

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD



TESIS

***“EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL JAMÓN COCIDO DE
MAYOR CONSUMO EN LA CIUDAD DE TIJUANA B.C. PARA ESTABLECER EL
RIESGO POTENCIAL QUE REPRESENTAN EN LA SALUD”***

Que para obtener el grado de Maestra en Ciencias de la Salud

Presenta

QFB. DIANA IRASEMA BARRAZA ÁLVAREZ

Directora de Tesis

Dra. Lilia Angélica Hurtado Ayala

Co-Directora

Dra. María Eugenia Pérez Morales

Tijuana, Baja California, Octubre de 2016.

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

FOLIO No. 185

Tijuana, B. C., a 17 de octubre de 2016

C. Diana Irasema Barraza Álvarez
Pasante de: Maestro en Ciencias de la Salud
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS

Es propuesto, por las C. Dras. Lilia Angélica Hurtado Ayala y María Eugenia Pérez Morales

Quiénes serán las responsables de la calidad del trabajo que usted presente, referido al
tema: "EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL JAMÓN COCIDO DE MAYOR CONSUMO EN LA CIUDAD DE TIJUANA, B.C. PARA ESTABLECER EL RIESGO POTENCIAL QUE REPRESENTAN EN LA SALUD"

el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- RESUMEN
- II.- ANTECEDENTES
- III.- JUSTIFICACION
- IV.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA
- V.- OBJETIVOS
- VI.- METODOLOGÍA
- VII.- RESULTADOS Y DISCUSION
- VIII.- CONCLUSIONES

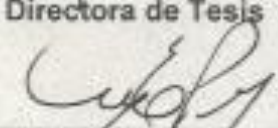
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA

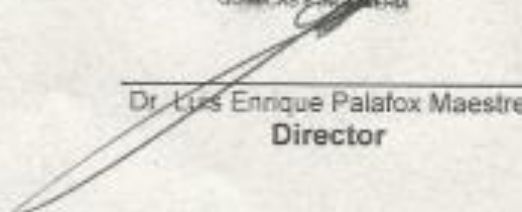


FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA


Dr. José Luis González Vázquez
Secretario


Dra. Lilia Angélica Hurtado Ayala
Directora de Tesis


Dra. María Eugenia Pérez Morales
Co-Directora de Tesis


Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a Dios por dejarme culminar este proyecto de muchos otros que están en mis metas a futuro.

A mi familia, a mis padres, a mi hermana, a mis abuelos y al resto de los seres que amo por estar conmigo y apoyarme en cada etapa de este proceso, sin ellos en mi vida cualquier logro académico o profesional perdería significado.

Por otra parte quiero agradecer a mis docentes, ya que sin su guía, apoyo y sabiduría este camino habría sido difícil de recorrer, a mi Directora de tesis, Dra. Lilia Angélica Hurtado Ayala, a mi codirectora, Dra. María Eugenia Pérez Morales.

A los miembros de mi comité y sinodales, Mtro. Luis Alberto Alcántara Jurado, Dra. Bertha Landero Sánchez y Dra. Mirna del Carmen Brito Perea.

Extiendo también un sincero agradecimiento a mi universidad, la Universidad Autónoma de Baja California y a la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería por adoptarme en sus instalaciones y proporcionar los elementos necesarios para llevar a cabo la presente investigación.

Por último y no menos importante agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo y patrocinio para la realización de este proyecto de tesis *“EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL JAMÓN COCIDO DE MAYOR CONSUMO EN LA CIUDAD DE TIJUANA B.C. PARA ESTABLECER EL RIESGO POTENCIAL QUE REPRESENTAN EN LA SALUD”*.

CONTENIDO

I. RESUMEN.....	11
ABSTRACT.....	12
II. ANTECEDENTES	13
Enfermedades transmitidas por alimentos.....	13
Bacterias asociadas a las enfermedades transmitidas por alimentos.....	13
Factores favorables para el desarrollo de las bacterias.....	16
Factores desfavorables para el desarrollo de las bacterias.....	17
La carne como fuente de ETA	17
Vías de contaminación.....	18
III. JUSTIFICACIÓN	20
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
V. OBJETIVOS	24
OBJETIVO GENERAL.....	24
HIPOTESIS	25
HIPOTESIS NULA	25
VI. METODOLOGÍA.....	26
DESARROLLO EXPERIMENTAL	26
A) Tipo de estudio.....	26
B) Espacio-temporal.....	26
C) Criterios de Inclusión y Exclusión.....	27
D) Variables	27
Variables independientes.....	27
Variable dependiente.....	28
E) Tamaño de muestra	28
F) Parte Estadística.....	28
PROCEDIMIENTO	30
A) Tratamiento general de la muestra.....	30
B) Muestreo	31

C) Análisis microbiológicos de las muestras.	32
Determinación de Mesófilos aerobios según la NOM-092-SSA1-1994.....	32
Recuento de coliformes fecales y <i>E. coli</i> con la NOM-112-SSA1-1994.	34
Recuento de hongos y levaduras según la NOM-111-SSA1-1994.	35
Determinación de <i>Salmonella spp</i> según la NOM-114-SSA1-1994	36
Determinación de <i>S. aureus</i> según la NOM-115-SSA1-1994.	37
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para detección de gen <i>mecA</i> en <i>S. aureus</i>	38
D) Obtención de resultados.	39
E) Determinar la calidad microbiológica.....	39
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
Resultados Mesófilos Aerobios.	44
Resultados hongos y levaduras.	46
Resultados <i>Staphylococcus aureus</i>	48
Resultados <i>Salmonella spp</i>	51
Resultados Coliformes Fecales.	54
Resultados <i>Escherichia coli</i>	57
LIMITACIONES.....	61
FORTALEZAS	62
VIII.CONCLUSIONES	63
RECOMENDACIONES.	64
BIBLIOGRAFÍA	65
ANEXOS	70
ANEXO 1. MATERIALES Y EQUIPOS	70
ANEXO 2. Normas Oficiales Mexicanas empleadas para el análisis de las muestras.	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales vías de contaminación para los productos cárnicos.	18
Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos y su localización en el gen mecA.	38
Tabla 3. Límites permisibles en muestras de jamón.	39
Tabla 4. Frecuencias para determinar el consumo de jamón por delegación según el numero de encuestados.	40
Tabla 5. Datos agrupados de los resultados para todos llos parámetros analizados	43

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Consumo general de jamón.	41
Gráfica 2. Recuento de mesófilos aerobios.	44
Gráfica 3. Mesófilos aerobios por marca.	45
Gráfica 4. Presencia de hongos y levaduras.	46
Gráfica 5. Presencia de hongos y levaduras por empaque	47
Gráfica 6. Hongos y levaduras por marca.	47
Gráfica 7. Presencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	48
Gráfica 8. Presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> por empaque.	49
Gráfica 9. Presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> por marca.	50
Gráfica 10. Presencia de coliformes totales	52
Gráfica 11. Presencia de coliformes totales por empaque.	52
Gráfica 12. Presencia de coliformes totales por marca	53
Gráfica 13. Presencia de coliformes fecales.....	54
Gráfica 14. Coliformes fecales por empaque.....	55
Gráfica 15. Coliformes fecales por marca.....	56
Gráfica 16. Presencia de <i>Escherichia coli</i>	57
Gráfica 17. Presencia de <i>Escherichia coli</i> segun empaque.....	58
Gráfica 18. Presencia de <i>Escherichia coli</i> por marca de jamón.....	58
Gráfica 19. Distribución de contaminación por empaque.	59
Gráfica 20. Distribución de muestras contaminadas por delegación	60
Gráfica 21. Contaminación general de las muestras	60

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Mapa de las delegaciones de la ciudad de Tijuana B.C.	26
Figura 2. Diagrama general de seguimiento de la muestra.	30
Figura 3. Diagrama de Muestreo	31
Figura 4. Determinación de Mesófilos aerobios según la NOM-092-SSA1-1994. .	32
Figura 5. Recuento de coliformes totales según la NOM-112-SSA1-1994	33
Figura 6. Recuento de coliformes fecales y <i>E. coli</i> con la NOM-112-SSA1-1994...	34
Figura 7. Recuento de hongos y levaduras según la NOM-111-SSA1-1994.....	35
Figura 8. Determinación de <i>Salmonella spp</i> según la NOM-114-SSA1-1994	36
Figura 9. Determinación de <i>S. aureus</i> según la NOM-115-SSA1-1994.....	37
Figura 10. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para detección de gen <i>mecA</i> en <i>S. aureus</i>	38
Figura 11. Electroforesis para detección del gen <i>mecA</i>	51

I. RESUMEN

Antecedentes: En la actualidad, el campo de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) es un tema al que no se le da importancia en México, la mayoría de las enfermedades no son reportadas, ya que algunas son de corta duración o se asocian a algún factor ajeno a la ingesta de alimentos, por lo tanto no se sabe el origen del que provienen. Los trabajos e investigaciones que existen acerca de este tema en el país, son pocos o estos no están difundidos. Dentro de los alimentos de más fácil contaminación se encuentra la carne y sus derivados, debido a su riqueza nutricional, su contenido en agua y su pH, los hace productos óptimos para el desarrollo de microorganismos, en la actualidad el consumo de embutidos ha aumentado por su bajo costo y su fácil preparación, debido a que son derivados de la carne también se contaminan con gran facilidad.

Objetivo: Determinar la calidad microbiológica del jamón cocido de mayor consumo en la ciudad de Tijuana B.C., con base en la NOM-158-SCFI-2003, mediante el uso de técnicas normalizadas, para establecer el riesgo potencial que representan en la salud de quien los consume.

Metodología: Se desarrollaron métodos normalizados para comparar los resultados obtenidos en el laboratorio con los parámetros de referencia según la NOM-158-SCFI-2003 *Jamón-Denominación y clasificación comercial, especificaciones fisicoquímicas, microbiológicas, organolépticas, información comercial y métodos de prueba*. Lo que permite conocer la calidad sanitaria de los productos que se comercializan y consumen en la región.

Los parámetros realizados en las muestras de jamón fueron: Recuento de coliformes totales, según la NOM-113-SSA1-1994, Recuento de mesófilos aerobios, según la NOM-092-SSA1-1994, Recuento de hongos y levaduras, según la NOM-111-SSA1-1994. Recuento de *E. coli*, según la NOM-112-SSA1-1994. Determinar la presencia o ausencia de *Salmonella spp*, según la NOM-114-SSA1-1994. Recuento de *Staphylococcus aureus*, según la NOM-115-SSA1-1994.

Resultados: Se analizaron un total de 72 muestras, el 14% cumplió con los límites permisibles según la NOM-158-SCFI-2003. Dentro de los hallazgos más importantes se encuentra la detección de *Escherichia coli* en 20 muestras y de *Staphylococcus aureus* en siete muestras.

Conclusiones: El 81% de los productos sobrepasan los límites permitidos. Los resultados obtenidos en el estudio indican que el consumo de los productos implica un riesgo potencial en la salud de los ciudadanos.

Palabras clave: Jamón cocido, Calidad microbiológica, cárnicos, embutidos

ABSTRACT

Background: Currently, the transmitted diseases food is a topic that do not have importance in Mexico, most of the diseases are not reported, since some are of short duration or are associated with any factor unrelated to food intake therefore its causes and origins are unknown. Research in the country on this topic are few and little widespread. Food of easy pollution include meat and its derivatives, due to its nutritional richness, its water content and pH, which the consumption of cold meats makes them optimal for the development of micro-organisms, currently sausage consumption has increased by its low cost and easy preparation, as being derived from meat are also contaminated easily

Objective: Determine the microbiological quality of the ham of higher consumption in the city of Tijuana B.C., based on the NOM-158-SCFI-2003, through the use of standard techniques, to establish the potential risk that represent the health of those who consume them.

Methodology: We apply standardized methods that allowed us to compare the results obtained in the laboratory with the parameters of reference standard according to the NOM-158-SCFI-2003 *Jamón-Denominación y clasificación comercial, especificaciones fisicoquímicas, microbiológicas, organolépticas, información comercial y métodos de prueba*. This in order to know the health quality of the products that are sold and consumed in the region.

The parameters in the samples of ham were: count of coliforms, according to NOM-113-SSA1-1994, count of aerobic mesophyll, according to NOM-092-SSA1-1994, count of molds and yeasts, according to NOM-111-SSA1-1994. Count of *E. coli*, according to the NOM-112-SSA1-1994. Determine the presence or absence of *Salmonella*, according to NOM-114-SSA1-1994. Count of *Staphylococcus aureus*, according to NOM-115-SSA1-1994.

Results: We analyzed a total of 72 samples, of which only 14% had complied with the permissible limits according to the NOM-158-SCFI-2003. The most important findings were the detection of *Escherichia coli* in 20 samples, and *Staphylococcus aureus* in 7 samples

Conclusions: The results obtained in this study indicate that 81% of the samples are outside the limits indicated by the NOM-158-SCFI-2003. This implies that the consumption of these products could generate a potential risk to the health of citizens

Key words: Cooked ham, microbiological quality, meat products, sausages

II. ANTECEDENTES

Enfermedades transmitidas por alimentos.

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) constituyen un importante problema de salud a nivel mundial. Estas enfermedades se producen por el consumo de agua o alimentos contaminados con microorganismos, parásitos o bien las sustancias tóxicas que ellos producen (Bayona, 2009).

Una de las principales causas en el aumento de las ETA es que en los últimos tiempos hay cambios en los hábitos alimentarios de la sociedad, como el consumo de alimentos envasados, comidas fuera del hogar, expendio de comidas preparadas y comidas rápidas (Olea et al., 2012).

Hasta la fecha se han descrito más de 250 tipos de ETA. La mayoría son infecciones ocasionadas por distintas bacterias, virus y parásitos; las más comunes son las producidas por bacterias, tales como: *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens*, así como *Escherichia coli* O157:H7. A largo plazo, algunas de estas enfermedades pueden causar complicaciones graves. *Escherichia coli* O157:H7 puede provocar el síndrome hemolítico urémico y trombocitopenia; *Salmonella* puede ocasionar artritis y septicemia; *Listeria monocytogenes* puede generar meningitis y aborto en las mujeres embarazadas, entre otras (Puig et al., 2013).

Bacterias asociadas a las enfermedades transmitidas por alimentos.

Staphylococcus aureus

Los estafilococos son anaerobios facultativos, que se multiplican con mayor velocidad en presencia de oxígeno. No poseen flagelo ni cilios, son incapaces de moverse por sí mismos. La temperatura ideal para su multiplicación es de 37°C, misma del cuerpo humano. Puede ser aislado a partir del polvo o la piel de animales de sangre caliente. Es un agente patológico oportunista, que usualmente se comporta como comensal. Algunas especies tóxicas pueden provocar infecciones en heridas o en individuos con bajas defensas. *S. aureus* se destaca por ser uno de los principales microorganismos responsables de intoxicación alimentaria, en donde figuran como principal fuente de contaminación, los manipuladores de alimentos (Jordá et al., 2012).

Clostrídios sulfito-reductores

Son bacilos anaeróbicos Gram-positivos, formadores de esporas. Existen dos especies de interés en el campo de la salud pública. Las enfermedades transmitidas por alimentos son provocadas por, *Clostridium botulinum*: el botulismo de origen alimentario es un padecimiento grave, causado por ingestión de alimentos contaminados con una potente neurotoxina, previamente formada en los alimentos afectados, apareciendo los primeros síntomas, desde las pocas horas hasta algunos días después de su ingestión. *Clostridium perfringens*: está presente en el agua, suelo y alimentos. Produce enterotoxinas, con cuatro serotipos distintos (A, B, C y D). La enfermedad provocada por esta bacteria es inducida a través de la enterotoxina, producida por las células vegetativas de serotipo A, involucrada con frecuencia en infecciones tóxicas de los alimentos, y por las células vegetativas del serotipo C, es raro que aparezca la enfermedad y está asociada a un padecimiento denominado, enteritis necrótica (Tornese et al., 2008).

Salmonella spp.

Es un agente que no pertenece a la población microbiana normal, su hallazgo en el hombre es siempre patológico. El género *Salmonella*, puede causar diferentes síntomas clínicos que van desde ligeras gastroenteritis a enfermedades sistémicas complicadas como la fiebre tifoidea, en individuos susceptibles, algunas especies puede tornarse invasivas desencadenando procesos más complicados de fiebre entérica. Las gastroenteritis son las enfermedades más frecuentes transmitidas por este agente patógeno al ser humano. La salmonelosis es una infección zoonótica con diseminación global, los principales reservorios son los roedores, los animales domésticos y el propio hombre. La transmisión ocurre por la vía fecal-oral, casi siempre a través del agua o alimentos contaminados. *Salmonella spp.* puede causar enfermedad con un número reducido de células, por lo tanto es importante garantizar su ausencia en alimentos listos para comer, estableciendo reglas de higiene, sobre todo a los manipuladores de alimentos (Yáñez et al., 2008).

Coliformes

Son miembros de la familia *Enterobacteriaceae* por definición, los coliformes son bacilos, Gram negativos, no esporulados, anaerobios facultativos, oxidasa

negativos, que crecen en condiciones aerobias en medios de cultivo selectivos conteniendo sales biliares, y capaces de fermentar la lactosa, en 48 horas a 37°C, con producción de ácido y gas. El grupo de los coliformes incluye, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* y *Klebsiella pneumoniae*. Los coliformes que presentan la capacidad de fermentar lactosa con la consecuente producción de gas, cuando son incubados a una temperatura de 44 a 45.5°C, se denominan coliformes fecales (González et al., 2007).

Escherichia coli es un indicador de contaminación fecal, es la principal representante de este grupo. Es una bacteria que integra la microbiota del tracto intestinal del hombre y de la mayoría de las especies de sangre caliente. Las especies patógenas de *E. coli* son responsables de síndromes diarreicos en el ser humano y animales, y están divididas en seis grupos distintos, de acuerdo a su patogenia, enteropatogénicas (EPEC), enterotoxigénicas (ETEC), enteroinvasivas (EIEC), enterohemorrágicas (EHEC), enteroagregativas (EaggEC) y las difusamente adherentes (DAEC), con mayor importancia a las 4 primeras (Roldán et al., 2007).

Las ETA pueden ser intoxicaciones o infecciones

Infección transmitida por alimentos: enfermedad que resulta de la ingestión de alimentos que contienen microorganismos perjudiciales vivos.

Intoxicación causada por alimentos: enfermedad que resulta de la ingestión de toxinas o venenos que están presentes en el alimento ingerido, que han sido producidas por hongos o bacterias aunque estos ya no estén presentes en el alimento.

Los síntomas más comunes de las ETA son vómitos, dolores abdominales, diarrea y fiebre, también pueden presentarse síntomas neurológicos, ojos hinchados, dificultades renales, visión doble, etc. Estos varían dependiendo de la cantidad de bacterias o de toxinas presentes en el alimento, de la cantidad de alimento consumido y del estado de salud de la persona, entre otros factores (ANMAT, 2013).

El interés por evitar las enfermedades transmitidas por los alimentos surge con la práctica misma de la ingestión de los alimentos; se manifiesta históricamente de

muy diversas maneras. La necesidad de preservar los alimentos contra el deterioro constituyó un medio que de forma indirecta ha contribuido a proteger su inocuidad. Aunque es difícil señalar con precisión los primeros conocimientos acerca de la presencia y el papel de los microorganismos en los alimentos, se tiene evidencia de que esta práctica antecede a la consideración de la microbiología como ciencia (Kopper et al., 2009).

Factores favorables para el desarrollo de las bacterias.

Disponibilidad de nutrientes: Casi todos los alimentos contienen el aporte de agua, proteínas, grasas, minerales o azúcar necesarios para las bacterias. Algunos más que otros, como es el caso de la leche y sus derivados, la carne y sus productos, las cremas y los huevos.

Disponibilidad de agua: Igual que para el hombre el agua es necesaria para la vida de las bacterias, por lo cual la leche, la mayonesa, las cremas y otros productos que tienen una combinación alta de agua y nutrientes, resultan ideales para facilitar la reproducción de las bacterias, en cambio los alimentos secos no la favorecen, como es el caso de la leche en polvo, fideos, cereales, huevos deshidratados y otros.

Temperatura: Las bacterias se reproducen en una amplia variedad de temperaturas, pero a temperaturas cercanas a las del cuerpo humano alcanzan su mayor reproducción. Por eso, los alimentos a temperatura ambiente permiten un rápido crecimiento de bacterias y tienen mayor riesgo de producir enfermedades. En general se considera que por debajo de los 5°C o por arriba de los 60°C, la reproducción de las bacterias es muy escasa o casi nula.

Oxígeno: Casi todas las bacterias necesitan de oxígeno para sobrevivir, pero algunas se reproducen en ambientes sin oxígeno, pueden crecer fácilmente en preparaciones que incluyen trozos voluminosos de carnes (una pierna de cerdo, un bloque de jamón, un matambre o un embutido por ejemplo), o alimentos totalmente cubiertos por salsas o aceites en cuyo interior se forma un ambiente sin aire.

Tiempo: Dadas las condiciones del tipo de alimento, la humedad y la temperatura, algunas bacterias tienen un tiempo de generación de 20 minutos. Si se da el tiempo suficiente, es posible que un pequeño grupo de bacterias se incremente hasta

alcanzar un número capaz de causar enfermedades. Por esa razón, es esencial que los alimentos de alto riesgo no permanezcan a la temperatura de la zona de peligro, más de lo necesario (Caballero, 2008), (Pascual, 2000).

Factores desfavorables para el desarrollo de las bacterias.

Acidez: Las bacterias crecen fácilmente sobre alimentos poco ácidos como son la gran mayoría de los que habitualmente preparamos.

Azúcares: Alimentos con altos contenidos de azúcar no favorecen la reproducción de las bacterias, porque existe inhibición catabólica por fuente de carbono.

Sal: La sal origina una disminución del agua disponible para las bacterias, por eso los alimentos con alto contenido de sal son poco favorables para la reproducción de las mismas (Forero, 2008).

La carne como fuente de ETA

Uno de los principales alimentos que producen ETA es la carne, ésta constituye la base de la alimentación humana, de gran importancia en la industria alimentaria. Tiene gran valor nutritivo y riqueza proteica lo que la hace uno de los alimentos más perecederos. Su composición, pH y actividad de agua son favorables para la contaminación microbiana (Heredia et al., 2014).

La demanda de carne a nivel mundial va en crecimiento, por lo que se ha convertido en un alimento muy importante para su consumo humano, debido a su gran resistencia a temperaturas medioambientales, los agentes patógenos han sido descritos como los principales microorganismos que alteran o producen enfermedades en el consumidor (Betancourt et al., 2010).

Los alimentos corren el riesgo de contaminación durante el proceso de producción, almacenamiento y consumo, y pueden llegar a producir enfermedades transmitidas por alimentos, constituyen un problema importante de salud pública. En los países industrializados, como Estados Unidos, se estima que cada año ocurren 76 millones de casos de enfermedades transmitidas por alimentos, 325.000 hospitalizaciones y 5.000 muertes (Flórez et al., 2007).

Esta contaminación empieza desde el sacrificio del animal, continua durante su manipulación en el matadero y los puntos de venta hasta llegar al hogar. Al

momento del sacrificio algunos gérmenes pueden atravesar la barrera intestinal para llegar a los músculos. La canal puede contaminarse durante diferentes etapas: desuello, evisceración y despiece. Otro punto de contaminación de gran importancia es el congelador, debido a que entran en contacto unas carnes con otras y en caso de que haya largos períodos de almacenamiento en frío puede proliferar la contaminación psicrófila. El transporte hacia los puntos de venta de las piezas también contribuye a la contaminación, donde también puede seguir contaminándose si las condiciones de almacenamiento no son óptimas (Doyle, 2001).

Vías de contaminación

Tabla 1. Principales vías de contaminación para los productos cárnicos.

Vía de contaminación	Causas	Principales microorganismos
Matadero	Mala salud de los manipuladores. Insectos y roedores.	<i>Micrococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , y otros Gram negativos
Piel del animal	Falta de higiene de los manipuladores.	<i>Staphylococcus</i> y <i>Lactobacillus</i>
Contenido intestinal del animal	Falta de higiene de los manipuladores.	<i>E. coli</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Salmonella</i>
Otras fuentes. Gérmenes del suelo, aire, agua.	Almacenamiento y manipulación erróneos	<i>B. cereus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Monilia</i> y levaduras.

(Pascual, 2000)

Aunque son varios los microorganismos que pueden contaminar la carne y sus derivados, la NOM-158-SCFI-2003 aplicable a la totalidad de los productos cárnicos, que se comercializan dentro del territorio de los Estados Unidos Mexicanos, bajo la denominación “Jamón”, indica cuáles han de ser microorganismos a determinar en esta clase de productos:

- ❖ Coliformes totales, NOM-113-SSA1-1994.
- ❖ Mesófilos aerobios, NOM-092-SSA1-1994.
- ❖ Hongos y levaduras, NOM-111-SSA1-1994.
- ❖ *Escherichia coli*, NOM-112-SSA1-1994.
- ❖ *Salmonella spp*, NOM-114-SSA1-1994.

❖ *Staphylococcus aureus*, NOM-115-SSA1-1994.

Además de las condiciones sanitarias que deben cubrir y los límites máximos permisibles para cada parámetro (NOM-158-SCFI-2003).

III. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, la carne constituye un componente importante en la alimentación de los mexicanos, aunque debido a las condiciones económicas no siempre puede ser adquirida por todos los sectores poblacionales, de tal manera que las personas optan por opciones menos costosas que puedan sustituir esta clase de alimentos, tal es el caso de los embutidos como jamones, bolognias y salchichas, sin embargo el hecho de que sean productos baratos la mayoría de las veces implica que no son de buena calidad (INAES, 2012).

Esta clase de productos tienen un alto consumo debido a que son de bajo costo y de fácil preparación. Si se divide la población en estratos económicos y se observan sus preferencias al consumir alimentos, el comportamiento indica que dependiendo de cada estrato los alimentos varían, sin embargo en relación al consumo de embutidos, todos los estratos los consumen de manera similar, convirtiéndose en un indicador que afecta a cualquier estrato social (Estevan, 2013).

En México la elaboración de productos cárnicos en lo referente a productos procesados ha incrementado en los últimos años. Para el 2008, la producción fue de 732,425 toneladas, teniendo una tasa de crecimiento promedio anual con respecto al año 2000 de 2,8%. Este crecimiento sobresale al resto de productos de la carne en fresco.

El consumo de productos cárnicos o carnes frías muestra un crecimiento sostenido en los últimos años en México. En el 2008, los niveles de consumo estimados de productos transformados de carne de otras especies, fue de 8 kg per cápita, siendo igual que en el 2007 (SAGARPA, 2008).

El 78% de la producción nacional de carnes frías y embutidos se consume principalmente en 11 estados de la república, de los cuales el Distrito Federal y Zona Metropolitana, Jalisco, Chihuahua, Nuevo León y Baja California absorben el 60% del consumo nacional y a su vez, estos estados representan el 40% de la población. Estas cifras indican que en la región son un alimento de alto consumo (Torres, 2005).

Sin embargo el consumir esta clase de productos implica varios riesgos, ya que la carne es un ingrediente de gran importancia en la alimentación humana. Su gran riqueza nutritiva se debe fundamentalmente a su elevado contenido en proteínas de alto valor biológico, pero, por otro lado, es uno de los alimentos más perecederos debido a su alto contenido en agua, composición y pH, lo que favorece la alteración y contaminación microbiana, pudiendo constituir un riesgo para la salud.

Las alteraciones de la carne son debidas a su propia composición y a su interacción con factores físicos o químicos como luz, temperatura o el aire. Las más frecuentes son: enranciamiento, enmohecimiento, putrefacción y coloraciones anormales. Algunas pueden ser causa de enfermedad, los principales microorganismos que pueden contaminar los productos cárnicos son *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Listeria spp.*, y *E. coli* (Caballero, 2008).

Dichas contaminaciones pueden representar grandes pérdidas en el sector cárnico, ocasionadas mayormente por la deficiencia en la cadena de frío durante la producción, el transporte, el almacenamiento, la comercialización y la manipulación, situaciones que potencian el crecimiento de microorganismos en el producto (Buelvas et al., 2012).

Debido a lo anterior es importante conocer las condiciones en las que se encuentran los productos que se consumen en la región, es necesario realizar un estudio que ayude a evaluar la calidad microbiológica del jamón cocido de mayor consumo en la ciudad, ya que este es el de menor costo y el de más fácil preparación, por tanto es el tipo de jamón que más se consume, además cabe mencionar que desafortunadamente solo existe normatividad para quien lo produce pero no se da un seguimiento a través de revisiones sanitarias en los puntos de distribución del producto. Este estudio se llevará a cabo con base a la NOM-158-SCF1-2003 que trata sobre las especificaciones fisicoquímicas, microbiológicas y organolépticas del jamón, para así poder contribuir en la mejora de las prácticas de manejo y conservación de los embutidos.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) han sido consideradas como un grave problema de salud pública a escala mundial, donde los alimentos se reconocen como el vector principal de las enfermedades entéricas agudas. En el continente americano las ETA figuran entre las primeras cinco causas de muerte en los menores de 5 años, con una incidencia promedio anual de cuatro episodios diarreicos anuales por niño (Acevedo et al., 2014).

Son a nivel mundial un problema de salud que genera alta morbilidad y mortalidad en la población, generando grandes pérdidas económicas y riesgos para la salud pública. Este problema se ha incrementado en los últimos años debido a los efectos de la globalización, la producción centralizada de alimentos y los cambios en la alimentación (Bolaños et al., 2005).

Durante la última década, hubo brotes de enfermedades transmitidas por esta vía en todos los continentes, mostrando un incremento significativo en varios países. Además, aproximadamente el 75% de las nuevas infecciones surgidas en los últimos 10 años, provienen de la manipulación de animales utilizados para la producción de alimentos ya sea en mercados o mataderos (OMS, 2014).

Se estima que en los Estados Unidos de América cada año ocurren 76 millones de casos de ETA, se estima que hay 325,000 hospitalizaciones y 5,000 muertes anuales relacionadas con estas enfermedades. Los casos más graves tienden a ocurrir entre los pacientes muy ancianos, los muy jóvenes, aquellos que ya tienen una enfermedad que reduce las funciones del sistema inmunológico y en personas saludables expuestas a dosis muy elevadas de elementos nocivos (CDC, 2011).

En México, los alimentos son la principal vía de transmisión de enfermedades gastrointestinales, datos obtenidos de la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud muestran que en el año 2002 se registraron en México 22,000 casos de intoxicación alimentaria, aumentando drásticamente durante el año 2003 a 35,000 casos, para el año 2005 la cifra ya había alcanzado los 40,000 casos, en el año 2006 la cifra comenzó a descender manteniéndose constante hasta el 2008 con no menos de 35,000 casos (Cortez et al., 2011).

Los principales alimentos identificados como causantes de ETA's son el pescado, el agua, las carnes rojas y los productos lácteos (Kopper et al., 2009).

Refiriéndonos específicamente a la carne, esta constituye una fuente de alimentación importante, aunque debido a condiciones económicas no siempre puede ser adquirida por todos los sectores poblacionales, de tal manera que las personas optan por opciones menos costosas que puedan sustituir esta clase de alimentos, como es el caso de los embutidos como jamón, bologna y salchicha (Sáez et al., 2009).

Esta clase de alimentos pasan por un largo proceso para su fabricación, teniendo numerosos puntos críticos durante los cuales pueden contaminarse, esto debido principalmente a la riqueza nutritiva en su composición, la cantidad de agua y el pH, lo que favorece la alteración y contaminación microbiana, pudiendo constituir un riesgo potencial para la salud (Kopper et al., 2009).

Una investigación en Venezuela reportó que el 3% de las muestras analizadas estaban fuera de especificación según la normatividad venezolana, mostrando 5 casos de *Escherichia coli*, 7 de *Staphylococcus aureus* y 2 de *Salmonella* en muestras de embutidos (Ávila, 2013).

Un estudio reciente realizado en Costa Rica mostró hallazgos que evidencian deficiencias en las cadenas de transporte, conservación y manipulación en los productos cárnicos, así como en la higiene de los dispensadores afectando su calidad microbiológica (Bolaños et al., 2005).

Las investigaciones en México, se limitan a estudios documentados sobre la composición organoléptica y nutrimental de este tipo de productos y de control de calidad microbiológica interna y no sobre la calidad de estos alimentos en el mercado o las condiciones con que llegan al mercado o al consumidor (PROFECO, 2013).

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la calidad microbiológica del jamón cocido de mayor consumo en la ciudad de Tijuana B.C., con base en la NOM-158-SCF1-2003, mediante el uso de técnicas normalizadas, para establecer el riesgo potencial que representan en la salud de quien los consume.

1. Determinar el tipo y el tamaño de muestra para establecer cuáles son las diferentes marcas de jamón cocido de mayor consumo en la ciudad de Tijuana, B.C. mediante una investigación de campo para la aplicación de encuestas, en las diferentes delegaciones de la ciudad de Tijuana B.C.
2. Aplicar los métodos de cuantificación de microorganismos, mediante procedimientos normalizados para determinar la concentración microbiana en jamón cocido de acuerdo a la NOM-158-SCFI-2003 *Jamón-Denominación y clasificación comercial, especificaciones fisicoquímicas, microbiológicas, organolépticas, información comercial y métodos de prueba.*
3. Realizar el análisis estadístico de resultados mediante el procesamiento de datos en el software Excel 2010 para determinar el perfil sanitario del jamón cocido de mayor consumo en la ciudad de Tijuana B.C. de acuerdo a los valores permisibles en la NOM-158-SCFI-2003.
4. Dar a conocer los resultados en foros nacionales e internacionales de inocuidad alimentaria, para su consideración en el establecimiento de monitoreo microbiológico fijo en centros de distribución de jamón cocido en la ciudad de Tijuana B.C.

HIPOTESIS

El jamón cocido distribuido en puntos de venta en la ciudad de Tijuana B.C. excede los límites microbiológicos permisibles por la NOM-158-SCFI-2003, *Jamón-Denominación y clasificación comercial, especificaciones fisicoquímicas, microbiológicas, organolépticas, información comercial y métodos de prueba*. Por lo que representa un riesgo potencial en la salud de quienes consumen estos productos.

HIPOTESIS NULA

El jamón cocido distribuido en puntos de venta en la ciudad de Tijuana B.C. cumple con el control de calidad microbiológico, debido a que sus parámetros se encuentran dentro de los límites permisibles por la NOM-158-SCFI-2003, *Jamón-Denominación y clasificación comercial, especificaciones fisicoquímicas, microbiológicas, organolépticas, información comercial y métodos de prueba*. Por lo cual no representa un riesgo potencial para la salud pública

VI. METODOLOGÍA

DESARROLLO EXPERIMENTAL

A) Tipo de estudio

Transversal, Prospectivo

B) Espacio-temporal

Junio a noviembre del 2015, en las 9 delegaciones ubicadas en la ciudad de Tijuana, B.C.

Temporalidad

De junio a noviembre de 2015.

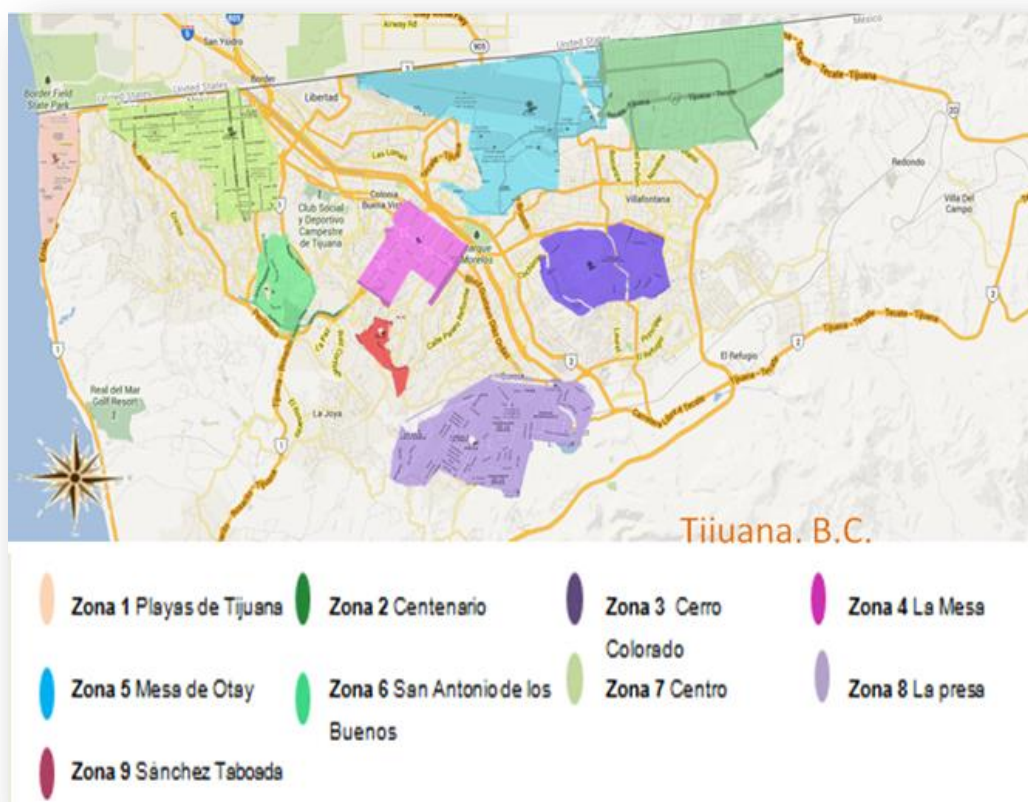


Figura 1. Mapa de las delegaciones de la ciudad de Tijuana B.C.

C) Criterios de Inclusión y Exclusión

Criterios de Inclusión: Para los criterios de inclusión se tomará en cuenta los resultados obtenidos de la aplicación del instrumento para determinar:

- 1.- Jamón cocido
- 2.- Marcas de mayor consumo
- 3.- Presentación de mayor consumo

Criterio de exclusión: Se descartan el resto de los productos embutidos como bolognias, chorizos y otros tipos de jamones.

D) Variables

Variables independientes.

Se tomaron como variables independientes:

1.- Temperatura:

*Temperatura de muestreo: Esta se toma en cuenta para conocer en qué condiciones se encuentra la muestra al momento de tomarla.

*Temperatura de transporte: Es importante mantener la muestra por debajo de la temperatura de muestreo, entre 2 y 8 grados centígrados.

*Temperatura de conservación: Una vez que la muestra se ingresa al laboratorio es importante mantener una la cadena de frio, para evitar que los microorganismos sigan reproduciéndose.

2.- Empaque del producto: Para la recolección de los productos se muestrearon tanto a granel como la versión empaquetada.

3.- pH de la muestra: Durante el análisis de los productos de medió el pH de la muestra, este parámetro influye en el crecimiento adecuado de los microorganismos

4.- Carga microbiana: Esta variable se define por la cantidad de microorganismos o bien la presencia o ausencia de los mismos en la muestra, esto ayudará a definir si la muestra cumple o no con los límites establecidos por la NOM-158-SCFI-2003

para establecer la calidad microbiológica del jamón cocido. Los microorganismos a considerar son; Mesófilos Aerobios, coliformes totales, coliformes fecales, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y el recuento de hongos y levaduras.

Variable dependiente.

La calidad microbiológica de las muestras se consideró como la variable dependiente.

E) Tamaño de muestra

Para determinar las marcas de jamón de mayor consumo se consideró el cálculo del tamaño de muestra poblacional mediante el siguiente procedimiento estadístico. El número de encuestas a realizar, se determinó en base a la siguiente fórmula:

$$n = \frac{t^2 * p(1 - p)}{m^2}$$

Dónde:

n = tamaño de la muestra requerido

t = nivel de confianza de 95% (valor estándar de 1.96)

p = homogeneidad estimada de la zona del proyecto (0.5)

m = margen de error de 5% (valor estándar de 0.05)

Considerando un 95% de confianza, homogeneidad de 0.5, margen de error de 5%, efecto del diseño e imprevistos.

Habiendo sido considerados estos criterios, el resultado fue de 810 encuestas distribuidas en las 9 delegaciones de la ciudad de Tijuana.

F) Parte Estadística.

Datos agrupados. Los datos se agruparon por delegación contra parámetro microbiológico como: recuento de mesófilos aerobios, recuento de coliformes totales, recuento de *E. coli*, Recuento de hongos y levaduras, determinación de *Salmonella* spp y recuento de *Staphylococcus aureus*.

- a. Tratamiento de datos. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el software estadístico Excel 2010 para determinar el perfil sanitario de las muestras analizadas.
- b. Tipo de gráficos. Los resultados se expresan mediante histogramas, gráfico de línea y diagramas de pastel.

PROCEDIMIENTO

A) Tratamiento general de la muestra

Como se muestra en la Figura 2, las muestras se transportan y conservan de 2 a 8 grados centígrados hasta su procesamiento, se preparan para su análisis de acuerdo la normatividad correspondiente para cada parámetro microbiológico y se analizan de acuerdo a la NOM-158-SCFI-2003, se incluyen controles positivos, controles negativos y blancos de esterilidad para las determinaciones, se recopilan y analizan los resultados para definir si las muestras cumplen con los criterios de la calidad microbiológica según dicha norma.

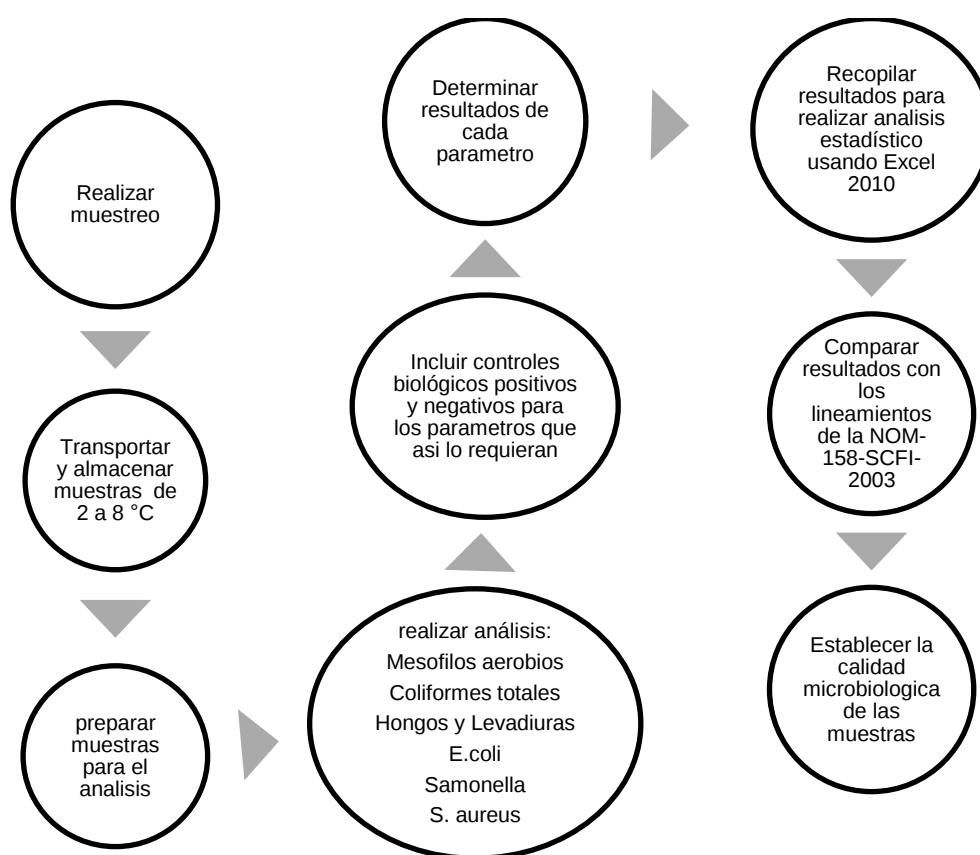


Figura 2. Diagrama general de seguimiento de la muestra.

B) Muestreo

Las muestras se transportan al laboratorio después de acudir a los centros de venta de las 9 delegaciones, empleando sus empaques de procedencia, se confirma que la muestra sea de al menos 100g, se identifica la muestra y se toma la temperatura en el sitio de muestreo, se transporta al laboratorio de 2 a 8 grados centígrados, en la Figura 3 se presenta el diagrama de flujo que aplica a este muestreo. Ver Anexo 1 para consultar equipo y material de muestreo.

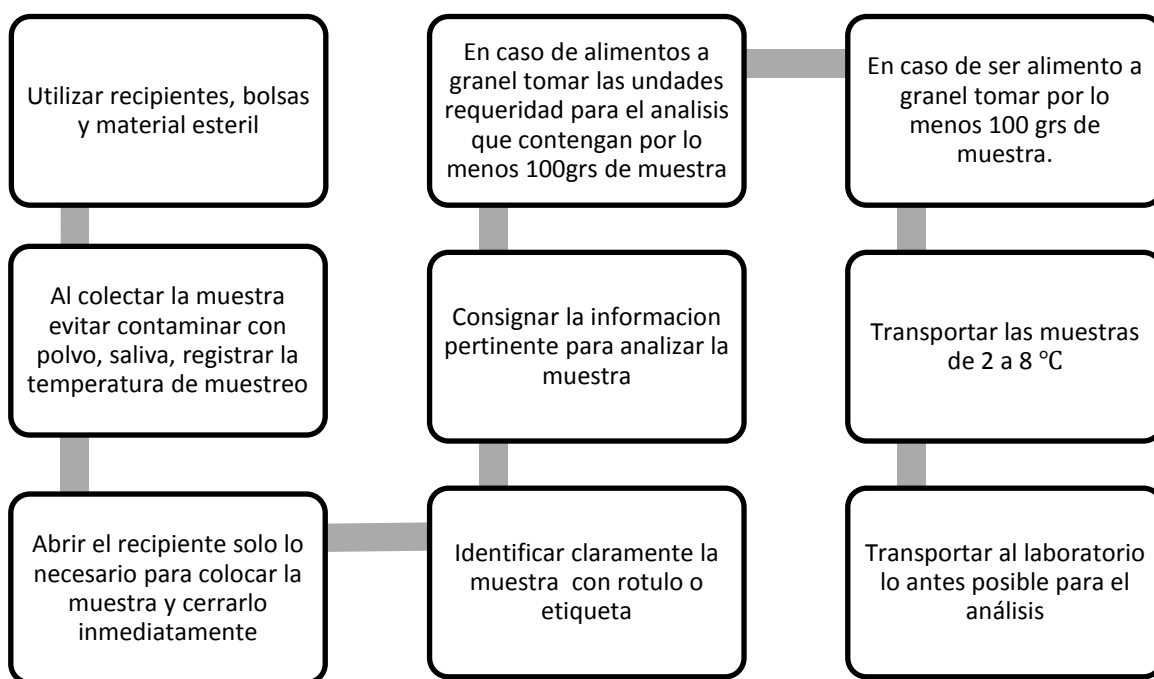


Figura 3. Diagrama de Muestreo

C) Análisis microbiológicos de las muestras.

Una vez en el laboratorio se procede a la preparación de las muestras para su análisis, empleando los procedimientos de las siguientes normas oficiales:

- ❖ Coliformes totales, NOM-113-SSA1-1994.
- ❖ Mesófilos aerobios, NOM-092-SSA1-1994.
- ❖ Hongos y levaduras, NOM-111-SSA1-1994.
- ❖ *Escherichia coli*, NOM-112-SSA1-1994.
- ❖ *Salmonella spp*, NOM-114-SSA1-1994.
- ❖ *Staphylococcus aureus*, NOM-115-SSA1-1994.

Ver anexo 2 para consultar las normas oficiales correspondientes con cada diagrama.

Determinación de Mesófilos aerobios según la NOM-092-SSA1-1994.

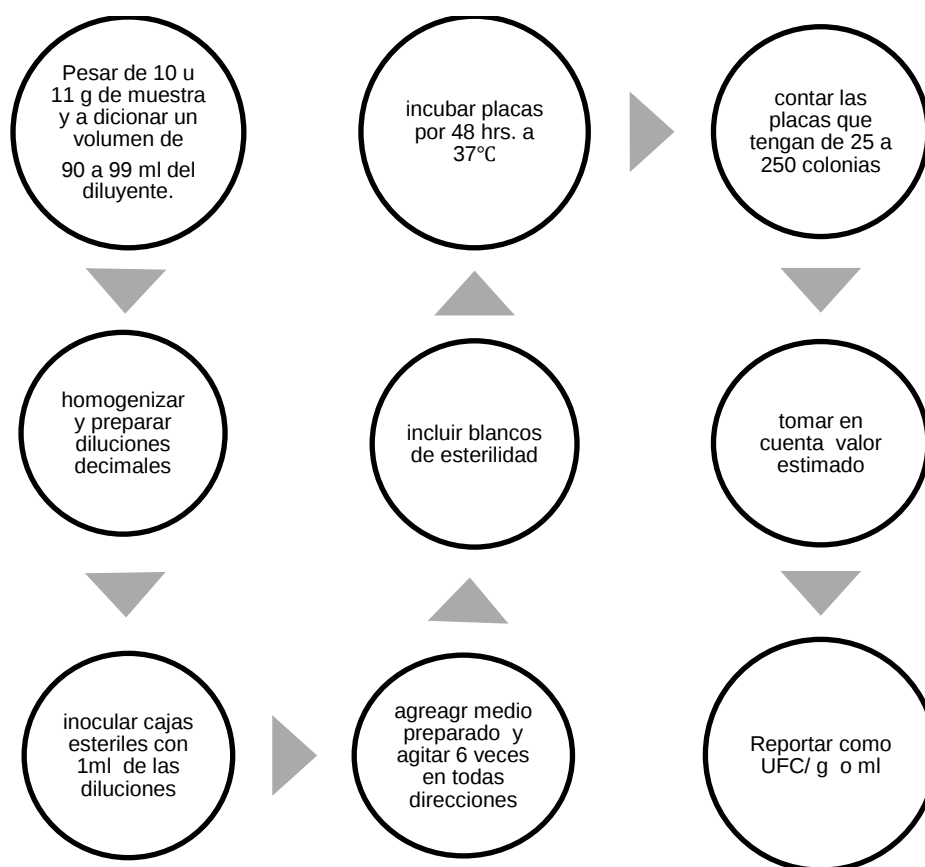


Figura 4. Determinación de Mesófilos aerobios según la NOM-092-SSA1-1994.

Recuento de coliformes totales según la NOM-112-SSA1-1994.

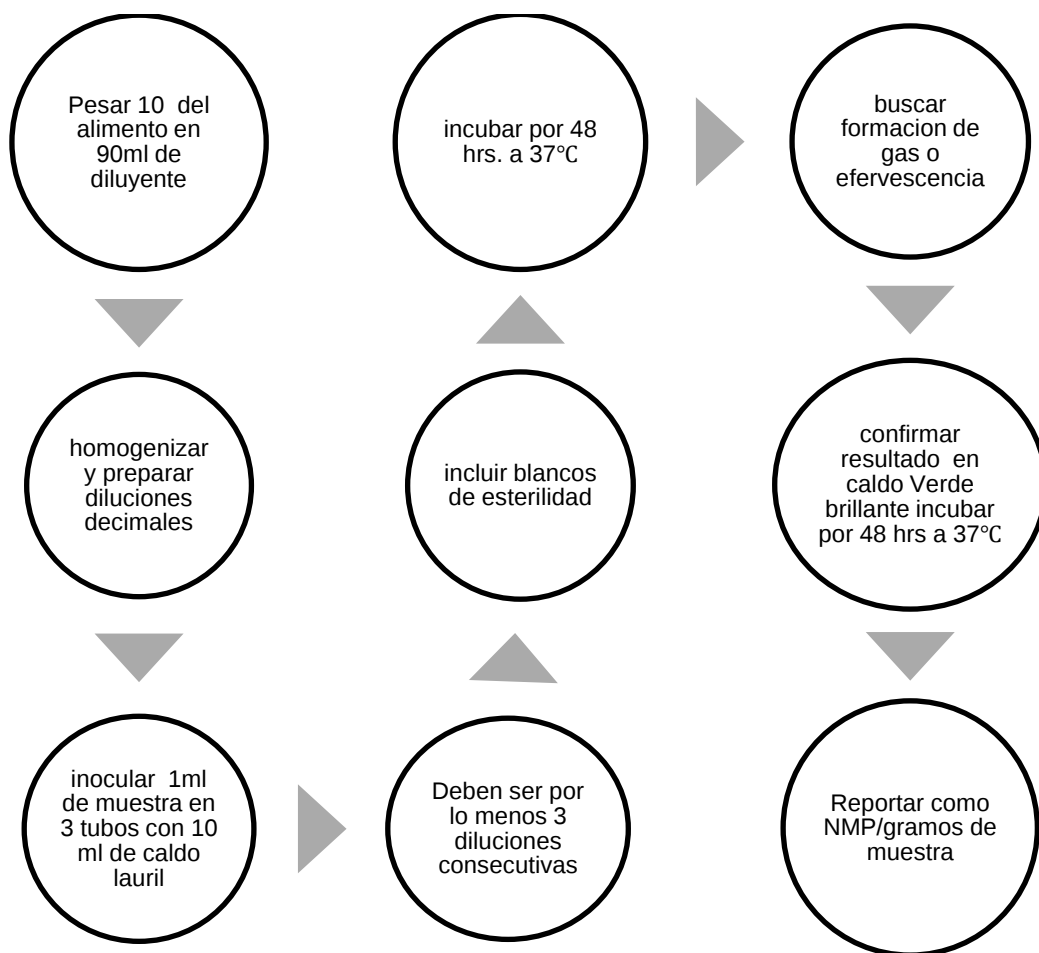


Figura 5. Recuento de coliformes totales según la NOM-112-SSA1-1994

Recuento de coliformes fecales y *E. coli* con la NOM-112-SSA1-1994.

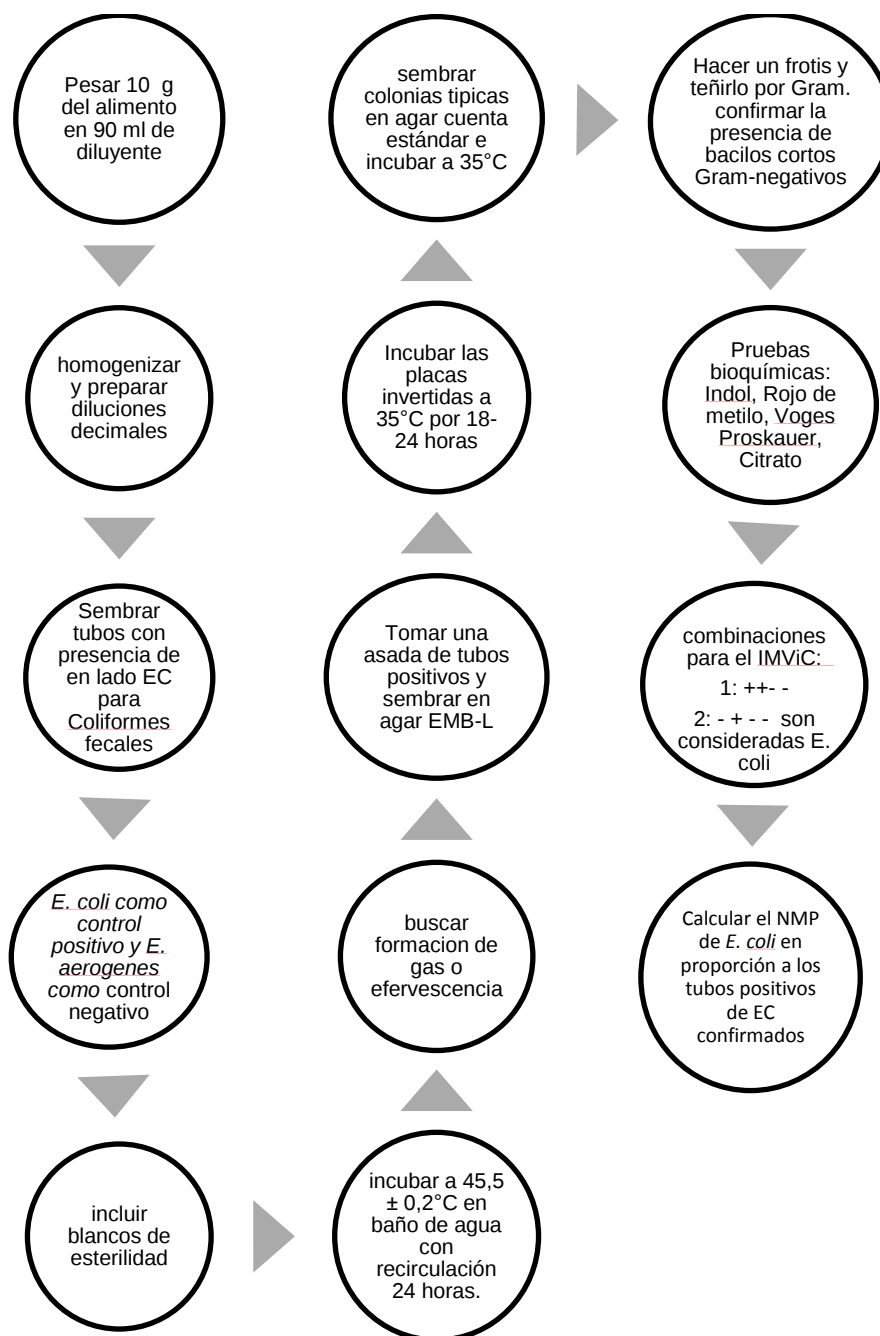


Figura 6. Recuento de coliformes fecales y *E. coli* con la NOM-112-SSA1-1994.

Recuento de hongos y levaduras según la NOM-111-SSA1-1994.

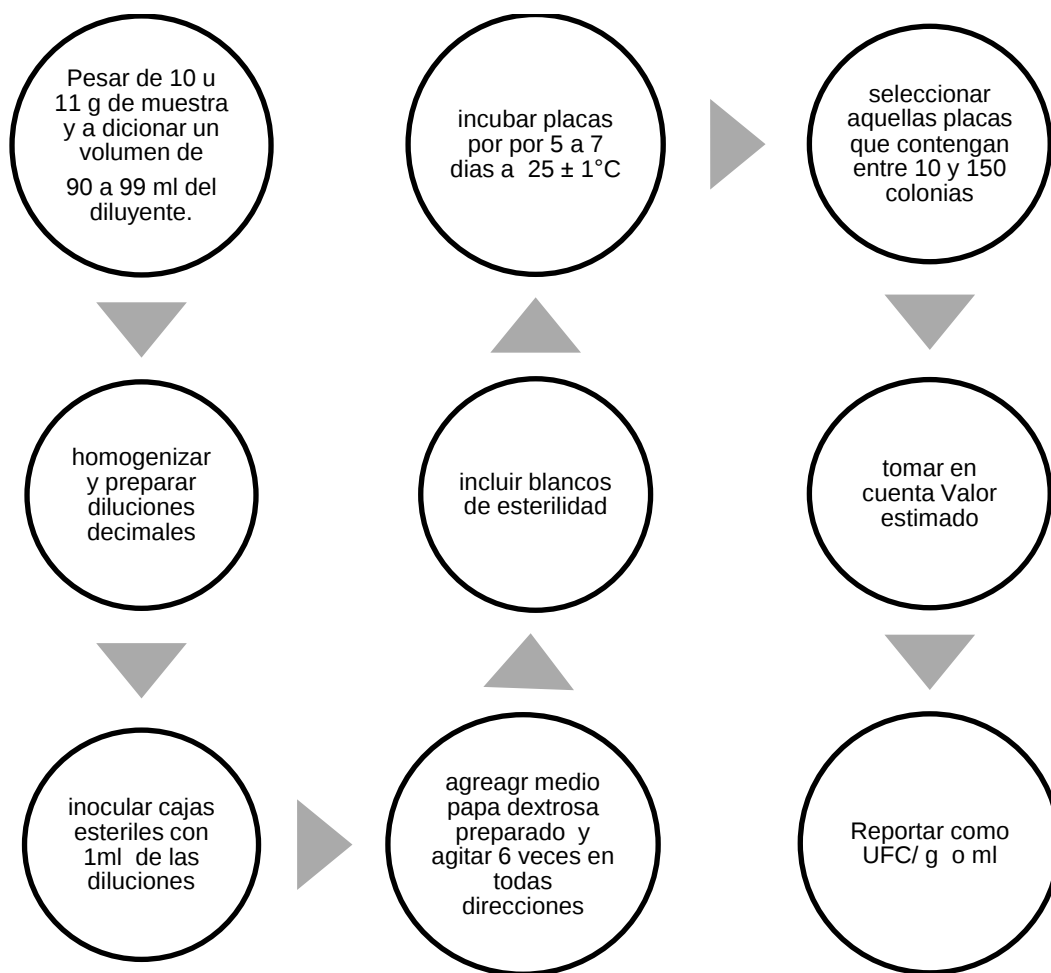


Figura 7. Recuento de hongos y levaduras según la NOM-111-SSA1-1994

Determinación de *Salmonella* spp según la NOM-114-SSA1-1994

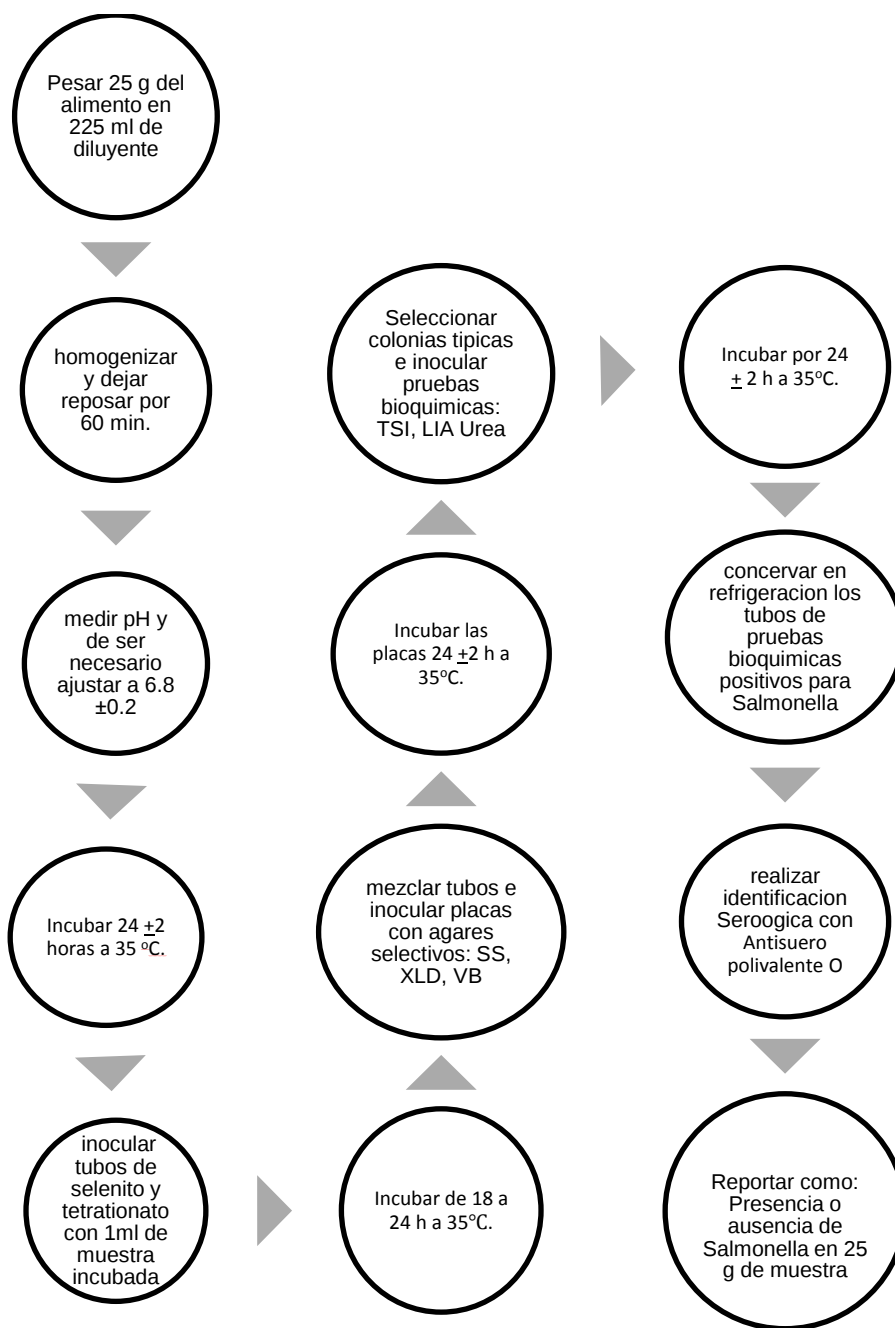


Figura 8. Determinación de *Salmonella* spp según la NOM-114-SSA1-1994

Determinación de *S. aureus* según la NOM-115-SSA1-1994.



Figura 9. Determinación de *S. aureus* según la NOM-115-SSA1-1994.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para detección de gen *mecA* en *S. aureus*.

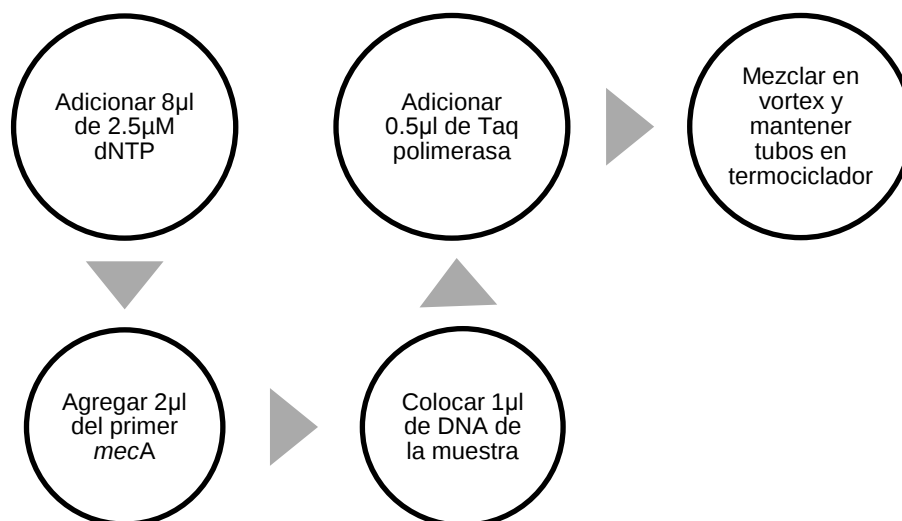


Figura 10. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para detección de gen *mecA* en *S. aureus*.

Condiciones de reacción:

1. 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto
2. Anillamiento a 55°C por 1 minuto
3. Extensión a 72°C por 2 minutos
4. Conservación a 4°C
5. Electroforesis de los productos en gel de agarosa al 1.2% por 35 minutos/100v (Islam et al., 2011).

Tabla 2. Secuencias de los oligonucleótidos y su localización en el gen *mecA*.

Gen	Primer	Secuencia	Longitud del producto	Localización (No. De nucleótidos)
<i>mecA</i>	mecA1	(+) AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	533	1282-1303
	mecA2	(-) GTTCTGCAGTACCGGATTTGC		1739-1814

D) Obtención de resultados.

Una vez desarrolladas los procedimientos, todos los resultados se registran en la bitácora asignada por el Laboratorio de Análisis Microbiológico de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, los datos se agrupan y se realiza un análisis estadístico que permite comparar los resultados con los límites permisibles de las normas.

E) Determinar la calidad microbiológica

Se determina con base a la comparación entre los resultados obtenidos durante los análisis con los límites de cada parámetro permitidos por la NOM-158-SCFI-2003, como se muestra en la Tabla 3, si las muestras no cumplen con al menos uno de los límites permisibles, se considera que el producto no cumple con la norma, por lo tanto carece de calidad microbiológica.

Tabla 3. Límites permisibles en muestras de jamón.

Parámetro	Límite permisible
Mesófilos Aerobios	Empaquetado ≤ 100000 UFC/g, Granel ≤ 600000 UFC/g
Coliformes totales	< 10 UFC/g ó < 3 NMP/g
Coliformes fecales	< 10 UFC/g ó < 3 NMP/g
<i>E. coli</i>	Ausente
Salmonella	Ausente
<i>S. aureus</i>	Empaquetado ≤ 100 UFC/g, Granel ≤ 1000 UFC/g
Hongos y levaduras	< 10 UFC/g

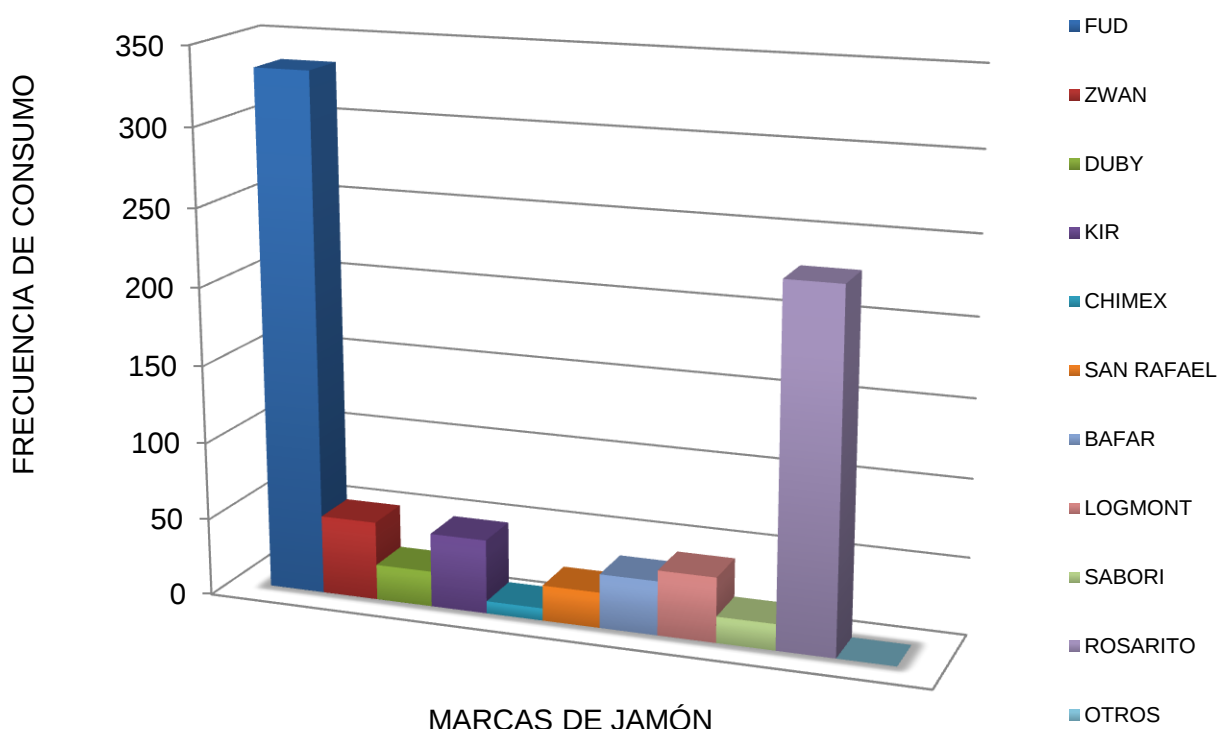
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de aplicar las encuestas, los resultados obtenidos se recopilaron como se muestra en la Tabla 4, incluyendo la cantidad de encuestados que consumen las diferentes marcas en cada delegación. Se aplicaron un total de 810 encuestas distribuidas en las 9 delegaciones de la ciudad de Tijuana, como se muestra en la Tabla 4, los resultados obtenidos son los siguientes:

Tabla 4. Frecuencias para determinar el consumo de jamón por delegación según el numero de encuestados.

FUD	ZWAN	DUBY	KIR	CHIMEX	SAN RAFAEL	BAFAR	LOGMONT	SABORI	ROSARITO	OTROS	DELEGACIÓN
53	12	0	0	0	11	0	0	0	14	0	Playas
34	11	0	6	0	5	0	10	3	21	0	Otay
27	8	0	4	0	3	1	6	4	37	0	Sánchez Taboada
37	0	0	12	0	4	0	3	2	32	0	Centenario
18	2	12	6	0	0	16	5	2	29	0	San Antonio de los Buenos
28	0	3	9	2	0	6	13	0	29	0	Cerro colorado
57	0	0	0	0	0	5	5	0	23	0	Centro
55	18	0	0	0	0	0	0	6	11	0	La mesa
25	0	8	11	6	0	7	0	0	33	0	La presa
334	51	23	48	8	23	35	42	17	229	0	TOTAL 810

Se seleccionaron las dos marcas con mayor consumo, para analizarlas en sus presentaciones a granel y empaquetada. Como se muestra en la Gráfica 1, las marcas seleccionadas fueron FUD y Rosarito, las cuales presentaron un mayor consumo global. Luego de la elección estas marcas se etiquetaron al azar como Marca 1 y Marca 2.



Gráfica 1. Consumo general de jamón.

El número de muestras se determinó por la cantidad de marcas, las variantes en los empaques, las delegaciones que integran la ciudad y el número de muestreos realizados, esto es, dos marcas, dos presentaciones, nueve delegaciones y dos muestreos consecutivos, que integraban un total de 72 muestras.

Los datos contenidos en la Tabla 5 muestran los resultados de todas las determinaciones para cada una de las 72 muestras analizadas, dicha tabla contiene la siguiente información:

Numero de muestra asignado, marca, presentación del empaque, la delegación de procedencia, el promedio del recuento de mesófilos aerobios (MA UFC/g), los recuentos en número más probable de coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli*, recuento de hongos y levaduras (Hongos UFC/g), recuento de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus* UFC/g) y el resultado de la detección de la presencia o ausencia de *Salmonella spp.*

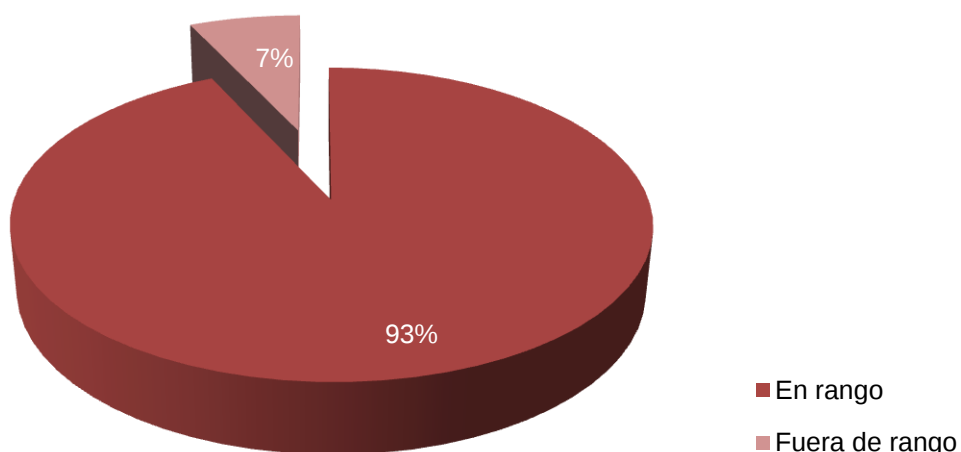
Las muestras DB-005, DB-013, DB-021, DB-037, DB-039, DB-044, DB-045, DB-047, DB-049, DB-053, DB-054, DB-057, DB-059 y DB-071 están dentro de los límites que se establecen para cada parámetro según la NOM-158-SCFI-2003

Tabla 5. Datos agrupados de los resultados para todos los parámetros analizados.

No. Muestra	DELEGACIÓN	MA UFC/g	CT NMP/g	CF NMP/g	E. coli NMP/g	Hongos UFC/g	S. aureus UFC/g	Salmonella
DB-001	Cerro colorado	48000	3.6	3.6	3.6	740	<10	Ausente en 25g
DB-002	Cerro colorado	44000	3.6	3.6	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-003	Cerro colorado	56000	3.6	3.6	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-004	Cerro colorado	73000	3.6	<3	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-005	Sánchez Taboada	59000	<3	<3	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-006	Sánchez Taboada	110000	3.6	3.6	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-007	Sánchez Taboada	56000	9.2	9.2	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-008	Sánchez Taboada	180000	23	9.2	9.2	800	<10	Ausente en 25g
DB-009	La mesa	150000	<3	<3	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-010	La mesa	49000	3.6	3.6	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-011	La mesa	97000	23	23	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-012	La mesa	180000	36	36	36	<10	<10	Ausente en 25g
DB-013	Otay	87000	<3	<3	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-014	Otay	52000	23	23	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-015	Otay	110000	3.6	<3	<3	620	<10	Ausente en 25g
DB-016	Otay	150000	43	43	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-017	Centenario	120000	<3	<3	<3	100	<10	Ausente en 25g
DB-018	Centenario	180000	93	93	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-019	Centenario	120000	93	<3	<3	300	3000	Ausente en 25g
DB-020	Centenario	70000	9.2	9.2	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-021	La presa	87000	<3	<3	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-022	La presa	74000	43	43	<3	200	<10	Ausente en 25g
DB-023	La presa	190000	9.2	<3	<3	<10	2100	Ausente en 25g
DB-024	La presa	63000	93	93	93	<10	<10	Ausente en 25g
DB-025	San Antonio de los Buenos	77000	240	240	240	<10	<10	Ausente en 25g
DB-026	San Antonio de los Buenos	75000	>1100	<3	<3	<10	5600	Ausente en 25g
DB-027	San Antonio de los Buenos	94000	43	<3	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-028	San Antonio de los Buenos	65000	>1100	>1100	>1100	400	4400	Ausente en 25g
DB-029	Playas de Tijuana	60000	<3	<3	<3	770	<10	Ausente en 25g
DB-030	Playas de Tijuana	72000	23	23	23	<10	6400	Ausente en 25g
DB-031	Playas de Tijuana	50000	23	23	23	600	<10	Ausente en 25g
DB-032	Playas de Tijuana	77000	<3	<3	<3	500	3600	Ausente en 25g
DB-033	Centro	49000	240	240	240	500	<10	Ausente en 25g
DB-034	Centro	88000	93	93	93	900	<10	Ausente en 25g
DB-035	Centro	66000	23	23	23	<10	<10	Ausente en 25g
DB-036	Centro	140000	>1100	>1100	>1100	<10	11200	Ausente en 25g
DB-037	La presa	57000	<3	<3	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-038	La presa	100000	15	15	15	<10	<10	Ausente en 25g
DB-039	La presa	41000	<3	<3	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-040	La presa	74000	240	240	240	600	<10	Ausente en 25g
DB-041	Sánchez Taboada	74000	<3	<3	<3	150	<10	Ausente en 25g
DB-042	Sánchez Taboada	64000	<3	<3	<3	400	<10	Ausente en 25g
DB-043	Sánchez Taboada	21000	<3	<3	<3	200	<10	Ausente en 25g
DB-044	Sánchez Taboada	51000	<3	<3	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-045	La mesa	64000	<3	<3	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-046	La mesa	71000	240	240	240	2100	<10	Ausente en 25g
DB-047	La mesa	29000	<3	<3	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-048	La mesa	78000	240	240	240	300	<10	Ausente en 25g
DB-049	Centenario	54000	<3	<3	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-050	Centenario	67000	15	15	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-051	Centenario	52000	<3	<3	<3	150	<10	Ausente en 25g
DB-052	Centenario	68000	240	240	240	<10	<10	Ausente en 25g
DB-053	Otay	29000	<3	<3	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-054	Otay	64000	<3	<3	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-055	Otay	74000	<3	<3	<3	200	<10	Ausente en 25g
DB-056	Otay	71000	3.6	3.6	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-057	Cerro colorado	14000	<3	<3	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-058	Cerro colorado	57000	1100	1100	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-059	Cerro colorado	42000	<3	<3	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-060	Cerro colorado	87000	460	460	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-061	San Antonio de los Buenos	37000	93	93	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-062	San Antonio de los Buenos	54000	240	240	240	500	<10	Ausente en 25g
DB-063	San Antonio de los Buenos	31000	93	23	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-064	San Antonio de los Buenos	38000	43	<3	<3	200	<10	Ausente en 25g
DB-065	Playas de Tijuana	23000	43	<3	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-066	Playas de Tijuana	51000	>1100	>1100	>1100	<10	<10	Ausente en 25g
DB-067	Playas de Tijuana	23000	>1100	23	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-068	Playas de Tijuana	58000	<3	<3	<3	800	<10	Ausente en 25g
DB-069	Centro	42000	93	<3	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-070	Centro	62000	23	<3	<3	300	<10	Ausente en 25g
DB-071	Centro	25000	<3	<3	<3	<10	<10	Ausente en 25g
DB-072	Centro	10000	43	23	23	<10	<10	Ausente en 25g

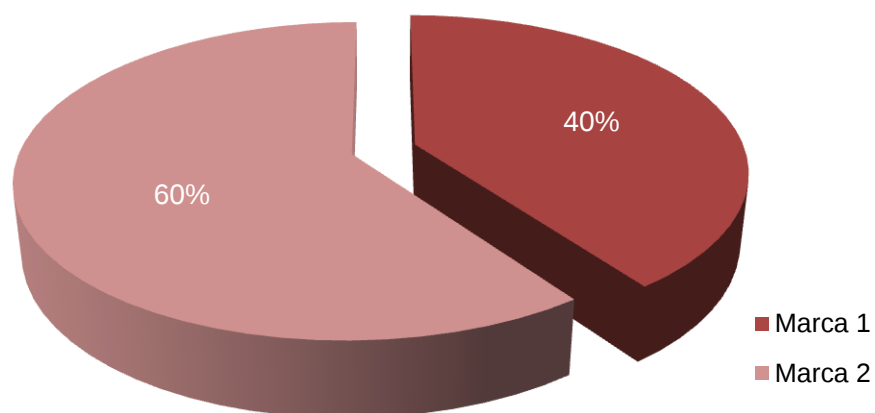
Resultados Mesófilos Aerobios.

De un total de 72 muestras analizadas en las nueve delegaciones de la ciudad, se detectaron cinco muestras de producto empaquetado que sobrepasaron el límite para mesófilos aerobios. Corresponde al 7% con respecto al total de las muestras. En un estudio realizado por Ávila en el año 2013, se analizaron 102 marcas de jamón cocido y el porcentaje de muestras fuera de los límites permisibles fue de 3.9%, resultado cercano al obtenido en el presente estudio como se muestra en la Grafica 2.



Gráfica 2. Recuento de Mesófilos Aerobios.

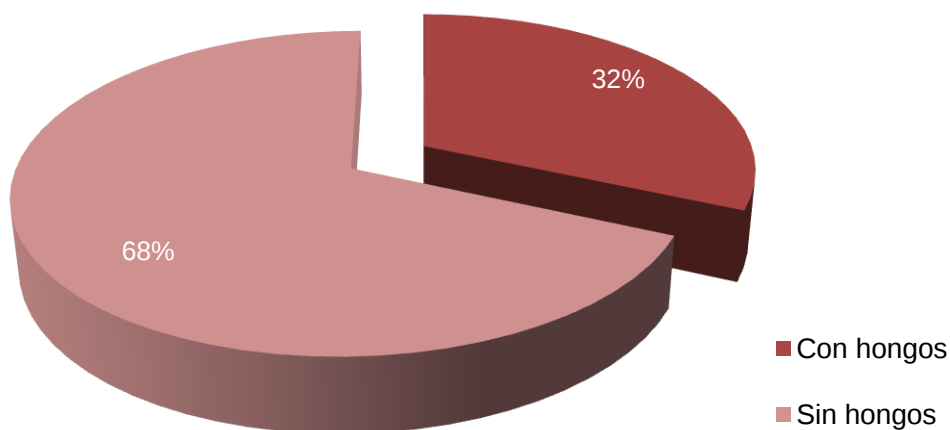
En la Gráfica 3 se muestra el porcentaje de contaminación de mesofilos aeribios para cada marca. La Marca 2 fue la que obtuvo un mayor numero de muestras contaminadas, de las cinco muestras que sobrepasaron este parámetro, tres corresponden a la Marca 2.



Gráfica 3. Mesófilos aerobios por marca.

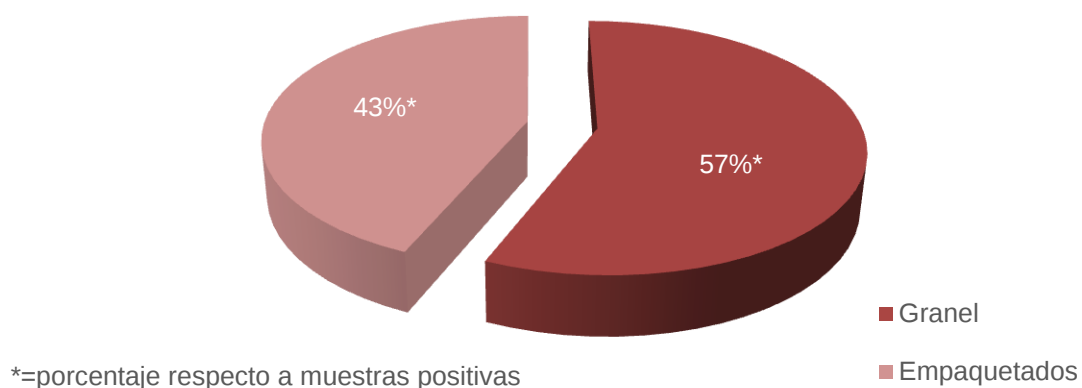
Resultados hongos y levaduras.

De un total de 72 muestras analizadas, el 32% muestras de producto sobre pasaron el límite de $<10\text{UFC/g}$ para hongos y levaduras como se observa en la Gráfica 4. En un estudio realizado por Afshin en el año 2011 en Irán, detectaron la presencia de hongos y levaduras en las muestras de jamón pero éstas no sobrepasaron los límites permisibles por la normatividad del país, no fue sino hasta cuatro semanas después de la fecha de caducidad cuando las muestras rebasaron los límites de este parámetro.



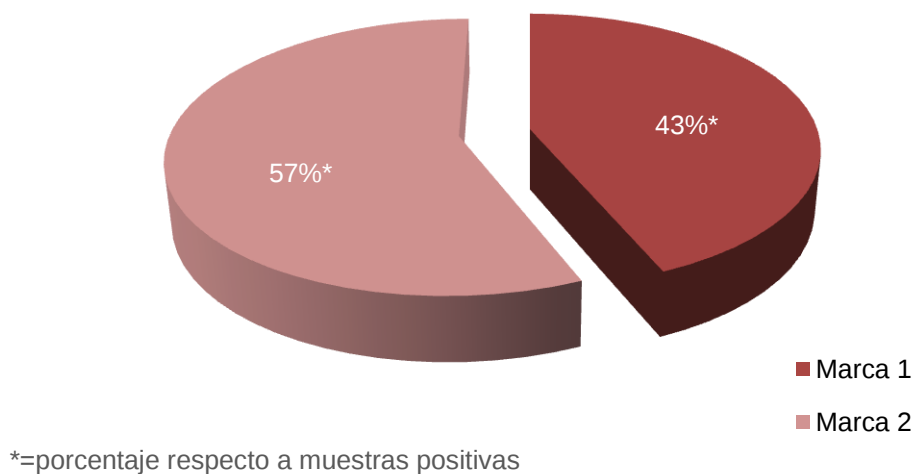
Gráfica 4. Presencia de hongos y levaduras.

De las 23 muestras que sobrepasaron el límite permisible para hongos y levaduras 10 (43%*) correspondieron a muestras empaquetadas y 13 (57%*) a granel, como se muestra en la Gráfica 5



Gráfica 5 . Presencia de hongos y levaduras por empaque

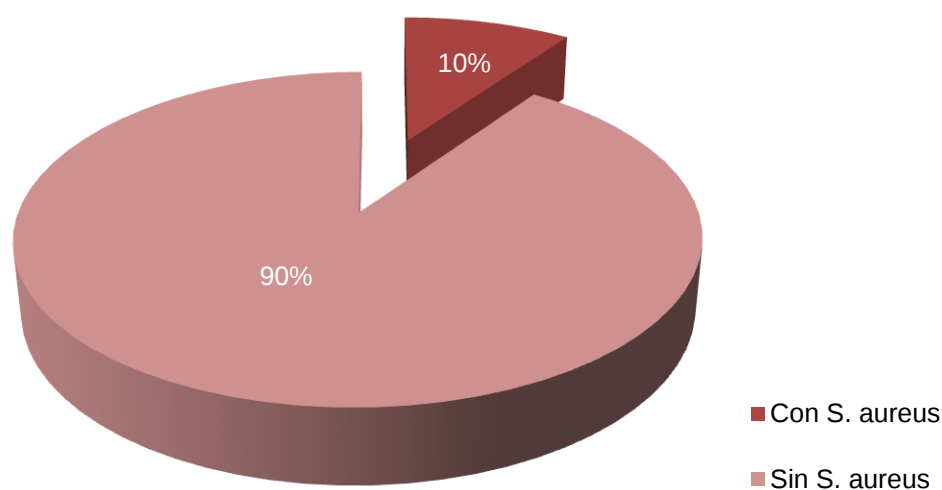
De las 23 muestras con presencia de hongos y levaduras, el 43%* corresponde a la Marca 1 y el 57%* a la Marca 2, como se muestra en la gráfica 6.



Gráfica 6 . Hongos y levaduras por marca.

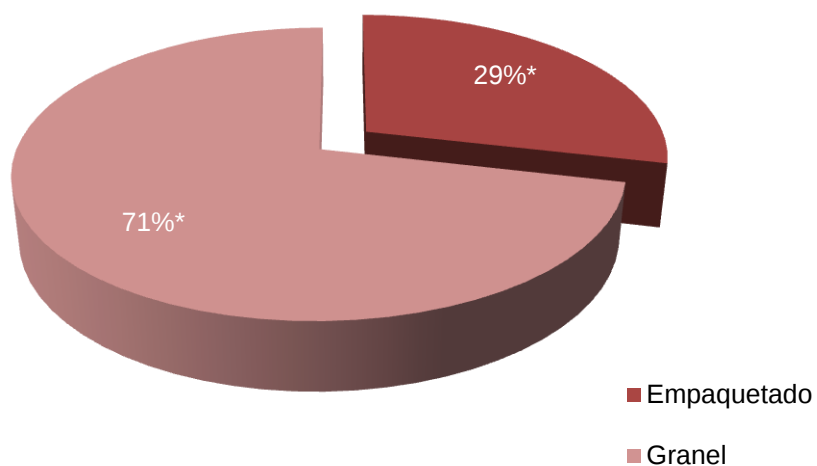
Resultados *Staphylococcus aureus*

La Gráfica 7 muestra la presencia de *Staphylococcus aureus* en siete de las 72 muestras analizadas (10%) con valores desde 2100 UFC/g hasta 11200 UFC/g. En comparación con el estudio realizado por Ávila en 2013 el porcentaje con respecto a la cantidad de muestras analizadas fue del 6.5% en producto cocido.



Gráfica 7 . Presencia de *Staphylococcus aureus*.

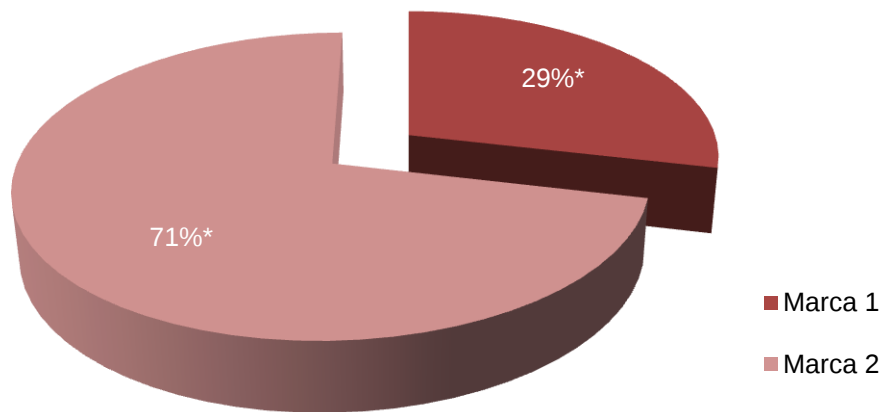
De acuerdo a la Gráfica 8, de las siete muestras positivas para *Staphylococcus aureus*, el 29%* correspondieron a muestras empaquetadas y 71%* a muestras a granel.



*=porcentaje respecto a muestras positivas

Gráfica 8 . Presencia de *Staphylococcus aureus* por empaque.

De las siete muestras positivas para *Staphylococcus aureus*, dos (29%*) correspondieron a la Marca 1 y cinco (71%*) a la Marca 2, como se muestra en la Gráfica 9.



*=porcentaje respecto a muestras positivas

Gráfica 9 . Presencia de *Staphylococcus aureus* por marca.

Debido a la propagación de cepas resistentes de este microorganismo, posterior al análisis microbiológico, se realizó la búsqueda del gen *mecA* de resistencia a meticilina a las cepas identificadas como *Staphylococcus aureus*, siendo la resistencia antimicrobiana uno de los principales problemas de salud pública en la actualidad, es importante conocer si los microorganismos están obteniendo dicha capacidad desde el momento en que contaminan un alimento, al ser *S. aureus* uno de los principales agentes causales de ETA es importante conocer si al momento de consumir alimentos se está adquiriendo una cepa resistente ya que la infección adquirida por un microorganismo con esta capacidad es más difícil de tratar y erradicar. El análisis por PCR no detectó la presencia del gen en ninguna de las 7 muestras. El resultado de dicho análisis se muestra en la Figura 11.

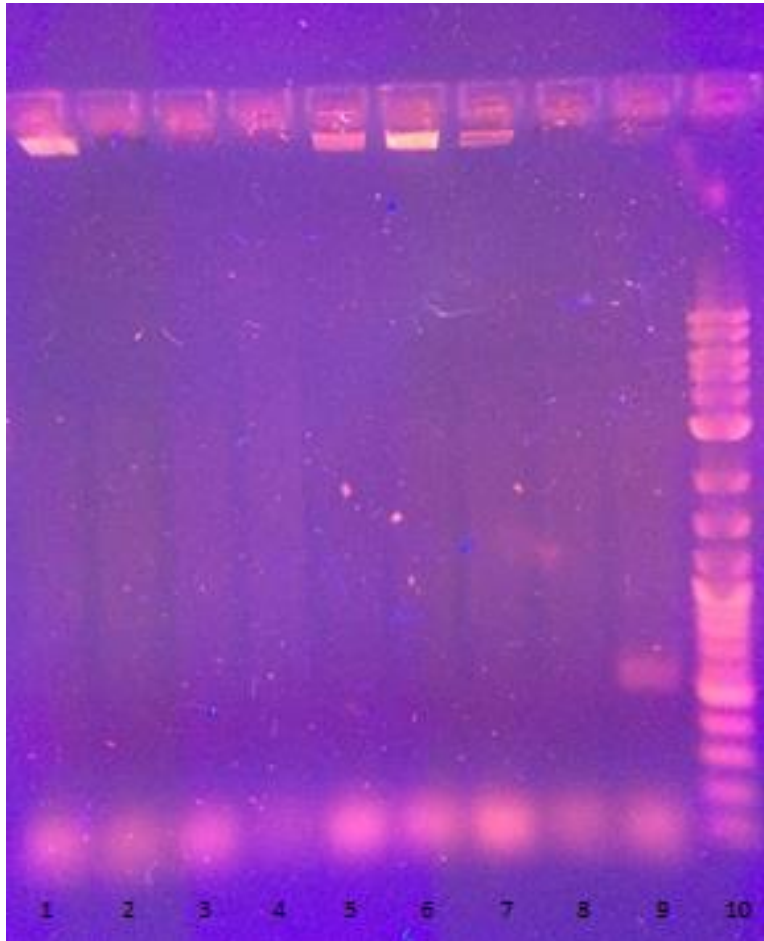


Figura 11 . Electroforesis para detección del gen mecA.

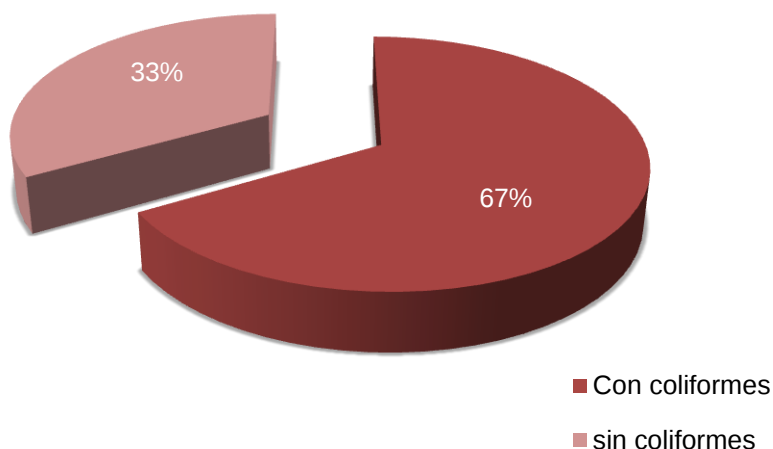
Los carriles 1 al 7 corresponden a las muestras identificadas como *Staphylococcus aureus*. El carril 8 corresponde a una cepa de control negativo, el carril 9 es una cepa control positivo que muestra la presencia del gen mecA. En el carril 10 se encuentra el marcador de peso molecular.

Resultados *Salmonella* spp.

No se detectó la presencia de *Salmonella* spp en ninguna de las muestras, lo cual es consistente con los resultados de Buelvas en el año 2012, ya que en su estudio tampoco hubo detección de este patógeno en esta clase de muestras.

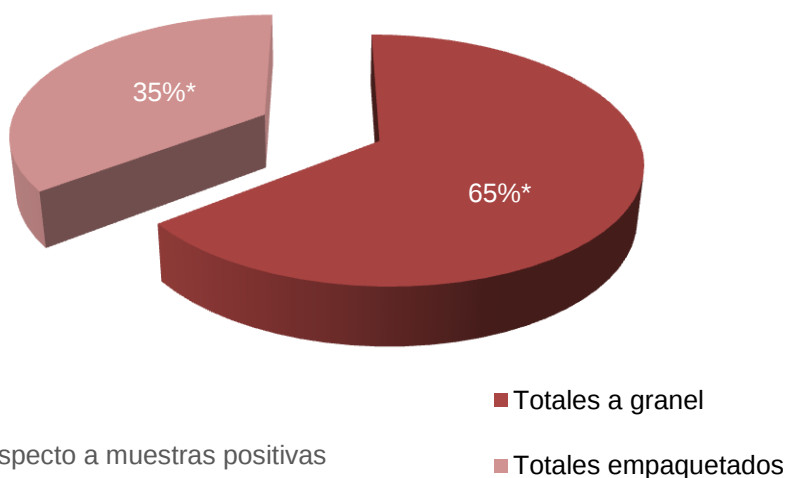
Resultados Coliformes Totales

Como se muestra en la Gráfica 10, de las 72 muestras analizadas, 48 muestras (67%) mostraron presencia de coliformes totales por encima del límite permisible de <3NMP/g.



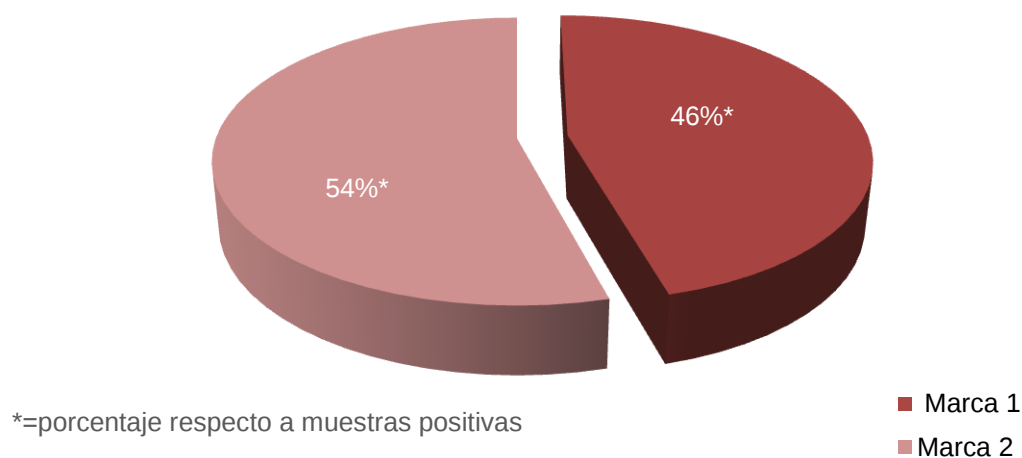
Gráfica 10 . Presencia de coliformes totales

Como se observa en la Gráfica 11, de las 48 muestras positivas, 31 (65%*) muestras fueron de producto granel y 17 (35%*) muestras de producto empaquetado.



Gráfica 11. Presencia de coliformes totales por empaque.

En total resultaron 48 muestras positivas para coliformes totales, el 46%* fue de las muestras contaminadas fueron de la Marca 1 y el 54%* de la Marca 2, tal como se observa en la Gráfica 12.

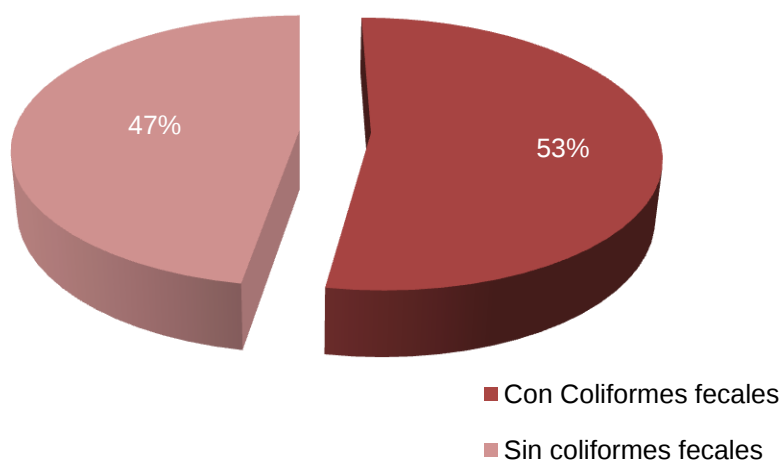


Gráfica 12 . Presencia de coliformes totales por marca

Los resultados obtenidos en el presente estudio contrastan con los encontrados en el estudio de Ossa en el año 2010 donde no se detectó la presencia de coliformes totales ni fecales en las 10 marcas de jamón cocido que analizaron en su estudio.

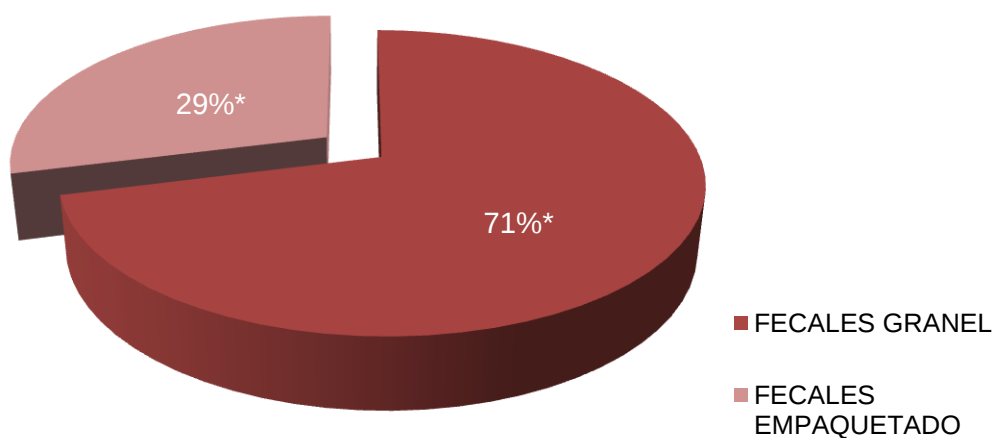
Resultados Coliformes Fecales.

De las 72 muestras analizadas, 38 muestras (53%) mostraron presencia de coliformes fecales por encima del límite permisible de $<3\text{NMP/g}$ como se muestra en la Gráfica 13. Los porcentajes expresados en las Gráficas 10 y 13 para la presencia de coliformes totales y coliformes fecales (respectivamente) son consistentes con los obtenidos por Iriarte en el 2011, ya que en dicho estudio obtuvieron 55% de contaminación en sus muestras para ambos parámetros.



Gráfica 13 . Presencia de coliformes fecales

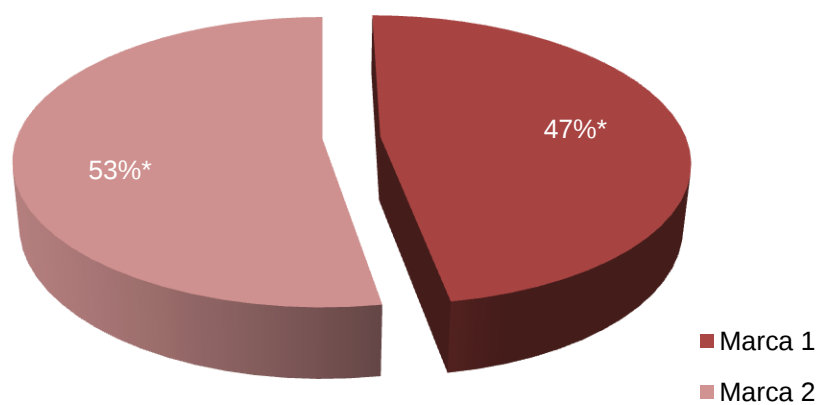
Como se muestra en la Gráfica 14, de las 38 muestras positivas, 27 muestras (71%*) corresponden a producto a granel y 11 muestras (29%*) a producto empaquetado. El resultado indica que las muestras con presentación a granel tienen una mayor contaminación de origen fecal, esto puede ser debido a que sufren una mayor manipulación por los dispensadores, además están expuestos a más cambios de temperatura por las entradas y salidas constantes de los refrigeradores para su dispensación.



*=porcentaje respecto a muestras positivas

Gráfica 14 . Coliformes fecales por empaque

De las 38 muestras positivas para coliformes fecales, 20 (53%*) fueron de la Marca 2 y 18 (47%*) de la Marca 1, en la Gráfica 2 se muestra que la Marca 2 es la más afectada con la presencia de contaminación fecal.

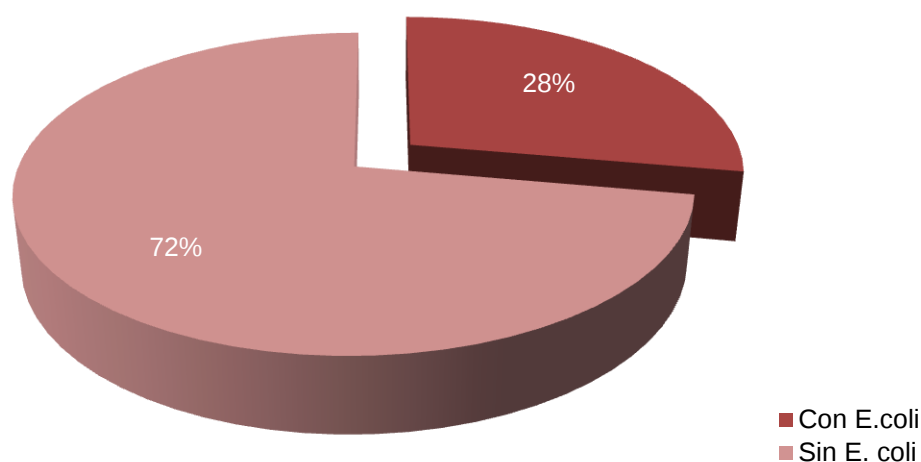


*=porcentaje respecto a muestras positivas

Gráfica 15 . Coliformes fecales por marca.

Resultados *Escherichia coli*.

Se cuantificó e identificó *Escherichia coli* en 20 (28%) de las 72 muestras analizadas con valores desde 9.2 NMP/g hasta >1100NMP/g. Como se muestra en la Gráfica 16.

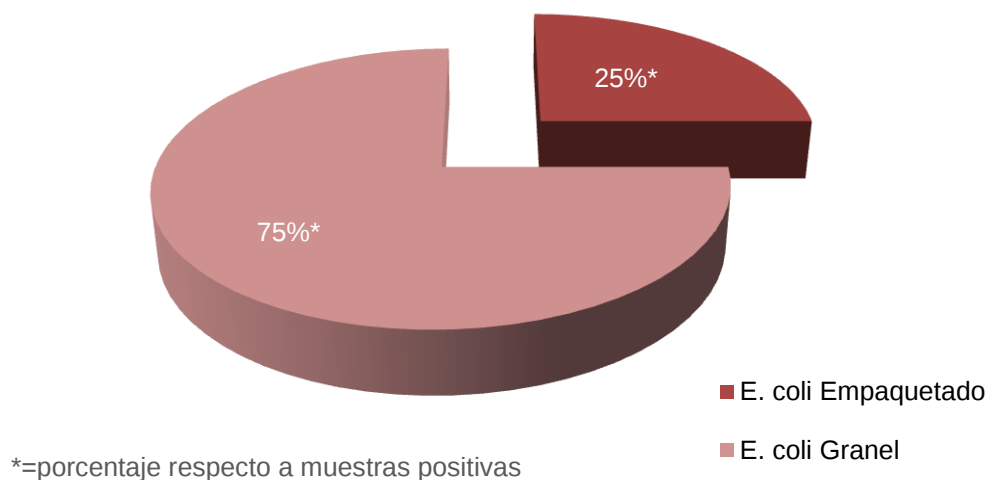


Gráfica 16 .Presencia de *Escherichia coli*

En un estudio realizado por Guerrero en 2013, analizaron muestras de diversos alimentos para detectar la presencia de *E. coli*. Dentro de diversidad de alimentos muestreados, se analizaron 76 muestras de jamón cocido, de las cuales 48 resultaron contaminadas con dicho microorganismo lo que corresponde al 63% del total de sus muestras de jamón analizadas.

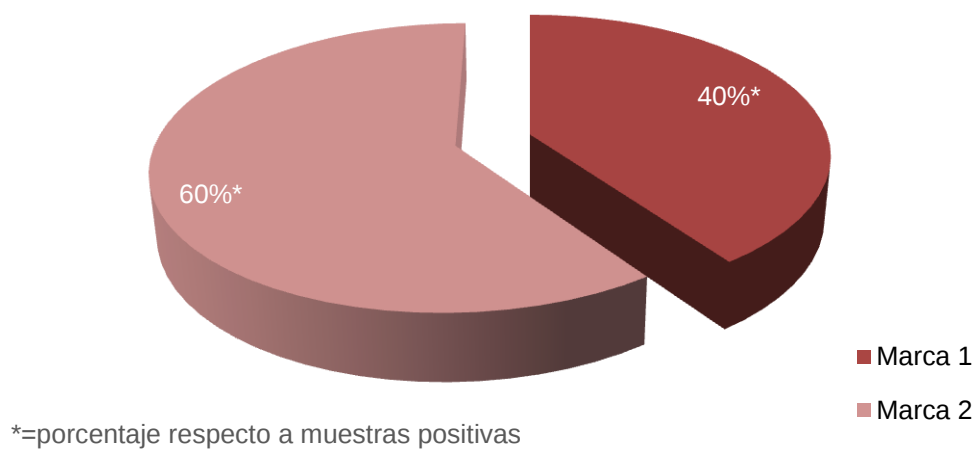
Las muestras analizadas en el estudio de Guerrero al igual que las analizadas en el presente estudio fueron a granel. Como se muestra en la Gráfica 17 obtuvimos un 75% de contaminación, lo cual es consistente con el 63% obtenido por Guerrero y colaboradores.

De las 20 muestras con presencia de *E. coli*, 5 (25%*) correspondieron a muestras empaquetadas y 15 (75%*) a muestras a granel, como se observa en la Gráfica 17.



Gráfica 17 . Presencia de *Escherichia coli* según empaque

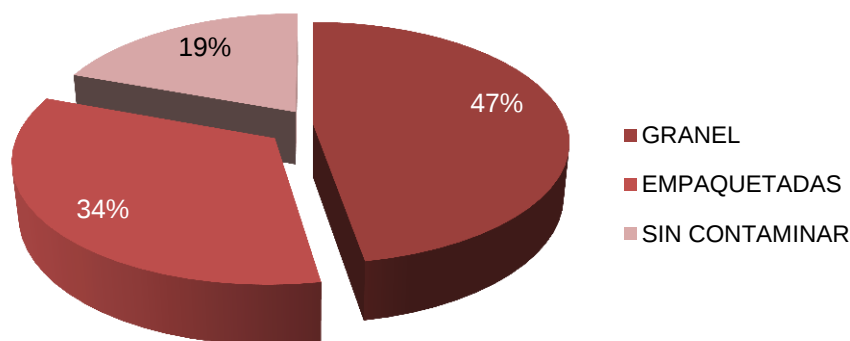
En la Gráfica 18 se observa que de las 20 muestras positivas para la presencia de *E. coli*, 12 (60%*) fueron de la Marca 2 y 8 (40%*) de la Marca 1



Gráfica 18. Presencia de *Escherichia coli* por marca de jamón

Resultados por empaque y delegación

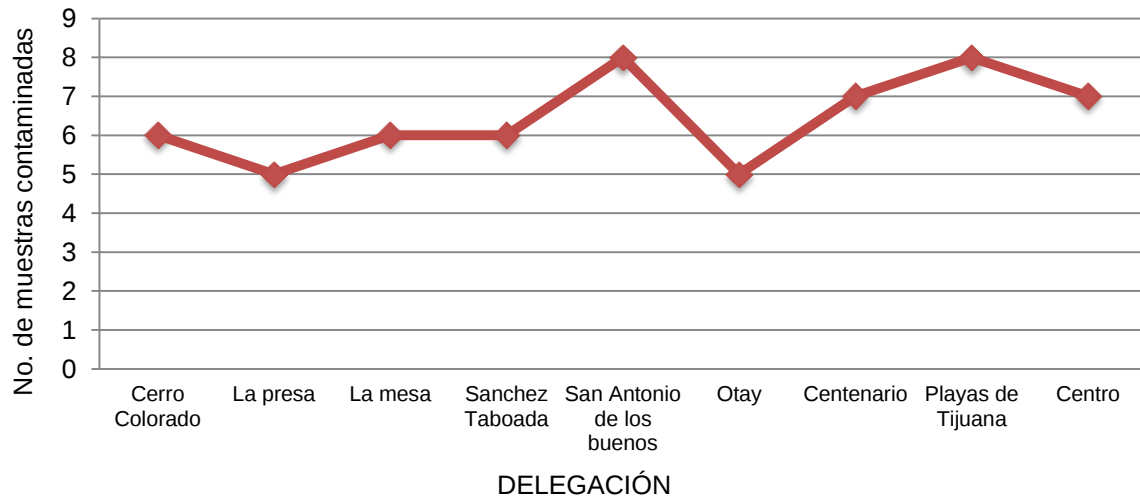
De las 72 muestras analizadas 34 correspondieron a muestras a granel lo cual corresponde a un 47% con respecto al total, mientras que la presentación empaquetada mostró contaminación en 24 de muestras, lo que corresponde a un 34% con respecto al total de muestras, tal como se observa en la Gráfica 19.



Gráfica 19. Distribución de contaminación por empaque.

Tomando en cuenta que durante el estudio se analizaron 36 muestras a granel y 36 muestras empaquetadas, es notorio que solo dos de las muestras a granel mostraron estar dentro de los límites permisibles de cada parámetro, lo cual representa un 94% de contaminación en muestras a granel, contrastando con el 66% de contaminación presente en las muestras empaquetadas con respecto a las 36 muestras analizadas en dicha presentación.

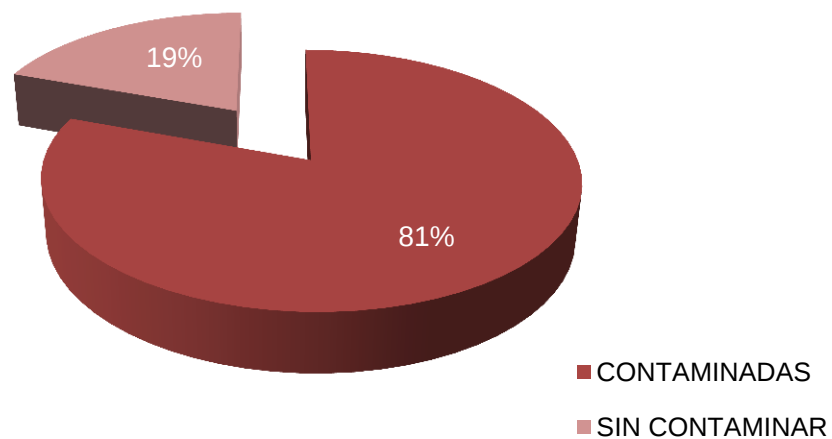
Como se muestra en la gráfica 20, en cuanto a la contaminación en las diferentes delegaciones de la ciudad las que presentaron mayor contaminación fueron San Antonio de los Buenos y Playas de Tijuana, en dichas delegaciones las ocho muestras analizadas mostraron estar fuera del límite permisible en por lo menos uno de los parámetros. Mientras que las delegaciones de La Presa y Otay mostraron contaminación en cinco de las ocho muestras, siendo por lo tanto las zonas con menor contaminación aparente.



Gráfica 20. Distribución de muestras contaminadas por delegación

Se analizaron ocho muestras en cada delegación, la Gráfica 20 muestra la cantidad de muestras por delegación que no cumplieron con los límites definidos en la norma

La Gráfica 21 nos muestra que de las 72 muestras solo 14 (19%) mostraron estar dentro de los límites que establece la NOM-158-SCFI-2003. Las 58(81%) muestras restantes no cumplieron con por lo menos uno de los límites permisibles por dicha norma.



Gráfica 21. Contaminación general de las muestras

LIMITACIONES.

1. La aplicación del instrumento de medición para el consumo de jamón. Las respuestas dadas por los encuestados podrían no representar el consumo real, ya que no hay forma de saber si en realidad es la marca que consumen o simplemente es la que recordaron en el momento.
2. La trazabilidad de las muestras de jamón por lotes. No se obtuvieron las muestras con base al lote al que pertenecían, solo se tomó en cuenta que estuvieran dentro de vigencia en cuanto a caducidad y que pertenecieran a la delegación correspondiente.
3. La obtención de las muestras. No se muestrearon todos los centros de distribución de cada delegación, las muestras se adquirieron al azar en cualquier establecimiento que estuviera dentro de la delegación correspondiente.

FORTALEZAS

1. La infraestructura del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, para el desarrollo de este tipo de estudios.
2. La cobertura del muestreo, se tiene la capacidad para muestrear en todas las delegaciones de la ciudad de Tijuana, B.C.

VIII. CONCLUSIONES

Catorce muestras están dentro de los límites que establece la NOM-158-SCFI-2003, por lo que se considera cumplen con los estándares de calidad.

El 81 % de los productos sobrepasan los límites permitidos por la NOM-158-SCFI-2003.

No se detectó la presencia de *Salmonella* en ninguna de las muestras.

Se identificó *Staphylococcus aureus* en 7 muestras (10%) con valores desde 2100 UFC/g hasta 11200 UFC/g.

En el total de muestras se aislaron un 67% de coliformes totales, 53% de coliformes fecales y *E. coli* en 20 muestras, es decir, en un 28%.

El tipo de refrigeradores que se emplean en los centros de distribución no son adecuados para conservar esta clase de productos a una temperatura adecuada, lo cual contribuye al aumento en la carga microbiana, lo cual se evidencia con la presencia de *Staphylococcus aureus* y Coliformes totales, fecales y *Escherichia coli*. Durante los muestreos se observó una alta en las temperaturas, promedio las estas alcanzaron los 14.5 °C, mientras que la temperatura óptima de almacenamiento es de 2 a 8°C.

Según el documento *Estimaciones de la OMS sobre la carga mundial de Enfermedades De Transmisión Alimentaria* publicado en 2015, *E. coli*, es uno de los principales causantes de cuadros diarreicos, sólo las enfermedades diarreicas matan a unos 1,8 millones de niños cada año, y la mayoría de ellas son atribuibles a aguas o alimentos contaminados.

Los resultados obtenidos en el estudio indican que el consumo de los productos implica un riesgo potencial en la salud de los ciudadanos, principalmente en el aumento de enfermedades gastrointestinales, pudiendo provocar ausentismo escolar, laboral y por tanto aumento en el sesgo económico.

RECOMENDACIONES.

Limpieza adecuada del equipo con el que cortan el producto en los centros de distribución.

Asignar cortadoras para cada tipo de producto a dispensar.

Es importante que los supermercados revisen la rotación del producto, para disminuir el problema de contaminación por rezago o estancamiento en el mercado.

Realizar análisis clínicos al personal que labore en el área de distribución.

Vigilar la temperatura a la cual se mantienen los productos, tanto para su venta a granel como los productos empaquetados.

Revisar que los refrigeradores sean adecuados para mantener la temperatura óptima de almacenamiento de 2 a 8 °C

Educar al consumidor para que almacene adecuadamente esta clase de productos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acevedo D, Granados C., Montero P. 2014. Caracterización de Propiedades Fisicoquímicas, Textura y Calidad Microbiológica de Butifarra Comercializada en Cartagena (Colombia). Revista Información Tecnológica. Vol. 25(6), 33-38.
2. Afshin J. 2011. Department of Food Hygiene, Tabriz branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran. Microbial Properties of Hot Smoked Sausage During Shelf Life. Global Veterinaria 7 (5): 423-426.
3. ANMAT. 2013 Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología. Campaña de Educación y prevención de las enfermedades transmitidas por alimentos.
<http://www.anmat.gov.ar/Alimentos/Alimentos.asp>
4. Ávila J., Orozco I. 2013. Calidad microbiológica de productos cárnicos analizados en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Fundación CIEPE, Venezuela. Período 2008-2012. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 4 (1) Enero-Junio: 132-145.
5. Bayona M. 2009. Microbiological evaluation of food acquired in streets of a northern area of Bogotá. Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 12 (2): 9-17.
6. Betancourt O., Villagrán K., Muñoz F., Gutiérrez E. Mayorga M., Melgarejo P., (2010). "Serotipos de *Listeria monocytogenes* aislados de alimentos producidos en la provincia de Cautín, Chile". Vol. XX, núm. 5, Septiembre-Octubre, pp. 530.
7. Buelvas G., Patiño J., Restrepo C. 2012. Efecto de la cadena de frío sobre el crecimiento de bacterias ácido-lácticas, la calidad fisicoquímica y la alteración de jamones cocidos lonchados empacados al vacío. Revista Lasallista De Investigación - Vol. 9 No. 2 Pag - 55-64.
8. Bolaños H., Acuña M., Duarte F., Salazar W., Oropeza G., Sánchez L., Campos E. 2007. Brotes de diarrea e intoxicaciones transmitidas por alimentos en Costa Rica, 2005. AMC, vol 49 (4), octubre-diciembre.

9. Caballero A. E. 2008. Temas de Higiene de los Alimentos La Habana: Editorial Ciencias Médicas, Pag. 15, 22, 29, 43.
10. CDC, 2011. Centros para el Control y Prevención de Enfermedades.
<http://www.cdc.gov/>
11. Doyle M. 2001. Microbiología de los alimentos: fundamentos y fronteras. Madrid, España. Editorial Acribia, S.A., 1er Edición. Pag. 13-30
12. Estevan M. Junio 2013. El mercado del jamón y el embutido curado en México. Estudio realizado bajo la supervisión de la Oficina Económica y Comercial de la Embajada de España en México. ICEX.
13. Flórez A., Rincón C., Garzón P., Vargas N., Enríquez C. 2008. Factores relacionados con enfermedades transmitidas por alimentos en restaurantes de cinco ciudades de Colombia, 2007. Infection (Colombia). 12(4):255-266.
14. Forero A., Sánchez S. 2008. Represión Catabólica por Carbono de Bacterias Gram-Positivas: Inteligencia Alimenticia. BioTecnología, Vol. 12 No. 2.
15. González U., Pérez V., Clemente A., Mazariegos M. A., Ruiz M., Rodríguez M. 2007. Determinación de coliformes totales en los productos lácteos y su comparación entre dos queserías del municipio de Pijijiapan, Chiapas, México Bioquímica, vol. 32 marzo.
16. Guerrero C., Guillén A., Rojas R. 2013. Vigilancia de Escherichia coli O157: H7 en alimentos y aguas. Cátedra Villarreal, Lima, Perú, V.1, N. 1 enero - junio, pag.35-45.
17. Heredia N., Dávila J., Solís L., García S. 2014. Productos cárnicos: principales patógenos y estrategias no térmicas de control. NACAMEH Vol. 8, Sup. 1, pp. S20-S42
18. Hernández C., Aguilera M., Castro G. 2011. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. Enfermedades Infecciosas y Microbiología, vol. 31, núm. 4, octubre-diciembre pag.137-151.
19. INAES. 2012. Guía Empresarial de Embutidos. Instituto Nacional de Economía Social.

20. Iriarte M. 2011. Calidad bacteriológica de comidas listas para su consumo, preparadas y distribuidas en la isla de Margarita (Venezuela), período 1991-2009. Revista del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"; 42 (2)
21. Islam M., Alam M., Uddin M., Kobayashi N. and Ahmed M. 2011. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (mrsa) from animal and human origin in Bangladesh by polymerase chain reaction. Bangl. J. Vet. Med. 9 (2): 161 – 166.
22. Jordá G., Marucci R., Guida A., Pires P., Manfredi E. 2012. Portación y caracterización de *Staphylococcus aureus* en manipuladores de alimentos. Revista Argentina de Microbiología, vol. 44, núm. 2, abril-junio pp. 101-104 Asociación Argentina de Microbiología Buenos Aires, Argentina.
23. Kopper G., Calderón G., Schneider S., Domínguez W., Gutiérrez G. 2009. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Estudios de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua. Organización De Las Naciones Unidas Para La Agricultura Y La Alimentación Roma.
24. Norma Oficial Mexicana NOM-158-SCFI-2003, Jamón-Denominación y clasificación comercial, especificaciones fisicoquímicas, microbiológicas, organolépticas, información comercial y métodos de prueba.
25. Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994, bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.
26. Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
27. Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
28. Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos.
29. Norma Oficial Mexicana NOM-115-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos.
30. NOM-110-SSA1-1994. Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

31. Olea J., Díaz R., Fuentes A., García M. 2012. Vigilancia de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en Chile. Ministerio de Salud de Chile. Departamento de Epidemiología Departamento de Alimentos y Nutrición (AV). Rev Chilena Infectol; 29 (5): 504-510.
32. OMS, 2014. Organización mundial de la salud.
http://www.who.int/topics/foodborne_diseases/es/
33. OMS. 2015. Estimaciones de la OMS sobre la carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria.
http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/es/
34. Ossa J., Coral A., Vanegas M. 2010. Microbiota de jamones de cerdo cocidos asociada al deterioro por abombamiento del empaque. Rev. MVZ Córdoba • Volumen 15(2), Mayo – Agosto.
35. Pascual M., Calderón y Pascual V. 2000. Microbiología Alimentaria. Metodología Analítica para alimentos y bebidas. Madrid, España: Ediciones Díaz de Santos. Pag. 200-238.
36. PROFECO. 2013. Laboratorio Nacional de Protección al Consumidor. Estudio Jamón, la tradición puesta bajo la lupa. Procuraduría Federal del Consumidor
37. Puig Y., Leyva V., Robert B., Pérez Y. 2013. Agentes bacterianos asociados a brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en La Habana, 2006-2010. . Revista Cubana de Higiene y Epidemiología, 51 (1), 74-83.
38. Roldán M., Chinen I., Otero J., Miliwebsky E., Alfaro N., Burns P., Rivas M. 2007. Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de Escherichia coli O157:H7 a partir de productos cárnicos y leche. Revista Argentina de Microbiología, vol. 39, núm. 2, junio, pp. 113-119
39. Sáez A., Aponte B., Castellano S. 2009. Preferencias Del Consumidor De Embutidos En El Municipio Maracaibo Del Estado Zulia, Venezuela. Agroalimentaria. Vol. 15, Nº 29. Julio-Diciembre (55-67)
40. SAGARPA. 2008. Tercera Sección Secretaría De Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Diario Oficial (Tercera Sección) 1

decreto por el que se aprueba el Programa Sectorial de Desarrollo Agropecuario y Pesquero.

41. Tornese M., Rossi L., Florencia C., Cricelli C. y Troncoso A. 2008. Epidemiología y factores de riesgo asociados al botulismo de los alimentos y al botulismo infantil: Rev Chil Infect; 25 (1): 22-27
42. Torres M. Octubre 2005. El sistema de patentes en el desarrollo tecnológico y la innovación de la empresa alimentaria en México, 1995-2005. México D.F.
43. Yáñez E., Máttar S., Durango A. 2008. Determinación de Salmonella spp. por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Montería, Córdoba. Rev. Infection. 12(4):246-253.

ANEXOS

ANEXO 1. MATERIALES Y EQUIPOS

Equipo para muestreo y análisis

Equipo	Marca
Hielera	UABC
Plumones marcadores	Sharpie
Refrigerador	Sci-cool
Incubadora	Quincy lab
Esterilizadora	All american
Balanza analítica	Mettler Toledo
Balanza granataria	Ohaus
Campana de flujo laminar	Envirco
Micropipeta	Thermo Science

Materiales para muestreo y análisis

Material	Marca
Bolsas estériles	Whirl-pak
Pipetas desechables	VWR
Cajas Petri estériles	Fisher
Medios de cultivo Agar cuenta estándar Agar Bilis rojo violeta Agar Baird- Parker Caldo Lactosado Caldo Selenito Caldo tetracionato Agar papa dextrosa Agar EMB Agar MacConkey	BD Becton Dickinson and Company, Sparks, MD 21152 USA
Tubos de ensayo	VWR
Gradillas	Science ware
Puntillas Estériles	Eppendorf

ANEXO 2. Normas Oficiales Mexicanas empleadas para el análisis de las muestras.

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

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

JOSE MELJEM MOCTEZUMA, Director General de Control Sanitario de Bienes y Servicios, por acuerdo del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en los artículos 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 38, fracción II, 47 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 194 fracción I de la Ley General de Salud; 2o. fracción III, 34, 37, 40 y demás aplicables del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios; 8o. fracción IV y 13 fracción I del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud.

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

SECRETARIA DE SALUD

Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios
Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica. INDRE
Laboratorio Nacional de Salud Pública

SECRETARIA DE PESCA (AHORA: SECRETARIA DE MEDIO AMBIENTE, RECURSOS NATURALES Y PESCA)

Instituto Nacional de la Pesca
INDUSTRIAS VINICOLAS PEDRO DOMECQ, S.A. DE C.V.
JUGOS DEL VALLE, S.A. DE C.V.
LECHE INDUSTRIALIZADA CONASUPO, S.A. DE C.V. LICONSA
SIGMA ALIMENTOS, S.A. DE C.V.
SOCIEDAD MEXICANA DE NORMALIZACION Y CERTIFICACION, S.C.
NORMEX

INDICE

0	INTRODUCCION
1	OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION
2	FUNDAMENTO
3	REFERENCIAS
4	DEFINICIONES
5	SIMBOLOS Y ABREVIATURAS
6	REACTIVOS Y MATERIALES
7	APARATOS E INSTRUMENTOS
8	PREPARACION DE LA MUESTRA
9	PROCEDIMIENTO
10	EXPRESION DE RESULTADOS
11	INFORME DE LA PRUEBA
12	CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES
13	BIBLIOGRAFIA

14 OBSERVANCIA DE LA NORMA

15 VIGENCIA

0. Introducción

Cuando se requiere investigar el contenido de microorganismos viables en un alimento, la técnica comúnmente utilizada es la cuenta en placa.

En realidad esta técnica no pretende poner en evidencia todos los microorganismos presentes. La variedad de especies y tipos diferenciables por sus necesidades nutricionales, temperatura requerida para su crecimiento, oxígeno disponible, etc., hacen que el número de colonias contadas constituyan una estimación de la cifra realmente presente y la misma refleja si el manejo sanitario del producto ha sido el adecuado.

Por otra parte el recuento de termófilos, psicrófilos y psicotróficos es importante para predecir la estabilidad del producto bajo diferentes condiciones de almacenamiento.

Para obtener resultados reproducibles y por lo tanto significativos, es de suma importancia seguir fielmente y controlar cuidadosamente las condiciones.

Esta técnica puede aplicarse para la estimación de microorganismos viables en una amplia variedad de alimentos.

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta Norma Oficial Mexicana establece el método para estimar la cantidad de microorganismos viables presentes en un alimento, agua potable y agua purificada, por la cuenta de colonias en un medio sólido, incubado aeróbicamente.

1.2 Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el Territorio Nacional para las personas físicas o morales que requieran efectuar este método en productos nacionales y de importación, para fines oficiales.

2. Fundamento

El fundamento de la técnica consiste en contar las colonias, que se desarrollan en el medio de elección después de un cierto tiempo y temperatura de incubación, presuponiendo que cada colonia proviene de un microorganismo de la muestra bajo estudio. El método admite numerosas fuentes de variación, algunas de ellas controlables, pero sujetas a la influencia de varios factores.

3. Referencias

Esta Norma se complementa con lo siguiente:

NOM-109-SSA1-1994 Procedimiento 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.

4. Definición

Para fines de esta norma se entiende por:

Unidades Formadoras de Colonias (UFC), término que debe utilizarse para reportar la cuenta de colonias en placa, las cuales pueden surgir de una célula o de un cúmulo de células.

5. Símbolos y abreviaturas

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

g gramo

l litro

ml mililitro

°C grado Celsius

pH potencial de hidrógeno

% por ciento

UFC unidades formadoras de colonias

h hora

6. Reactivos y materiales

6.1 Reactivos

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

Medio de Cultivo.

Agar Triptona-Extracto de Levadura (agar para cuenta estándar).

FORMULA

INGREDIENTES CANTIDADES

Extracto de levadura 2,5 g

Triptona 5,0 g

Dextrosa 1,0 g

Agar 15,0 g

Agua 1,0 l

Preparación del medio de cultivo.

Suspender los componentes del medio deshidratado en un litro de agua. Hervir hasta total disolución. Distribuir en recipientes de vidrio esterilizables de capacidad no mayor de 500 ml, cantidades de aproximadamente la mitad del volumen del mismo. Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1,0$ °C, durante 15 minutos. El pH final del medio debe ser $7,0 \pm 0,2$ a 25°C.

Si el medio de cultivo es utilizado inmediatamente, enfriar a $45^{\circ}\text{C} \pm 1,0$ °C en baño de agua y mantenerlo a esta temperatura hasta antes de su uso. El medio no debe fundirse más de una vez.

En caso de medios deshidratados seguir las instrucciones del fabricante.

El medio de cultivo anterior es el de uso más generalizado. Para algunos alimentos en particular se requerirá de un medio de cultivo especial que se debe indicar al describir la técnica para ese alimento.

6.2 Materiales

Todo el material que tenga contacto con las muestras o los microorganismos debe estar estéril.

Se requiere, los materiales mencionados en la NOM-110-SSA1-1994, Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

7. Aparatos e instrumentos

Se requiere, además de los mencionados en la NOM-110-SSA1-1994, Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico, los siguientes:

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

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

Registrador mecánico o electrónico.

Microscopio óptico.

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

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 ± 2 h

Mesofílicos aerobios* $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 48 ± 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 aquella 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 tripton extracto de levadura o agar para cuenta estándar, incubadas _____ horas a _____ °C.

CUADRO 2

Cálculo de los valores de la cuenta en placa

(Ensayos por duplicado)

Ejemplo Colonias contadas UFC/g o ml

número 1: 100 1: 1000 1: 10000

1 > 250a 178 16 180000
> 250 190 17
2 > 250 220 25 250000
238 28
3 18 2 0 1600b
14 0 0
4 > 250 > 250 512 5000000b
> 250 > 250 495
5 > 250 240 34 290000
> 250 235 crecimiento
extendido
6 0 0 0 < 100c
7 > 250 240 24 250000
> 250 268 19
8 > 250 216 23 280000
> 250 262 42
9 > 250 215 20 230000
> 250 235 26
> 250 275 32 270000
> 250 225 26

12. Concordancia con normas internacionales

Esta Norma no tiene concordancia con normas internacionales.

13. Bibliografía

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

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

13.3 Secretaría de Salud. 1988. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. México, D.F.

13.4 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. NOM-008-SCFI-1993. Norma Oficial Mexicana. Sistema General de Unidades de Medida.

13.5 Bacteriological Analytical Manual. 1984. Food and Drugs Administration FDA. Bureau of Foods. Division of Microbiology. 6a Ed. Washington D.C.

13.6 NORMA-Z-013/02. 1981. Guía para la Redacción, Estructuración y Presentación de las Normas Oficiales Mexicanas. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial.

13.7 Tomaszewicz, D. M., et al. 1980. The most suitable number of colonies on plate for counting. Journal of Food Protection. 43: 4.

13.8 Vanderzant F., Carland S., y Don F. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association. Washington, D.C. 1992.

14. Observancia de la norma

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

15. Vigencia

La presente Norma Oficial Mexicana, entrará en vigor con carácter de obligatorio a los 30 días siguientes a partir de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 10 de noviembre de 1995.- El Director General, José Meljem Moctezuma.- Rúbrica.

Fecha de publicación: 12 de diciembre de 1995

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

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

JOSE MELJEM MOCTEZUMA, Director General de Control Sanitario de Bienes y Servicios, por acuerdo del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en los artículos 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 38, fracción II, 47 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 194 fracción I de la Ley General de Salud; 2o. fracción III, 34, 37, 40 y demás aplicables del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios; 8o. fracción IV y 13 fracción I del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud.

PREFACIO

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

SECRETARIA DE SALUD

Laboratorio Nacional de Salud Pública
Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios

SECRETARIA DE MEDIO AMBIENTE, RECURSOS NATURALES Y PESCA

Instituto Nacional de Pesca

SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA Y DESARROLLO RURAL

Comisión Nacional del Agua

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

INDUSTRIAS VINICOLAS PEDRO DOMECQ

JUGOS DEL VALLE, S.A. DE C.V.

LABORATORIO FERMI, S.A.

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

LECHE INDUSTRIALIZADA CONASUPO, S.A. DE C.V. LICONSA

SIGMA ALIMENTOS, S.A. DE C.V.

SOCIEDAD MEXICANA DE NORMALIZACION Y CERTIFICACION, S.C.
NORMEX

INDICE

0. INTRODUCCION

1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION

2. FUNDAMENTO

3. REFERENCIAS

4. DEFINICIONES

5. SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

6. REACTIVOS Y MATERIALES

7. EQUIPO

8. PROCEDIMIENTO

9. CALCULO Y EXPRESION DE RESULTADOS

10. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

11. BIBLIOGRAFIA

12. OBSERVANCIA DE LA NORMA

13. VIGENCIA

14. APENDICE INFORMATIVO

APENDICE A

0. Introducción

Los miembros del género *Salmonella* han sido muy estudiados como patógenos cuando se encuentran presentes en los alimentos. El control de este microorganismo, tanto por parte de las autoridades sanitarias, como en las plantas procesadoras de alimentos, depende en cierta medida del método analítico utilizado para su detección.

Este microorganismo fue inicialmente identificado en muestras clínicas y los métodos empleados para estos casos se adaptaron posteriormente para su detección en alimentos. Las modificaciones a los métodos consideraron dos aspectos principales, el primero es el debilitamiento o daño a las células bacterianas presentes en un alimento, debido al proceso a que está sujeto (por ejemplo: tratamiento térmico, secado, etc.) y segundo, la variabilidad inherente a la naturaleza del producto bajo estudio.

Para diversos alimentos existen diferentes protocolos para el aislamiento de *Salmonella*, todos ellos son esencialmente similares en principio y emplean las etapas de preenriquecimiento, enriquecimiento selectivo, aislamiento en medios de cultivo selectivos y diferenciales, identificación bioquímica y confirmación serológica de los microorganismos.

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta Norma Oficial Mexicana establece un método general para la determinación de *Salmonella* en alimentos.

1.2 Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el territorio nacional para las personas físicas y morales que requieran efectuar este método en productos nacionales y de importación para fines oficiales.

2. Fundamento

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

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

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

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

2.4 Identificación bioquímica, este paso permite la identificación générica de los cultivos de *Salmonella* y la eliminación de cultivos sospechosos falsos.

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

3. Referencias

Esta norma se complementa con la siguiente Norma Oficial Mexicana:

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

4. Definiciones

Para fines de esta norma se entiende por:

4.1 Detección de Salmonella: determinación de la presencia o ausencia de estos microorganismos en una masa determinada de producto, cuando las pruebas se llevan a cabo de acuerdo con esta norma.

4.2 Salmonella: microorganismo patógeno perteneciente al grupo de Enterobacterias. Bacilo gram negativo, aerobio, no esporulado que forman colonias típicas en medios selectivos sólidos y que presentan además las características bioquímicas y serológicas descritas cuando los procedimientos se efectúan de acuerdo con esta norma.

5. Símbolos y abreviaturas

Cuando en esta norma se haga referencia a las siguientes abreviaturas, se entiende por:

g gramos
°C grados celsius
l litros
ml mililitros
cm centímetros
mm milímetros
min minutos
h hora
± más, menos
p. ejem. por ejemplo
N Normal
µm micrómetro
lb libras
cbp cuanto basta para
% por ciento
x por
pH potencial de hidrógeno

6. Reactivos y materiales

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

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

6.1 Reactivos

6.1.1 Medios de pre-enriquecimiento

6.1.1.1 Agua de peptona tamponada

Fórmula

Ingredientes Cantidades Unidades

Peptona 10,0 g

Cloruro sódico 5,0 g

Fosfato sódico dibásico 3,5 g

Fosfato potásico monobásico 1,5 g
Agua 1,0 l

Preparación. Disolver los componentes en agua, calentando si es necesario. Ajustar el pH, si es necesario, después de la esterilización a 7,0. Distribuir en recipientes de vidrio esterilizables con la capacidad necesaria para obtener las porciones necesarias para la prueba. Esterilizar por 20 min a $121 \pm 1^\circ\text{C}$

6.1.1.2 Caldo lactosado

Fórmula

Ingredientes Cantidades Unidades

Extracto de carne 3,0 g

Peptona 5,0 g

Lactosa 5,0 g

Agua destilada 1,0 l

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

Preparación. Disolver los ingredientes en agua, calentando a 65°C . Distribuir en porciones de 225 ml, en frascos de 500 ml. Esterilizar durante 15 min a $121^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$

6.1.2 Caldo de enriquecimiento

6.1.2.1 Caldo selenito-cistina

Fórmula

Ingredientes Cantidades Unidades

Triptona o polipeptona 5,00 g

Lactosa 4,00 g

Fosfato disódico 10,00 g

Selenito ácido de sodio 4,00 g

L-cistina 0,01 g

Agua destilada 1,00 l

pH final: $7,0 \pm 0,2$ a 25°C

Preparación

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

6.1.2.2 Caldo tetratiónato

Fórmula

Ingredientes Cantidades Unidades

Proteosa peptona o triptona 5,0 g

Sales biliares 1,0 g

Carbonato de calcio 10,0 g

Tiosulfato de sodio pentahidratado 30,0 g

Agua destilada 1,0 l

pH final: $7,0 \pm 0,1$

Preparación. Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada estéril. Distribuir, agitando constantemente, en porciones de 10 y 225 ml, en recipientes estériles. Guardar en refrigeración. Antes de usar el medio, agregar 2 ml de una solución yodo-yoduro y 1 ml de solución de verde brillante al 0,1% por cada 100 ml de caldo. El medio una vez adicionado de yodo no debe calentarse y debe usarse el mismo día de su preparación.

6.1.2.3 Vassiliadis-Rappaport

Fórmula

Solución A

Ingredientes Cantidades Unidades

Triptona 5,0 g

Cloruro de sodio 8,0 g

Fosfato de potasio dihidrogenado 1,6 g

Agua destilada 1,0 l

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

Solución B

Ingredientes Cantidades Unidades

Cloruro de magnesio hexahidratado 400,0 g

Agua destilada 1,0 l

Disolver el cloruro de magnesio en agua. Como esta sal es muy higroscópica es conveniente disolver el contenido entero de cloruro de magnesio desde un recipiente recientemente abierto de tal modo que la concentración de la solución sea de 0,4 g/ml. Conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

Solución C

Ingredientes Cantidades Unidades

Oxalato de verde de malaquita 0,4 g

Agua destilada 100,0 ml

Disolver el oxalato de verde de malaquita en agua.

Conservar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

Medio completo

Ingredientes Cantidades Unidades

solución A 1000 ml

solución B 100 ml

solución C 10 ml

Preparación. Adicionar 1 000 ml de la solución A, 100 ml de la solución B y 10 ml de la solución C. Ajustar el pH si es necesario, de tal manera que después de la esterilización sea de 5,2. Distribuir antes de usar dentro de tubos en cantidades de 10 ml. Almacenar en refrigeración.

6.1.2.4 Caldo de soya tripticasa

Fórmula

Ingredientes Cantidades Unidades

Tripticasa o triptosa 17,0 g

Fitona 3,0 g

Glucosa 2,5 g

Cloruro de sodio 2,5 g

Agua destilada 1,0 l

pH final: 7,3 ±0,2

Preparación. Disolver los ingredientes en 1 litro de agua destilada, calentando lentamente hasta su disolución completa. Distribuir porciones de 225 ml dentro de matraces de 500 ml y esterilizar en autoclave durante 15 min a 121°C ±1°C

6.1.2.5 Leche descremada reconstituida

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

6.1.2.6 Caldo soya triptica estéril adicionado con sulfito de potasio

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

6.1.3 Medios de aislamiento

6.1.3.1 Agar verde brillante (VB)

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
--------------	------------	----------

Extracto de levadura	3,0000	g
----------------------	--------	---

Polipeptona (Proteosa peptona No. 3)	10,0000	g
--------------------------------------	---------	---

Cloruro de sodio	5,0000	g
------------------	--------	---

Lactosa	10,0000	g
---------	---------	---

Sacarosa	10,0000	g
----------	---------	---

Rojo de fenol	0,0800	g
---------------	--------	---

Agar	20,0000	g
------	---------	---

Verde brillante	0,0125	g
-----------------	--------	---

Agua destilada	1,0000	l
----------------	--------	---

pH final: 6,9± 0,2

Preparación. Suspender los ingredientes en un litro de agua destilada y calentar a ebullición, hasta disolución completa. Ajustar el pH. Esterilizar en autoclave 15 min a 121°C ±1°C. El sobrecalentamiento del medio disminuye su selectividad. Enfriar el medio a 50 °C y distribuirlo en cajas de petri estériles. El aspecto del medio es oscuro, de color marrón.

6.1.3.2 Agar con sulfito de bismuto

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
--------------	------------	----------

Extracto de carne de res	5,000	g
--------------------------	-------	---

Mezcla de peptonas	10,000	g
--------------------	--------	---

Glucosa	5,000	g
---------	-------	---

Fosfato disódico (anhidro)	5,000	g
----------------------------	-------	---

Sulfato ferroso (anhidro)	0,300	g
---------------------------	-------	---

Sulfito de bismuto	8,000	g
--------------------	-------	---

Verde brillante	0,025	g
-----------------	-------	---

Agar	20,000	g
------	--------	---

Agua destilada	1,000	l
----------------	-------	---

pH final: 7,6 ±0,2

Preparación. Suspender los ingredientes en un litro de agua. Calentar hasta su disolución completa, agitando frecuentemente. Ajustar el pH. Enfriar a 45°C y verter en cajas de petri estériles, distribuyendo de manera homogénea el precipitado propio del medio.

El aspecto de las placas es opaco, de color verde pálido y deben usarse el mismo día de su preparación. Si la coloración es parda, no deben utilizarse. El medio no debe esterilizarse en autoclave; el sobrecalentamiento afecta su selectividad.

6.1.3.3 Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
--------------	------------	----------

Xilosa	3,75	g
--------	------	---

L-lisina	5,00	g
----------	------	---

Lactosa	7,50	g
---------	------	---

Sacarosa	7,50	g
----------	------	---

Cloruro de sodio 5,00 g
Extracto de levadura 3,00 g
Rojo de fenol 0,08 g
Agar 15,00 g
Desoxicolato de sodio 2,50 g
Citrato férrico-amónico 0,80 g
Tiosulfato de sodio 6,80 g
Agua destilada 1,00 l
pH final: $6,9 \pm 0,2$

Preparación. Suspender los ingredientes en un litro de agua destilada, y calentar en baño de agua a 55°C, agitando frecuentemente, hasta disolución completa. Ajustar el pH. Enfriar a 50°C y verter en cajas de petri estériles. No se esterilice. El sobrecalentamiento produce una precipitación; la reactividad del medio puede ser satisfactoria, pero las colonias suelen ser muy pequeñas. El aspecto del medio es claro y de color rojo brillante.

6.1.3.4 Agar para Salmonella y Shigella (SS)

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
Extracto de carne	5,000	g
Polipeptona *	5,000	g
Lactosa	10,000	g
Sales biliares	8,500	g
Citrato de sodio dihidratado	8,500	g
Tiosulfato de sodio pentahidratado	8,500	g
Citrato férrico	1,000	g
Agar	13,500	g
Rojo neutro	0,025	g
Verde brillante	0,330	mg
Agua destilada	1,000	l
pH final:	$7,0 \pm 0,2$	

Preparación. Suspender los ingredientes en un litro de agua destilada estéril y calentar a ebullición hasta disolución completa. Ajustar el pH. No esterilizar en autoclave. Enfriar a 50°C y distribuir en cajas de petri estériles en condiciones asépticas. El aspecto del medio fundido es claro y de color rosado.

6.1.3.5 Agar entérico Hektoen

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
Proteosa peptona	12,000	g
Extracto de levadura	3,000	g
Lactosa	12,000	g
Sacarosa	12,000	g
Salicina	2,000	g
Sales biliares	9,000	g
Cloruro de sodio	5,000	g
Tiosulfato de sodio	5,000	g
Citrato amónico férrico	1,500	g
Azul de bromotimol	0,064	g
Fuscina ácida	0,100	g
Agar	13,500	g
Agua	1,000	l
pH final:	$7,5 \pm 0,2$	

Preparación. Suspender los ingredientes en agua destilada, hervir con agitación hasta completa disolución del agar. No sobrecalentar. Dejar enfriar a 55-60°C y distribuir en cajas de petri estériles en condiciones asépticas.

6.1.4 Medios para pruebas bioquímicas

6.1.4.1 Agar de tres azúcares y hierro (TSI)

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
--------------	------------	----------

Peptona de carne	* 1,0	g
------------------	-------	---

Peptona de caseína	* 1,0	g
--------------------	-------	---

Cloruro de sodio	0,5	g
------------------	-----	---

Lactosa	1,0	g
---------	-----	---

Sacarosa	1,0	g
----------	-----	---

Glucosa	0,1	g
---------	-----	---

Agar	1,3	g
------	-----	---

Rojo de fenol	2,5	mg
---------------	-----	----

Sulfato ferroso amónico		
-------------------------	--	--

pentahidratado	20,0	mg
----------------	------	----

Tiosulfato de sodio	20,0	mg
---------------------	------	----

Agua destilada	100,0	ml
----------------	-------	----

pH final:	7,3 ±0,2	
-----------	----------	--

Preparación. Suspender los ingredientes en 100 ml de agua destilada. Calentar a ebullición, agitando ocasionalmente, hasta disolución completa. Enfriar a 60°C y ajustar el pH. Distribuir en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar a 15 min a 121°C ±1°C. Inclinar los tubos de manera que el medio de cultivo en el fondo alcance una altura de 3 cm y una profundidad de 4 cm. El medio es de color rojo.

6.1.4.2 Agar de hierro y lisina (LIA)

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
--------------	------------	----------

Peptona de gelatina	0,5	g
---------------------	-----	---

Extracto de levadura	0,3	g
----------------------	-----	---

Glucosa	0,1	g
---------	-----	---

L-lisina	1,0	g
----------	-----	---

Citrato férrico-amónico	50,0	mg
-------------------------	------	----

Tiosulfato de sodio anhidro	4,0	mg
-----------------------------	-----	----

Púrpura de bromocresol	2,0	mg
------------------------	-----	----

Agar	1,5	g
------	-----	---

Agua destilada	100,0	ml
----------------	-------	----

pH final:	6,7 ±0,2	
-----------	----------	--

Preparación. Suspender los ingredientes en el agua destilada y mezclar bien, calentar hasta ebullición con agitación frecuente hasta conseguir la disolución completa. Ajustar el pH. Distribuir en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm, con tapón de rosca. Esterilizar en autoclave a 121°C ±1°C. durante 12 min. Dejar que los tubos se enfríen en posición inclinada, de tal modo que se obtengan columnas de medio de 4 cm y una superficie inclinada de 2 cm. El medio ya preparado es de color púrpura.

6.1.4.3 Agar nutritivo

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
--------------	------------	----------

Extracto de carne	3,0	g
-------------------	-----	---

Peptona	5,0	g
---------	-----	---

Agar 15,0 g
Agua destilada 1,0 l
pH final: 6,8 $\pm$ 0,2

Preparación. Suspender los ingredientes en agua. Dejar reposar de 5 a 10 min. Calentar a ebullición hasta disolución completa. Distribuir en tubos de 13 x 100 mm, en cantidades de 1/3 de su volumen. Esterilizar a 15 min a 121°C $\pm$ 1°C.. Inclinar los tubos antes que el agar solidifique.

6.1.4.4 Medio de SIM (para Sulfuro, Indol y Movilidad)

Fórmula

Ingredientes Cantidades Unidades

Extracto de carne 3,000 g

Peptona 30,000 g

Hierro peptonizado 0,200 g

Tiosulfato de sodio 0,025 g

Agua destilada 1,000 l

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

Preparación. Suspender los ingredientes en el agua destilada, calentar a ebullición agitando frecuentemente hasta lograr una disolución completa. Enfriar a 50°C y ajustar el pH. Distribuir el medio en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar en autoclave a 15 min a 121°C $\pm$ 1°C. Se dejan enfriar los tubos en posición vertical.

6.1.4.5 Agar citrato de Simmons

Fórmula

Ingredientes Cantidades Unidades

Fosfato de amonio 1,00 g

Fosfato dipotásico 1,00 g

Cloruro de sodio 5,00 g

Citrato de sodio 2,00 g

Sulfato de magnesio 0,20 g

Azul de bromotimol 0,08 g

Agar 15,00 g

Agua destilada 1,00 l

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

Preparación. Suspender los ingredientes en el agua destilada, calentar a ebullición agitando frecuentemente hasta lograr una disolución completa. Ajustar el pH. Distribuir el medio en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar en autoclave a 15 min a 121°C $\pm$ 1°C. Dejar enfriar los tubos en posición inclinada.

6.1.4.6 Caldo MR-VP (Rojo de metilo-Voges Proskauer)

Fórmula

Ingredientes Cantidades Unidades

Peptona 7,0 g

Dextrosa 5,0 g

Difosfato de potasio 5,0 g

Agua destilada 1,0 l

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

Preparación. Suspender los ingredientes en el agua destilada, calentar a ebullición agitando frecuentemente hasta lograr una disolución completa. Ajustar el pH. Distribuir el medio en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm y esterilizar en autoclave a 15 min a 121°C $\pm$ 1°C.

6.1.4.7 Caldo manitol

Fórmula

Ingredientes Cantidades Unidades

Extracto de carne 1,000 g

Proteosa peptona 10,000 g

Cloruro de sodio 5,000 g

Rojo de fenol 0,018 g

Manitol 10,000 g

Agua 1,000 l

pH final: 7,4 $\pm$ 0,2

Preparación. Suspender 26 g del medio deshidratado en un litro de agua, mezclar y ajustar el pH. Distribuir en volúmenes de 2 a 3 ml en tubos de 13 x 100 mm. Esterilizar a 15 min a 121°C $\pm$ 1°C.

6.1.4.8 Caldo malonato

Fórmula

Ingredientes Cantidades Unidades

Extracto de levadura 1,000 g

Sulfato de amonio 2,000 g

Fosfato dipotásico 0,600 g

Fosfato monopotásico 0,400 g

Cloruro de sodio 2,000 g

Malonato 3,000 g

Glucosa 0,250 g

Azul de bromotimol 0,025 g

Agua 1,000 l

pH final: 6,7 $\pm$ 0,2

Preparación. Suspender los ingredientes en agua, mezclar y ajustar el pH. Distribuir en tubos de 13 x 100 mm en cantidades de 3 ml. Esterilizar en autoclave a 15 min a 121°C $\pm$ 1°C.

6.1.4.9 Caldo urea

Fórmula

Ingredientes Cantidades Unidades

Urea 20,00 g

Extracto de levadura 0,10 g

Fosfato monopotásico 9,10 g

Fosfato disódico 9,50 g

Rojo de fenol 0,01 g

Agua 1,00 l

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

Preparación. Disolver los ingredientes en agua destilada. NO CALENTAR. Esterilizar por filtración a través de membrana 0,45 μ m o en autoclave de 5 a 8 lb de presión durante 15 min. Distribuir asépticamente de 1,5 a 3 ml en tubos estériles de 13 x 100 mm.

6.1.4.10 Caldo de urea rápido

Fórmula

Ingredientes Cantidades Unidades

Urea 20,000 g

Extracto de levadura 0,100 g

Fosfato monopotásico 0,091 g

Fosfato disódico 0,095 g

Rojo de fenol 0,010 g

Agua 1,000 l

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

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

6.1.4.11 Caldo infusión cerebro corazón

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
--------------	------------	----------

Infusión cerebro corazón	200,0	g
--------------------------	-------	---

Infusión de corazón de res	250,0	g
----------------------------	-------	---

Proteosa peptona	10,0	g
------------------	------	---

Cloruro de sodio	5,0	g
------------------	-----	---

Fosfato disódico dodecahidratado	2,5	g
----------------------------------	-----	---

Dextrosa	2,0	g
----------	-----	---

Agua destilada	1,0	l
----------------	-----	---

pH final: 7,4 $\pm$ 0,2

Preparación. Disolver los ingredientes en agua destilada, calentar suavemente. Distribuir y esterilizar 15 min a 121°C $\pm$ 1°C.

6.1.5 Soluciones

6.1.5.1 Solución verde brillante al 0,1% (1:1000)

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
--------------	------------	----------

Verde brillante	0,1	g
-----------------	-----	---

Agua destilada estéril	100,0	ml
------------------------	-------	----

Disolver 0,1 g de verde brillante en agua destilada estéril hasta completar 100 ml.

6.1.5.2 Solución de yodo-yoduro

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
--------------	------------	----------

Cristales de yodo	6,0	g
-------------------	-----	---

Yoduro de potasio	6,0	g
-------------------	-----	---

Agua destilada	100,0	ml
----------------	-------	----

Disolver los cristales y el yoduro de potasio en agua destilada hasta completar 100 ml. Conservar en frasco ámbar.

6.1.5.3 Solución salina al 0,85%

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
--------------	------------	----------

Cloruro de sodio	0,85	g
------------------	------	---

Agua destilada	100,00	ml
----------------	--------	----

Disolver el cloruro de sodio en el agua y esterilizar a 15 min a 121°C $\pm$ 1°C.

6.1.5.4 Solución salina formalizada

Fórmula

Ingredientes	Cantidades	Unidades
--------------	------------	----------

Solución de formaldehído (36-38%)	6,0	ml
-----------------------------------	-----	----

Cloruro de sodio	8,5	g
------------------	-----	---

Agua destilada	1,0	l
----------------	-----	---

Disolver 8,5 g de cloruro de sodio en 1 litro de agua destilada. Esterilizar a 15 min a $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Enfriar a temperatura ambiente. Adicionar 6 ml de la solución de formaldehído. No esterilizar después de la adición de formaldehído.

6.1.5.5 Reactivo de Kovac

Fórmula

Ingredientes Cantidades Unidades

p-dimetil-aminobenzaldehído 5,0 g

Alcohol amílico 75,0 ml

Acido clorhídrico concentrado 25,0 ml

Disolver el p-dimetil-aminobenzaldehído en el alcohol amílico y después agregar el ácido clorhídrico lentamente. Conservar en frasco ámbar en refrigeración.

6.1.5.6 Solución de alfa-naftol al 5%

Fórmula

Ingredientes Cantidades Unidades

Alfa-naftol 5,0 g

Alcohol 100,0 ml

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

6.1.5.7 Solución de rojo de metilo

Fórmula

Ingredientes Cantidades Unidades

Rojo de metilo 0,10 g

Alcohol etílico 300,00 ml

Agua destilada c.b.p. 500,00 ml

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

6.1.5.8 Solución de hidróxido de potasio al 40%

Fórmula

Ingredientes Cantidades Unidades

Hidróxido de potasio 40,0 g

Agua destilada 100,0 ml

Disolver 40 g de hidróxido de potasio en agua hasta completar 100 ml.

6.1.5.9 Solución de gelatinasa al 5%

Fórmula

Ingredientes Cantidades Unidades

Gelatinasa 5,0 g

Agua 100,0 ml

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

6.1.6 Antisueros

Antisuero polivalente somático (O)

Antisuero polivalente flagelar (H)

Antisuero Vi

6.2 Material

Matraces Erlenmeyer de 500 ml

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

Angulos de vidrio

Cucharas, bisturíes, cuchillos y pinzas

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

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

Pipetas bacteriológicas de 10,0 y 5,0 ml, graduadas en 0,1 ml y protegidas con tapón de algodón
Pipetas de 1 ml, con graduaciones de 0,01 ml
Cajas de petri estériles de vidrio o desechables
Rejillas para tubos de ensaye
Asa de platino o nicromel de aproximadamente 3 mm de diámetro
Papel pH (intervalo de 6-8) con graduaciones máximas de 0,4 unidades de pH para cambios de color
Todo el material que tenga contacto con las muestras bajo estudio debe esterilizarse mediante:
Horno, durante 2 horas a 170-175°C o autoclave, durante 15 min a 121°C $\pm$ 1°C.

7. Equipo

Horno para esterilizar que alcance los 180°C
Incubadora con termostato para evitar variaciones mayores de $\pm 0,1^\circ\text{C}$ y termómetro
Autoclave con termómetro o manómetro, probado con termómetro de máximas
Baño maría con termostato y termómetro
Balanza granataria con sensibilidad de 0,1 g
Licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato, con vasos esterilizables (vidrio o aluminio)
Mecheros Bunsen o Fisher
Potenciómetro

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 ± 2 h a 35°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°C por 15 min aproximadamente con agitación constante en un baño de agua o por 18 h a una temperatura entre 2-5°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 tetratiónato, 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 tetratiónato 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 (15 min a 121°C ±1°C.) 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 tetratiónato y 10 ml de caldo lauril triptosa. Incubar los medios selectivos por 24 ±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 tetracionato (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 tetracionato. 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 tetrationato y a otro con 10 ml de caldo selenito cistina. Como alternativa, en sustitución del caldo tetrationato puede emplearse el medio Vassiliadis-Rappaport.

8.2.2 Incubar de 18 a 24 h a 35°C, 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 tetrationato.

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 azulverdes con o sin centro negro. En algunos casos las colonias pueden aparecer completamente negras.

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

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

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 vire púrpura de las reacciones positivas con el color del medio original. Incubar 24 ± 2 h a 35°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 $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ en baño de agua.

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

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 grupoespecíficos, solicitar la tipificación de la cepa al Laboratorio de Enterobacterias del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia de la Secretaría de Salud o al Laboratorio Nacional de Salud Pública.

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 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 ± 2°C.

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 ± 2 h a 35 ± 2°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 ± 2°C o 4 h a temperatura ambiente.

Prueba positiva: desarrollo de color rojo ladrillo.

Prueba negativa: sin cambio de color.

Reincubar el resto del medio RM-VP 48 h más a 35 ± 2°C

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 ± 2 h a 35 ± 2°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 ± 2 h a 35 ± 2°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 bioquímicas Reacciones serológicas Interpretación
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 púrpura amarillo +
(LIA)

H₂S (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.

10. Concordancia con normas internacionales

Esta norma no tiene concordancia con normas internacionales.

11. Bibliografía

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

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

11.3 Secretaría de Salud. 1988. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.

11.4 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. NOM-008-SCFI-1993. Norma Oficial Mexicana. Sistema General de Unidades de Medida. México, D.F.

11.5 Amador L.R. y col. 1993. Manual de Laboratorio de Microbiología Sanitaria. IPN-ENCB. 2a. edición. pp. 139-153.

11.6 Ewing, W.H. y Ewing's. 1986. Identification of Enterobacteriaceae. 4th. Edition. Elsevier. New York.

11.7 ISO 6579. 1990. Microbiology-General guidance on methods for detection of *Salmonella*. International Organization for Standardization. Second edition.

11.8 Manual Difco. 1984. Medios de Cultivo Deshidratados y Reactivos para Microbiología. Difco Laboratories. Detroit Michigan USA. Décima edición. pp. 765, 946, 1042, 1044 y 1128.

11.9 Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1990. Vol. I. 15th. Edition, USA. pp. 467-492.

11.10 Poelma L.P. y Silliker H.J. 1984. *Salmonella*; Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Second Edition. American Public Health Association. Washington, DC. pp. 301-328.

11.11 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Norma Z-013/02. 1981. Guía para la Redacción, Estructuración y Presentación de las Normas Oficiales Mexicanas. México, D.F.

11.12 Secretaría de Salud. 1992. Manual de Técnicas y Procedimientos para Análisis Microbiológico de leche en polvo. México, D.F. pp. 11-18.

11.13 Secretaría de Salud. 1989. Manual de Técnicas y Procedimientos para Análisis Microbiológico de productos cárnicos. México, D.F. pp. 15-24 y 28-30.

11.14 Wallace H.A.; Paul L.P. and Clyde R. W. 1984. Isolation and Identification of *Salmonella* Species. FDA. Bacteriological Analytical Manual. Chapter 7. 6th. Edition. pp. 7.01-7.18.

12. Observancia de la norma

La vigilancia del cumplimiento de la presente norma corresponde a la Secretaría de Salud.

13. Vigencia

La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor con su carácter obligatoria a los treinta días siguientes a partir de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

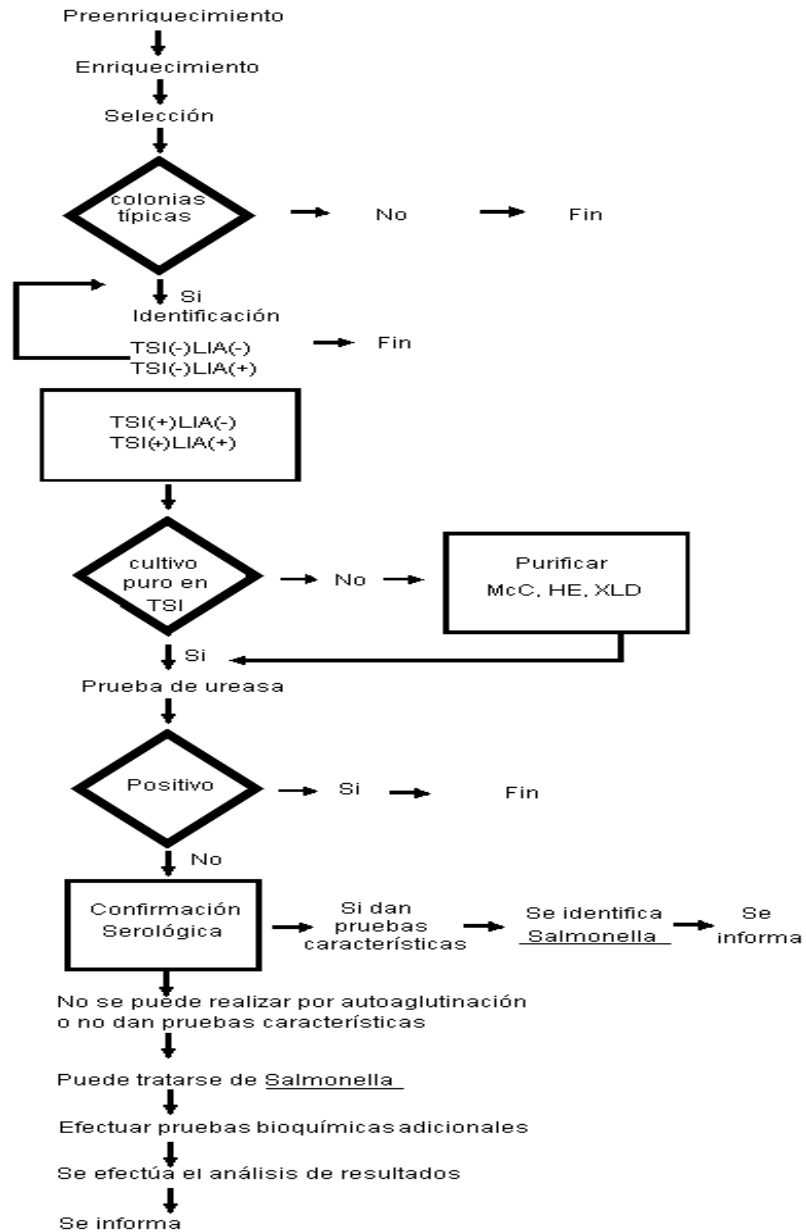
Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 10 de mayo de 1995.- El Director General, José Meljem Moctezuma.- Rúbrica.

APENDICE INFORMATIVO A

APENDICE INFORMATIVO A

A, DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA DETERMINACION DE SALMONELLA



Fecha de publicación: 22 de septiembre de 1995

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-115-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN ALIMENTOS.

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

JOSE MELJEM MOCTEZUMA, Director General de Control Sanitario de Bienes y Servicios, por acuerdo del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en los artículos 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 38 fracción II, 47 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 194 fracción I de la Ley General de Salud; 2o. fracción III, 34, 37, 40 y los demás aplicables del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios; 8o. fracción IV y 13 fracción I del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud.

PREFACIO

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

SECRETARIA DE SALUD

Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios

Laboratorio Nacional de Salud Pública

SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA Y DESARROLLO RURAL

Comisión Nacional del Agua

SECRETARIA DE MEDIO AMBIENTE, RECURSOS NATURALES Y PESCA

Instituto Nacional de la Pesca

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

JUGOS DEL VALLE, S.A. DE C.V.

LABORATORIO FERMI, S.A.

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

LECHE INDUSTRIALIZADA CONASUPO, S.A DE C.V. LICONSA

SOCIEDAD MEXICANA DE NORMALIZACION Y CERTIFICACION, S.C.

NORMEX

INDICE

0. INTRODUCCION
1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION
2. FUNDAMENTO
3. REFERENCIAS
4. DEFINICIONES
5. SIMBOLOS Y ABREVIATURAS
6. REACTIVOS Y MATERIALES
7. APARATOS
8. PREPARACION DE LA MUESTRA
9. PROCEDIMIENTO
10. CALCULO Y EXPRESION DE RESULTADOS
11. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES
12. BIBLIOGRAFIA
13. OBSERVANCIA DE LA NORMA
14. VIGENCIA

0. Introducción

El crecimiento de *Staphylococcus aureus* en alimentos tiene gran importancia por tratarse de un microorganismo capaz de producir una poderosa enterotoxina que al ingerirse causa intoxicaciones alimentarias.

Entre las razones para determinar el *Staphylococcus aureus* en alimentos están:

Confirmar la presencia de este microorganismo como agente causal de una enfermedad de origen alimentario.

Determinar si un alimento o ingrediente es fuente potencial de este microorganismo enterotoxigénico.

Demostrar la contaminación postproceso la cual es usualmente debida a contacto humano o con superficies inadecuadamente sanitizadas.

Los alimentos sujetos a contaminación postproceso con tipos enterotoxigénicos de *Staphylococcus aureus* representan un riesgo por la ausencia de flora competitiva que normalmente restringe el crecimiento del *Staphylococcus aureus* y la producción de enterotoxinas.

Este tipo de alimentos se vuelven más peligrosos, si además son sujetos a un inadecuado manejo o son mantenidos a temperaturas de conservación inapropiadas.

Los alimentos perecederos tales como: carnes crudas y procesadas, ensaladas, productos de pastelería y productos de leche, son los más comúnmente asociados con intoxicación estafilocócica.

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta Norma Oficial Mexicana establece el método microbiológico para determinar la cuenta de *Staphylococcus aureus* presente en alimentos nacionales o de importación.

1.2 Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el territorio nacional para las personas físicas o morales que requieran efectuar este método en alimentos, para fines oficiales.

2. Fundamento

Este método permite hacer una estimación del contenido de *Staphylococcus aureus* en alimentos, se efectúa directamente en placas de medio de cultivo selectivo y diferencial, con la confirmación mediante las pruebas de coagulasa y termonucleasa.

Este método es adecuado para el análisis de alimentos en los cuales se esperen más de 100 células de *Staphylococcus aureus* por g.

3. Referencias

Esta norma se complementa con lo siguiente:

NOM-109-SSA1-1994 Procedimiento 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.*

4. Definiciones

Para fines de esta norma se entiende por:

Staphylococcus aureus, microorganismo que se desarrolla en medios de cultivo selectivo y diferencial, que es capaz de dar positiva la prueba de coagulasa y termonucleasa.

5. Símbolos y abreviaturas

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

kg	kilogramo
cm ²	centímetro cuadrado
g	gramo
l	litro
ml	mililitro
cm	centímetro
mm	milímetro
h	hora
min	minuto
seg	segundo
°C	grados Celsius
N	normal
M	molar
PM	peso molecular
pH	potencial de hidrógeno
±	más o menos
%	por ciento
/	por
µm	micrómetro
UFC	unidades formadoras de colonias

6. Reactivos y materiales

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

Cuando se mencione agua debe entenderse que se trata de "agua destilada".

Los reactivos a emplear en el método objeto de esta norma deben ser grado analítico.

6.1 Reactivos

6.1.1 Soluciones diluyentes

6.1.1.1 Solución reguladora de fosfatos (Solución concentrada)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Fosfato monopotásico	34,0 g
Agua	1,0 l

Preparación. Disolver el fosfato en 500 ml de agua y ajustar el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio 1 N, aforar con agua a 1 l. Esterilizar durante 15 min a 121°C $\pm$ 1, conservar en refrigeración (solución concentrada). Tomar 1,25 ml de la solución concentrada y llevar a 1 l con agua (solución de trabajo). Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml según se requiera. Esterilizar a 121°C $\pm$ 1 durante 15 min.

Después de la esterilización, los volúmenes finales y el pH de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

6.1.1.2 Agua peptonada

FORMULA

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

Preparación. Disolver los componentes en un litro de agua. Ajustar el pH a 7,0 con solución de hidróxido de sodio 1N. Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml según se requiera. Esterilizar a 121°C $\pm$ 1 durante 15 min. Después de la esterilización los volúmenes finales y el pH de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

6.1.2 Medios de cultivo

6.1.2.1 Medio de Baird-Parker

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Medio base (6.1.2.1.1)	95,0 ml
Solución de telurito de potasio (6.1.2.1.2)	1,0 ml
Emulsión de yema de huevo (6.1.2.1.3)	5,0 ml

Preparación. Cuando el medio base esté a 45°C, agregar los demás ingredientes y mezclar. Colocar de 15 a 20 ml del medio completo, enfriar y dejar solidificar. Las placas pueden almacenarse por 48 h a temperatura de 0 a 5°C.

6.1.2.1.1 Medio base de Baird-Parker

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Tryptona	10,0 g
Extracto de levadura	1,0 g
Extracto de carne	5,0 g
Glicina	12,0 g
Cloruro de litio	5,0 g
Piruvato de sodio	10,0 g
Agar	20,0 g
Agua	1,0 l

Preparación. Disolver los ingredientes o el agar base en agua y calentar con agitación constante y hervir durante 1 min. Esterilizar a $121^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante 15 min. Enfriar y mantener el medio a 45°C .

6.1.2.1.2 Solución de telurito

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Telurito de potasio	1,0 g
Agua	100,0 ml

Preparación. Disolver el telurito de potasio en agua y esterilizar. La solución puede ser almacenada por varios meses a temperatura de 0 a 5°C .

6.1.2.1.3 Emulsión de yema de huevo

Preparación. Lavar con agua y jabón los huevos frescos que sean necesarios y limpiarlos con una solución de tintura de yodo (solución alcohólica al 2%) o sumergirlos en solución de cloruro mercurico (1:1000). Enjuagar con agua estéril y secar con gasa estéril.

En campana de flujo laminar o en condiciones asépticas, abrir los huevos y vaciarlos en un separador de claras estéril. Transferir las yemas a una probeta hasta un volumen de 60 ml y completar a 90 ml con solución salina isotónica.

Verter la emulsión a un matraz Erlenmeyer con perlas de vidrio estéril y agitar fuertemente para formar la emulsión.

Filtrar a través de gasa. Las placas deben utilizarse dentro de las 48 h siguientes a su preparación.

6.1.2.1.4 Solución salina isotónica

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
--------------	----------

Cloruro de sodio 0,85 g

Agua 100,0 ml

Preparación. Disolver el ingrediente en agua y esterilizar a 121°C ±1 durante 15 min.

6.1.2.2 Caldo de infusión cerebro-corazón (BHI)

FORMULA

Ingredientes	Cantidad
Infusión de cerebro de ternera	200,0 ml
Infusión de corazón de res	250,0 ml
Peptona de gelatina	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Fosfato disódico dodecahidratado	2,5 g
Glucosa	2,0 g
Agua	1,0 l

Preparación. Disolver los ingredientes en agua y calentar ligeramente si es necesario. Distribuir y esterilizar durante 15 min a 121°C ±1.

6.1.2.3 Acido desoxirribonucleico helicoidal de timo de ternera.

FORMULA

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

Preparación. Disolver los ingredientes, excepto el azul de toluidina agitando hasta completar la disolución del ácido desoxirribonucleico y calentar a ebullición. Agregar el azul de toluidina. Distribuir en frascos pequeños con tapón de hule. No es necesario esterilizar. Este medio es estable a temperatura ambiente hasta 4 meses y funciona perfectamente aun después de fundirlo varias veces. Tomar un porta objetos limpio y agregar 3 ml del medio fundido esparciéndolo por la superficie. Cuando el agar solidifique, hacer orificios con la punta de una pipeta Pasteur. Conservar en refrigeración para evitar la deshidratación.

6.1.2.3.1 Solución de cloruro de calcio anhidro 0,01 M

Cloruro de calcio PM = 110,99

Disolver 0,1199 g de cloruro de calcio en 100 ml de agua.

6.1.2.3.2 Solución de azul de toluidina 0,1 M

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

6.1.2.3.3 Solución amortiguadora 0,05 M Tris-(hidroximetilaminometano)

(Tris pH 9) PM = 121,1

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

6.1.3 Reactivo biológico:

Plasma de conejo

Emplear plasma de conejo deshidratado o rehidratado siguiendo las instrucciones del fabricante y agregar ácido etilendiaminotetracético (EDTA) en solución al 0,1% en plasma rehidratado. Si se utiliza plasma deshidratado diluir con agua estéril en proporción de 1:3.

Puede emplearse plasma de conejo liofilizado adicionado de EDTA. No debe emplearse sangre citratada.

6.2 Materiales

Todos los instrumentos que se utilicen para trabajar la muestra deben esterilizarse mediante horno, durante 2 h de 170-175°C o como alternativa en autoclave durante 15 min como mínimo a 121°C $\pm$ 1.

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

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

Tubos de cultivo de 10 mm x 75 mm.

Cajas Petri de 90 a 100 mm de diámetro.

Pipetas bacteriológicas de 1 ml y 10 ml de capacidad graduadas en 0,1 ml y 1 ml respectivamente y diámetro de 2 a 3 mm.

Pipetas Pasteur.

Probetas.

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

Matraz Erlenmeyer con perlas de vidrio

Cámara húmeda: consiste en una caja Petri en la cual se coloca una varilla de vidrio en forma de "V" rodeada de algodón humedecido con agua.

7. Aparatos

Horno para esterilizar que alcance 180°C.

Autoclave con termómetro.

Baño de agua con regulador de temperatura de 35 $\pm$ 0,5°C.

Baño de agua con regulador de temperatura de 45 $\pm$ 0,5°C.

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

Incubadora a 35 $\pm$ 1°C.

8. Preparación de la muestra

La preparación de la muestra se debe realizar de acuerdo a lo establecido en la NOM-110-SSA1-1994 "Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico".

9. Procedimiento

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

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

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

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

9.5 Seleccionar las placas que tengan entre 15 y 150 colonias típicas de *Staphylococcus aureus*; si no es posible, seleccionar las placas de las diluciones más altas no obstante tengan más de 150 colonias.

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

9.7 Las colonias típicas son negras, circulares, brillantes, convexas, lisas, de diámetro de 1 a 2 mm y muestran una zona opaca y un halo claro alrededor de la colonia.

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

CUADRO

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

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

9.10 Incubar a 35°C durante 24 h.

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

9.12 Después del periodo de incubación pasar con una pipeta de 1 ml, 0,3 ml de cada cultivo a otro tubo de 10 mm x 75 mm y conservarlo para la prueba de termonucleasa. El resto del cultivo se usa para la prueba de coagulasa.

9.13 Prueba de coagulasa

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

9.13.2 Incubar en baño de agua de 35 a 37°C y observar durante 6 h a intervalos de 1 h; si no hay formación de coágulo, observar a las 24 h. Considerar positiva la prueba si hay formación de coágulo.

Para comprobar la coagulabilidad del plasma de conejo se añade una gota de cloruro de calcio al 5% a 0,5 ml de plasma reconstituido empleado, formándose un coágulo en 10-15 seg.

9.14 Prueba de termonucleasa

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

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

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

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

10. Cálculo y expresión de resultados

10.1 Cálculo

Hacer el cálculo del contenido de microorganismos en el producto tomando en cuenta el número de colonias totales, el número de colonias confirmadas, la dilución y el volumen inoculado (0,1 ml).

Ejemplo 1:

Si la caja tiene 80 colonias en la dilución 1:1000

Se toman 5 colonias para la prueba, de éstas dan 4 positivas, el cálculo es:

$$80 \times 4 = 64 \times 1000 \times 10 = 640\,000$$

5

Ejemplo 2:

Si la caja tiene 14 colonias en la dilución 1:10

Se toman 3 colonias para la prueba, de éstas dan 2 positivas, el cálculo es:

$$14 \times 2 = 9,3 \times 10 \times 10 = 930$$

3

10.2 Expresión de los resultados:

Según ejemplo 1:

Informar como *Staphylococcus aureus* 640 000 UFC/g

Según ejemplo 2:

Informar como *Staphylococcus aureus* 930 UFC/g valor estimado

Si las pruebas confirmativas resultan negativas en todas las colonias probadas, informar como:

0 UFC/g en muestras directas

-10 UFC/g en muestras de dilución 1:10

-100 UFC/g en muestras de dilución 1:100

En la práctica los resultados pueden variar, esto dependerá del técnico que trabaje el método y el grado de confiabilidad del mismo, que en el 95% de los casos es de $\pm 16\%$ a $\pm 52\%$.

11. Concordancia con normas internacionales

Esta norma no tiene concordancia con normas internacionales.

12. Bibliografía

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

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

12.3 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1993. NOM-008-SCFI-1993 Sistema General de Unidades de Medida. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.

12.4 Food and Drug Administration. 1978. Bacteriological Analytical Manual. 6th ed. Cap. XI p.p 4-5.

12.5 Koneman E./Stephen D. Diagnóstico Microbiológico. 3ra. ed. Editorial Médica Panamericana Uruguay. p.p. 295

12.6 Secretaría de Salud. Manual para la determinación de Staphylococcus aureus. Laboratorio Nacional de Salud Pública. México, D.F. p.p. 12-14 y 26-28.

12.7 NORMA ISO. 6888. 1983. General Guidance for the Enumeration of Staphylococcus aureus-Colony Count Technique. International Organization for Standardization

12.8 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1981
NORMA-Z-013/02. Guía para la Redacción, Estructuración y Presentación de las Normas Oficiales Mexicanas. México, D.F.

12.9 Poelman L.P./Silleker H.J. 1984. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Staphylococcus aureus. 2nd ed. Ed. American Public Health Association. Washington, D.C.

13. Observancia de la Norma

La vigilancia del cumplimiento de la presente norma corresponde a la Secretaría de Salud.

14. Vigencia

La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor con su carácter de obligatoria a partir de los treinta días siguientes a su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 10 de mayo de 1995.- El Director General, José Meljem Moctezuma.- Rúbrica.

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

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

JOSE MELJEM MOCTEZUMA, Director General de Control Sanitario de Bienes y Servicios, por acuerdo del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en los artículos 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 38 fracción II, 47 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 194 fracción I de la Ley General de Salud; 20. fracción III, 34, 37, 40 y demás aplicables del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios; 80. fracción IV y 13 fracción I del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud.

PREFACIO

En la elaboración de la presente norma participaron los siguientes Organismos e Instituciones:

SECRETARIA DE SALUD

Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios

Laboratorio Nacional de Salud Pública

SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA Y DESARROLLO RURAL

Comisión Nacional del Agua

SECRETARIA DE MEDIO AMBIENTE, RECURSOS NATURALES Y PESCA

Instituto Nacional de la Pesca

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

INDUSTRIAS VINICOLAS PEDRO DOMECQ, S.A. DE C.V.

JUGOS DEL VALLE, S.A. DE C.V.

LABORATORIO FERMI, S.A.

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

LECHE INDUSTRIALIZADA CONASUPO, S.A. DE C.V. LICONSA

SIGMA ALIMENTOS, S.A. DE C.V.

SOCIEDAD MEXICANA DE NORMALIZACION Y CERTIFICACION, S.C.

NORMEX

INDICE

0. INTRODUCCION
1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION
2. FUNDAMENTO
3. REFERENCIAS
4. DEFINICIONES
5. SIMBOLOS Y ABREVIATURAS
6. REACTIVOS Y MATERIALES
7. APARATOS E INSTRUMENTOS
8. PREPARACION DE LA MUESTRA
9. PROCEDIMIENTO
10. EXPRESION DE LOS RESULTADOS
11. INFORME DE LA PRUEBA
12. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES
13. BIBLIOGRAFIA
14. OBSERVANCIA DE LA NORMA
15. VIGENCIA

0. Introducción

Las bacterias coliformes son un grupo heterogéneo compuesto por varios. Existe poca evidencia que indique que estas bacterias coliformes pertenezcan a un solo género taxonómico.

La falta de certeza en cuanto a su filiación taxonómica y la imprecisa correlación entre los métodos recomendados para la detección de coliformes han presentado problemas. El primero, es que

Escherichia coli es aceptada como bacteria coliforme, la especie contiene variantes que no producen gas de la lactosa o lo hacen después de 48 horas, por lo que no se les identifica por medio de esta técnica. Segundo, la capacidad de fermentar la lactosa está frecuentemente asociada a genes localizados en plásmidos. Estos determinantes extracromosomales son fácilmente transferidos entre otras bacterias Gram negativas no relacionadas a las coliformes, que pueden, en consecuencia, ser recuperadas en la etapa inicial del análisis. No obstante en la práctica, la técnica ha demostrado su efectividad.

El número de organismos se establece mediante la cuenta de unidades formadoras de colonias (NOM-113-SSA1-1994. Método para la Cuenta de Microorganismos Coliformes Totales en Placa) o el uso de la técnica del número más probable. Esta última, también llamada técnica de dilución en tubo, proporciona una estimación estadística de la densidad microbiana presente con base a que la probabilidad de obtener tubos con crecimiento positivo disminuye conforme es menor el volumen de muestra inoculado.

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta Norma Oficial Mexicana establece el método microbiológico para estimar el número de coliformes presentes en productos alimenticios, por medio del cálculo del número más probable (NMP) después de la incubación a 35 °C de la muestra diluida en un medio líquido.

Este procedimiento puede aplicarse a agua potable, agua purificada, hielo y alimentos procesados térmicamente, así como a muestras destinadas a evaluar la eficiencia de prácticas sanitarias en la industria alimentaria. Este procedimiento debe seleccionarse cuando la densidad esperada es como mínimo de una bacteria en 10 ml de producto líquido o una bacteria por gramo de alimento sólido.

Cuando la densidad bacteriana sea menor que la aquí citada y si la naturaleza del alimento lo permite, utilizar el método de filtrado en membrana. Si la densidad microbiana se espera sea mayor a 100 por mililitro o gramo de muestra, ampliar el intervalo de diluciones o utilizar el método en placa.

1.2 Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el territorio nacional para las personas físicas o morales que requieran efectuar este método en productos nacionales o de importación, para fines oficiales.

2. Fundamento

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

3. Referencias

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.*

4. Definiciones

Para fines de esta norma se entiende por:

Coliformes, bacilos Gram negativos, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos, que a 35 °C fermentan la lactosa con la producción de gas bajo las condiciones especificadas en esta norma.

5. Símbolos y abreviaturas

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

g	gramo
ml	mililitro
l	litro
mm	milímetro
°C	grado Celsius
%	por ciento
pH	potencial de hidrógeno
N	normal
NMP	número más probable

6. Reactivos y materiales

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

6.1 Reactivos

6.1.1 Soluciones diluyentes

6.1.1.1 Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada)

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
--------------	------------

Fosfato monopotásico	34,0 g
----------------------	--------

Agua	1,0 l
------	-------

Preparación: Disolver el fosfato en 500 ml de agua y ajustar el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio 1 N. Llevar a un litro con agua. Esterilizar durante 15 minutos a $121 \pm 1,0$ °C. Conservar en refrigeración (solución concentrada). Tomar 1,25 ml de la solución concentrada y llevar a un litro con agua. Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml según se requiera. Esterilizar durante 15 minutos a 121 ± 1 °C. Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

6.1.1.2. Agua peptonada

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
--------------	------------

Peptona	1,0 g
---------	-------

Cloruro de sodio	8,5 g
------------------	-------

Agua	1,0 l
------	-------

Preparación: Disolver los componentes en un litro de agua. Ajustar el pH a 7,0 con hidróxido de sodio 1 N. Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml o en cualquier volumen múltiplo de nueve según se requiera. Esterilizar durante 15 minutos a $121 \pm 1,0$ °C. Después de la esterilización los volúmenes finales de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

Si este diluyente no es usado inmediatamente, almacenar en lugar obscuro a una temperatura entre 0 a 5 °C por un tiempo no mayor de un mes, en condiciones tales que no alteren su volumen o composición.

6.1.2 Medios de cultivo.

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

Caldo lauril sulfato triptosa (medio de enriquecimiento selectivo).

Caldo lactosa bilis verde brillante (medio de confirmación).

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

6.1.2.1 Caldo lactosado

CUADRO 1

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

Disolver los ingredientes en 1 l de agua, calentando si es necesario o el medio completo deshidratado, siguiendo las instrucciones del fabricante. Ajustar el pH final de tal manera que después de la esterilización éste sea de $6,9 \pm 0,2$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Distribuir en volúmenes de 10 ml en tubos con dimensiones de 16 x 160 mm el medio de concentración sencilla y de 20 ml en tubos de 20 x 200 mm el medio de concentración 1,5, cada tubo debe tener campana de fermentación. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a $121 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Enfriar rápidamente para evitar una exposición excesiva al calor. El aspecto del caldo es claro y de color beige. Se puede utilizar una concentración doble del medio de cultivo, en cuyo caso se emplearán 10 ml del caldo preparado, cuando se agreguen 10 ml de la muestra.

6.1.2.2 Caldo lauril sulfato triptosa.

CUADRO 2

Ingrediente	Medio de	Medio de
	concentración 1,5	concentración sencilla
Triptosa	30,0g	20,0g
Lactosa	7,5g	5,0g
Fosfato dipotásico	4,125g	2,75g
Fosfato monopotásico	4,125g	2,75g
Cloruro de sodio	7,50g	5,0g
Lauril sulfato de sodio	0,15g	0,1g
Agua destilada	1000,0 ml	1000,0 ml

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

Las campanas de fermentación no deben de contener burbujas de aire después de la esterilización. Se puede utilizar una concentración doble del medio de cultivo, en cuyo caso se emplearán 10 ml de caldo preparado, cuando se agreguen 10 ml de muestra.

6.1.2.3 Caldo lactosa bilis verde brillante

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Peptona	10,0 g
Lactosa	10,0 g
Sales biliares	20,0 g
Verde brillante	0,0133 g
Agua	1,0 l

Disolver los componentes o el medio completo deshidratado en agua, calentar si es necesario. Ajustar el pH, de tal manera que después de la esterilización éste sea de 7,2 a 25 °C. Distribuir el medio en cantidades de 10 ml en tubos de 16 X 160 mm conteniendo campana de fermentación. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a $121 \pm 1,0$ °C. Las campanas de fermentación no deben contener burbujas de aire después de la esterilización.

6.2 Materiales

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

Frascos de vidrio de 250 ml con tapón de rosca.

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

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

Campanas de fermentación (tubos de Durham).

Pipetas bacteriológicas graduadas de 10 y 1 ml.

Gradillas.

Asa de platino o nicromel de aproximadamente 3 mm de diámetro.

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

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

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

7. Aparatos e instrumentos

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

Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de $\pm 1,0$ °C, provista con termómetro calibrado.

Termómetro de máximas y mínimas.

Autoclave que alcance una temperatura mínima de $121 \pm 1,0$ °C.

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

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 ± 0,5 °C por 24 ± 2 horas y observar si hay formación de gas, en caso contrario prolongar la incubación hasta 48 ± 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 ± 0,5 °C por 24 ± 2 horas o si la formación de gas no se observa en este tiempo, prolongar la incubación por 48 ± 2 horas.

En esta Norma Oficial Mexicana se considera una combinación de tres tubos por cada dilución de la serie. Para algunos productos y siempre que se requiera una mayor precisión en los resultados, será necesario inocular una serie de cinco o diez tubos.

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).

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

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

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

positivos cuando se usasen varios números de tubos. (Diluciones 10, 1,0 y 0,1 g)						
		3 tubos por dilución		5 tubos por dilución		
combinación	índice	95% Límites de		índice	95% Límites de	
de	del NMP	confianza		del NMP	confianza	
positivos	por g	bajo	alto	por g	bajo	alto
0-0-0	<0,03	<0,005	<0,09	<0,02	<0,005	<0,07
0-0-1	0,03	<0,005	<0,09	0,02	<0,005	0,07
0-1-0	0,03	<0,005	0,13	0,02	<0,005	0,07
0-2-0	--	--	--	0,04	<0,005	0,11
1-0-0	0,04	<0,005	0,20	0,02	<0,005	0,07
1-0-1	0,07	0,01	0,21	0,04	<0,005	0,11
1-1-0	0,07	0,01	0,23	0,04	<0,005	0,11
1-1-1	0,11	0,03	0,36	0,06	<0,005	0,15
1-2-0	0,11	0,03	0,36	0,06	<0,005	0,15
2-0-0	0,09	0,01	0,36	0,05	<0,005	0,13
2-0-1	0,14	0,03	0,37	0,07	0,01	0,17
2-1-0	0,15	0,03	0,44	0,07	0,01	0,17
2-1-1	0,20	0,07	0,89	0,09	0,02	0,21
2-2-0	0,21	0,04	0,47	0,09	0,02	0,21
2-2-1	0,28	0,10	1,50	--	--	--
2-3-0	--	--	--	0,12	0,03	0,28
3-0-0	0,23	0,04	1,20	0,08	0,01	0,19
3-0-1	0,39	0,07	1,3	0,11	0,02	0,25
3-0-2	0,64	0,15	3,80	--	--	--
3-1-0	0,43	0,07	2,1	0,11	0,02	0,25
3-1-1	0,75	0,14	2,3	0,14	0,04	0,34
3-1-2	1,20	0,30	3,8	--	--	--
3-2-0	0,93	0,15	3,80	0,14	0,04	0,34
3-2-1	1,50	0,30	4,40	0,17	0,05	0,46
3-2-2	2,10	0,35	4,70	--	--	--
3-3-0	2,40	0,36	13,0	--	--	--
3-3-1	4,60	0,71	24,0	--	--	--
3-3-2	11,0	1,50	48,0	--	--	--
3-3-3	>11,0	>1,50	>48,0	--	--	--

4-0-0	--	0,13	0,03	0,31
4-0-1	--	0,17	0,05	0,46
4-1-0	--	0,17	0,05	0,46
4-1-1	--	0,21	0,07	0,63
4-1-2	--	0,26	0,09	0,78
4-2-0	--	0,22	0,07	0,67
4-2-1	--	0,26	0,09	0,78
4-3-0	--	0,27	0,09	0,80
4-3-1	--	0,33	0,11	0,93
4-4-0	--	0,34	0,12	0,93
5-0-0	--	0,23	0,07	0,70
5-0-1	--	0,31	0,11	0,89
5-0-2	--	0,43	0,15	1,14
5-1-0	--	0,33	0,11	0,93
5-1-1	--	0,46	0,16	1,2
5-1-2	--	0,63	0,21	1,5
5-2-0	--	0,49	0,17	1,3
5-2-1	--	0,70	0,23	1,70
5-2-2	--	0,94	0,28	2,2
5-3-0	--	0,79	0,25	1,9
5-3-1	--	1,10	0,31	2,5
5-3-2	--	1,4	0,37	3,4
5-3-3	--	1,80	0,44	5,0
5-4-0	--	1,30	0,35	3,0
5-4-1	--	1,70	0,43	4,9
5-4-2	--	2,20	0,57	7,0
5-4-3	--	2,80	0,90	8,5
5-4-4	--	3,50	1,20	10,0
5-5-0	--	2,40	0,68	7,5
5-5-1	--	3,50	1,60	10,0
5-5-2	--	5,40	1,80	14,0
5-5-3	--	9,20	3,0	32,0
5-5-4	--	16,09	6,40	58,0
5-5-5	--	--	--	--

CUADRO 5. Índice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos. (Diluciones 1,0, 0,1 y 0,01 g)a

combinación de positivos	3 tubos por dilución			5 tubos por dilución		
	índice del NMP	95% Límites de confianza		índice del NMP	95% Límites de confianza	
	por g	bajo	alto	por g	bajo	alto
0-0-0	<0,3	<0,05	<0,9	<0,2	<0,05	<0,7
0-0-1	0,3	<0,05	<0,9	0,2	<0,05	0,7
0-1-0	0,3	<0,05	1,3	0,2	<0,05	0,7
0-2-0	--	--	--	0,4	<0,05	0,11
1-0-0	0,4	<0,05	2,0	0,2	<0,05	0,7
1-0-1	0,7	0,1	2,0	0,4	<0,05	1,1
1-1-0	0,7	0,1	2,3	0,4	<0,05	1,1
1-1-1	1,1	0,3	3,6	0,6	<0,05	1,5
1-2-0	1,1	0,3	3,6	0,6	<0,05	1,5
2-0-0	0,9	0,1	3,6	0,5	<0,05	1,3
2-0-1	1,4	0,3	3,7	0,7	0,1	1,7
2-1-0	1,5	0,3	4,4	0,7	0,1	1,7
2-1-1	2,0	0,7	8,9	0,9	0,2	2,1
2-2-0	2,1	0,4	4,7	0,9	0,2	2,1
2-2-1	2,8	1,0	15,0	--	--	--
2-3-0	--	--	--	1,2	0,3	2,8
3-0-0	2,3	0,4	12,0	0,8	0,1	1,9
3-0-1	3,9	0,7	13,0	1,1	0,2	2,5
3-0-2	6,4	1,5	38,0	--	--	--
3-1-0	4,3	0,7	21,0	1,1	0,2	2,5
3-1-1	7,5	1,4	23,0	1,4	0,4	3,4
3-1-2	12,0	3,0	38,0	--	--	--
3-2-0	9,3	1,5	38,0	1,4	0,4	3,4
3-2-1	15,0	3,0	44,0	1,7	0,5	4,6
3-2-2	21,0	3,5	47,0	--	--	--
3-3-0	24,0	3,6	130,0	--	--	--
3-3-1	46,0	7,1	240,0	--	--	--
3-3-2	110,0	15,0	480,0	--	--	--

3-3-3	>110,0	>15,0	>480,0	—	—	—
4-0-0	—			1,3	0,3	3,1
4-0-1	—			1,7	0,5	4,6
4-1-0	—			1,7	0,5	4,6
4-1-1	—			2,1	0,7	6,3
4-1-2	—			2,6	0,9	7,8
4-2-0	—			2,2	0,7	6,7
4-2-1	—			2,6	0,9	7,8
4-3-0	—			2,7	0,9	8,0
4-3-1	—			3,3	1,1	9,3
4-4-0	—			3,4	1,2	9,3
5-0-0	—			2,3	0,7	7,0
5-0-1	—			3,1	1,1	8,9
5-0-2	—			4,3	1,5	11,4
5-1-0	—			3,3	1,1	9,3
5-1-1	—			4,6	1,6	12,0
5-1-2	—			6,3	2,1	15,0
5-2-0	—			4,9	1,7	13,0
5-2-1	—			7,0	2,3	17,0
5-2-2	—			9,4	2,8	22,0
5-3-0	—			7,9	2,5	19,0
5-3-1	—			11,0	3,1	25,0
5-3-2	—			14,0	3,7	34,0
5-3-3	—			18,0	4,4	50,0
5-4-0	—			13,0	3,5	30,0
5-4-1	—			17,0	4,3	49,0
5-4-2	—			22,0	5,7	70,0
5-4-3	—			28,0	9,0	85,0
5-4-4	—			35,0	12,0	100,0
5-5-0	—			24,0	6,8	75,0
5-5-1	—			35,0	12,0	100,0
5-5-2	—			54,0	18,0	140,0
5-5-3	—			92,0	30,0	320,0
5-5-4	—			161,0	64,0	580,0

CUADRO 6. Índice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos. (Diluciones 0,1, 0,01 y 0,001 g)a

combinación de positivos	3 tubos por dilución			5 tubos por dilución		
	índice	95% Límites de		índice	95% Límites de	
	del NMP	confianza		del NMP	confianza	
	por g	bajo	alto	por g	bajo	alto
0-0-0	<3	<0,5	<9	<2	<0,5	<7
0-0-1	3	<0,5	9	2	<0,5	7
0-1-0	3	<0,5	13	2	<0,5	7
0-2-0	--	--	--	4	<0,5	11
1-0-0	4	<0,5	20	2	<0,5	7
1-0-1	7	1	21	4	<0,5	11
1-1-0	7	1	23	4	<0,5	11
1-1-1	11	3	36	6	<0,5	15
1-2-0	11	3	36	6	<0,5	15
2-0-0	9	1	36	5	<0,5	13
2-0-1	14	3	37	7	1,0	17
2-1-0	15	3	44	7	1,0	17
2-1-1	20	7	89	9	2,0	21
2-2-0	21	4	47	9	2,0	21
2-2-1	28	10	150	--	--	--
2-3-0	--	--	--	12	3,0	28
3-0-0	23	4	120	8	1,0	19
3-0-1	39	7	13	11	2,0	25
3-0-2	64	15	380	--	--	--
3-1-0	43	7	210	11	2,0	25
3-1-1	75	14	230	14	4,0	34
3-1-2	120	30	380	--	--	--
3-2-0	93	15	380	14	4,0	34
3-2-1	150	30	440	17	5,0	46
3-2-2	210	35	470	--	--	--
3-3-0	240	36	130	--	--	--
3-3-1	460	71	240	--	--	--
3-3-2	1100	150	480	--	--	--
3-3-3	>1100	>150	>480	--	--	--

4-0-0	--	13	3,0	31
4-0-1	--	17	5,0	46
4-1-0	--	17	5,0	46
4-1-1	--	21	7,0	63
4-1-2	--	26	9,0	78
4-2-0	--	22	7,0	67
4-2-1	--	26	9,0	78
4-3-0	--	27	9,0	80
4-3-1	--	33	11,0	93
4-4-0	--	34	12,0	93
5-0-0	--	23	7,0	70
5-0-1	--	31	11,0	89
5-0-2	--	43	15,0	114
5-1-0	--	33	11,0	93
5-1-1	--	46	16,0	120
5-1-2	--	63	21,0	150
5-2-0	--	49	17,0	130
5-2-1	--	70	23,0	170
5-2-2	--	94	28,0	220
5-3-0	--	79	25,0	190
5-3-1	--	110	31,0	250
5-3-2	--	140	37,0	340
5-3-3	--	180	44,0	500
5-4-0	--	130	35,0	300
5-4-1	--	170	43,0	490
5-4-2	--	220	57,0	700
5-4-3	--	280	90,0	850
5-4-4	--	350	120,0	1000
5-5-0	--	240	68,0	750
5-5-1	--	350	120,0	1000
5-5-2	--	540	180,0	1400
5-5-3	--	920	300,0	3200
5-5-4	--	1600	640,0	5800
5-5-5	--	>1600	>640,0	>5800

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

combinación de positivos	3 tubos por dilución			5 tubos por dilución		
	índice del NMP por g	95% Límites de confianza		índice del NMP por g	95% Límites de confianza	
		bajo	alto		bajo	alto
0-0-0	<30	<5	<90	<20	<5	<70
0-0-1	30	<5	<90	20	<5	70
0-1-0	30	<5	130	20	<5	70
0-2-0	--	--	--	40	<5	110
1-0-0	40	<5	200	20	<5	70
1-0-1	70	10	210	40	<5	110
1-1-0	70	10	230	40	<5	110
1-1-1	110	30	360	60	<5	150
1-2-0	110	30	360	60	<5	150
2-0-0	90	10	360	50	<5	130
2-0-1	140	30	370	70	10	170
2-1-0	150	30	440	70	10	170
2-1-1	200	70	890	90	20	210
2-2-0	210	40	470	90	20	210
2-2-1	280	100	1500	--	--	--
2-3-0	--	--	--	120	30	280
3-0-0	230	40	1200	80	10	190
3-0-1	390	70	1300	110	20	250
3-0-2	640	150	3800	--	--	--
3-1-0	430	70	2100	110	20	250
3-1-1	750	140	2300	140	40	340
3-1-2	1200	300	3800	--	--	--
3-2-0	930	150	3800	140	40	340
3-2-1	1500	300	4400	170	50	460
3-2-2	2100	350	4700	--	--	--
3-3-0	2400	360	13000	--	--	--
3-3-1	4600	710	24000	--	--	--
3-3-2	11000	1500	48000	--	--	--
3-3-3	>11000	>1500	>48000	--	--	--

4-0-0	--	130	30	310
4-0-1	--	170	50	460
4-1-0	--	170	50	460
4-1-1	--	210	70	630
4-1-2	--	260	90	780
4-2-0	--	220	70	670
4-2-1	--	260	90	780
4-3-0	--	270	90	800
4-3-1	--	330	110	930
4-4-0	--	340	120	930
5-0-0	--	230	70	700
5-0-1	--	310	110	890
5-0-2	--	430	150	1140
5-1-0	--	330	110	930
5-1-1	--	460	160	1200
5-1-2	--	630	210	1500
5-2-0	--	490	170	1300
5-2-1	--	700	230	1700
5-2-2	--	940	280	2200
5-3-0	--	790	250	1900
5-3-1	--	1100	310	2500
5-3-2	--	1400	370	3400
5-3-3	--	1800	440	5000
5-4-0	--	1300	350	3000
5-4-1	--	1700	430	4900
5-4-2	--	2200	570	7000
5-4-3	--	2800	900	8500
5-4-4	--	3500	1200	10000
5-5-0	--	2400	680	7500
5-5-1	--	3500	1200	10000
5-5-2	--	5400	1800	14000
5-5-3	--	9200	3000	32000
5-5-4	--	16000	6400	58000
5-5-5	--	>16000	>6400	>58000

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.

12. Concordancia con normas internacionales

Esta norma no tiene concordancia con normas internacionales.

13. Bibliografía

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

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

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

13.4 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. NOM-008-SCFI-1993. Norma Oficial Mexicana. Sistema General de Unidades de Medida.

13.5 Bacteriological Analytical Manual. 1984. Food and Drugs Administration FDA. Bureau of Foods. Division of Microbiology. 6a Ed. Washington, D.C.

13.6 Norma ISO 4831 2a. 1991. Microbiology - General guidance for the enumeration of coliforms - Most probable number technique. International Organization for Standardization.

13.7 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. NORMA-Z-013/02. 1981. Guía para la Redacción, Estructuración y Presentación de las Normas Oficiales Mexicanas.

13.8 Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 1989. American Public Health Association. APHA-WWA-WPCF. 17o. Ed. Washington D.C.

13.9 Vanderzant F., Carland S. y Don F. 1992. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association. Washington, D.C.

14. Observancia de la norma

La vigilancia del cumplimiento de la presente norma corresponde a la Secretaría de Salud.

15. Vigencia

La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor con su carácter de obligatorio a los 30 días siguientes a partir de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 10 de mayo de 1995.- El Director General, José Meljem Moctezuma.- Rúbrica.

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

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

JOSE MELJEM MOCTEZUMA, Director General de Control Sanitario de Bienes y Servicios, por acuerdo del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en los artículos 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 38 fracción II, 47 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 194 fracción I de la Ley General de Salud; 2o. fracción III, 34, 37, 40 y demás aplicables del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios; 8o. fracción IV y 13 fracción I del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud.

PREFACIO

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

SECRETARIA DE SALUD

Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios

Laboratorio Nacional de Salud Pública

SECRETARIA DE MEDIO AMBIENTE, RECURSOS NATURALES Y PESCA

Instituto Nacional de la Pesca

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

INDUSTRIAS VINICOLAS PEDRO DOMECQ, S.A. DE C.V.

JUGOS DEL VALLE, S.A. DE C.V.

LECHE INDUSTRIALIZADA CONASUPO, S.A. DE C.V. LICONSA

SIGMA ALIMENTOS, S.A. DE C.V.

SOCIEDAD MEXICANA DE NORMALIZACION Y CERTIFICACION, S.C.

NORMEX

INDICE

0. INTRODUCCION
1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION
2. FUNDAMENTO
3. REFERENCIAS
4. DEFINICIONES
5. SIMBOLOS Y ABREVIATURAS
6. REACTIVOS Y MATERIALES
7. APARATOS E INSTRUMENTOS
8. PREPARACION DE LA MUESTRA
9. PROCEDIMIENTO
10. EXPRESION DE RESULTADOS
11. INFORME DE LA PRUEBA
12. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES
13. BIBLIOGRAFIA
14. OBSERVANCIA DE LA NORMA
15. VIGENCIA

0. Introducción

Los mohos y levaduras están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se pueden encontrar formando parte de la flora normal de un alimento, o como agentes contaminantes y en los equipos sanitizados inadecuadamente, provocando el deterioro fisicoquímico de éstos, debido a la utilización en su metabolismo de los carbohidratos, ácidos orgánicos, proteínas y lípidos originando mal olor,

alterando el sabor y el color en la superficie de los productos contaminados. Además los mohos y levaduras pueden sintetizar metabolitos tóxicos termoresistentes, capaces de soportar algunas sustancias químicas, así como la irradiación y presentan capacidad para alterar sustratos desfavorables, permitiendo el crecimiento de bacterias patógenas.

Es de gran importancia cuantificar los mohos y levaduras en los alimentos, puesto que al establecer la cuenta de estos microorganismos, permite su utilización como un indicador de prácticas sanitarias inadecuadas durante la producción y el almacenamiento de los productos, así como el uso de materia prima inadecuada.

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta Norma Oficial Mexicana establece el método general para determinar el número de mohos y levaduras viables presentes en productos destinados al consumo humano por medio de la cuenta en placa a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

1.2 Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el Territorio Nacional para las personas físicas o morales que requieran efectuar este método en productos nacionales o de importación, para fines oficiales.

2. Fundamento

El método se basa en inocular una cantidad conocida de muestra de prueba en un medio selectivo específico, acidificado a un pH 3,5 e incubado a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, dando como resultado el crecimiento de colonias características para este tipo de microorganismos.

3. Referencias

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.*

4. Definiciones

Para fines de esta Norma se entiende por:

4.1 Colonias, agrupamiento de células en forma de masas visibles, sobre el agar de cultivo.

4.2 Levaduras, son microorganismos cuya forma dominante de crecimiento es unicelular. Poseen un núcleo y se multiplican por reproducción sexual o asexual, por gemación o por fisión transversal. La reproducción sexual cuando ocurre, es por medio de ascosporas contenidas en un saco o asca.

4.3 Mohos, grupo de hongos microscópicos; organismos pertenecientes al reino Fungi, que se caracterizan por tener un cuerpo formado por estructura filamentosa con ramificaciones, que se conocen con el nombre de hifas, el conjunto de hifas constituye el micelio, carecen de clorofila, se alimentan por absorción pudiendo propagarse por esporas flageladas o no, las paredes celulares pueden ser de queratina, celulosa o manana. Crecen formando colonias en un medio selectivo a 25°C .

4.4 Unidades Formadoras de Colonias (UFC), término que debe utilizarse para reportar la cuenta de colonias en placa, las cuales pueden surgir de una célula o de un cúmulo de células.

5. Símbolos y abreviaturas

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

mm milímetro

μm micrómetro

g gramo
 ml mililitro
 pH potencial de hidrógeno
 N normal
 °C grado Celsius
 % por ciento
 UFC unidades formadoras de colonias
 l litro
 h hora

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°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 $45 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$.

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

Registrador mecánico o electrónico.

Microscopio óptico.

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

8. Preparación de la muestra

La preparación de la muestra debe ser de acuerdo a lo establecido en la NOM-110-SSA1-1994. Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

9. Procedimiento

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

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

9.3 Verter de 15 a 20 ml de agar papa dextrosa acidificado, fundido y mantenido a $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$ en un baño de agua. El tiempo transcurrido entre la preparación de la dilución primaria y el momento en que es vertido el medio de cultivo, no debe exceder de 20 minutos.

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

9.5 Preparar una caja control con 15 ml de medio, para verificar la esterilidad.

9.6 Invertir las cajas y colocarlas en la incubadora a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

9.7 Contar las colonias de cada placa después de 3, 4 y 5 días de incubación. Después de 5 días, seleccionar aquellas placas que contengan entre 10 y 150 colonias. Si alguna parte de la caja muestra crecimiento extendido de mohos o si es difícil contar colonias bien aisladas, considerar los conteos de 4 días de incubación y aún de 3 días. En este caso, informar el periodo de incubación de 3 o 4 días en los resultados del análisis.

9.8 Si es necesario, cuando la morfología colonial no sea suficiente, examinar microscópicamente para distinguir las colonias de levaduras y mohos de las bacterias.

10. Expresión de resultados

Cálculo del Método

Considerar las cuentas de placas con 10 a 150 colonias como las adecuadas para el informe. Multiplicar por el inverso de la dilución, tomando en consideración los criterios de la NOM-092-SSA1-1994. Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa, para la expresión de resultados.

11. Informe de la prueba

Informar:

Unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro (UFC/g o ml) de mohos en agar papa - dextrosa acidificado, incubadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 5 días.

Unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro (UFC/g o ml) de levaduras en agar papa-dextrosa acidificado, incubadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 5 días.

12. Concordancia con normas internacionales

Esta Norma no tiene concordancia con normas internacionales.

13. Bibliografía

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

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

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

13.4 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. NOM-008-SCFI-1993. Norma Oficial Mexicana. Sistema General de Unidades de Medida.

13.5 Bacteriological Analytical Manual. 1984. Food and Drugs Administration FDA. Bureau of Foods. Division of Microbiology. 6a Ed. Washington, D.C.

13.6 Norma ISO 7954. 1987. Microbiology - General Guidance for Enumeration of Yeast and Moulds - Colony Count Technique at 25°C . International Organization for Standardization.

13.7 NORMA-Z-013/02. 1981. Guía para la Redacción, Estructuración y Presentación de las Normas Oficiales Mexicanas. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial.

13.9 Vanderzant F., Carland S., y Don F., 1992. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association. Washington, D.C.

14. Observancia de la Norma

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

15. Vigencia

La presente Norma Oficial Mexicana, entrará en vigor con su carácter obligatorio a los 30 días siguientes a partir de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 10 de mayo de 1995.- El Director General, José Meljem Moctezuma.- Rúbrica.