como testigos cajas con medio de cultivo abiertas, a los lados y al centro del área de trabajo, durante todo el tiempo que dure la operación.

Si no se tiene el equipo necesario, se puede utilizar un cuarto o cubículo perfectamente limpio, lavado con agua y jabón, desinfectándolo con un agente bactericida apropiado. En este caso se trabajará entre dos mecheros Bunsen.

B.22.4.5.2 Personal

El personal debe trabajar con bata limpia. Si tiene el pelo largo, debe usar turbante. El uso de mascarillas quirúrgicas es opcional. El personal enfermo con gripe o cualquier otro problema infeccioso no debe intervenir en el análisis.

B.22.4.6 Preparación de latas o envases normales

Lavar el envase con un cepillo, usando agua caliente y jabón; enjuagar y dejar secar.

Remojar con un sanitizante durante 10 a 15 min, la tapa contraria a donde está grabado el lote. Escurrir el líquido y secar con la flama de un mechero.

Destapar con un abridor de latas sanitario estéril.

En las latas de cierre de anillo o dispositivos abre fácil, abrir por la cara opuesta.

* El equipo debe proveer un ambiente libre de partículas de 0,3 micras con una eficiencia del 99,99% en un flujo de 100 pies3/min.

B.22.4.6.1 Frascos de vidrio

Lavar la tapa del frasco y sumergirlo durante 15 min en una solución sanitizante, de manera que quede cubierta la tapa; esta solución puede ser cloro 100 mg/kg. Colocar un algodón estéril en torno a la tapa y con un punzón estéril hacer un orificio en el centro, a fin de que se pierda el vacío y pueda abrirse con facilidad. Abrir el frasco sin contaminar los bordes del mismo.

B.22.4.7 Preparación de latas o envases alterados

Lavar el envase con un cepillo, con agua caliente y jabón; enjuagar y secar. Si la lata está muy inflada, mantener en el refrigerador antes de abrirla. Limpiar y sanitizar la tapa con una solución de cloro 100 mg/kg o yodo al 2% en alcohol al 70%; limpiar con una gasa estéril.

En latas muy infladas de pH muy ácido, es necesario hacer una prueba para hidrógeno, con objeto de conocer si el gas se debe a la acción del ácido sobre el metal.

Para ello, practicar una pequeña puntura en el centro de la tapa y recibir el gas en un tubo de ensayo invertido; inmediatamente ponerlo sobre la flama. Una pequeña explosión indica la presencia de hidrógeno. No debe flamearse directamente el orificio de la lata.

Para abrir latas infladas, colocar un embudo invertido con un algodón estéril sobre la tapa y picar con un

picahielo estéril, hasta desalojar el gas antes de abrir la lata.

B.22.5 Procedimiento

Abrir la lata entre dos mecheros Bunsen o en el gabinete de flujo laminar vertical. Tomar porciones tanto del contenido sólido como del líquido; si es posible, homogeneizar. Utilizando utensilios adecuados a la naturaleza del producto (espátulas, pinzas, tubos de vidrio, pipetas, etcétera) transferir aproximadamente 2 g o 2 ml del producto a los tubos con el medio que se va a utilizar, dependiendo del pH del alimento.

Conservar una muestra en un frasco estéril, para cualquier aclaración o para efectuar pruebas biológicas. Hacer una extensión en un portaobjetos del contenido de la lata, ya que muchas veces los gérmenes causantes del deterioro mueren durante el almacenamiento y sólo el examen microscópico puede dar una idea de los microorganismos involucrados en la descomposición. Preparar las extensiones mediante una asa de platino. Si el alimento es sólido o muy espeso, agregar una pequeña cantidad de agua estéril. Si es muy grasoso, depositar sobre la extensión una pequeña cantidad de xilol con posterioridad a su fijación por calor.

Una vez tomada la muestra, anotar el estado del alimento: su olor, cambios en su color, consistencia, etcétera. No debe probarse. Determinar el pH y vaciar el contenido de la lata. Observar su interior, anotando el estado del barniz, la presencia de manchas, defectos del frasco o de la tapa, etcétera.

B.22.5.1 Examen de alimentos envasados de baja acidez (pH > a 4,6)

Inocular aproximadamente 2 g o 2 ml, en cada uno de 4 tubos con caldo hígado, previamente calentado a 100°C para expulsar el oxígeno disuelto, y enfriar rápidamente.

Inocular asimismo, 4 tubos de caldo púrpura de bromocresol

Inocular asimismo, 4 tubos de caldo púrpura de bromocresol.

Incubar según el siguiente esquema:

MEDIO DE CULTIVO	TUBOS	TEMPERATURA	TIEMPO	INVESTIGACION
Caldo hígado o CCC	2	35°C	96 h/120 h	Mesofílicos anaerobios
Caldo hígado o CCC	2	55°C	24 h/72 h	Termofílicos anaerobios
Caldo púrpura de bromocresol	2	35°C	96 h/120 h	Mesofílicos aerobios
Caldo púrpura de bromocresol	2	55°C	24 h/48 h	Termofílicos aerobios

Transferir los alimentos líquidos por medio de una pipeta, utilizando un bulbo o propipeta. ¡Precaución! Tener ciudado al manipular el producto, incluso cuando provenga de envases aparentemente normales. ¡La Toxina botulínica puede estar presente! Observar los tubos diariamente, hasta el término del tiempo de incubación si no hay crecimiento en todos los tubos, descartar e informar como NEGATIVO.

Cuadro 1 DIAGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE CULTIVO PARA ALIMENTOS ENLATADOS DE BAJA ACIDEZ (> 4,6).

CULTIVO ORIGINAL	TEMPERATURA	SUBCULTIVO		CULTIVO PURO	IDENTIFICACION
CH o CCC y CGPB	35°C 96/120 h	AN o AHT Aeróbico AN o AHT Anaeróbico	Crecimiento Crecimiento	Frotis CH o CCC Frotis CH o CCC	Tinción de Gram Anaeróbico AN o AHT Tinción de Gram Aeróbico AN o AHT
CH o CCC y CGPB	55°C 24/72 h	AN o AHT Aeróbico AN o AHT Anaeróbico	Crecimiento Crecimiento	Frotis CH o CCC Frotis CH o CCC	Tinción de Gram Anaeróbico Tinción de Gram Aeróbico AN o AHT

CH = Caldo Hígado de Ternera AN = Agar Nutritivo

CCC = Caldo Carne Cocida AHT = Agar Hígado de Ternera

CGPB = Caldo Púrpura de Bromocresol

DIAGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE CULTIVO PARA ALIMENTOS ENLATADOS ACIDOS (4,6).

CULTIVO ORIGINAL	TEMPERATURA	SUBCULTIVO		CULTIVO PURO	IDENTIFICACION
CA, CEM	30°C 96/120 h	AN, ADS o ADP Aeróbico AN, ADS o ADP Anaeróbico	Crecimiento Crecimiento	Frotis CA, CEM Frotis CA, CEM	Tinción de Gram Anaeróbico AN, ADS o ADP Tinción de Gram Aeróbico AN, ADS o ADP
CA	55°C 24/72 h	AN Aeróbico AN Anaeróbico	Crecimiento Crecimiento	Frotis CA Frotis CA	Tinción de Gram Anaeróbico AN Tinción de Gram Aeróbico AN

CA = Caldo Acido AN = Agar Nutritivo

CEM = Caldo Extracto de Malta ADS = Agar Dextrosa Sabouraud

ADP = Agar Papa Dextrosa

Si hay crecimiento, hacer frotis y teñir-resembrar a placas de agar hígado de ternera (sin yema de huevo) o agar nutritivo.

Incubar a 35°C y 55°C una placa en aerobiosis y anaeróbico (ver cuadro 1) continuar la incubación a 35°C de caldo de hígado (CH) o caldo carne cocida (CCC) hasta un máximo de 5 días y guardar para determinación de toxina (cuando proceda).

Observar los agares y seleccionar un número representativo de los diferentes tipos de colonias y resembrar a CH y CCC a la temperatura y las condiciones según se especifica en el cuadro 1 (a 35°C por 96/120h y 55°C por 24/72h).

Expulsar el oxígeno inmediatamente antes de utilizar el CH que se va a incubar en anaerobiosis. Mantener viables los cultivos puros aislados. Hacer tinción de Gram.

B.22.5.1.1 Cuando se presente crecimiento microbiano durante las pruebas para esterilidad comercial en un enlatado y no haya evidencia de descomposición del alimento, efectuar la confirmación de la siguiente forma:

B.22.5.1.1.1 Obtener cultivos puros de la cepa o cepas encontradas.

B.22.5.1.1.2 Seleccionar otro envase del mismo producto y el mismo lote que el anterior.

B.22.5.1.1.3 En condiciones asépticas, practicar una pequeña perforación en el extremo de la lata o cerca del cierre.

A.22.5.1.1.4 Inocular el producto con la cepa por abajo de la superficie.

B.22.5.1.1.5 Flamear el orificio para crear vacío y sellar asépticamente con soldadura o un material similar.

B.22.5.1.1.6 Después de inocular, incubar a 30-35°C durante 10 días.

B.22.5.1.1.7 Abrir el enlatado y examinar el producto.

El aspecto del producto debe ser igual al que se observó en el envase de donde se obtuvo el cultivo. Si en el primer enlatado el producto fue de apariencia normal, pero se obtuvo crecimiento y en el segundo, inoculado con la flora microbiana aislada del primero, se encuentra el producto alterado (gas, consistencia diferente, olor, etcétera), debe considerarse que el primer enlatado era comercialmente estéril y que el crecimiento fue el resultado de un procedimiento deficiente por el laboratorio. Si se encuentra flora mixta únicamente en el CGPB, hacer informe de los tipos morfológicos. Si hay flora mixta en CH/CCC entre la cual se incluyan bacilos, hacer prueba toxina. Si se observan únicamente bacilos Gram positivo o Gram variable típicos del género *Bacillus* o *Clostridium* investigar presencia de esporas. En algunos casos las células vegetativas envejecidas pueden dar la apariencia de Gram negativo y debe considerarse como si fuera Gram positivo. Determinar la presencia de toxina. Esta prueba la podrá realizar un laboratorio oficialmente acreditado por las autoridades correspondientes.

B.22.5.2 Examen microbiológico de alimentos envasados de acidez alta (pH $\leq$ 4,6)

Inocular 2 g o 2 ml de alimento en 4 tubos de caldo ácido y 2 tubos de caldo extracto de malta.

Incubar según el esquema:

MEDIO DE CULTIVO	TUBOS	TEMPERATURA	TIEMPO	INVESTIGACION
Caldo ácido	2	30°C	96 h	Lactobacilos, hongos y levaduras
Caldo ácido	2	55°C	48 h	Termofílicos de descomposición ácida
Caldo extracto de malta	2	30°C	96 h	Lactobacilos, hongos y levaduras

B.22.6 Expresión de resultados

B.22.6.1 Envases normales

Conviene extremar los cuidados al efectuar los ensayos, seleccionar las muestras e interpretar los resultados de las pruebas para demostrar la esterilidad comercial, ya que cualquier error basado en fallas de manipulación o interpretación, puede originar la destrucción de un lote comercialmente estéril, como contaminado. Al incubar el enlatado o al recibirse la lata, la presencia de hinchazón, principalmente cuando es muy acentuada, indica contaminación microbiana. Estas condiciones deben ser confirmadas demostrando la presencia de un gran número de microorganismos en las extensiones preparadas directamente a partir del alimento, descubriendo cambios en el aspecto del producto (consistencia, olor, coloración anormal) o variaciones en el pH, en comparación siempre con un producto normal. Los cultivos se practican por duplicado, cuando hay contaminación, en ambos tubos se debe hallar una flora similar a la encontrada en las extensiones de la muestra original. Encontrar sólo uno de los tubos de cultivo positivo y otro negativo, puede indicar una contaminación por manipulación en el laboratorio, a menos que se compruebe que existe el mismo tipo de flora que en la extensión de la muestra original.

A veces existe alguna dificultad en diferenciar partículas del alimento de microorganismos. Otras veces las levaduras o lactobacilos participan en la producción del alimento, como sucede en algunos productos obtenidos por fermentación. En estos casos, aunque ya no sean viables, los microorganismos pueden aparecer en la extensión, y sólo la experiencia y el conocimiento de los procesos permite interpretar correctamente los resultados.

B.A.22.6.2 Envases alterados, con pH > de 4,6

B.22.6.2.1 Presencia de mesofílicos aerobios

La flora presente en este caso, puede estar constituida por bacilos o ser mixta.

B.22.6.2.1.1 Presencia de bacilos esporulados

Generalmente consiste en esporas termorresistentes de diferentes especies de bacilos. Regularmente el alimento no presenta alteraciones, ya que las esporas no pueden desarrollarse en condiciones de anaerobiosis; sin embargo, se han encontrado alteraciones producidas por bacilos con esporas resistentes (*Bacillus mesentericus* y *Bacillus subtilis*), en alimentos de acidez media, con tratamiento térmico adecuado, pero con vacío incompleto. También se ha encontrado *Bacillus ß nigrificans*, en conservas de betabeles con ennegrecimiento del producto.

B.22.6.2.1.2 Presencia de flora mixta

La presencia de flora mixta se debe generalmente a la penetración de gérmenes, con posterioridad al proceso térmico, actuando como vehículo el agua de enfriamiento. La flora que se observa puede ser muy variada.

La penetración de los gérmenes se debe a defectos en las cerraduras, que permiten el paso de los microorganismos. Las latas generalmente se encuentran infladas y pueden mostrar defectos o derrames.

El pH y el aspecto del producto varían.

B.22.6.2.2 Presencia de mesofílicos anaerobios

Consiste de anaerobios del género *Clostridium*, entre los que se encuentran *C. sporogenes*, *C. putrificans, C. hystoliticum, C. bifermentans, C. perfringens* y *C. botulinum*; este último es el de mayor importancia sanitaria, por producir una toxina muy potente. Las latas pueden estar parcialmente infladas y el producto

parcialmente digerido; el olor es pútrido. El pH aumenta. En este caso, es necesario practicar la prueba en animales, tanto del producto como del filtrado del cultivo, para investigar la presencia de la toxina. Esta prueba la podrá realizar un laboratorio oficialmente acreditado por las autoridades correspondientes.

B.22.6.2.3 Presencia de termofílicos aerobios

Consta de bacilos termofílicos estrictos o facultativos, que poseen esporas muy resistentes al calor (especie tipo *B. stearothermophilus*, causante de la descomposición ácida flat sour). Las latas son planas, sin alteración y con marcado aumento de la acidez del producto; puede haber olor anormal o enturbiamiento del líquido.

B.22.6.2.4 Termofílicos anaerobios

Pertenecen también al género *Clostridium*, con esporas muy resistentes al calor.

La especie tipo *C. thermosaccharolyticum,* es un anaerobio estricto no productor de sulfhídrico; las latas se encuentran infladas.

Otro tipo de descomposición poco común, puede ser causada por C. nigrificans, que produce sulfhídrico con ennegrecimiento del producto.

B.22.6.3 Interpretación de resultados en alimentos de acidez alta

B.22.6.3.1 Presencia de mesofílicos aerobios

B.22.6.3.1.1 Presencia de *Lactobacillus*. La descomposición por bacterias acidúricas no formadoras de esporas, puede deberse a varias especies del género *Lactobacillus*. Se han aislado *L. lycoperci, L. pentoaceticus, L. menitipolum* y *L. pleofructi*.

B.22.6.3.1.2 Presencia de levaduras. El hallazgo de levaduras indica falta de procesamiento. Las latas contaminadas generalmente se presentan muy hinchadas y el olor del producto es característico de levadura (olor ácido). Entre las levaduras se han aislado esporas del género Torula.

B.22.6.3.1.3 Presencia de hongos. Otro tipo de descomposición puede ser causada por hongos como *Byssochlamys fulva*, que forma esporas muy resistentes al calor. Se han encontrado también algunas cepas de Penicillium; en estos casos generalmente las latas se encuentran planas, sin alteración y el hongo crece en la superficie del producto.

B.22.6.3.2 Mesofílicos anaerobios

Clostridium pasteurianum causa una descomposición poco frecuente, en que las latas se encuentran infladas y con olor butírico. Si se sospecha este tipo de contaminación, sembrar un tubo con medio o caldo ácido en anaerobiosis a 35°C.

B.22.6.3.3 Termofílicos aerobios

La descomposición por termofílicos aerobios produce el tipo flat-sour, o sea la descomposición ácida. Las latas se encuentran planas y se observan cambios en el vacío; entre los gérmenes causantes está *B. coagulans*, que es el responsable de la descomposición de productos derivados del jitomate y de la producción de grumos de leche evaporada.

B.22.6.3.4 Termofílicos anaerobios

La descomposición por termofílicos anaerobios es poco frecuente en productos ácidos. La producen anaerobios butíricos.

En productos de acidez muy alta, con pH inferior a 3, 7, como col agria, encurtidos, etcétera, la descomposición puede deberse a las bacterias ya señaladas, pero generalmente la acidez inhibe el desarrollo de gérmenes. En muchos casos, la hinchazón de la lata se debe a causas químicas, por formación de hidrógeno.

B.22.6.4 Observaciones generales

Algunas veces se pueden encontrar cultivos negativos, procedentes de latas anormales, o de latas normales con productos descompuestos. Esto puede deberse a que la alteración ocurrió antes del procesamiento térmico del enlatado y han muerto los microorganismos que la originaron, o bien a que en un producto contaminado, los gérmenes murieron al agotarse el oxígeno o los nutrientes.

En estos casos, un examen microscópico del producto puede ayudar al diagnóstico.

B.23. PROCEDIMIENTO AL TRASLUZ PARA LA DETECCION DE PARASITOS.

B.23.1 Para detectar los parásitos se coloca una muestra sobre una lámina acrílica de 5 mm de espesor, de 45% de traslúcidez y una fuente luminosa de 1500 lux a una distancia de 30 cm por encima de la lámina.

B.23.2 La infestación parasítica podrá detectarse mediante este procedimiento al trasluz, por examen visual.