

EL presente trabajo de investigación se desarrolló en el comedor del ISSSTE de Ciudad Obregón y en el Laboratorio de Microbiología de la Dirección de Investigación y Estudios de Postgrado (DIEP) del Instituto Tecnológico de Sonora formando parte del proyecto “Evaluación Físicoquímica y Microbiológica en agua y alimento”; siendo asesorado por el M.I. Anacleto Félix Fuentes.

## DEDICATORIAS

### **A DIOS:**

*Por darme la oportunidad de vivir y de compartir mi vida con el, de ser su hija, de estudiar y así cumplir esta meta y por estar siempre cerca de mi guiándome e iluminando mi camino.*

### **A MIS PADRES:**

*Abelardo Rosas Robles y Sylvia Montoya Quintana, Por estar siempre pendientes de mi, por apoyarme, por estar conmigo en las buenas y en las malas por sus consejos, por todo ese amor que me han brindado y sobre todo por darme la vida y de esta manera permitirme ser su hija.*

### **A MI MADRE:**

*Sylvia Montoya Quintana, por ser como eres gracias mamá, eres la persona a la que mas he admirado en mi vida eres única porque solo tu sabes entregar tanto amor y más que eso por enseñarnos a entregarlo a nosotras también, se que a veces no te lo demuestro pero eres muy importante para mi, gracias por todo lo que has hecho por mi y por mi hermana porque no podíamos tener otra mejor, Dios te lo pague, te quiero y te adoro con todo mi corazón.*

### ***A MI PADRE:***

*Abelardo Rosas Robles, por ser alguien muy especial en mi vida, gracias Papá, porque sin ti no hubiera podido llegar hasta donde estoy, gracias por enseñarme a valorar y a querer a las personas por lo que son y por ayudarme siempre que te lo pido, gracias por haberme dado la oportunidad de convivir estos años contigo (y los que faltan) no sabes cuanto se lo pedía a Dios cuando no estabas, se que nunca lo digo pues tu sabes que es difícil pero te quiero mucho.*

### ***A MI BISABUELO:***

*Abato Quintana por ser tantos años mi padre y estar ahí siempre que lo he necesitado desde que nací hasta la fecha, te quiero mucho (Papá Abato).*

### ***A MIS ABUELAS:***

*Guadalupe Quintana Jiménez por estar siempre conmigo y por quererme tanto para mi siempre vas a ser mi segunda madre te quiero mucho (mi mamá Lupe) y (t) María Robles de Rosas que por desgracia no esta conmigo pero estará siempre en mi corazón y se que en donde estas me vas a mandar la bendición te quiero mucho mamá Nina.*

### ***A MI HERMANA:***

*Que tanto quiero y por ser una de las personas mas importantes en mi vida Sylvia Maria Rosas Montoya porque aparte de ser mi hermana has sido siempre mi amiga y has estado en*

*las buenas y en las malas, por todos los momentos que hemos pasado juntas, por apoyarme en los momentos difíciles de mi vida porque a pesar de que estas lejos siempre estas pendiente de mi, te quiero mucho se que nunca lo digo pero lo pienso y siempre estas en mi corazón.*

***A MI NOVIO (ALEX VLADIMIR SANDOVAL PERAL):***

*AMOR, tengo que darte las gracias por muchas cosas por el amor, cariño, comprensión y el apoyo que me has brindado desde que te conocí, desde ese momento supe que eras la persona con la que quiero compartir cada segundo de mi vida, pero a quien más debo de darle gracias es a Dios por darme la oportunidad de conocerte por haberte puesto en mi camino y cambiar mi vida, por ser esa persona tan importante para mi que siempre me hace tan feliz. Te amo.*

***A MI NIÑA:***

*Edna Cecilia Montoya Quintana, por ser como mi madre ya que cuando te he necesitado siempre has estado ahí, te quiero mucho y gracias por apoyarme.*

***A MIS TIAS:***

*Luz Elia, Mayra, Carmelita, Chuyita, por que aunque no se encuentran cerca siempre están pendientes de mi de todo lo que me pasa, gracias por eso y mucho mas las quiero mucho.*

### ***A MIS TIOS:***

*Juan Armando, Fernando, Marco Antonio, Gaby, Ofelia, por ayudarme siempre que los necesito y por todos los momentos que hemos pasado juntos, también los quiero mucho.*

### ***A MIS SUEGROS:***

*Roberto Sandoval Esparza y Delfina Peral Félix, por su apoyo incondicional y por hacerme sentir como su hija muchas gracias por ser como son, los quiero mucho.*

### ***A MIS CUÑADOS:***

*Diana Araceli, Roberto Carlos por todos los momentos que hemos pasado juntos por ser mis hermanos y mis amigos por todo el apoyo y todo el cariño que me han brindado los quiero mucho.*

### ***A MI TIA LUCERO:***

*Por ser como eres ya que sin conocerme siempre me has tratado como si fuera uno de tus hijos gracias por todo ese apoyo, cariño y amor que me has dado a mi y a Vlady te quiero mucho y quiero que siempre estés cerca de nosotros.*

### ***A MIS PRIMOS:***

*Jorge, Luis Alonso, Denisse, Estefanía, Marco Antonio, Laura Fernanda, Aritza, Ivan, Brayán, cesar, por ser unas personitas muy importantes en mi vida los quiero mucho.*

***A MIS AMIGOS:***

*Mariana, Siulam, Elías, Maricela, Silvia, Alejandra, Angela, Gladis, Carolina, Meza, Viky, julio, juli, patty, Joel y a todos mis compañeros de la carrera, por demostrarme que son mis verdaderos amigos ya que han estado en las buenas y en las malas siempre pendientes de mí los quiero mucho. Y a todos mis compañeros que de alguna manera intervinieron para que esta meta se hiciera realidad ayudándome siempre con mis dudas.*

## AGRADECIMIENTOS

### ***A MI ASESOR:***

*M.I. Anacleto Félix Fuentes, por todo su apoyo y amistad que me brindó durante todos los años de la carrera y mi formación estudiantil, y muchas gracias por todos los consejos y conocimientos que compartió conmigo que me ayudaron a culminar esta gran meta. Ya que sin su ayuda hubiera sido muy difícil ¡Muchas gracias Ingeniero!. Que Dios se lo pague.*

### ***A MI MAESTRA:***

*Olga Nydia Campas Baypoli, Por brindarme su amistad y su apoyo incondicional, por compartir todos sus conocimientos y por ser una maestra ejemplar.*

### ***A LA COORDINADORA DE LA CARRERA:***

*Laura Gassos por todos los conocimientos, consejos que recibí de ella durante toda la mi formación como profesionalista, muchas gracias.*

### ***AL PERSONAL DEL ISSSTE:***

*Por su apoyo brindado para la realización de la presente investigación.*

# ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABLA .....	iii
RESUMEN .....	iv
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>v</b>
<b>1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>vii</b>
<b>1.2 JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>viii</b>
<b>1.3 OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>ix</b>
<b>1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>x</b>
<b>1.5 HIPÒTESIS .....</b>	<b>xi</b>
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>1</b>
2.1 Generalidades del grupo coliforme .....	1
2.1.1. Definición .....	1
2.1.2. Conformación .....	1
2.1.3. Cultivo y Desarrollo .....	1
2.1.4. Resistencia .....	2
2.1.5. Efecto sobre los alimentos .....	2
2.1.6. Significado en los alimentos .....	3
2.2 Generalidades de <i>Salmonella</i> .....	4
2.2.1. Morfología y tinción .....	4
2.2.2. Fisiología .....	4
2.2.3. Toxina .....	5
2.2.4. Patogenia y Virulencia .....	5
2.2.5. Clasificación .....	6
2.3 Microorganismos indicadores .....	7
2.3.1. Recuento de organismos mesófilos aerobios .....	8
2.3.2. Determinación de organismos coliformes .....	9
2.3.3. Investigación de <i>Salmonella</i> .....	11
2.3.4. Recuento de hongos y levaduras .....	12
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>15</b>
3.1 Localización y características del sitio de muestreo .....	15
3.1.1. Sitio de muestreo .....	15
3.1.2. Periodo de muestreo .....	15
3.1.3. Características de la muestra .....	16
3.1.4. Recolección de la muestra .....	16
3.1.5. Tipos de muestras .....	17
3.2 Análisis bacteriológico .....	17
3.2.1. Aislamiento e identificación por pruebas bioquímicas a <i>Salmonella sp.</i> .....	17
3.2.1.1. Preenriquecimiento .....	17
3.2.1.2. Aislamiento e identificación típico de <i>Salmonella sp.</i> .....	18

	<b>Página</b>
3.2.2. Determinación de organismos coliformes totales por la técnica tubos de fermentación múltiple del Número Más Probable NMP	18
3.2.2.1. Prueba presuntiva .....	18
3.2.2.2. Prueba confirmativa .....	18
3.2.2.3. Determinación del NMP de coliformes totales .....	19
3.2.3. Determinación de organismos coliformes fecales por la técnica de tubos de fermentación múltiple .....	19
3.2.3.1. Prueba presuntiva .....	19
3.2.3.2. Prueba confirmativa .....	19
3.2.3.3. Determinación del NMP de coliformes fecales .....	20
3.2.4. Recuento de hongos y levaduras por la técnica de vaciado en placa .....	20
3.2.5. Recuento de organismos mesófilos aerobios por la técnica de vaciado en placa .....	20
3.2.6. Pruebas bioquímicas para identificación de <i>Salmonella</i> sp. ....	21
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>26</b>
4.1 Análisis microbiológico .....	26
4.1.1. Recuento de organismos mesófilos aerobios .....	26
4.1.2. Número Más Probable (NMP) de coliformes totales y fecales ...	28
4.2.3. Recuento de hongos y levaduras .....	30
4.2.4. Aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i> .....	32
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>34</b>
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>36</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>37</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>39</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
1	Fechas de muestreo .....	16
2	Aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i> en alimentos procedentes del comedor del hospital del ISSSTE en el periodo junio-agosto de 2002.....	27
3	Determinación de organismos coliformes totales y fecales en alimentos procedentes del comedor del hospital del ISSSTE en el periodo junio-agosto de 2002.....	29
4	Recuento de hongos y levaduras en alimentos procedentes del comedor del hospital del ISSSTE en el periodo junio-agosto de 2002 .....	31
5	Recuento de organismos mesófilos aerobios en alimentos procedentes del comedor del hospital del ISSSTE en el periodo junio-agosto de 2002.....	33

---

---

## RESUMEN

---

---

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Microbiología de la Dirección de Investigación de Estudios de Postgrado (DIEP) del Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON), durante el periodo comprendido en los meses junio-Agosto de 2002.

El objetivo fue realizar análisis microbiológicos a los alimentos elaborados y consumidos en el hospital del ISSSTE de Ciudad Obregón, Sonora; con la finalidad de verificar si son aptos para consumo humano, según las Normas Oficiales Mexicanas.

Se realizaron 8 muestreos cada semana en el comedor del hospital del ISSSTE, que se encuentra ubicado en las calles Mayo y Tehuantepec, analizando un total de 32 muestras. Algunas de los alimentos analizados fueron sopa de arroz, frijoles, picadillo, enchiladas, sopas, ensaladas, aguas frescas entre otras.

Los análisis que se llevaron a cabo fueron aislamiento en medios de enriquecimiento y selectivos e identificación por pruebas bioquímicas de *Salmonella sp.* (NOM-114-SSA1-1994), recuento de hongos y levaduras (NOM-111-SSA1-1994), recuento de organismos mesófilos aerobios por la técnica de vaciado en placa (NOM-092-SSA1-1994) y recuento de coliformes totales y fecales por la técnica del Número Más Probable (NOM-112-SSA1-1994).

Los resultados obtenidos para mesófilos aerobios el 96.8% se encontró dentro de los límites permisibles, para coliformes totales el 90.6% no sobrepasaron los límites establecidos en la (NOM-093-SSA1-1994) y para coliformes fecales se encontró incidencia solo en el 15.6%, mientras que para hongos y levaduras solo se dio una cuenta alta que en este caso no es significativa y para *Salmonella sp*, fueron negativos ya que dicho microorganismo no se encontró presente en el 100% de las muestras, con esto se demostró la buena calidad sanitaria de los alimentos elaborados en este lugar debido a las adecuadas prácticas de higiene y limpieza, así como su preparación y manipulación, lo cual nos indica que son aptos para consumo humano, por no causar daños a la salud y cumplir con las Normas Oficiales Mexicanas.

---

---

## I. INTRODUCCIÓN

---

---

Los alimentos juegan un papel muy importante en la vida de cada uno de nosotros, ya que todos tenemos la necesidad de alimentarnos sanamente con alimentos libres de contaminantes porque nos pueden causar serias enfermedades, en este caso se habla de la contaminación por microorganismos ya que estos utilizan a los alimentos como fuente de elementos nutritivos para su multiplicación, esto puede dar lugar a la alteración de los alimentos. El deterioro de dichos alimentos no sólo obedece al incremento de microorganismos sino que, además estos alimentos sirven como vehículos portadores de enfermedades que en ocasiones pueden ser de consideración, ya que muchas veces son causadas por microorganismos patógenos, como son *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella*, *Escherichia coli*, toxinas y cepas enteropatógenas (Frazier, 1993).

Un alimento alterado puede ser definido como un alimento que ha sido deteriorado o dañado hasta un grado que lo convierte en indeseable para el consumo humano. La alteración de dichos alimentos puede ser originada por el deterioro producido por los insectos, por el daño físico, como el machacamiento y la congelación, y por los microorganismos (Jay, 1992).

En el mundo es cada vez mayor la preocupación por la inocuidad, la contaminación del medio, la adulteración, las prácticas sanitarias deshonestas en relación con la calidad. Por esto en los últimos años se han formado organizaciones las cuales rigen la calidad sanitaria, como son la FAO, OMS, Codex Alimentarius, etc. Estas organizaciones tienen el propósito de contribuir a mejorar a la inocuidad de los

alimentos en toda la cadena alimentaria por medio del mantenimiento de la voluntad política de los países para aprobar y consolidar un producto como apto para consumo humano, comprobando que las características de este sean las aceptables. Esto se lleva a cabo con la ejecución de análisis de laboratorio y la correspondencia con las normas sanitarias vigentes (Jay, 1992).

Las enfermedades microbianas transmitidas por los alimentos contaminados se originan de diversas maneras, según el microorganismo patógeno del cual se trate, los cuales utilizan a los alimentos como vehículos para infestar y crear serios problemas en la salud de los consumidores; estas enfermedades pueden ser transmitidas por los mismos microorganismos provocando una infección o por las toxinas que estos producen, ocasionando una intoxicación.

Debido a esto en el presente trabajo se realizaron análisis microbiológicos de alimentos elaborados y consumidos en el hospital del ISSSTE de ciudad Obregón, Sonora. Con esto se pretendió evaluar su calidad sanitaria y determinar si son aptos para consumo humano, en base a las normas oficiales mexicanas establecidas.

---

---

## **1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

---

---

En el hospital del ISSSTE de ciudad Obregón, Sonora; no se hacen los análisis correspondientes, para monitorear y conocer la calidad de los alimentos ahí elaborados y conocer si estos cumplen con todos los parámetros establecidos en las Normas Oficiales Mexicanas. Debido a ello se pretende con este estudio es verificar que se estén cumpliendo dichos parámetros de calidad y en caso necesario tomar acciones correctivas para mejorar la calidad sanitaria en este lugar.

---

---

## **1.2 JUSTIFICACIÓN**

---

---

Este trabajo pretende demostrar la calidad sanitaria de los alimentos elaborados y consumidos en el comedor del ISSSTE de Ciudad Obregón Sonora, con el fin de tomar acciones correctivas en caso de que esta no cumpla con los parámetros establecidos en las Normas Oficiales Mexicanas y tomar medidas correspondientes, todo esto para beneficiar a las personas que consumen alimentos en dicho comedor.

---

---

### **1.3 OBJETIVO GENERAL**

---

---

Realizar análisis microbiológicos de alimentos elaborados y consumidos en el hospital del ISSSTE para determinar su calidad sanitaria y definir si son aptos para consumo humano en base a Normas Oficiales Mexicanas.

---

---

## 1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

---

---

- 📖 Aislar e identificar por pruebas bioquímicas a *Salmonella sp.*
  
- 📖 Determinar organismos coliformes totales y fecales por la técnica de tubos de fermentación múltiple del Número Más Probable (NMP).
  
- 📖 Cuantificar microorganismos mesofílicos aerobios, hongos y levaduras por la técnica de vaciado en placa.
  
- 📖 Comparar los resultados obtenidos con las Normas Oficiales Mexicanas, para verificar que los alimentos sean aptos para consumo humano.

---

---

## **1.5 HIPÓTESIS**

---

---

Los alimentos elaborados y consumidos en el comedor del ISSSTE de Ciudad Obregón, Sonora no cumplen con los parámetros establecidos por las normas oficiales mexicanas pudiendo estar contaminados y por lo tanto no ser aptos para consumo humano.

---

---

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

---

### 2.1 Generalidades del grupo coliforme

#### 2.1.1. Definición.

El concepto de organismo coliforme se describe como bacterias gram negativas, no esporuladas, que fermentan la lactosa con producción de gas dentro de las 48 horas de incubación a 35°C (Fernandez,1981).

#### 2.1.2. Conformación del grupo.

Los coliformes están distribuidos ampliamente, en todas partes, en el sentido de que los bacilos coliformes se encuentran en las vías intestinales del hombre y animales, tanto de sangre caliente como fría. Típicamente dentro de este grupo se encuentran los géneros de la familia Enterobacteriaceae que fermentan fácilmente la lactosa: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter*, son los más comunes; aunque algunas especies no fermentan la lactosa antes de 48 horas, por lo que se descartan del grupo (Fernandez, 1981).

#### 2.1.3. Cultivo y desarrollo.

Los miembros del grupo coliforme proliferan abundantemente en los medios de cultivo simples. Sus demandas nutricionales son satisfactorias sin necesidad de

recorrir a compuestos especialmente complejos. La temperatura óptima y los límites para su crecimiento corresponden a los de las bacterias mesofílicas, esto es, entre 32 y 37 °C, con un límite superior cercano a los 45 y 46 °C. La capacidad para desarrollarse a temperatura superior a 40 °C la exhibe un grupo especial dentro de los coliformes que en la actualidad se designan como fecales. Pueden generalizarse por una temperatura de 4°C o menos, esta impedirá la proliferación de coliformes; temperaturas superiores de refrigeración mantienen su número o permiten ligeros incrementos. Si el tiempo de conservación de 4 °C se prolonga, eventualmente los coliformes entran en actividad. El pH óptimo para su desarrollo se encuentra próximo a la neutralidad. Los microorganismos del grupo crecen bien en aerobiosis pero muestran capacidad para hacerlo en potencial de oxido reducción bajos (Fernández, 1981).

#### **2.1.4. Resistencia.**

En congelación el número de coliformes disminuye progresivamente hasta alcanzar una cifra reducida que casi ya no es modificada. Los sobrevivientes pueden por supuesto reiniciar su multiplicación cuando las condiciones del medio lo permitan, en los alimentos congelados y precocinados (Fernández, 1981).

La pasteurización destruye los organismos coliformes; se trata pues de bacterias no termodúricas (capaz de sobrevivir a altas temperaturas). Pero la susceptibilidad al calor se encuentra condicionada a diversos factores como son la concentración de las células presentes y su empleo como indicador de prácticas no higiénicas en el manejo de algunos alimentos (Fernández, 1981).

#### **2.1.5. Efecto sobre los alimentos.**

Al desarrollarse en los alimentos, los microorganismos coliformes pueden dar lugar a algunas alteraciones; esta acción proviene de la intensa facultad heterofermentativa

de todos los miembros, una importante capacidad putrefactiva y el carácter psicotrónico de muchas cepas (Fernández, 1981).

Algunas de las propiedades que determinan que las bacterias coliformes sean importantes en las alteraciones que experimentan los alimentos son:

1. Su capacidad para crecer en sustratos muy distintos para utilizar como fuente de energía algunos hidratos de carbono, compuestos orgánicos y como fuente de nitrógeno, algunos compuestos nitrogenados bastante sencillos.
2. Su capacidad para sintetizar la mayoría de las vitaminas que necesitan.
3. La capacidad de las bacterias de este grupo para crecer perfectamente dentro de un intervalo de temperatura bastante amplio, desde temperaturas inferiores a 10 °C hasta una temperatura próxima a los 46°C.
4. Su capacidad para producir importantes cantidades de ácido y gas a partir de azúcares.
5. Su capacidad para producir sabores desagradables.
6. La capacidad de *E. aerogenes* para producir mucosidad y viscosidad. (Frazier, 1993).

#### **2.1.6. Significado en los alimentos.**

La presencia y recuento de organismos coliformes en los alimentos, adquiere cierto significado, son indicativos de malas prácticas sanitarias en el manejo o fabricación de un alimento, expresan la calidad microbiológica de un producto lo que no necesariamente implica un riesgo sanitario y revela la eficiencia de un proceso contaminante o germicida, etc. (Fernández, 1981).

## **2.2. Generalidades de *Salmonella***

Este género tiene varias especies que son patógenas para el hombre, provocando salmonelosis gastroenteríticas agudas. Las salmonellas no producen exotoxinas (toxina excretada por un microorganismos en el medio). Su acción patógena sobre el organismo animal y del hombre está relacionada con la endotoxina (toxina producida por un microorganismo y liberada sólo cuando éste se desintegra), que se caracteriza por su elevada toxicidad (Piakin, 1989).

Todos los bacilos entéricos que constituyen el gran grupo *Salmonella* son patógenos para el hombre en mayor o menor grado. Esta incluye al bacilo de la fiebre tifoidea y una gran variedad de formas cuyos huéspedes naturales habitualmente son animales, en especial roedores y aves (Freeman, 1983).

### **2.2.2. Morfología y Tinción.**

Los microorganismos del género *Salmonella* son bacilos gram negativos cuya morfología celular es muy similar a la del resto de las Enterobacterias, y no se pueden distinguir de ellas. Se tiñen fácilmente con los colorantes habituales, y si se examinan al microscopio no parece un ordenamiento celular aparente. Todos los miembros excepto *S. enteritidis serotipos pullorum y gallinarum* se mueven activamente con flagelos períticos (Freeman, 1983).

### **2.2.3. Fisiología.**

Las bacterias de este grupo tienen requerimientos nutricionales sencillos y crecen con facilidad en los medios habituales. Se obtiene un crecimiento adecuado en

medios sintéticos que contienen sales de amonio como fuente de nitrógeno y fuentes de carbono sencillas como glucosa, piruvato o lactato. La gran mayoría de las cepas no necesitan vitaminas o aminoácidos: algunas cepas *S. typhi* necesitan que se les suministre triptófano. La temperatura óptima de crecimiento es de 37° C, pero se observa un buen crecimiento a temperatura ambiente. Son anaerobios facultativos, es decir que crecen bien tanto en condiciones aerobias como anaerobias (Freeman, 1983).

#### **2.2.4. Toxina.**

Todas las especies de *Salmonella* forman una endotoxina, el lipopolisacárido de la membrana externa. Las cadenas laterales O-específicas del lipopolisacárido constituyen los antígenos O lisos de estas bacterias. La manifestación clínica de la gastroenteritis producida por *Salmonella* sugiere la implicación de una enterotoxina análoga a las de *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae*. La toxina es una proteína termolábil, con un peso molecular superior a 110,000 daltons. Induce la acumulación de los fluidos en el asa intestinal y estimula la adenileto-ciclasa. Se ha indicado semejanza antigénica con la toxina del cólera (Freeman, 1983).

#### **2.2.5. Patogenia y Virulencia.**

Con respecto a la patogenia, las infecciones producidas por *Salmonella* son de dos clases, fiebres entéricas y gastroenteritis. En ambas infecciones, las bacterias se ingieren con la comida o la bebida, e inician la infección mediante la adherencia y la colonización del tracto intestinal. En las fiebres entéricas las bacterias invaden primero el epitelio intestinal y posteriormente se multiplican en los ganglios linfáticos

del intestino y en el lugar donde desembocan los nódulos mesentéricos, alcanzando el torrente sanguíneo a través de la linfa torácica. *S. typhi*, que produce la fiebre tifoidea, es la especie de *Salmonella* que es responsable con mas frecuencia de estas infecciones generalizadas, junto con el bacilo paratífico (Freeman, 1983).

La gastroenteritis producida por la *Salmonella* difiere en que la invasión es esencialmente superficial y se limita al epitelio intestinal. La multiplicación en este lugar está acompañada probablemente por la producción de enterotoxinas, que a su vez da lugar a los síntomas de la gastroenteritis. Estas infecciones se conocen a menudo como intoxicaciones alimentarias por *Salmonella* y son causadas por serotipos de *S. enteritidis* (Freeman, 1983).

#### **2.2.6. Clasificación.**

El grupo *Salmonella* es relativamente homogéneo, puesto que estas bacterias se parecen entre sí a otros bacilos entéricos. Las similitudes en las reacciones bioquímicas, en la estructura antigénica y en las secuencias de polinucleótidos de su DNA indican la estrecha relación que existe entre ellas (Freeman, 1983).

1. Las que infectan solamente a las personas: estas incluyen a *S. typhi*, a *S. paratyphi A* y a *S. paratyphi C*. Este grupo incluye a los agentes de las fiebres tifoideas y paratifoideas, que son las más graves de todas las enfermedades producidas por las salmonelas. La fiebre corporal es mas elevada, y el índice de la mortalidad es más alto. *S. typhi* puede ser aislada en la sangre y a veces en la orina de las víctimas. El síndrome paratifoideo es más benigno que el tifoideo.
2. Las serovariedades adaptadas a los hospedadores (algunas de las cuales son patógenas para el hombre y pueden ser contraídas a partir de alimentos):

están incluidas *S. gallinarum* (aves), *S. dublín* (bóvidos), *S. abortus-equi* (équidos), *S. abortus-ovis* (óvidos), y *S. choleraesuis* (suidos).

3. Serovariedades inadaptadas (sin preferencia de hospedador), son patógenas para las personas y para otras especies de animales, e incluye la mayoría de las serovariedades transmitidas por los alimentos (Jay, 1992).

### **2.3. Microorganismos indicadores**

La presencia de microorganismos en los alimentos no significa necesariamente un peligro para el consumidor o una calidad inferior de estos productos. En realidad, si se exceptúa el reducido número de productos esterilizados, cada bocado de alimentos contiene levaduras, mohos, bacterias y otros microorganismos. La mayor parte de los alimentos se convierten en potencialmente peligrosos para el consumidor sólo después de que han sido violados los principios de higiene, limpieza y desinfección. Si los alimentos han estado sometidos a condiciones que pudieran haber permitido la llegada y/o la multiplicación de agentes infecciosos o tóxicos, pueden constituirse en vehículo de transmisión de enfermedades, tales como la salmonelosis o la intoxicación estafilocócica. La puesta en evidencia de estos riesgos se basa en el examen de muestras de alimentos en busca de los propios agentes causales o indicadores de una contaminación no admisible (ICMSF 1983).

Los microorganismos indicadores se han utilizado con varios fines. El principal objetivo de la utilización de bacterias como indicadores de prácticas no sanitarias es revelar efectos de tratamientos que llevan consigo un peligro potencial. Peligro que no está necesariamente en la muestra particular examinada, pero que es probable pueda encontrarse en muestras paralelas (ICMSF, 1983).

Tales agentes indicadores de contaminación han determinado la amplia utilización de grupos (o especies) de microorganismos. Cuya enumeración o recuento se realizan con mayor facilidad y cuya presencia en los alimentos (en determinado número) indican que estos productos estuvieron expuestos a condiciones que pudieran haber introducido organismos peligrosos, y permitido la multiplicación de especies infecciosas o toxigénicas (ICMSF, 1983 ).

### **2.3.2. Recuento de organismos mesofílicos aerobios.**

Cuando se requiere de investigar el contenido de microorganismos viables en un alimento, la técnica más común utilizada es el recuento en placa, en medios de cultivo con un soporte nutricional adecuado y libres de agentes inhibitorios (Amador *et al.*, 1993).

Los recuentos de bacterias viables se basan comúnmente en el número de colonias que se desarrollan en placas de agar estándar métodos que han sido previamente inoculadas con cantidades conocidas de alimento diluido e incubadas en condiciones ambientales predeterminadas (ICMSF, 1983).

En realidad, está técnica no pretende poner en evidencia todos los microorganismos presentes en un alimento determinado, ya que la variedad de especies y tipos se diferencian: por sus necesidades nutricionales, temperatura requerida para su crecimiento, oxígeno disponible etc. hacen que el número de colonias contadas constituyan una estimación de la cifra realmente presente (Amador *et al.*, 1993).

Cuando la temperatura de incubación ha sido entre los 20° y 37 ° C, se les designa como microorganismos mesofílicos aerobios. Al grupo de organismos mesofílicos aerobios pertenecen una gran variedad de microorganismos, de hecho, están incluidos todos aquellos microorganismos capaces de desarrollarse entre 20 y 37 ° C, que son los extremos de las temperaturas a las cuales suele realizarse este recuento, en condiciones de aerobiosis. Dentro de la flora mesofílica aerobia tenemos bacilos, cocos, gram positivos y gram negativos, aislados o agrupados en todas las variedades que nos son familiares. La utilidad del recuento de las bacterias mesofílicas aerobias en la microbiología sanitaria se ha recomendado para los siguientes objetivos.

- a) Como indicadores de la posible presencia de microorganismos patógenos.
- b) Como indicador del valor comercial de un alimento.
- c) Como indicador de las condiciones higiénicas en que ha sido manejado el producto.
- d) Como indicador de la idoneidad de un ingrediente cuando se va a incorporar a un alimento.
- e) Para seguir la eficiencia de un proceso germicida o de preservación.
- f) Para predecir la vida de anaquel de un producto (Amador *et al.*, 1993).

### **2.3.3. Determinación de organismos coliformes.**

Los organismos coliformes constituyen un grupo heterogéneo con hábitat primordialmente intestinal para la mayoría de las especies que involucra. A fin de simplificar su manejo en el laboratorio, se ha establecido una definición base a las características más constantes que exhibe la especie tipo de grupo, *Escherichia coli*. Esta simplificación sin embargo da lugar a que se incluyan en el grupo, bacterias de origen no intestinal, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsilla pneumoniae* y *Citrobacter*, porque comparten las características que la definición impone. Estos

microorganismos no necesariamente guardan una relación directa con la contaminación de origen fecal y en consecuencia, tampoco con la presencia de patógenos entéricos (Amador *et al.*, 1993).

El uso de los coliformes como indicador sanitario significativo debe restringirse al agua y hielo potable, a los alimentos sometidos a procesos térmicos y a la evaluación de la eficiencia de prácticas sanitarias e higienización del equipo. La demostración y el recuento de organismos coliformes, puede realizarse mediante el empleo de medios de cultivo líquidos o sólidos con características selectivas y diferenciales.

La situación de los organismos coliformes, considerando su definición, es más que suficiente para evaluar la calidad sanitaria de algunos productos, como es el caso del agua potable. Sin embargo, por las características del grupo donde encontramos microorganismos que no son estrictamente de asiento intestinal. Se llega a tener la necesidad de diferenciar a los organismos coliformes contenidos en la prueba confirmativa de la técnica de NMP con el fin de demostrar la presencia de *Escherichia coli* (Amador *et al.* 1993).

Con el propósito de simplificar la investigación se ha introducido el término de coliformes fecales para referirlo a un grupo de microorganismos más específicos que el de los coliformes y con mayor identidad a *Escherichia coli*. El recuento de este grupo de bacterias, cuya conceptualización es de orden funcional, se fundamenta en la capacidad del microorganismo para producir indol y fermentar la lactosa a temperaturas elevadas (44.5°C). Bajo estas condiciones se excluyen cepas coliformes de asiento no intestinal, lo que le da mayor especificidad al estudio (Amador *et al.*, 1993).

Es importante realizar la prueba con un estricto control de la temperatura, para ello se requiere de un baño de agua con termostato y un sistema de circulación de agua. Llama la atención la rigidez de los investigadores para evitar fluctuaciones en la

temperatura mayores de 0.1° C cuando que algunos señalan 44.5 °C otros 45.5 °C para su incubación. Los métodos disponibles para este propósito siguen la técnica del NMP.

La prueba presuntiva se realiza en caldo lactosado a 35°C durante 48 horas considerando la prueba positiva al observar producción de gas. La diferencia se hace inoculando caldo EC a partir de los tubos positivos de la prueba presuntiva, incubando a 44.5°C durante 24 horas. La producción de gas, confirma la prueba para el grupo de coliformes fecales (Amador *et al.*, 1993).

#### **2.3.4. Investigación de *Salmonella*.**

Las técnicas para la identificación de *Salmonella* son laboriosas y costosas y se requiere de tiempo y personal bien adiestrado. Pero la importancia que para la salud pública constituyen estos microorganismos da lugar a que se continúen ensayando nuevas técnicas con el objetivo de hacerlas más sensibles, específicas, económicas y rápidas (Amador *et al.*, 1993).

En la técnica de cultivo la metodología general constituye una serie de etapas que son:

- a) Pre-enriquecimiento o enriquecimiento no selectivo.
- b) Enriquecimiento en medios selectivos.
- c) Aislamiento en medios diferenciales.
- d) Identificación presuntiva por pruebas bioquímicas.
- e) Identificación serológica.

El propósito del pre-enriquecimiento consiste en facilitar a las salmonelas presentes una recuperación del estado en que se encuentran como resultado de la exposición a

condiciones traumatizantes durante la elaboración de algunos alimentos. Los medios de cultivo que se utilizan para el pre-enriquecimiento no contienen en general sustancias inhibitorias, por lo que la flora asociada no se ve impedida para proliferar. De ahí que el pre-enriquecimiento debe manejarse cautelosamente para obtener sus beneficios en la recuperación de las salmonelas y evitar su sobre-desarrollo de la flora competitiva que enmascararía su aislamiento (Amador *et al.*, 1993).

Dos medios de enriquecimiento selectivo han sido utilizados con mayor profusión: el grupo de tetrionato (caldo tetrionato-bilis-verde brillante o medio de Kauffmann, caldo tetrionato verde brillante, caldo tetrionato-sulfatiazol-bilis-verde brillante y caldo tetrionato novobicina) y el grupo del selenito (caldo selenito F. caldo selenito-cistina caldo selenito-verde brillante y caldo selenito-sulfa-verde brillante) (Amador *et al.*, 1993).

Como consecuencia del empleo de los medios de enriquecimiento se obtiene, después de la incubación, una aflora mixta en los caldos y a partir de ellos se procede al aislamiento de las salmonelas, lo cual se realiza en medios sólidos los que mantienen un efecto inhibitorio sobre la flora asociada, estimulando la formación de colonias de *Salmonella* y finalmente comunican a éstas, características diferenciales respecto a las colonia de otros microorganismos. En atención a una fuerza selectiva, se pueden construir tres grupos: ligeramente selectivos (agar eosina azul de metileno y agar Mac conkey), moderadamente selectivos (agar Entérico de hectoen, y agar XLD o sea agar xilosa lisina desoxicolato) y fuertemente selectivos (agar verde brillante y agar sulfito de bismuto) ( Amador *et al.*, 1993).

### **2.3.5. Recuento de hongos y levaduras.**

Algunas diferencias que se observan en los hongos con respecto a las bacterias en las técnicas de recuento en alimentos, incluyen:

- a) Una velocidad de crecimiento más lenta que la de las bacterias.
- b) La demanda de un ambiente aeróbico.
- c) La tendencia de algunas especies de desarrollar extensivamente sobre las placas de cultivo.
- d) Una temperatura de crecimiento inferior a la de la mayoría de las bacterias mesófilicas de interés sanitario.
- e) La formación de colonias considerablemente mayor a las de naturaleza bacteriana y limitadas a la superficie del medio.
- f) Una tolerancia notable de la mayoría de las especies para desarrollar en un medio de alta acidez (pH 3 a 4).
- g) La resistencia de los hongos y levaduras para desarrollar en concentraciones de muchos antibióticos que resulten fuertemente inhibitorios para las bacterias (Amador *et al.*, 1993).

Sin merma en la exactitud y la precisión, en las técnicas de preparación de la muestra y dilución pueden utilizarse las mismas suspensiones preparadas para el recuento de bacterias a partir del alimento. Incluso, así para el recuento viable de bacterias se emplean las técnicas de vaciado en placa, extensión de superficie y NMP, se ha señalado recientemente, el éxito en su aplicación para el recuento de hongos. Los requerimientos nutricionales de los hongos en general no son muy especializados y estrictos, desarrollan con facilidad en casi todos los medios simples de laboratorio. Sin embargo, dada la lentitud en su crecimiento que demanda hasta 5 días de incubación, para evitar la interferencia de bacterias, suele adicionarse al medio de cultivo un agente selectivo. Los más utilizados son antibióticos de amplio espectro con bacterias (aureomicina, cloranfenicol) o la acidificación del medio con un ácido orgánico. Los datos reportados por algunos autores muestran que con estos artificios no suele encontrarse una diferencia significativa en los recursos al utilizar diferentes medios de cultivo: agar papa dextrosa, agar extracto de malta, agar libre de azúcar, o agar cuenta estándar (Amador *et al.*, 1993).

En general, simultáneamente con el recuento de hongos puede realizarse el de las levaduras ya que el medio de cultivo les proporciona también buenas condiciones para su multiplicación. Sin embargo, cuando se presenta un desarrollo excesivo de hongos, difícilmente puede efectuarse el recuento de las colonias de levaduras. Si tal es el caso y existe la necesidad de practicar su recuento lo recomendable es preparar doble serie de dilución e incubar una a 35° C durante 48 horas, lo que permite desarrollar a las levaduras cuando los hongos aún no cubren las placas. Las colonias de levaduras pueden aparecer sobre la superficie o en el seno de la gelosa en el primer caso son circulares y de diámetro mayor; en el seno del medio suelen aparecer estrelladas y algo más pequeñas (Amador *et al.*, 1993).

Al contar las colonias de hongos en las placas se debe cuidar de individualizar cada una debido a la confluencia ocasional en el desarrollo de las colonias cuyo centro no existe o es difícilmente perceptible. Esto se elimina o disminuye cuando el recuento se realiza en las primeras 72 horas de incubación (Amador *et al.*, 1993).

---

---

## **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

---

---

### **3.1. Localización y características del sitio de muestreo**

Los análisis se llevaron a cabo en el laboratorio de Microbiología de la Dirección de Investigación y Estudios de Postgrado del Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON). Y en el comedor del ISSSTE de Ciudad Obregón Sonora, con el fin de conocer la calidad sanitaria de los alimentos elaborados y consumidos en dicho hospital.

#### **3.1.1. Sitio de muestreo.**

El muestreo se llevó a cabo en el comedor del ISSSTE de Ciudad Obregón, Sonora que se encuentra ubicado en las calles Mayo y Tehuantepec. Dicho comedor se encarga de elaborar los alimentos y servirlos para alimentar al personal que ahí labora y a los enfermos que se encuentran hospitalizados.

#### **3.1.2. Periodo de muestreo.**

La presente investigación se llevó a cabo en los meses, junio de 2002, a agosto de 2002, los muestreos se realizaron cada semana durante dos meses logrando así un total de 8 muestreos, recolectándose 32 muestras (Tabla 1).

**Tabla 1.** Fechas de muestreo

<b>Número de muestreo</b>	<b>Fecha de muestreo</b>
1	10 de junio de 2002
2	17 de junio de 2002
3	24 de junio de 2002
4	2 de julio de 2002
5	8 de julio de 2002
6	16 de julio de 2002
7	7 de agosto de 2002
8	14 de agosto de 2002

### **3.1.3. Características de la muestra.**

Las muestras que se analizaron son preparadas en el comedor de este hospital y se eligió la mayoría de los platillos tratando de abarcar todos los tipos de comidas ejemplo: (aguas frescas, carnes, cereales, productos marinos, pollo, etc.).

### **3.1.4. Recolección de la muestra.**

Para la recolección de las muestras se utilizaron recipientes estériles en los cuales se depositó aproximadamente 200 g o ml de muestra. Una vez tomada la muestra se transportó al Laboratorio de Microbiología de la Dirección de Investigación y Estudios de Postgrado (DIEP) en donde se llevaron a cabo los análisis para la identificación de *Salmonella sp.*, determinación de organismos coliformes fecales y totales, recuento de organismos mesófilos aerobios, hongos y levaduras.

### 3.1.5. Tipos de muestras.

Algunos tipos de muestras analizadas fueron frijoles, sopa de repollo, carne molida, sopa de arroz, ensaladas, enchiladas, cahuamanta, pollo en mole, aguas frescas de cebada, jamaica, tang de naranja, entre otras.

## 3.2. Análisis bacteriológico

A las muestras se les realizaron los siguientes análisis bacteriológicos:

- Aislamiento e identificación por pruebas bioquímicas de *Salmonella sp.*
- Recuento de mesófilos aerobios, hongos y levaduras por la técnica de vaciado en placa.
- Determinación de organismos coliformes totales y fecales por la técnica de tubos de fermentación múltiple del Número Más Probable (NMP).

### 3.2.1. Aislamiento e identificación por pruebas bioquímicas de *Salmonella sp.*

#### 3.2.1.1. Preenriquecimiento.

Para el aislamiento de *Salmonella* se utilizaron matraces de 225 ml de caldo lactosado al cual se le agregaron asépticamente 25 ml de muestra, los cuales se incubaron durante 24 horas a 35-37°C. Después de este tiempo se colocó 1 ml del caldo lactosado en un tubo con 10 ml de caldo selenito-cistina, el cual se incubó a 35-37°C por 24 horas.

### **3.2.1.2. Aislamiento e identificación típica de *Salmonella sp.***

Los tubos con caldo selenito-cistina se sembraron por estrías en agar Mac Conkey, y se incubaron a 35-37°C durante 24 horas, y a las colonias que se desarrollaron se realizó una resiembra nuevamente en el mismo medio para obtener colonias puras, y a partir de ellas se realizaron pruebas bioquímicas para su identificación.

### **3.2.2. Determinación de organismos coliformes totales por la técnica de tubos de fermentación múltiple del Número Más Probable (NMP).**

#### **3.2.2.1. Prueba presuntiva.**

En esta prueba se utilizaron como medio caldo lauril sulfato, en el cual se hacen diluciones de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-3}$  de la muestra y con esta se inocularon los tubos por triplicado de cada una de las diluciones que contienen 10 ml del medio, con campanas de Durham. Después de inocularlos, los tubos se incubaron a 35-37°C por 24-48 horas. A las 48 horas los tubos en los que se produce gas y turbidez se consideraron como positivos, lo cual se aprecia cuando se forman burbujas en las campanas de Durham. Se recomienda que antes de incubar se verifique que las campanas no tengan burbujas con el fin de evitar falsos positivos. Los tubos positivos en los que no se producen gas se consideraron negativos y se descartaron.

#### **3.2.2.2. Prueba confirmativa.**

A partir de los tubos en los cuales dieron positiva la prueba presuntiva, se inocularon dos asadas en los tubos que contenían 10 ml de caldo bilis verde brillante con campanas Durham. Se incubaron a 35-37°C por 24-48 horas y se consideran positivos los tubos en los que se obtuvo la presencia de gas y turbidez.

La producción de gas y turbidez en el caldo bilis verde brillante es una confirmación de la presencia de organismos coliformes en la muestra analizada.

### **3.2.2.3. Determinación del NMP de coliformes totales.**

Los resultados de las pruebas para organismos totales se expresan por la técnica del Número más Probable (NMP). A cada una de las series se les determina el número de tubos que fueron positivos con turbidez y producción de gas en caldo bilis verde brillante obteniendo los resultados por medio de las tablas (prueba confirmativa).

### **3.2.3. Determinación de organismos fecales por la técnica de tubos de fermentación múltiple.**

#### **3.2.3.1. Prueba presuntiva.**

La prueba presuntiva para la determinación de coliformes fecales es exactamente igual que la utilizada para los coliformes totales.

#### **3.2.3.2. Prueba confirmativa.**

Se procede igual que para coliformes totales con la diferencia de que en este caso se empleó caldo EC, el cual es específico para la recuperación de *E. coli*. Además, la incubación se realiza en el baño María a una temperatura de 44.5°C durante 18-24 horas. Igualmente se considera positiva la prueba al observar turbidez en el medio y producción de gas en la campana de Durham.

#### **3.2.3.3. Determinación del NMP de coliformes fecales.**

Los resultados de las pruebas para organismos fecales se expresan por la técnica del Número Más Probable (NMP). A cada una de las series se les determina el

número de tubos que fueron positivos con turbidez y producción de gas en caldo EC, obteniendo los resultados por medio de las tablas (prueba confirmativa).

#### **3.2.4. Recuento de hongos y levaduras por la técnica de vaciado en placa.**

Para determinar hongos y levaduras se utilizó la técnica de vaciado en placa, de cada dilución se colocó 1 ml en las cajas petri estériles y posteriormente se le agregó al agar dextrosa de papa, fundido y mantenido entre 43 y 45°C, enseguida se homogenizó y se dejó solidificar. Una vez solidificado, las cajas son invertidas y se incubaron a 30°C durante 4 días y se realizaron recuentos diarios en contador de colonias Quebec, para determinar las UFC/ml o gramo de muestra. se seleccionaron las cajas con un rango de 20 a 200 colonias por placa, y el número de colonias se multiplicó por la inversa del factor de dilución correspondiente a la caja petri contada y se reportó como Unidades Formadoras de Colonias por mililitro o gramo de muestra (UFC/ml o g) según sea el caso.

#### **3.2.5. Recuento de organismos mesófilos aerobios por la técnica de vaciado en placa.**

La cuenta total viable se realizó por el método de vaciado en placa. Primeramente se homogenizó la muestra en la licuadora por un minuto, después se formaron las diluciones. Se tomaron 10 ml de la muestra y se agregaron a un frasco de dilución que contiene 90 ml de solución de fosfatos obteniendo así la dilución  $10^{-1}$ . Se agitó la muestra vigorosamente alrededor de 25 veces con el fin de lograr una completa homogenización; de esta dilución se tomó 1 ml y se agregó a un tubo que contiene 9 ml de la misma solución obteniendo así la dilución  $10^{-2}$ ; y así sucesivamente hasta obtener la dilución  $10^{-5}$ . De cada una de las diluciones se agregó 1 ml a cajas petri estériles y se agregaron de 15 a 20 ml de agar estándar métodos, se homogenizó la muestra con el agar y se dejó solidificar el medio. Una vez solidificado el medio, se

incubaron invertidas a 37°C durante 24 a 48 horas, pasando este tiempo se realiza el conteo de las colonias en un contador Quebec.

El reporte del resultado de bacterias mesofílicas aeróbicas se expresa en Unidades Formadoras de Colonias por mililitro o gramo de muestra ( UFC/ml o g ); se seleccionaron las cajas petri que se encuentren en el intervalo de 25 a 250 colonias y el número de colonias se multiplica por la inversa del factor de dilución correspondiente a la placa contada.

### 3.2.6. Pruebas bioquímicas para identificación de *Salmonella sp.*

A continuación se enlistan y explican cada una de las pruebas bioquímicas realizadas a las colonias puras aisladas en sus respectivos medios.

**Agar TSI.-** Es un medio diferencial muy usado en la diferenciación de Enterobacterias patógenas, ya que determinan la capacidad de un organismo de atacar un carbono incorporado en un medio de crecimiento básico, con producción o no de gases, junto con la producción de ácido sulfhídrico. Esto permite el reconocimiento y exclusión de *Proteus*, *Hafnia* y *Providencia*, no fermentan la lactosa o lo hacen muy lentamente y si en cambio fermentan la sacarosa con bastante rapidez, lo cual permite excluir a este grupo de bacterias como *Salmonella* y *Shigella* (León, 1997).

**Caldo urea.-** Este medio se utiliza para la identificación de bacterias, particularmente para diferenciar los miembros del género *Proteus* de la *Salmonella* y *Shigella*, se fundamenta en la capacidad que tiene el primer género de producir ureasas que le permitan utilizar el nitrógeno de la urea. El medio se siembra por asada simple a partir de la colonia en estudio, el color del medio es rosa pálido y la

reacción positiva se observa por viraje a rojo-violeta (McFADDIN, 1984).

**Caldo RM-VP.- (1) .- Prueba rojo de metilo.-** Esta prueba se realiza con la finalidad de comprobar la capacidad de un microorganismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa y vencer la capacidad amortiguadora del sistema. El medio se siembra por asada simple, la reacción es positiva cuando el cultivo es lo suficientemente ácido como para permitir que el rojo de metilo mantenga un definido color rojo en la superficie del medio. Y negativo cuando tienen un color amarillo en la superficie del tubo, será reacción retardada cuando se presente un color naranja en la superficie. Para hacer la lectura de esta reacción es necesario tener de 3 a 5 días de incubación de los tubos.

**Prueba de Voges-Proskauer.-** Con esta prueba se trata de determinar la capacidad de algunos microorganismos de producir un producto final neutro, el acetilmetilcarbinol (acetoína), a partir de la fermentación de la glucosa. La reacción es positiva cuando aparece un color rojo en la superficie del tubo, después que ha sido adicionado con 0.6 ml de naftol y 0.4 ml de KOH al 40% y negativa cuando tiene un color amarillo o cobrizo en la superficie (McFADDIN, 1984).

**Agar de Hierro y Lisina.-** Este medio se utiliza para determinar la descarboxilación y desaminación de la lisina. La primera reacción se lleva a cabo en anaerobiosis y la segunda en aerobiosis, el medio se inocula por picadura y por estría en la superficie del mismo. La interpretación de los resultados es la siguiente: descarboxilación positiva: fondo color púrpura; descarboxilación negativa: fondo color amarillo; desaminación positiva: superficie del tubo color roja; desaminación negativa: superficie del tubo color púrpura sin cambio (McFADDIN, 1984).

**Agar Citrato de Simmons.-** Se utiliza para determinar la capacidad de una cepa de aprovechar el citrato como única fuente de carbono, provocando alcalinidad. Esta prueba ayuda a la diferenciación de algunas Enterobacterias como *Edwardsiella* que es negativa y *Serratia* y *Klebsiella* que son positivas. Este medio es inoculado por picadura en el fondo y por estría en la superficie, la reacción positiva se puede observar por un cambio de color en el medio de verde a azul intenso; la prueba será negativa cuando el medio permanezca sin cambio en el color (McFADDIN, 1984).

**Medio MIO.-** La utilización de este medio es con el fin de observar movilidad, producción de indol y descarboxilación de la ornitina; para lo cual se siembra por picadura y se incuba durante 24 horas a 37<sup>0</sup>C . Los criterios se deben de seguir para determinar la interpretación de los resultados son los siguientes: **Movilidad.** Esta prueba será positiva cuando se observa turbidez en el fondo del medio y negativa cuando solo se observa crecimiento en la picadura. **Descarboxilación de la Ornitina.** Esta reacción sólo se lleva a cabo en anaerobiosis, por lo que la prueba sólo se lee en el fondo del tubo. La prueba será positiva cuando se observe un cambio de color en el medio de violeta a púrpura y negativa cuando se presente un cambio de color amarillo. **Indol.** Este compuesto es el producto final de la degradación del triptofano y se pone de manifiesto al agregar 5 gotas del reactivo de kovacs al medio que fue inoculado e incubado por 24 horas. La reacción es positiva cuando se forma un anillo rojo y negativa cuando se forma un anillo amarillo (McFADDIN, 1984)

**Medio basal OF.-** Es uno de los medios más importantes para el estudio de bacilos no fermentadores de carbohidratos, permite conocer si el germen en cuestión oxida, fermenta o ataca al carbohidrato agregado al mismo ( en este caso se emplea glucosa). Para esto se inoculan dos tubos por picadura profunda, se agrega a uno de ellos una capa fina de aceite mineral (1 ml) se incuban ambos a 37<sup>0</sup> C durante 48 horas, se puede observar la producción de ácido por el cambio al color amarillo del

medio. La aparición del color amarillo a ambos tubos: carbohidrato fermentado. Degradación fermentativa. Cambio únicamente en el tubo que no contiene aceite. Degradación oxidativa. Sin cambio en ninguno de los tubos: microorganismos inertes, el carbohidrato no ha sido fermentado ni oxidado (McFADDIN, 1984).

**Gelatina Nutritiva.-** Se usa principalmente para la identificación de cultivos puros de bacterias que no son especialmente delicadas en cuanto a sus requerimientos nutritivos. La licuefacción de la gelatina es una prueba esencial para la identificación de bacilos entéricos. Ayuda en la identificación de Enterobacterias. La prueba consiste en enfriar durante 20 minutos los tubos que fueron inoculados anteriormente, si la gelatina permanece sólida, la reacción es negativa y si se licua entonces es positiva, la inoculación se realiza mediante una asada (Merck, 1982).

**Medio SIM.-** Es útil para la identificación de bacilos entéricos. La reacción de sulfuros se indica por el ennegrecimiento del medio a lo largo de la línea de inoculación. Su alto contenido de triptófano en la peptona trypticase lo hace ideal para la producción de indol. La movilidad se manifiesta por la presencia de turbidez alrededor de la picadura o en todo el tubo y la no movilidad cuando hay crecimiento solamente en la picadura. Para la determinación del indol se agregan cinco gotas de reactivo de Kovacs, la prueba se considera positiva si aparece un anillo color púrpura en la superficie (McFADDIN, 1984).

**Caldo malonato modificado.-** Los microorganismos como los miembros del género *Aerobacter* y *Klebsiella* y la mayor parte de las cepas de *Arizona* que son capaces de utilizar el malonato del medio sintético como una fuente de energía producen una reacción alcalina durante su desarrollo y cambian de color del medio a azul. Después de la inoculación los bacilos de los géneros *Escherichia*, *Salmonella* y

*Serratia* son incapaces de utilizar el malonato por lo que el medio no cambia de color. El caldo se inocula con la cepa por medio de una asada, y se incuba a 37<sup>0</sup> C durante 48 horas (León, 1997).

---

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

---

### 4.1 Análisis microbiológico

Este estudio se realizó durante el período comprendido de junio-agosto de 2002, se analizaron un total de 32 muestras de diferentes platillos cocinados y frescos, a los cuales se les determinó: recuento de microorganismos mesófilos aerobios en placa, presencia de organismos coliformes totales y fecales, grado de contaminación por hongos y levaduras, así como *Salmonella sp*, mediante el aislamiento e identificación por pruebas bioquímicas. Los resultados obtenidos de la presente investigación se presentan a continuación.

#### 4.1.1 Aislamiento e identificación de *Salmonella*.

No se encontró la presencia de *Salmonella sp* (Tabla 2) en el total de las muestras analizadas. Esto indica que el 100% de las muestras son aceptables por no existir riesgo de infecciones alimentarias, en lo que respecta a este parámetro, para el consumidor ya que la norma (NOM-093-SSA1-1994) indica total ausencia.

**Tabla 2.** Aislamiento e identificación de *Salmonella* en alimentos procedentes del comedor del hospital del ISSSTE en el período junio-agosto de 2002.

FECHAS DE MUESTREO	MUESTRAS	<i>Salmonella sp.</i> En 25 g de muestra.
10 de junio	1. Sopa de repollo	Ausente
	2. Tang de Naranja	Ausente
	3. Frijoles	Ausente
	4. Picadillo	Ausente
17 de junio	1. Jamaica	Ausente
	2. Cahuamanta	Ausente
	3. Frijoles	Ausente
	4. Sopa de Arroz	Ausente
24 de junio	1. Tang de Naranja	Ausente
	2. Cocido	Ausente
	3. Frijoles	Ausente
	4. Arroz con mantequilla	Ausente
2 de julio	1. Jamaica	Ausente
	2. Sopa de verduras	Ausente
	3. Pollo en achiote	Ausente
	4. Sopa de arroz	Ausente
8 de julio	1. Jamaica	Ausente
	2. Sopa de fideo	Ausente
	3. Frijoles	Ausente
	4. Picadillo	Ausente
16 de julio	1. Frijoles	Ausente
	2. Jamaica	Ausente
	3. Ensalada de atún	Ausente
	4. Sopa de lentejas	Ausente
7 de agosto	1. Frijoles	Ausente
	2. Sopa de verduras	Ausente
	3. Enchiladas	Ausente
	4. Tang de Naranja	Ausente
14 de agosto	1. Pollo en mole	Ausente
	2. Frijoles	Ausente
	3. Arroz	Ausente
	4. Cebada	Ausente

#### 4.1.2 Número más probable de (NMP) de coliformes totales y fecales.

Los recuentos de organismos coliformes permiten evaluar los riesgos de contaminación en los alimentos. Como se puede observar en la Tabla 3, sólo 2 de 23 muestras cocinadas analizadas se encuentran fuera del rango dictado por la norma (NOM-093-SSA1-1994) la cual indica, para coliformes totales, menos de 10 NMP/g o ml. De esta forma, el 91.4% de las muestras están dentro de los límites establecidos. El 8.6% restante que sobrepasa la norma, está asociado a un defectuoso saneamiento y a un posible deficiente tratamiento térmico. En cuanto a las aguas preparadas los 8 casos analizados se encuentran dentro del rango dictado por la norma antes mencionada la cual indica, para coliformes totales, 100 NMP/g o ml, esto quiere decir que el 100% están dentro del rango establecido. Respecto a la ensalada de atún, ésta sobrepasa el límite ya que la norma no indica parámetros para este conteo de coliformes totales en ensaladas pero fue demasiado alto no alcanzó a ser contado, este fue >1,100 NMP/g o ml. Por los porcentajes mencionados los alimentos no representan un peligro para el consumidor ya que solo 3 de 32 muestras no cumplen con dicha norma, o sea que el 90.6% de las muestras son aceptables.

En lo que respecta a coliformes fecales la norma no indica parámetros para el conteo de estos en la mayoría de los alimentos; solo en el caso de la ensalada de atún (Tabla 3) que la norma (NOM-093-SSA1-1994), indica para coliformes fecales 100 NMP/g o ml, y se sobrepasó el límite con >1,100 NMP/g o ml. Tomando en cuenta que 5 de los 32 alimentos analizados se presentaron cuentas que van de 4 a >1,100 NMP/g o ml, el 84.4% de las muestras fueron negativas y el 15.6% presentaron incidencia; Sin embargo la ausencia de este microorganismo, ya que su presencia indica una reciente contaminación de origen fecal, lo cual representa peligro para el consumidor. aún así se puede decir que los alimentos se encuentran en buen estado ya que son muy pocas las muestras que no cumplen este parámetro.

**Tabla 3.** Determinación de organismos coliformes totales y fecales en alimentos procedentes del comedor del hospital del ISSSTE en el período junio-agosto de 2002.

FECHAS DE MUESTREO	MUESTRAS	<i>Coliformes totales</i> (NMP/g o ml)	<i>Coliformes fecales</i> (NMP/g o ml)
10 de junio	1. Sopa de repollo	0	0
	2. Tang de Naranja	0	0
	3. Frijoles	0	0
	4. Picadillo	0	0
17 de junio	1. Jamaica	0	0
	2. Cahuamanta	0	0
	3. Frijoles	0	0
	4. Sopa de Arroz	0	0
24 de junio	1. Tang de Naranja	4	4
	2. Cocido	0	0
	3. Frijoles	0	0
	4. Arroz con mantequilla	0	0
2 de julio	1. Jamaica	0	0
	2. Sopa de verduras	0	0
	3. Pollo en achiote	0	0
	4. Sopa de arroz	0	0
8 de julio	1. Jamaica	0	0
	2. Sopa de fideo	0	0
	3. Frijoles	0	0
	4. Picadillo	200	200
16 de julio	1. Frijoles	0	0
	2. Jamaica	0	0
	3. Ensalada de atún	>1,100	>1,100
	4. Sopa de lentejas	0	0
7 de agosto	1. Frijoles	40	40
	2. Sopa de verduras	0	0
	3. Enchiladas	0	0
	4. Tang de Naranja	0	0
14 de agosto	1. Pollo en mole	0	0
	2. Frijoles	0	0
	3. Arroz	0	0
	4. Cebada	90	90

#### **4.1.3 Recuento de hongos y levaduras.**

Para las muestras analizadas la norma no indica el límite permisible de hongos y levaduras, sólo se observa (Tabla 4) una muestra que arroja un conteo elevado 178,000 UFC/g o ml, esto en la ensalada de atún porque el ingrediente principal fue la lechuga pero no se considera significativo. Por otra parte, las demás muestras presentan un conteo que van desde las 10 UFC/g o ml a 7,500 UFC/g o ml, que es considerado como un conteo bajo y otros intermedios que van de 10,000 UFC/g o ml a 61,000 UFC/g o ml.

Los hongos y las levaduras en los alimentos producen diversas alteraciones y generan toxinas con numerosos efectos en animales y en el hombre. En este caso, la presencia cuantitativa puede asociarse a deficientes e inadecuadas desinfecciones en la lechuga de la ensalada de atún y también cabe mencionar a la composición nutrimental de dichos alimentos como en este caso los azúcares en las aguas preparadas.

**Tabla 4.** Recuento de hongos y levaduras en alimentos procedentes del comedor del hospital del ISSSTE en el período junio-agosto de 2002.

FECHAS DE MUESTREO	MUESTRAS	<i>Hongos y Levaduras (UFC/g o ml)</i>
10 de junio	1. Sopa de repollo	0
	2. Tang de Naranja	120
	3. Frijoles	0
	4. Picadillo	10
17 de junio	1. Jamaica	0
	2. Cahuamanta	0
	3. Frijoles	0
	4. Sopa de Arroz	0
24 de junio	1. Tang de Naranja	140
	2. Cocido	3000
	3. Frijoles	50
	4. Arroz con mantequilla	690
2 de julio	1. Jamaica	0
	2. Sopa de verduras	0
	3. Pollo en achiote	10
	4. Sopa de arroz	0
8 de julio	1. Jamaica	290
	2. Sopa de fideo	340
	3. Frijoles	10
	4. Picadillo	13600
16 de julio	1. Frijoles	10000
	2. Jamaica	0
	3. Ensalada de atún	176000
	4. Sopa de lentejas	0
7 de agosto	1. Frijoles	7500
	2. Sopa de verduras	0
	3. Enchiladas	10
	4. Tang de Naranja	660
14 de agosto	1. Pollo en mole	1000
	2. Frijoles	300
	3. Arroz	0
	4. Cebada	61000

#### **4.1.4 Recuento de organismos mesófilos aerobios.**

Los resultados del conteo se expresaron en unidades formadoras de colonia por gramo (UFC/g o ml), en los cuales se encontraron recuentos que van desde 0 UFC/g o ml hasta 168,000 UFC/g o ml (Tabla 5) en donde el 96.8% del total de las muestras se encuentra dentro de la norma establecida (NOM-093-SSA1-1994) la cual señala que la cuenta total de mesófilos aerobios no debe de pasar de 150,000 UFC/g o ml. Lo anterior indica que las condiciones higiénicas y de manejo del alimento han sido las adecuadas, y en lo que respecta a este parámetro los alimentos son considerados como aptos para consumo humano. Con excepción de la ensalada de atún la cual sobrepasó los límites permisibles por la norma, esto probablemente debido a condiciones defectuosas de higiene al momento de lavar la lechuga que fue el principal ingrediente de esta ya que se supone no se llevo una adecuada desinfección antes de preparar el alimento pero la cual no es significativa ya que no es muy alta la cuenta.

**Tabla 5.** Recuento de organismos mesófilos aerobios en alimentos procedentes del comedor del hospital del ISSSTE en el período junio-agosto de 2002.

FECHAS DE MUESTREO	MUESTRAS	Mesófilos aerobios (UFC/g o ml)
10 de junio	1. Sopa de repollo	0
	2. Tang de Naranja	40
	3. Frijoles	0
	4. Picadillo	230
17 de junio	1. Jamaica	10
	2. Cahuamanta	10
	3. Frijoles	0
	4. Sopa de Arroz	0
24 de junio	1. Tang de Naranja	130
	2. Cocido	590
	3. Frijoles	0
	4. Arroz con mantequilla	0
2 de julio	1. Jamaica	0
	2. Sopa de verduras	0
	3. Pollo en achiote	0
	4. Sopa de arroz	20
8 de julio	1. Jamaica	370
	2. Sopa de fideo	100
	3. Frijoles	0
	4. Picadillo	18000
16 de julio	1. Frijoles	11000
	2. Jamaica	0
	3. Ensalada de atún	168000
	4. Sopa de lentejas	0
7 de agosto	1. Frijoles	7500
	2. Sopa de verduras	100
	3. Enchiladas	10
	4. Tang de Naranja	190
14 de agosto	1. Pollo en mole	24000
	2. Frijoles	500
	3. Arroz	0
	4. Cebada	32000

---

---

## CONCLUSIONES

---

---

- En relación al aislamiento e identificación de *Salmonella sp*, no se encontró presencia de dicha bacteria así que el 100% de las muestras cumplen con los parámetros establecidos.
- Para coliformes totales el 90.6% de las muestras cumple con los límites permisibles.
- En cuanto al NMP de coliformes fecales el 84.4% no presenta incidencia mientras que el 15.6% del total de las muestras presenta incidencia que es considerada como mínima.
- Se presentó una cuenta alta de hongos esto fue en la ensalada de atún esto se debe a que la lechuga era el ingrediente principal.
- Con respecto a bacterias mesofílicas aerobias el 96.8% cumplen con las normas establecidas .
- La calidad sanitaria de los alimentos elaborados y consumidos en el hospital del ISSSTE de Ciudad Obregón, Sonora, es de buena calidad según las Normas Oficiales Mexicanas, ya que no representan riesgos a la salud de los consumidores.

- Por último es rechazada la hipótesis ya que la calidad sanitaria de los alimentos es aceptable y se encuentra dentro de las Normas Oficiales Mexicanas.

---

---

## RECOMENDACIONES

---

---

- Desinfectar bien la lechuga antes de preparar los alimentos, esto puede ser con concentraciones adecuadas de yodo y tiempo de contacto suficiente para inhibir la flora microbiana.
- Utilizar buenas temperaturas tanto de almacenamiento como de cocción para evitar la proliferación de los microorganismos.
- Continuar con buenas prácticas de higiene y tomar algunas medidas correctivas para el manejo de los alimentos.
- Es importante que se de una educación a los manipuladores de los alimentos en relación al cuidado higiénico en la elaboración de los mismos, así como implementar buenos hábitos de elaboración de alimentos.
- Monitorear periódicamente la calidad de los alimentos, así como la higiene del lugar donde se elaboran y consumen los alimentos.

---

---

## BIBLIOGRAFIA

---

---

Amador *et al* (1993). Manual de Laboratorio de Microbiología Sanitaria. 2<sup>da</sup> Edición. P 43-48, 50-60, 69-74, 139-148.

Fernández, E. Eduardo. (1981). Microbiología Sanitaria: Agua y Alimentos. Vol.1 Universidad de Guadalajara. México P 209-257, 470-490.

Frazier, W.C. (1993). Microbiología de los alimentos. 4<sup>ta</sup> Edición. Editorial Acribia S.A. España. P 54-64, 326-328.

Freeman, (1983). Tratado de Microbiología de Burrows. 4<sup>ta</sup> Edición, Editorial Interamericana S.A. de C.V. México. P 497.

I.C.M.S.F. (1983). Microorganismos de los alimentos Vol. 1. Técnicas de los análisis microbiológicos. 2<sup>da</sup> Edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza España. P 3-8.

Jay M. J. (1992). Microbiología de los Alimentos. 3<sup>ra</sup> Edición, Editorial Acribia S.A. 651-660.

León, S., Aguirre, E., Castañeda, R. (1997). Diplomado en bacteriología clínica. Cd. Obregón Sonora. México.

MaFADDIN. (1984). Pruebas Bioquímicas para identificación de Bacterias de importancia clínica. Editorial Panamericana. México, D.F.

Merck. (1982). Manual de medio de cultivo. Editorial Merck. Darmstadt, Alemania.

Piatkin y YU. S. Krivoshein, (1989). Microbiología (con virología e inmunología). Editorial Mir Moscú, URRS.

<http://www.mercanet.cnp.go.cr/riesgos.htm>

<http://www.seim.org/protocolos/cap7.htm#salmo>

<http://www.solomujeres.com/Articles/Salmonella.html>

[http://www.mejorprevenir.com/salud\\_alimentaria/riesgos/salmonelosis.htm](http://www.mejorprevenir.com/salud_alimentaria/riesgos/salmonelosis.htm)

[http://bvs.sld.cu/revistas/ali/vol12\\_1\\_98/alio3198.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/ali/vol12_1_98/alio3198.htm)

---

---

# *A N E X O S*

---

---

---

---

## **NORMAS OFICIALES MEXICANAS**

---

---

### **NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-092-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA.**

#### **8. Preparación de la muestra**

Para la preparación de la muestra seguir la NOM-110-SSA1-1994, Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

#### **9. Procedimiento**

9.1 Distribuir las cajas estériles en la mesa de trabajo de manera que la inoculación; la adición de medio de cultivo y homogenización, se puedan realizar cómoda y libremente. Marcar las cajas en sus tapas con los datos pertinentes previamente a su inoculación y correr por duplicado.

9.2 Después de inocular las diluciones de las muestras preparadas según la NOM-110-SSA1-1994, Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico, en las cajas Petri, agregar de 12 a 15 ml del medio preparado, mezclarlo mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio; cuidar que el medio no moje la cubierta de las cajas. Dejar solidificar.

9.3 Incluir una caja sin inóculo por cada lote de medio y diluyente preparado como testigo de esterilidad.

9.4 El tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra se incorpora al diluyente hasta que finalmente se adiciona el medio de cultivo a las cajas, no debe exceder de 20 minutos.

9.5 Incubar las cajas en posición invertida (la tapa hacia abajo) por el tiempo y la temperatura que se requieran, según el tipo de alimento y microorganismo de que se trate, véase el cuadro 1.

## CUADRO 1

Grupo Bacteriano Temperatura Tiempo de Incubación

Termofílicos aerobios  $55 \pm 2^{\circ}\text{C}$   $48 \pm 2$  h

Mesofílicos aerobios\*  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$   $48 \pm 2$  h

Psicrotróficos  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  3 - 5 días

Psicrofílicos  $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$  7 - 10 días

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

9.7 Contar todas las colonias desarrolladas en las placas seleccionadas (excepto las de mohos y levaduras), incluyendo las colonias puntiformes. Hacer uso del microscopio para resolver los casos en los que no se pueden distinguir las colonias de las pequeñas partículas de alimento.

## 10. Expresión de resultados

10.1 Cálculo del método.

10.1.1 Después de la incubación, contar las placas que se encuentren en el intervalo de 25 a 250 colonias, usando el contador de colonias y el registrador. Las placas de al menos una de tres diluciones deben estar en el intervalo de 25 a 250. Cuando sólo una dilución está en el intervalo apropiado, véase el cuadro 2, ejemplo 1. Calcular la cuenta promedio por gramo o mililitro de dicha dilución y reportar.

10.1.2 Cuando dos diluciones están en el intervalo apropiado, determinar la cuenta promedio dada por cada dilución antes de promediar la cuenta de las dos diluciones para obtener la cuenta en placa por gramo o mililitro, véase el cuadro 2, ejemplo 2.

10.1.3 Con el fin de uniformar los criterios para el reporte de las cuentas en ensayos donde las placas presenten situaciones no contempladas en los ejemplos anteriores, se presentan las siguientes guías:

10.1.3.1 Placas con menos de 25 colonias.- Cuando las placas corridas para la menor dilución muestran cuentas de menos de 25 colonias, contar el número de colonias presentes en dicha dilución, promediar el número de colonias y multiplicar por el factor de dilución para obtener el valor estimado de cuenta en placa. Aclarar en su informe esta situación agregando la leyenda "valor estimado", véase el cuadro 2, ejemplo 3.

10.1.3.2 Placas con más de 250 colonias.- Cuando el número de colonias por placa exceda de 250, contar las colonias en aquellas porciones de la placa que sean representativas de la distribución de colonias. Contar por ejemplo, una cuarta parte o una mitad del área de la caja y multiplicar el valor obtenido por 4 ó 2, respectivamente. Si solamente pueden contarse algunos cuadros, considerar que el

fondo de una caja Petri de 100 mm de diámetro contiene 65 cuadros de la cuadrícula del contador. Aclarar en el informe esta situación agregando la leyenda "valor estimado", véase el cuadro 2, ejemplo 4.

10.1.3.3 Colonias extendidas.- Las colonias extendidas pueden presentarse en las siguientes formas:

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

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

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

10.1.3.3.4 Colonias de crecimiento extendido y en algunas ocasiones acompañadas de inhibición del crecimiento, que en conjunto exceden el 50% de la caja o represión del crecimiento que por sí mismo excede el 25% de la superficie de la caja.

10.1.3.3.5 Cuando es necesario contar en cajas que contienen colonias extendidas que no están incluidas en 10.1.3.3.4, contar cualquiera de los tipos 10.1.3.3.1, 10.1.3.3.2 ó 10.1.3.3.3, como provenientes de una sola fuente. En el caso de las colonias del tipo 10.1.3.3.1, si la caja contiene una sola cadena, contar como una sola colonia, si la caja contiene varias cadenas que parecen originarse de fuentes separadas, contar cada cadena como colonia individual. No contar cada colonia de la cadena individualmente. Las colonias del tipo 10.1.3.3.2 y 10.1.3.3.3 generalmente se observan como crecimiento diferenciable de otras colonias y se cuentan como tales. Los crecimientos tipo 10.1.3.3.4, reportarlos como crecimiento extendido. En caso de que una dilución se encuentre dentro del rango y otra dilución presente colonias de crecimiento extendido, reportar la dilución en la que se pueden contar las colonias, véase el cuadro 2, ejemplo 5

10.1.4 Placas sin colonias.- Cuando las placas de todas las diluciones no muestran colonias, reportar la cuenta en placa como menor que una vez el valor de la dilución más baja usada, véase el cuadro 2, ejemplo 6.

10.1.5 Placas corridas por duplicado, una con crecimiento dentro del intervalo adecuado y otra con más de 250 colonias.- Cuando una placa tiene entre 25 y 250 colonias y su duplicado más de 250 colonias, contar ambas placas incluyendo la que está fuera del intervalo para determinar la cuenta en placa, véase el cuadro 2, ejemplo 7.

10.1.6 Placas corridas por duplicado, una placa de cada dilución dentro del intervalo de 25 a 250 colonias.- Cuando una placa dentro de diferentes diluciones contiene el número de colonias especificadas en el intervalo, contar el número de colonias de las cuatro placas para calcular la cuenta en placa, véase el cuadro 2, ejemplo 8.

10.1.7 Placas corridas por duplicado, ambas placas de una dilución dentro del intervalo de 25 a 250 y sólo una de la otra dilución dentro del mismo. Contar las

cuatro cajas incluyendo aquélla con menos de 25 o más de 250 colonias, para calcular la cuenta en placa, véase el cuadro 2, ejemplo 9.

10.1.8 Después de contabilizar las colonias en las placas seleccionadas, multiplicar por la inversa de la dilución para obtener el número de UFC por mililitro o gramo de la muestra. Redondear la cifra obtenida en la cuenta de manera que sólo aparezcan dos dígitos significativos al inicio de esta cifra. Para redondear, elevar el segundo dígito al número inmediato superior cuando el tercer dígito de la derecha sea cinco o mayor (por ejemplo: 128 redondear a 130). Si el tercer dígito es cuatro o menos, reemplazar el tercer dígito con cero y el segundo dígito mantenerlo igual (Por ejemplo: 2417 a 2400):

#### 11. Informe de la prueba

Reportar como: Unidades formadoras de colonias, \_\_\_ UFC/g o ml, de bacterias aerobias en placa en agar triptona extracto de levadura o agar para cuenta estándar, incubadas \_\_\_\_\_ horas a \_\_\_\_\_ °C.

### **NOM-093-SSA1-1994. BIENES Y SERVICIOS. PRACTICAS DE HIGIENE Y SANIDAD EN LA PREPARACIÓN DE ALIMENTOS QUE SE OFRECEN EN ESTABLECIMIENTOS FIJOS.**

#### **APENDICE INFORMATIVO B**

##### **B. DE LAS ESPECIFICACIONES SANITARIAS**

###### 1. Especificaciones microbiológicas en alimentos

Los alimentos preparados podrán ser sujetos a análisis especiales. La investigación de microorganismos patógenos específicos dependerá de los ingredientes adicionados.

1.1 Ningún alimento preparado debe contener microorganismos patógenos.

1.2 Los límites microbiológicos básicos máximos permisibles para diferentes alimentos, se señalan a continuación:

1.2.1 Salsas y purés cocidos. Cuenta total de mesofílicos aerobios 5 000 UFC/g, coliformes totales 50 UFC/g.

1.2.2 Mayonesas, salsas tipo mayonesa, aderezo. Cuenta total de mesofílicos aerobios 3 000 UFC/g, cuenta de mohos 20 UFC/g, cuenta de levaduras 50 UFC/g.

1.2.3 Ensaladas:

1.2.3.1 Rusas, mixtas cocidas. Cuenta total de mesofílicos aerobios 100 000 UFC/g, coliformes totales < 100 UFC/g.

1.2.3.2 Verdes. Crudas o de Frutas. Cuenta total de mesofílicos aerobios 150 000 UFC/g, coliformes fecales 100/g.

#### 1.2.4 Alimentos cocidos como:

Carnes de mamíferos, aves, pescados, mariscos, crustáceos, moluscos bivalvos, etc. Cuenta total de mesofílicos aerobios 150 000 UFC/g, coliformes totales < 10 UFC/g.

1.2.5 Postres no lácteos. Cuenta total de mesofílicos aerobios 5 000 UFC/g, coliformes totales 10 UFC/g.

1.2.6 Postres lácteos como son: pastel de crema, dulce de leche, gelatina de leche, flan. Cuenta total de mesofílicos aerobios 100000 UFC/g, coliformes totales < 100 UFC/g o ml, *Staphylococcus aureus* < 100 UFC/g o ml.

1.2.6.1 Helados. Cuenta total de mesofílicos aerobios 200 000 UFC/g, coliformes totales 100 UFC/g o ml, *Salmonella* ausente en 25 g.

1.2.6.2 Yogurth. Coliformes totales 10 UFC/g o ml, mohos 10 UFC/g o ml, levaduras 10 UFC/g.

1.2.8 Agua y hielo potable. Cuenta total de mesofílicos aerobios 100 UFC/ml, coliformes totales < 2 NMP/100 ml.

1.2.9 Aguas preparadas. Cuenta total de mesofílicos aerobios 150 000 UFC/g o ml, coliformes totales 100/g y coliformes fecales negativo.

1.3 Todos los alimentos que no se preparen dentro del establecimiento pero que se manipulen para su servicio deberán cumplir con las especificaciones microbiológicas que se señalen en las normas correspondientes.

### **NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-110-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.**

#### **8. Procedimiento**

8.1 Preparación de la dilución primaria.

8.1.1 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).

8.1.1.1 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.

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

8.1.2 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.

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

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

8.1.2.3 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.

8.1.2.4 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.

8.2 Preparación de las diluciones decimales adicionales.

8.2.1 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.

8.2.2 Mezclar cuidadosamente cada botella de diluyente siempre de la misma manera que se describe en 8.1.1.1.

8.2.3 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.

8.2.4 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.

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

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

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

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

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

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

8.3 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.

## **NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-111-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE MOHOS Y LEVADURAS EN ALIMENTOS.**

### **6. Reactivos y materiales**

#### 6.1 Reactivos

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

##### 6.1.1 Medios de cultivo.

Agar papa - dextrosa, comercialmente disponible en forma deshidratada.

Preparación del medio de cultivo.

Seguir instrucciones del fabricante y después de esterilizar, enfriar en baño de agua a  $45 \pm 1^\circ\text{C}$ , acidificar a un pH de  $3,5 \pm 0,1$  con ácido tartárico estéril al 10% (aproximadamente 1,4 ml de ácido tartárico por 100 ml de medio). Después de adicionar la solución, mezclar y medir el pH con potenciómetro. Dejar solidificar una porción del medio. Hacer esto en cada lote de medio preparado.

A fin de preservar las propiedades gelificantes del medio, no calentar después de agregar el ácido tartárico.

#### 6.1.2 Soluciones.

##### 6.1.2.1 Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada)

###### FORMULA

###### INGREDIENTES CANTIDADES

Fosfato de potasio monobásico 34,0 g

Agua 1,0 l

###### Preparación:

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

Llevar a 1,0 l de agua.

Esterilizar a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 minutos. Conservar en refrigeración (solución concentrada).

Tomar 1,25 ml de la solución concentrada y llevar a 1,0 l con agua (solución de trabajo).

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

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

##### 6.1.2.2 Solución estéril de ácido tartárico al 10%

###### FORMULA

###### INGREDIENTES CANTIDADES

Acido tartárico 10,0 g

Agua destilada 100,0 ml

###### Preparación:

Disolver el ácido en el agua y esterilizar a  $121 \pm 1,0^\circ\text{C}$  por 15 minutos o por filtración a través de membrana de  $0,45 \mu\text{m}$ .

## 6.2 Materiales.

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

Cajas Petri.

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.

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

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

## 7. Aparatos e instrumentos

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

Incubadora con termostato que pueda ser mantenido a  $25 \pm 1,0^\circ\text{C}$  provista con termómetro calibrado.

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

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

Esta Norma se complementa con lo siguiente:

NOM-109-SSA1-1994 Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.\*

NOM-110-SSA1-1994 Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.\*

NOM-092-SSA1-1994 Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.\*

**NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-112-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES. TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE.**

8. Preparación de la muestra

Las muestras deben prepararse y diluirse, siempre que sea posible, de acuerdo a la NOM-110-SSA1-1994. Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

9. Procedimiento

9.1 Para agua potable y hielo

9.1.1 Prueba presuntiva

9.1.1.1 Inoculación. Agitar la muestra. Transferir volúmenes de 10 ml de muestra a cada uno de 5 tubos con 20 ml de caldo lactosado de mayor concentración y 1,0 ml y 0,1 ml de muestra a cada uno de los tubos de las series de 5 respectivamente con 10 ml de caldo lactosado de concentración sencilla o caldo lauril sulfato triptosa con púrpura de bromocresol. (Ver punto 6.1.2)

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

9.1.2 Prueba confirmativa

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

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

9.2 Para alimentos.

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

9.2.1 Prueba presuntiva

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

9.2.1.1.1 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.

9.2.1.1.2 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.

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

#### 9.2.2 Prueba confirmativa

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

### 10. Expresión de los resultados

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

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 g), seleccionar las tres primeras diluciones para el cálculo del número más probable.

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

La técnica de NMP puede admitir gran cantidad de variaciones. Los resultados obtenidos con esta técnica deben ser utilizados con precaución. Los límites de

confianza están representados en los cuadros 4 al 7. Por ejemplo, para una muestra sólida con un NMP de 70 coliformes por gramo, los límites de confianza en el 95% de los casos variarán de 10 a 230 coliformes por gramo (ejemplo 3 del cuadro 3) y en un producto con 24 de NMP de coliformes por gramo, los límites de confianza son de 3,6 a 130 coliformes por gramo (ejemplo 2 cuadro 3).

## 11. 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.

## **NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-114-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE SALMONELLA EN ALIMENTOS.**

### 8. Procedimiento

#### 8.1 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.

##### 8.1.1 Procedimiento general para la preparación de muestras

Pesar asépticamente 25 g de la muestra en un vaso estéril de licuadora o en bolsa estéril para trabajar en homogeneizador peristáltico (stomacher). Adicionar 225 ml del medio de preenriquecimiento estéril (generalmente caldo lactosado, a menos que se indique otro) y licuar si es necesario durante un min. Transferir asépticamente la mezcla homogeneizada a un recipiente estéril de boca ancha con tapón de rosca y dejar reposar por 60 min a temperatura ambiente con la tapa bien enroscada. Mezclar bien y determinar el pH aproximado con papel pH. Ajustar, si es necesario, a un pH 6,8  $\pm$  0,2 con hidróxido de sodio 1N o ácido clorhídrico 1N estériles. Mezclar y cubrir el recipiente enroscando suavemente la tapa.

Incubar 24  $\pm$  2 h a 35 $\pm$ 0,5°C. Continuar como se indica en 8.2.1.

##### 8.1.2 Procedimiento específico para la preparación de muestra según el producto

8.1.2.1 Huevo en polvo, claras de huevo en polvo, yema de huevo en polvo, huevos líquidos pasteurizados y congelados, fórmulas infantiles y mezclas preparadas en polvo (harinas para hot cakes, galletas, donas, bisquets y pan).

De preferencia no descongelar la muestra. Si se requiere, preparar los alimentos congelados justo antes de tomar la muestra analítica descongelándolos a 45 $\pm$ 0,5°C por 15 min aproximadamente con agitación constante en un baño de agua o por 18 h a una temperatura entre 2-5 $\pm$ 0,5°C. Los productos que no son en polvo se trabajan como indica el procedimiento general (8.1.1). Para los productos en polvo, pesar 25 g de muestra analítica en el medio de preenriquecimiento, dejando que el polvo se humecte lentamente. Si es necesario homogeneizando poco a poco con una varilla

de vidrio estéril u otra herramienta también estéril. Continuar igual que el procedimiento general.

#### 8.1.2.2 Productos no pasteurizados congelados de huevo

Descongelar la muestra como se indica en 8.1.2.1 Pesar asépticamente y por duplicado 25 g de muestra. Colocar en un matraz con 225 ml de caldo selenito cistina una de las muestras y la otra en un matraz con 225 ml de caldo tetracionato, sin verde brillante. Proceder como en 8.1.1 hasta ajustar el pH. Adicionar 2,25 ml de verde brillante al 0,1% y 4,5 ml de solución yodo-yoduro a la muestra contenida en el caldo tetracionato y mezclar bien. Incubar como se indica en 8.2.2.

8.1.2.3 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, proceder igual que en 8.1.2.1 utilizando caldo lactosado como medio de preenriquecimiento, licuar dos min. Continuar después de la incubación como en 8.2.1.

#### 8.1.2.4 Leche en polvo, entera, semidescremada o descremada

Seguir el procedimiento general para el pesado de la muestra y adicionarla lentamente a un matraz Erlenmeyer con 225 ml de solución verde brillante al 0,1%, procurando que el polvo quede en la superficie del líquido y se hidrate suavemente. Dejar la mezcla en reposo por 60 min, e incubar como se indica en 8.1.1.

#### 8.1.2.5 Queso

Proceder igual que en 8.1.1 utilizando agua de peptona tamponada como medio de preenriquecimiento.

#### 8.1.2.6 Caseína

Seguir el procedimiento señalado en 8.1.1, licuar por dos min y ajustar cuidadosamente el pH.

#### 8.1.2.7 Coco

Proceder como se indica en 8.1.1 hasta ajustar, si es necesario, el pH a los valores indicados. Adicionar hasta un máximo de 2,25 ml de Tergitol aniónico 7 estéril (121&ordm;C &plusmn; 1&ordm;C/15 min) y mezclar bien. Puede utilizarse Tritón X-100 estéril. Usar la cantidad necesaria de estos detergentes utilizando el volumen mínimo para que se inicie la formación de espuma. Puede ser, para el Tritón X-100 de dos a tres gotas. Incubar como se indica en 8.1.1.

#### 8.1.2.8 Levadura seca

Seguir el procedimiento de 8.1.1, utilizando como medio de enriquecimiento caldo soya tripticasa estéril. Mezclar para formar una suspensión homogénea. Ajustar el pH y terminar el procedimiento como en 8.1.1.

Para levadura seca inactiva, continuar como en 8.2.1. Para levadura seca activa, mezclar la muestra incubada y transferir 1 ml a cada tubo de 10 ml de caldo tetrionato y 10 ml de caldo lauril triptosa. Incubar los medios selectivos por 24 h; 2 h. Continuar como se indica en 8.2.2.

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

8.1.2.9.1 Productos procesados térmicamente y productos secos. Se sigue el procedimiento señalado en 8.1.1 hasta la homogeneización. Si la muestra es en polvo o molida, el licuado puede omitirse. Después de reposar, mezclar bien y ajustar el pH como se indica en el procedimiento general. Para emulsionar las grasas, 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 8.1.1.

8.1.2.9.2 Productos crudos o altamente contaminados. Pesar porciones de 25 g de producto en dos vasos para licuadora. Si la muestra es en polvo o molida, el licuado puede omitirse y el producto puede pesarse directamente en matraces Erlenmeyer estériles de 500 ml. Adicionar 225 ml de caldo selenito cistina o 225 ml de caldo tetrionato (sin verde brillante) a cada muestra analítica. Licuar por dos min y pasar asépticamente a matraces Erlenmeyer de 500 ml. Dejar reposar y ajustar el pH como se indica en 8.1.1.

Adicionar 2,25 ml de solución de verde brillante 0,1% y 4,5 ml de solución yodo-yoduro a la muestra que se enriquecerá con caldo tetrionato. Homogeneizar e incubar. Continuar como se indica en 8.2.1.

8.1.2.10 Dulces y dulces cubiertos (incluyendo chocolate)

Pesar asépticamente 25 g de la muestra en un vaso para licuadora agregando 225 ml de leche descremada reconstituida. Licuar por dos min. Manejar igual que en 8.1.1 hasta después de ajustar el pH. Adicionar 0,45 ml de la solución verde brillante al 0,1% y mezclar bien. Incubar como se indica en 8.1.1.

8.1.2.11 Especias

8.1.2.11.1 Pimienta negra, pimienta blanca, semilla de apio, comino, perejil seco, romero, tomillo, chile en polvo, paprika o pimentón, ajonjolí, hojuelas de vegetales (vegetales secos).

Pesar asépticamente 25 g de la muestra y verter en un recipiente de tapón de rosca de 500 ml con 225 ml de caldo soya tripticasa estéril y mezclar bien. Continuar con el procedimiento 8.1.1.

#### 8.1.2.11.2 Ajo en polvo u hojuelas; cebolla en polvo u hojuelas

Pesar asépticamente 25 g de la muestra y verter en un recipiente de tapón de rosca de 500 ml con 225 ml de caldo soya tripticasa estéril adicionado con sulfito de potasio y mezclar bien. Continuar con el procedimiento 8.1.1.

#### 8.1.2.11.3 Pimienta de Jamaica (Pimienta inglesa), clavo de especia, canela y orégano

No se conoce un método para neutralizar la toxicidad de estas cuatro especias. Diluir por lo tanto, más allá de su poder de toxicidad. Examinar la pimienta, canela y orégano en una proporción 1:100 muestra/ caldo, y el clavo a 1:1000 muestra/caldo. Seguir el procedimiento igual que en 8.1.2.11.1.

#### 8.1.2.12 Gelatina

Pesar asépticamente 25 g de muestra en un recipiente de boca ancha y tapón de rosca de 500 ml. Adicionar 225 ml de caldo lactosado estéril con 5 ml de solución acuosa de gelatinasa al 5% y mezclar bien. Dejar reposar 60 min y continuar igual que el procedimiento 8.1.1.

### 8.2 Aislamiento de *Salmonella*

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

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

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

Efectuar el mismo procedimiento para el caldo tetrionato.

Incubar las placas 24 ± 2 h a 35°C.

8.2.4 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 azul verdes 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.

### 8.3 Identificación bioquímica

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

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

Incubar por 24 ± 2 h a 35°C.

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

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

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

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

8.3.2.3 Retener todos los cultivos que muestren las reacciones características de *Salmonella* en los medios TSI y LIA para las pruebas adicionales, indicadas en 8.3.3.

8.3.3 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.

8.3.4 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.

8.3.5 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.

#### 8.3.6 Prueba de ureasa

8.3.6.1 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 virre púrpura de las reacciones positivas con el color del medio original. Incubar 24  $\pm$  2 h a 35 $\pm$ 0,5 $\pm$ C.

8.3.6.2 Prueba de ureasa (rápida). Tomar dos asadas de crecimiento del cultivo presumiblemente positivo de cada tubo de medio TSI e inocular tubos de caldo urea (rápida). Incubar 2 h a 37  $\pm$  0,5 $\pm$ 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).

#### 8.4 Identificación serológica

##### 8.4.1 Ensayo de los antígenos somáticos de *Salmonella* (Antisuero polivalente O)

8.4.1.1 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.

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

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

8.4.1.4 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.

8.4.2 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).

8.4.2.1 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.

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

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

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

8.4.3.2 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.

## 8.5 Pruebas bioquímicas complementarias

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

8.5.1 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*.

8.5.2 Interpretar los cambios en los medios inoculados conforme lo siguiente:

### 8.5.2.1 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.

### 8.5.2.2 Medio SIM

Inocular por punción.

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

Movilidad.

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

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

Producción de ácido sulfhídrico.

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

Prueba negativa: ausencia de color negro.

Producción de indol

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

Prueba positiva: desarrollo de un anillo de color rojo.

Prueba negativa: sin cambio de color.

#### 8.5.2.3 Caldo RM-VP

Inocular un tubo con el medio.

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

##### 8.5.2.3.1 Prueba de Voges-Proskauer (VP)

Transferir a un tubo un ml del cultivo de 48 h.

Adicionar 0,6 ml de solución de alfa naftol.

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

Adicionar algunos cristales de creatinina (opcional).

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

Prueba positiva: desarrollo de color rojo ladrillo.

Prueba negativa: sin cambio de color.

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

#### 8.5.2.3.2 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.

#### 8.5.2.4 Caldo malonato

Inocular un tubo conteniendo el medio.

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

Prueba positiva: desarrollo de color azul.

Prueba negativa: sin cambio de color.

#### 8.5.2.5 Caldo manitol

Inocular un tubo conteniendo el medio.

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

Prueba positiva: desarrollo de color amarillo.

Prueba negativa: sin cambio de color.

8.5.3 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.

### 9. Cálculo y expresión de resultados

9.1 Interpretación de reacciones bioquímicas y serológicas.

#### CUADRO 1

Reacciones Reacciones Interpretación

bioquímicas serológicas

Típica Antígeno O, Cepas consideradas

Vi o H positivo como *Salmonella*

Típica Todas las reacciones

negativas

Típica No probada Puede ser

*Salmonella*

Reacciones Antígeno O,

atípicas Vi o H

positivo

Reacciones Todas las No debe ser

atípicas reacciones considerada

negativas *Salmonella*

Nota: Ver apéndice informativo A.

9.2 Reacciones bioquímicas y serológicas de *Salmonella*

#### CUADRO 2

Prueba o sustrato	Positivo	Negativo	Reacción
-------------------	----------	----------	----------

Glucosa (TSI)	amarillo	rojo	+
---------------	----------	------	---

Lisina descarboxilasa (LIA)	púrpura	amarillo	+
-----------------------------	---------	----------	---

H <sub>2</sub> S (TSI y LIA)	negro	no negro	+
------------------------------	-------	----------	---

Ureasa	rojo-púrpura	no hay cambio	-
de color			

Caldo de lisina	púrpura	amarillo	+
descarboxilasa			

Caldo dulcitol	amarillo	o gas	no hay cambio	+b
rojo de fenol	de color	ni gas		

Caldo KCN	crecimiento	no hay	-	
crecimiento				

Caldo malonato	azul	no hay cambio	-c	
de color				

Prueba de indol superficie color superficie color –  
violeta amarillo

Prueba del antígeno aglutinación no hay +  
flagelar aglutinación

Prueba del antígeno aglutinación no hay +  
somático aglutinación

Caldo lactosa amarillo o gas no hay cambio -c  
rojo fenol de color ni gas

Caldo sacarosa amarillo o gas no hay cambio -  
rojo fenol de color ni gas

Prueba Voges- de rosa a rojo no hay cambio -  
Proskauer de color

Prueba rojo de metilo rojo difuso amarillo difuso +

Citrato de Simmons crecimiento no hay v  
color azul crecimiento, no

hay cambio

de color

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.

### 9.3 Informe de resultados

Informar: presencia o ausencia de *Salmonella* en \_\_\_\_\_ g o \_\_\_\_\_ ml  
de muestra.

## ORGANISMOS COLIFORMES

Número mas probable de microorganismos y límites de confianza para diferentes tubos positivos cuando se inoculan tres tubos con 1 ml de la dilución 1:10, tres con 1 ml de la dilución 1:100 y tres con 1 ml de la dilución 1:1000 de la muestra

Combinación de tubos positivos			NMP/g o ml de muestra	Límites de confianza al 99%		Límites de confianza al 95%	
10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>		Superior	Inferior	Superior	Inferior
0	1	0	3.0	<1.0	23.0	<1.0	17.0
1	0	0	4.0	<1.0	28.0	1.0	21.0
1	0	1	7.0	1.0	35.0	2.0	27.0
1	1	0	7.0	1.0	36.0	2.0	28.0
1	2	0	11.0	2.0	44.0	4.0	35.0
2	0	0	9.0	1.0	50.0	2.0	38.0
2	0	1	14.0	3.0	62.0	5.0	48.0
2	1	0	15.0	3.0	65.0	5.0	50.0
2	1	1	20.0	5.0	77.0	8.0	61.0
2	2	0	21.0	5.0	80.0	8.0	63.0
3	0	0	23.0	4.0	177.0	7.0	129.0
3	0	1	40.0	10.0	230.0	10.0	180.0
3	1	0	40.0	10.0	290.0	20.0	210.0
3	1	1	70.0	20.0	370.0	20.0	280.0
3	2	0	90.0	20.0	520.0	30.0	390.0
3	2	1	150.0	30.0	660.0	50.0	510.0
3	2	2	210.0	50.0	820.0	80.0	640.0
3	3	0	200.0	100.0	1,900.0	100.0	1,400.0
3	3	1	500.0	100.0	3,200.0	200.0	2,400.0
3	3	2	1,100.0	200.0	6,400.0	300.0	4,800.0