



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD
HIGIÉNICO-SANITARIA DE QUESOS FRESCOS
ARTESANALES QUE SE
CONSUMEN EN LA CIUDAD DE MÉXICO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

AURORA FERNANDA QUINTERO PAIZ



MÉXICO, D.F.,

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Federico Galdeano Bienzobas

VOCAL: Profesor: Rodolfo Pastelín Palacios

SECRETARIO: Profesor: Eduardo Bonilla Espinosa

1ER SUPLENTE: Profesor: Fabiola González Olguín

2º SUPLENTE: Profesor: Rosalba Esquivel Cote

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 1-B Edificio A, Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM

ASESOR DEL TEMA: Dr. Rodolfo Pastelín Palacios

SUPERVISORA TÉCNICA: Q.F.B. Norma Castellanos Chávez

SUSTENTANTE: Aurora Fernanda Quintero Paiz

AGRADECIMIENTOS

Hace ya 5 años empezó esta historia... hoy se escribe su final y no podría ser mejor que éste. Se cerró el ciclo y me llena de satisfacción saber que todas las metas que me planteé se han cumplido. Afortunadamente este camino no lo he recorrido sola, y no puedo dejar de agradecer a todos aquellos que forman parte de este momento:

A **Dios**, por tomarme de la mano y llevarme hasta aquí, a terminar una maravillosa etapa en mi vida, llena de satisfacciones e increíbles momentos para recordar.

A las personas que más admiro en esta vida:

Mi **mamá**, por su apoyo incondicional, por todas las lágrimas que derramé en su hombro, por escucharme y aconsejarme en los momentos más difíciles y ser la luz que me ha guiado hasta aquí. Te amo!

Mi **papá**, por ser mi superhéroe, darme un gran ejemplo de fortaleza, perseverancia, constancia y entrega. Te amo!

Al topil de **mi hermano**, con el que compartí maravillosos momentos y que siempre ha tenido la capacidad de dibujar una sonrisa en mi rostro. Te adoro!

Los Quintero, por todo el cariño que día a día me hace más fuerte y por la confianza que han depositado en mí.

Los Paiz, por ser el ejemplo más grande de unión y amor que he podido tener. A pesar de la distancia, los siento tan cerca...

A mis amigas, **las maravillosas QAs**, por el excelente trabajo en equipo, tantos momentos para recordar y esta amistad que es para siempre.

A todos **mis amigos** y aquellas personas que han dejado una huella en mi vida, por estar ahí, por las risas, el llanto, la complicidad... que hicieron de mi estancia en la universidad una experiencia única.

Al **Dr. Rodolfo** y la **maestra Normiux**, por las excelentes clases de microbiología, todo el apoyo que me han dado y el compromiso de estar ahí durante este proyecto.

A la **Universidad**, donde se encuentran los recuerdos de la mejor etapa de mi vida hasta ahora.

INDICE GENERAL

	Página
I. Resumen	1
II. Introducción	3
Generalidades	3
Normatividad Mexicana	8
Microorganismos indicadores de la calidad e inocuidad microbiológicas de los alimentos	9
Mesófilos aerobios	10
Coliformes totales	10
<i>Escherichia coli</i>	11
<i>Staphylococcus aureus</i>	14
Presencia de <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> en leche y queso	17
Métodos tradicionales de análisis microbiológico	18
Métodos rápidos de análisis microbiológico	21
Placas Petrifilm	25
El sistema API y la identificación bioquímica	29
Sensibilidad a antimicrobianos	30
III. Objetivos	39
IV. Justificación	39
V. Hipótesis	40
VI. Materiales y métodos	40
1. Validación del método	43
2. Análisis presuntivo: Placas Petrifilm 3M	43
2.1 Almacenamiento	43
2.2 Preparación de la muestra	44
2.3 Inoculación	44
2.4 Incubación	45
3. Conservación de cepas características de <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	46
4. Identificación bioquímica. Sistema API 20E y API Staph	47
4.1 Utilización de las galerías API 20E y API Staph	47
4.1.1 Preparación de la galería	47
4.1.2 Preparación del inóculo	48
4.1.3 Inoculación de la galería	48
4.1.4 Lectura e interpretación	49
5. Sensibilidad a antimicrobianos	50
5.1 Material y reactivos	50
5.1.1. Agar Müeller-Hinton	50
5.1.2. Discos antimicrobianos	50
5.1.3. Estándar de turbidez	50
5.2 Procedimiento	51
5.2.1. Inoculación de cajas petri por el método Estándar	51
5.2.2. Procedimiento de prueba	51
5.2.3. Procedimientos de control de calidad	52

	5.2.3.1. Límites de tamaño de zona de Inhibición	52
	5.2.3.2. Fuentes comunes de error	52
VII.	Resultados	53
VIII.	Discusión	73
IX.	Conclusiones	87
X.	Bibliografía	89
	Apéndice 1. Medios de Cultivo y disoluciones	94

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación de quesos	7
Tabla 2. Exotoxinas y factores de virulencia extracelulares producidos por <i>S. aureus</i>	15
Tabla 3. Kits para detección de bacterias asociadas con alimentos	23
Tabla 4. Ensayos inmunológicos más representativos en la industria de alimentos	24
Tabla 5. Métodos moleculares	25
Tabla 6. Tamaños de las zonas de inhibición en algunas pruebas de susceptibilidad a discos de antimicrobianos	36
Tabla 7. Comparación de la capacidad de recuperación de <i>E. coli</i> en el método tradicional y en placas Petrifilm	53
Tabla 8. Análisis microbiológico. Quesos artesanales	55
Tabla 9. Análisis microbiológico. Quesos industriales	55
Tabla 10. Identificación bioquímica de Enterobacterias mediante tiras API 20E	61
Tabla 11. Identificación bioquímica mediante el sistema API Staph	64
Tabla 12. Sensibilidad de cepas de <i>Kluyvera spp</i> aisladas a diversos antimicrobianos	66
Tabla 13. Sensibilidad de cepas de <i>Serratia odorifera</i> aisladas a diversos antimicrobianos	66
Tabla 14. Sensibilidad de cepas de <i>Klebsiella ornithinolytica</i> aisladas a diversos antimicrobianos	67
Tabla 15. Sensibilidad de cepas de <i>Enterobacter cloacae</i> aisladas a diversos antimicrobianos	67
Tabla 16. Sensibilidad de cepas de <i>Serratia liquefaciens</i> aisladas a diversos antimicrobianos	67
Tabla 17. Sensibilidad de cepas de <i>Staphylococcus lentus</i> a diferentes antibióticos	69
Tabla 18. Sensibilidad de cepas de <i>Staphylococcus xylosus</i> a diferentes antibióticos	70
Tabla 19. Sensibilidad de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> a diferentes antibióticos	70
Tabla 20. Sensibilidad de cepas de <i>Staphylococcus saprophyticus</i> a diferentes antibióticos	70
Tabla 21. Resistencia antimicrobiana de Enterobacterias	84
Tabla 22. Resistencia antimicrobiana de <i>Staphylococcus</i>	86

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. <i>Escherichia coli</i>	12
Figura 2. <i>Staphylococcus aureus</i>	15
Figura 3. Estructura de una enterotoxina estafilocócica	16
Figura 4. Placas Petrifilm	26
Figura 5. Placas Petrifilm AC	27
Figura 6. Placas Petrifilm EC	28
Figura 7. Mecanismo de reacción entre sustrato y enzima en la Placa Petrifilm EC	28
Figura 8. Placas Staph Express	29
Figura 9. Tiras API para la identificación bioquímica	30
Figura 10. Emergencia de bacterias resistentes a drogas antimicrobianas	32
Figura 11. Aparición de resistencia a drogas antimicrobianas en algunos patógenos humanos	33
Figura 12. Evaluación de un antibiótico mediante el método de dilución en tubo	34
Figura 13. Método de difusión en agar para determinar la actividad de un antibiótico	35
Figura 14. Comparación de la presencia de <i>E. coli</i> en medio RVBA y Placas Petrifilm 3M	53
Figura 15. Placa EC. Cuenta de coliformes totales	56
Figura 16. Placa AC. Cuenta de mesófilas aerobios	56
Figura 17. Placa EC. Cuenta de <i>E. coli</i>	56
Figura 18. Placa Staph Express	56
Figura 19. Uso del Disco Staph Express	56
Figura 20. <i>Escherichia coli</i> en queso fresco identificado mediante la técnica de Placas Petrifilm	57
Figura 21. <i>Staphylococcus aureus</i> en queso fresco identificado mediante Placas Petrifilm	57
Figura 22. Microbiología de queso fresco	58
Figura 23. Cumplimiento de la NOM-121-SSA1-1994: Coliformes totales.	58
Figura 24. Cumplimiento de la NOM-121-SSA1-1994: <i>Staphylococcus aureus</i>	59
Figura 25. Aislamiento de <i>E. coli</i> en Agar Rojo Bilis Violeta (RVBA)	60
Figura 26. Identificación de Enterobacterias mediante el sistema API 20E.	62
Figura 27. Sistema API 20E para identificación bioquímica	62
Figura 28. Aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i> en Agar Manitol Sal (MSA)	63
Figura 29. Galería API Staph con resultados positivos para <i>Staphylococcus epidermidis</i>	64

	Página
Figura 30. Identificación bioquímica mediante el sistema API Staph	65
Figura 31. Técnica de difusión en agar y uso de sensidiscos para la evaluación de sensibilidad de enterobacterias a diferentes antimicrobianos	68
Figura 32. Sensibilidad a antimicrobianos: Enterobacterias	68
Figura 33. Técnica de difusión en agar y uso de sensidiscos para la evaluación de sensibilidad de bacterias Gram positivas a diferentes antimicrobianos	71
Figura 34. Resistencia a antimicrobianos: <i>Staphylococcus</i>	71

I. RESUMEN

Los alimentos que consumimos raramente son estériles; en ellos se puede encontrar una microbiota que varía dependiendo de la composición del alimento y de las condiciones en las que éste se procese, almacene y distribuya. En la mayoría de los casos, la microflora patógena presente no tiene un efecto apreciable en el alimento, como cambios de color y aroma, así que éste es consumido pudiendo causar enfermedades.

El queso fresco, objeto de nuestro estudio, es un alimento ampliamente consumido por la población mexicana y en él, debido a su composición y actividad de agua, es posible encontrar una gran variedad de microorganismos, siendo de especial importancia los patógenos como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, dos bacterias que se sabe están relacionadas con enfermedades transmitidas por alimentos. Su identificación es importante debido a varias razones:

1. Su presencia en queso se encuentra regulada por la norma correspondiente a este tipo de productos, NOM-121-SSA1-1994.
2. La presencia de ambos microorganismos es un indicador de la calidad del producto, permitiéndonos saber si fueron llevadas a cabo buenas prácticas de manufactura y procedimientos de calidad adecuados;
3. Estos patógenos tienen gran importancia sanitaria y su presencia nos lleva a inferir el impacto que pueden tener en la población que las consume y así tomar medidas preventivas y correctivas en cuanto a estas bacterias se refiere.
4. Su resistencia a antibióticos ha ido en aumento con el paso del tiempo, por lo que la búsqueda de antimicrobianos efectivos contra estas bacterias adquiere gran importancia.

Para identificar los microorganismos causantes de las enfermedades transmitidas por alimentos se cuenta con métodos tradicionales donde son necesarias grandes cantidades de medios de cultivo y reactivos y requieren de múltiples pasos que implican tiempos de incubación prolongados para obtener resultados. Por esta razón se han desarrollado métodos rápidos para la identificación de microorganismos que han resultado ser una herramienta muy útil debido a las ventajas que presentan sobre

los métodos convencionales^{5,12,14}. Se pensó en el uso de estos métodos rápidos para fines de nuestro análisis por las siguientes razones:

1. Ahorro de tiempo, costos en cuanto a materia prima y espacio
2. Obtención de resultados precisos
3. Disminución de la variabilidad en resultados^{1,18,19,20}

Dentro de las 30 muestras analizadas, en el 53% *E. coli* estuvo presente y *S. aureus* se aisló en el 73% de los casos, según la técnica rápida de las placas Petrifilm 3M. Después de la identificación bioquímica, ninguna de las cepas ensayadas resultó ser *E. coli* y únicamente el 7.14% resultó ser *S. aureus*.

En cuanto a la resistencia a antimicrobianos, el 35% de las cepas de enterobacterias es multirresistente; se tuvo que el 100% de los microorganismos fueron resistentes a ciprofloxacina, cefotaxima, amikacina, gentamicina, netilmicina y norfloxacina; mientras que el menor porcentaje de resistencia se presentó ante ampicilina, únicamente 5%. En el caso de los cocos gram positivos aislados, se vio que ninguna de las cepas fue resistente a ciprofloxacina, gentamicina, sulfametoxazol-trimetoprim y vancomicina; el 46.15% de las cepas resultó multirresistente y la mayor resistencia se presentó ante la penicilina, siendo el 69% de los microorganismos resistente a este antimicrobiano.

II. INTRODUCCIÓN

Desde tiempos remotos se han escrito documentos o normas que regulan la higiene en los alimentos. Las primeras referencias que se tienen son el Antiguo Testamento, los escritos de Confucio, los libros del Islam y el hinduismo, y manifiestan un concepto vago de la causa real de las enfermedades transmitidas por alimentos. Actualmente se sabe que éstas <<constituyen el problema sanitario más universal y difundido en el mundo contemporáneo>> (OMS, 1992). Así, existe una gran preocupación respecto a la calidad y seguridad de los alimentos, pues es bien conocido que, al ser matrices complejas de nutrientes, sirven como vehículos para muchos microorganismos patógenos, cuyo origen es diverso: contaminación de las materias primas, el proceso, el almacenamiento, el punto de venta o el lugar de preparación.

Los quesos frescos son un alimento consumido ampliamente por varios sectores de la población y son vendidos en todo tipo de establecimientos (mercados, supermercados, tienditas, entre otros) en donde las medidas de higiene, control de calidad del producto y manipulación varían. Los quesos frescos se elaboran muchas veces a base de leche bronca, para mantener un concepto de alimento "natural" y "orgánico", características que satisfacen a un gran grupos de consumidores en la actualidad; además, generalmente este alimento se consume sin recibir un tratamiento térmico previo a la ingesta que pudiera ayudar a disminuir la carga microbiana que contienen, en especial, de aquellas especies que resultan patógenas para el ser humano.

Escherichia coli y *Staphylococcus aureus* son dos de las bacterias más relacionadas con enfermedades transmitidas por alimentos, siendo los derivados lácteos algunos de los principales productos asociados con brotes importantes, convirtiéndose así en un problema de salud pública⁶. Según algunos estudios realizados, aproximadamente el 63% de los brotes de enfermedades relacionadas con queso se debió al uso de leche bronca como materia prima y 16% a una pasteurización inadecuada de la misma. En cuanto a los agentes contaminantes asociados a leche cruda, *E. coli* y *S. aureus* se encuentran relacionados a aproximadamente en el 9% de los brotes reportados. Si hablamos de producto elaborado a partir de leche sometida a pasteurización deficiente, las cifras son distintas: el 40% de los brotes se deben a *S. aureus*.⁴⁸

Por estas razones, es necesaria la implementación de estrictos controles de calidad que permitan asegurar la inocuidad de los alimentos.

Calidad se define como el grado de excelencia que posee un producto, es decir, cuan bueno es para cumplir su finalidad¹. El concepto de *calidad alimentaria* es asociado con la seguridad para el consumidor y engloba, fundamentalmente, los aspectos higiénicos-sanitarios y nutritivos de los alimentos. En los términos de la microbiología de los alimentos, la calidad comprende tres aspectos:

1. *Inocuidad*. Un alimento no debe contener niveles de un patógeno o de su toxina que es probable que causen trastornos cuando se consume.
2. *Aceptabilidad/vida comercial*. Un alimento no debe contener niveles de microorganismos suficientes para convertirlo en alterado desde el punto de vista organoléptico en un tiempo inadmisiblemente corto.
3. *Estabilidad*. Un alimento debe ser de calidad constante tanto con respecto a su inocuidad como con respecto a su vida comercial. El consumidor no admitirá productos que presenten grandes variaciones en cuanto a su vida comercial de un lote a otro y evidentemente tampoco está dispuesto a poner en riesgo su salud cada vez que come un determinado producto. ^{1,6}

Dentro de un alimento, los microorganismos presentes pueden desempeñar diversas funciones como son: alteración del alimento, ayuda en procesos o causar alguna enfermedad. Para fines de este estudio, consideraremos de mayor importancia estos últimos, al ser un problema de salud pública a nivel mundial.⁶

Para caracterizar los microorganismos que se cultivan y aíslan de diferentes muestras de alimentos existen muchas técnicas. Las más comúnmente utilizadas son la descripción de las características morfológicas y las pruebas bioquímicas, basadas en técnicas tradicionales según la normatividad mexicana. Sin embargo, se han hecho muchos esfuerzos por crear y evaluar sistemas un poco más avanzados de identificación de microorganismos, que permitan un ahorro de tiempo y recursos obteniendo resultados altamente confiables.⁴⁵

Todos los alimentos tienen posibilidades de transmitir enfermedades, y la leche y los productos lácteos no son la excepción. Los animales productores de leche pueden ser portadores de agentes patógenos para los seres humanos con lo que se aumenta el riesgo de contraer enfermedades transmitidas por alimentos. Además, durante las actividades de ordeño, la manipulación posterior de la leche y su almacenamiento existen riesgos de contaminación por contacto con el hombre o el medio y de proliferación de patógenos intrínsecos. Cabe recordar que muchos de los productos lácteos, debido a su composición, constituyen un medio propicio para el desarrollo de microorganismos.⁸

La leche y los productos lácteos constituyen una fuente común y abundante de nutrientes para la población a nivel mundial, y el volumen del comercio internacional de productos derivados de la leche es muy grande.⁴⁵

Las fuentes de microorganismos patógenos en leche cruda son las vacas, los trabajadores involucrados con todas las operaciones desde la granja hasta el punto de venta del producto terminado y el ambiente en el cual la leche y el producto son manejados. Las vacas pueden excretar patógenos a través de heces y ubres; los trabajadores pueden ser portadores y transmitir los microorganismos al alimento a través de piel y mucosas y el factor ambiental que frecuentemente introduce patógenos a los productos lácteos, incluida la leche bronca, es el agua.²⁷

Entre las enfermedades que se han transmitido a los humanos a través de la ingesta de productos lácteos se encuentran: brucelosis, leptospirosis, listeriosis, fiebre tifoidea, gastroenteritis por toxina de *Staphylococcus aureus*, tuberculosis, encefalitis, toxoplasmosis y toxiinfecciones provocadas por cepas de *Escherichia coli*, cuyos síntomas más comunes son diarrea y vómito. Si se llevan a cabo buenas prácticas de manufactura, es raro encontrar microorganismos patógenos provenientes del ambiente o de personal, pues se inactivan con pasteurización u otros tratamientos térmicos. Sin embargo, siempre existe la posibilidad de que ocurra contaminación post-pasteurización.²⁷

Un control efectivo de los microorganismos patógenos que se encuentran en leche y productos lácteos incluye la aplicación de medidas de sanidad a través de toda la

cadena de producción, manejo, pasteurización y distribución de la leche y sus derivados. Existen diversos tratamientos térmicos usados comercialmente para reducir la población de microorganismos potencialmente patógenos en alimentos de origen lácteo, entre los que se encuentran: pasteurización, UHT (Ultra High Temperature Treatment – Ultra Pasteurización) y esterilización. Las mayores ventajas de estos procesos se obtienen cuando se aplican a la leche cruda, pues así se garantiza una mayor calidad en el producto terminado. La pasteurización es el tratamiento térmico más usado y su objetivo es inactivar las células vegetativas de microorganismos patógenos. La muerte de microorganismos que causan descomposición es otra de las ventajas de este proceso, aunque no es su objetivo primordial.⁴⁵

El queso es un producto alimenticio que se define como “producto elaborado con la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenido por la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos pudiendo por su proceso ser: fresco, madurado o procesado”.³⁴

Dentro de los diferentes tipos de queso que existen en nuestro país de acuerdo a la clasificación que señala la NOM-121-SSA1-1994, encontramos a los quesos frescos, objeto de estudio de esta investigación y que se caracterizan por ser productos de alto contenido de humedad, sabor suave y no tener corteza, pudiendo o no adicionarle ingredientes opcionales y tener un periodo de vida de anaquel corto, requiriendo condiciones de refrigeración. La mayoría de los quesos frescos artesanales no siguen un proceso de pasteurización y debido a su composición y alta actividad acuosa, se puede encontrar una gran variedad de microorganismos, incluidos algunos patógenos que representan hoy en día un problema de salud pública.

A continuación se muestra la clasificación de los quesos en base a la NOM-121-SSA1-1994:

Tabla 1. Clasificación de quesos

Variedad	Ejemplos
<i>Frescos</i>	
Frescales	Panela, Canasto, Sierra. Ranchero, Fresco, Blanco, Enchilado, Adobado.
De pasta cocida	Oaxaca, Asadero, Mozzarella, Del Morral, Adobera
Acidificados	Cottage, Crema, Doble crema, Petít Suisse, Nuefchatel.
<i>Madurados</i>	
Madurados prensados de pasta dura	Añejo, Parmesano, Cotija,
Madurados prensados	Cheddar, Chester, Chihuahua, Manchego, Brick, Edam, Gouda. Gruyere, Emmental. Cheshire, Holandés, Amsterdam, Butterkase, Coulomiers, Dambo, Erom, Friese, Fynbo. Havarti, Harzer-Kase, Herrgardsost, Huskallsost, Leidse, Manbo, Norvergia, Provolone, Port Salut, Romadur, Saint Paulin,
De maduración con mohos	Azul, Cabrales, Camembert, Roquefort, Danablu, Limburgo, Brie.

La población mexicana consume una gran cantidad de productos lácteos, entre los que destacan los quesos frescos, que son elaborados la mayoría de las veces con leche bronca y se venden en diferentes tipos de comercios, en los cuales muchas veces no se cuenta con un sistema de refrigeración; así, el queso es consumido 1 o 2 días después de su elaboración y mantiene cierto carácter de producto "fresco" y "natural", características apreciadas por ciertos grupos de consumidores. Además, se debe tomar en cuenta que, debido a la elaboración más sencilla en comparación con quesos madurados, son los que se encuentran más accesibles para las clases económicas más desprotegidas y además, son más susceptibles a contaminación por bacterias patógenas. Entre las características que distinguen a los quesos frescos se encuentran su alto contenido de humedad y proteína, por lo que durante su elaboración se pueden presentar puntos críticos que pueden favorecer:

- ✓ Presencia de mastitis en el animal del que se extrae la leche
- ✓ Falta de limpieza del sitio de ordeña y manos del ordeñador
- ✓ Falta de limpieza previa de las glándulas mamarias

- ✓ Empleo de utensilios sucios y sin desinfectar
- ✓ Exposición del queso al ambiente sin empaque apropiado⁸

En nuestro país la población en el año 2008 ha destinado en promedio 9 mil millones de pesos a la compra de derivados lácteos, siendo uno de los principales el queso fresco, que representa el 80% de la producción total de lácteos, junto con la leche fluida, leche en polvo y yogurt⁴⁹. Esta cifra se pronostica aumentará a lo largo de los años en todas las clases sociales. Debido al alto consumo de quesos en nuestro país, donde se producen aproximadamente 130 millones de toneladas al año⁴⁹, la aplicación de medidas adecuadas de control de la higiene de la leche y los productos lácteos a lo largo de toda la cadena de producción es esencial para garantizar la inocuidad de estos alimentos y su idoneidad para el uso al que se destinan. Para esto, se emplean técnicas microbiológicas que nos permitan identificar tanto bacterias indicadoras, que nos darán idea de las condiciones del proceso del alimento, como bacterias patógenas para el ser humano, como son *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Shigella*, entre otras⁵⁸. Las primeros dos serán el centro de atención en este estudio por encontrarse con mayor frecuencia asociados a enfermedades gastrointestinales transmitidas por alimentos.

NORMATIVIDAD MEXICANA

La Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) es un órgano de la Secretaría de Salud con autonomía técnica, administrativa y operativa que tiene como misión proteger a la población contra riesgos sanitarios, para lo cual integra la regulación, control y fomento sanitario.⁵⁵

A la COFEPRIS le compete proteger a la población contra riesgos por consumo o uso de agua, alimentos, bebidas, medicamentos, equipos médicos, productos de perfumería, belleza y aseo, nutrientes vegetales, plaguicidas, sustancias tóxicas o peligrosas y otros productos, sustancias o agentes físicos, químicos o biológicos presentes en el medio ambiente o en el trabajo.

COFEPRIS es el organismo encargado de publicar las Normas Oficiales Mexicanas, que buscan regular características y especificaciones que deben reunir los productos y

procesos cuando estos puedan constituir un riesgo para la seguridad de las personas o dañar la salud humana.

La Norma Oficial Mexicana correspondiente al producto analizado es la NOM-121-SSA1-1994, que tiene como propósito establecer las especificaciones sanitarias para los quesos frescos, madurados y procesados, con el fin de reducir los riesgos de transmisión de enfermedades causadas por alimentos, así como propiciar que se procesen e importen productos de la calidad sanitaria necesaria para garantizar la salud del consumidor y la nutrición.

Además, son complemento otras normas oficiales mexicanas que establecen los procedimientos a seguir para llevar a cabo el análisis microbiológico de alimentos, como serían:

- Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- Norma Oficial Mexicana NOM-115-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos.
- Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.

MICROORGANISMOS INDICADORES DE LA CALIDAD E INOCUIDAD MICROBIOLÓGICAS DE LOS ALIMENTOS

Los microorganismos indicadores de la calidad o vida útil de los alimentos son microorganismos y/o sus productos metabólicos cuya presencia en alimentos en cantidades determinadas puede ser usada para evaluar la calidad existente o para predecir la vida útil de los alimentos.

Todo indicador de la inocuidad de los alimentos debe cumplir determinados criterios importantes como:

1. Ser detectable con facilidad y rapidez
2. Ser fácilmente diferenciables

3. Tener antecedentes de asociación con el patógeno de interés
4. Tener necesidades y velocidad de crecimiento similares a las del patógeno
5. Tener una tasa de muerte similar a la del patógeno y que, teóricamente, persista durante algún tiempo más que el patógeno de interés
6. No existir en los alimentos que están exentos del patógeno

MESÓFILOS AEROBIOS

Son microorganismos cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 20 y 37°C. Se buscan como indicadores de calidad debido a que la mayoría de los patógenos que se buscan en alimentos son mesófilos, tienen alta especificidad por el intestino, se encuentran en números altos en heces y se detectan fácilmente.

A pesar de que los microorganismos mesófilos aerobios son únicamente considerados como indicadores, su recuento es de importancia debido a que los resultados de este análisis permiten:

- Verificar efectividad de los procedimientos de limpieza y desinfección.
- Determinar si las temperaturas aplicadas en los procesos fueron las adecuadas.
- Determinar el origen de la contaminación durante los procesos de elaboración de los alimentos.
- Verificar condiciones óptimas de almacenamiento y transporte.
- Obtener información acerca de la vida útil de los alimentos.
- Indicar alteración incipiente en ciertos alimentos³⁶

COLIFORMES TOTALES^{46,10,34}

Son bacterias Gram-negativas, no esporuladas, bacilos aerobios o anaerobios facultativos, que fermentan la lactosa con producción de gas a 35°C en 48 horas.²²

El grupo de microorganismos coliformes es el más ampliamente utilizado en la microbiología de alimentos como indicador de prácticas higiénicas adecuadas y a él pertenecen los géneros *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Escherichia*.

El uso de los coliformes como indicador sanitario puede aplicarse para:

- La detección de prácticas sanitarias deficientes en el manejo y en la fabricación de los alimentos.
- La evaluación de la calidad microbiológica de un producto, aunque su presencia no necesariamente implica un riesgo sanitario.
- Evaluación de la eficiencia de prácticas sanitarias e higiénicas del equipo.
- La calidad sanitaria del agua y hielo utilizados en las diferentes áreas del procesamiento de alimentos.
- La demostración y la cuenta de microorganismos coliformes, puede realizarse mediante el empleo de medios de cultivos líquidos o sólidos con características selectivas o diferenciales.³⁵

Escherichia coli ^{1,10,22,46}

Dentro del grupo de las enterobacterias se encuentran especies patógenas para el hombre, animales y plantas y también otras muy importantes desde el punto de vista industrial. Sin lugar a dudas se sabe más de la enterobacteria por excelencia *Escherichia coli* que de ninguna otra especie bacteriana.

Los miembros del género *Escherichia* son habitantes universales de todos los animales de sangre caliente, incluido el hombre, aunque no son los taxones dominantes en estos hábitats. *Escherichia* puede tener una función nutricional en el intestino sintetizando vitaminas, en especial la vitamina K. como anaerobio facultativo que es, probablemente también contribuye a la anaerobiosis del ambiente del intestino grueso. Las cepas de este género raramente tienen requerimientos nutricionales especiales, pudiendo crecer en gran diversidad de compuestos carbonados tales como azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos. Algunas cepas son patógenas y han sido implicadas en el desarrollo de cuadros diarréicos en niños y en infecciones de las vías urinarias en personas de edad avanzada.

Aislada por primera vez en heces en 1885, *Escherichia coli* (Figura 1) es una bacteria que se encuentra universalmente en el intestino de las personas y de los animales de sangre caliente, formando parte de la microflora total ahí presente. Pertenece a la

familia *Enterobacteriaceae*; es un bacilo Gram-negativo, anaerobio facultativo, catalasa positivo, oxidasa negativo, que puede ser un patógeno oportunista causante de algunas enfermedades.

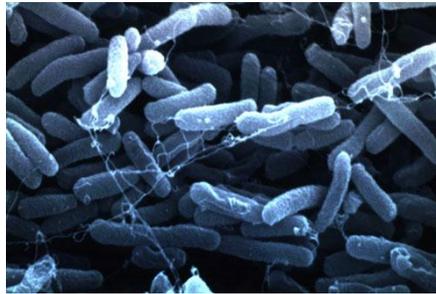


Figura 1. *Escherichia coli*

Es un microorganismo mesófilo cuya temperatura óptima de crecimiento está alrededor de los 37°C. Un pH casi neutro es óptimo para su crecimiento aunque también puede desarrollarse a pH inferior a 4.4. Su actividad acuosa mínima de crecimiento es 0.95. Es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción de Gram, es anaeróbico facultativo, móvil por flagelos peritricos, no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa y su prueba de IMVIC es +++-.

Existen cuatro clases principales de *E. coli* que provocan diarreas, variando para cada cepa el factor de virulencia, provocando así que los síntomas y características de la enfermedad sean distintas en cada caso.⁵¹

1. *E. coli* enterotoxigénico (ETEC): dentro de este grupo se encuentra una pequeña proporción de las cepas de *E. coli*; la enfermedad se asocia con gente de todas las edad y diversos grupos de personas alrededor del mundo y se manifiesta de 12 a 36 horas después de consumir el alimento; los síntomas van desde diarrea afebril hasta un síndrome grave parecido al cólera, con heces acuosas sin sangre ni moco. La enfermedad es autolimitante. Existen estudios que indican que es necesario un gran número de bacterias de ETEC, entre 100 millones y 10 billones de microorganismos, para colonizar el intestino delgado, donde proliferan y producen toxinas. Esta cepa de *E. coli* no es considerada de riesgo en países que tienen buenas prácticas de manufactura y altos estándares de calidad y sanidad.

2. *E. coli* enteroinvasor (EIEC): síntomas clásicos de una disentería bacilar, causa ulceración e inflamación de las células del colon. La dosis infectiva de este microorganismo es similar a la de *Shigella*, aproximadamente 10 microorganismos. Los signos son fiebre, dolores abdominales intensos, malestar y diarrea acuosa con sangre, moco y leucocitos fecales, y se presentan entre 12 y 72 horas después de la ingesta de alimentos contaminados.

3. *E. coli* enteropatógeno (EPEC): no se sabe con exactitud la procedencia de estas bacterias pues los brotes son esporádicos. Se ha visto que la dosis infectiva de este microorganismo es relativamente baja, aproximadamente 1×10^6 células. Alimentos comúnmente implicados con EPEC son carne de res y pollo, aunque cualquier alimento expuesto a contaminación fecal podría ser sospechoso. Los síntomas son malestar, vómito y diarrea con moco y rara vez sangre, que aparecen a las 12 a 36 horas después de haber consumido el alimento.

4. *E. coli* enterohemorrágico (EHEC): causa enfermedades muy graves como colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y púrpura trombótica trombocitopénica. Las cepas de EHEC producen verotoxina, que además de las enfermedades descritas, también causa diarrea y es comúnmente asociada con enfermedades alimentarias. *E. coli* O157:H7, como también se le conoce, se ha convertido en un patógeno común en alimentos, pues una gran variedad de éstos han estado involucrados en brotes de la bacteria: leche pasteurizada, salchichas, yogurt, mayonesa, espinacas, por citar algunos. La dosis mínima infectiva es de 10 microorganismos, al igual que *Shigella* y EIEC. Cualquier persona puede padecer alguna enfermedad provocada por EHEC, sin embargo, los grupos más susceptibles son los niños y las personas mayores. Este microorganismo es de especial importancia en el caso de los productos lácteos, pues se han asociado brotes con leche cruda, que muchas veces sirve de materia prima para elaboración de quesos. *E. coli* O157:H7 ha sido aislada de derivados de leche como crema, queso y mantequilla debido a que los procedimientos de producción, transporte, manejo y venta de la leche y sus derivados es en muchos casos, carente de higiene.

La contaminación fecal, la mala manipulación y almacenaje de alimentos contaminados han sido implicados en la aparición de cepas de *E. coli* en enfermedades transmitidas por alimentos. Estudios han demostrado que en el 46% de muestras de

leche bronca y 26% de productos lácteos *E. coli* está presente, y una buena proporción de las cepas aisladas podría ser patógena.^{4,39}

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus (Figura 2) es un microorganismo de gran importancia médica. Desde hace muchos años se le ha reconocido como uno de los principales agentes patógenos para el humano. Es una bacteria en forma de coco, que al microscopio aparece en forma de cadenas cortas o de racimos de uvas, que posee un alto grado de patogenicidad y es responsable de una amplia gama de enfermedades. Produce lesiones superficiales de la piel, causa infecciones del sistema nervioso central e infecciones profundas como osteomielitis y endocarditis, es causante también de infecciones respiratorias como neumonía e infecciones del tracto urinario; provoca intoxicación alimentaria al liberar sus enterotoxinas en los alimentos y produce el síndrome del shock tóxico al liberar superantígenos en el torrente sanguíneo.²²

Es un microorganismo catalasa positivo, lo que permite diferenciarlo de las especies del género *Streptococcus* y otros géneros de cocos Gram positivos que son relativamente tolerantes a condiciones de baja actividad de agua, resistiendo bastante bien en hábitats secos y salinos. Esta última característica, proporciona una buena herramienta para el aislamiento primario en medios que contengan 7-8% de cloruro de sodio (NaCl). *Staphylococcus aureus* es una bacteria anaerobia facultativa y produce ácido de la glucosa; es de color amarillo y se encuentra normalmente asociado con patologías como acné, neumonía, meningitis, artritis y enfermedades gastrointestinales.²²

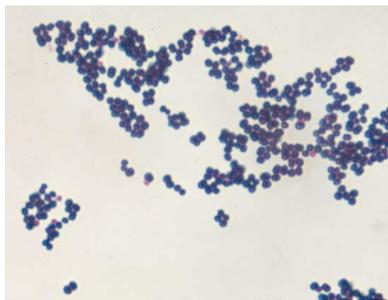


Figura 2. *Staphylococcus aureus*

Las personas son el reservorio más común de *S. aureus*, encontrándose dentro del tracto respiratorio superior, especialmente las fosas nasales, la garganta y la piel, siendo así capaces de distribuir la bacteria a otras personas y a los alimentos. Así, se sabe que la mayoría de los casos de intoxicación por *S. aureus* se debe a la manipulación incorrecta de los alimentos, en especial, durante el proceso de elaboración. Además de la contaminación debido a los humanos, la bacteria también puede encontrarse en material como cuchillos, contenedores, navajas, sierras, entre otros.³¹

En la siguiente tabla se muestran las principales exotoxinas y factores de virulencia producidos por *S. aureus*.

Tabla 2. Exotoxinas y factores de virulencia extracelulares producidos por *S. aureus*²²

Microorganismo	Enfermedad	Toxina o factor	Acción
<i>S. aureus</i>	Infecciones piógenas (formadoras de pus) Infecciones respiratorias, intoxicación alimentaria, síndrome de shock séptico, síndrome de piel escaldada	α -toxina Toxina del síndrome de shock tóxico Toxinas exfoliantes A y B Leucocidina β -toxina γ -toxina δ -toxina Enterotoxinas A,B,C,D, y E Coagulasa	Hemólisis Shock sistémico Descamación de la piel, shock Destruye leucocitos Hemólisis Mata células Hemólisis, leucolisis Inducen vómitos, diarrea, shock Induce coagulación de la fibrina

La mayoría de las cepas de estafilococos son productoras de enzimas (nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasas y colagenasas) y citotoxinas (las denominadas hemolisinas α , β , δ y γ) que contribuyen a transformar los tejidos del hospedador en substrato para su crecimiento y desarrollo. Algunas especies de estafilococos son productoras de una familia de proteínas no glicosiladas de bajo peso molecular conocidas como enterotoxinas estafilocócicas (SEs). *S. aureus* produce alrededor de 11 serotipos distintos de SEs, además de otras toxinas de gran virulencia para los mamíferos como la toxina del síndrome del shock tóxico-1 (TSST-1). La patología de la intoxicación empieza con síntomas como fiebre alta, hipotensión, náuseas, vómitos

frecuentes y diarrea, pudiendo llegar a desencadenar un shock tóxico orgánico el cual, en un 5% de los casos, es causa de defunción. Se conoce una gran variedad de SE: en secuencia alfabética de SEA a SEE, de SEG a J, SEK, SEL, SEP, SEM y SEO. Cuando se consumen alimentos contaminados con *S. aureus*, las SE causan gastroenteritis, estimula el peristaltismo intestinal y ejercen un efecto sobre el sistema nervioso central, que se manifiesta por vómitos, los cuales acompañan a la enfermedad gastrointestinal.^{7,48,52}

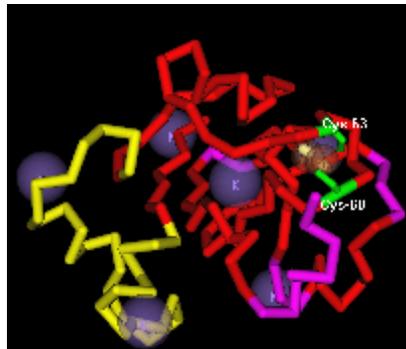


Figura 3. Estructura de una enterotoxina estafilocócica

Las condiciones que generalmente están asociadas a brotes de intoxicación por *S. aureus* son:

- ↗ refrigeración inadecuada
- ↗ preparación de alimentos tanto crudos como cocidos con mucha anticipación
- ↗ higiene deficiente del personal
- ↗ cocimiento o calentamiento insuficiente del alimento^{2,5}

Algunos animales también pueden ser portadores de la bacteria. El caso más común es el de las vacas, pues si no se tienen las condiciones de higiene adecuadas, éstas pueden contraer mastitis, favoreciendo la contaminación de la leche y todos sus derivados. La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria de primates y la ubre en otros mamíferos, causada por *Staphylococcus aureus*; es difícil de controlar y tratar. Manos de quien ordeña, trapos, equipo para ordeñar y moscas son formas en las que la infección puede pasarse de vaca a vaca. El control más eficaz para prevenir nuevas infecciones es minimizar o eliminar condiciones que contribuyan a la exposición de las ubres a focos de infección o condiciones donde la bacteria pueda penetrar con facilidad al canal de las ubres. Además, la alimentación también contribuye a que el

animal desarrolle cierta resistencia a la mastitis; suplementar la dieta con vitamina E, selenio, vitamina A, beta-caroteno, cobre y zinc ayuda a prevenir esta enfermedad.^{52,58} Debido a esto, *S. aureus* también se ha asociado frecuentemente a enfermedades transmitidas a través de derivados lácteos. Diferentes tipos de queso han sido involucrados en brotes de enfermedades gastrointestinales porque han sido elaborados a partir de leche contaminada después de la pasteurización. Ha habido casos en que a pesar de encontrar cuentas relativamente bajas del microorganismo, la toxina ha estado presente en leche y sus derivados debido a su termorresistencia, factor que debe tomarse en cuenta al diseñar procedimientos que aseguren la calidad del producto terminado. En el caso de la leche, la principal razón por la que la toxina estafilocócica puede ser encontrada, es la falta de control en las temperaturas de almacenamiento del alimento, pues en muchos casos excede los 7°C, temperatura máxima permitida en condiciones de refrigeración para disminuir el crecimiento microbiano⁵². En México, se han hecho estudios donde se ha demostrado que es muy común encontrar *S. aureus* en quesos frescos y otros derivados lácteos, aislándose la bacteria del alimento en el 31% de las muestras y en las heces de personas intoxicadas.⁷

Aunque inicialmente las cuentas de *S. aureus* en alimentos sean bajas, este microorganismo es de los patógenos no esporulados más resistentes que existen, lo que le permite multiplicarse rápidamente en el alimento y causar intoxicación. La bacteria es capaz de sobrevivir a la presencia de antibióticos, metales pesados y altas concentraciones de sal; el tratamiento térmico es una buena forma de disminuir la cuenta del microorganismo en el alimento, aunque no es capaz de destruir la toxina una vez que ésta se encuentra en él. Los síntomas de la intoxicación debida a *S. aureus* son: vómito, que se da a los 30 minutos aproximadamente después de haber ingerido el alimento, náusea, diarrea, dolor de cabeza y dolor abdominal.⁶

PRESENCIA DE *E. coli* y *S. aureus* EN LECHE Y QUESO^{2,42}

Tanto *E. coli* como *S. aureus* se encuentran de forma común en leche y sus derivados y las causas pueden ser distintas: contaminación de la leche bronca o contaminación post-proceso de los productos lácteos debido al manejo, en los locales de venta o por el consumidor.

La mayoría de los casos de enfermedades transmitidas por derivados lácteos se debe a la contaminación de la leche bronca y a una pasteurización ineficiente. Se ha visto que por esta razón, es común encontrar tanto *E. coli* como *S. aureus* en productos elaborados a partir de leche bronca, contaminada por contacto con materia fecal, infecciones en el animal a ordeñar, ubres sin sanitizar y malas condiciones de ordeño. Se ha propuesto como medida de control prohibir la venta de leche bronca, sin embargo, esto implicaría la desaparición de pequeños comercios familiares, que sirven de sostén económico para un gran sector de la población indígena.

En el caso de alimentos como el queso, es claro que también puede ocurrir contaminación post-pasteurización como resultado de contaminación cruzada al ponerse en contacto el producto terminado con la materia prima, procedimientos inadecuados de sanitización de equipo y material o manipulación por parte del personal. Como la aparición de patógenos en el producto terminado puede darse en cualquier etapa del proceso de elaboración de quesos, la distribución, almacenamiento y manejo de éstos, procedimientos confiables de análisis microbiológico y medidas efectivas de control para prevenir contaminación son esenciales como parte del programa de seguridad alimentaria en la elaboración de estos derivados lácteos.

MÉTODOS TRADICIONALES DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO²²

Los métodos microbiológicos "convencionales", empleados en numerosos laboratorios de todo el mundo y establecidos en muchos casos como métodos estándares de análisis microbiológico de los alimentos, se caracterizan por ser laboriosos, emplear grandes volúmenes de medios de cultivo y requerir un tiempo considerable para la obtención y el análisis de los resultados.

En México, los métodos tradicionales de análisis forman parte de las normas oficiales mexicanas para la identificación de microorganismos patógenos, como es el caso de *Staphylococcus aureus* (NOM-115-SSA1-1994)³³.

De forma general, los métodos convencionales de análisis se pueden dividir en tres etapas:

1. Enriquecimiento, que generalmente se lleva a cabo en caldos que permiten la recuperación de las cepas estresadas.
2. Aislamiento, mediante el uso de medios de cultivo selectivos y/o diferenciales.
3. Identificación bioquímica, para asegurar la existencia del patógeno en estudio.

La etapa de enriquecimiento tiene como propósito incrementar las poblaciones del microorganismo en cuestión y si es posible, inhibir otros organismos presentes en la muestra.

Después, en la etapa de selección se emplean medios de cultivo selectivos, que restringen el crecimiento de otros géneros diferentes al microorganismo a analizar y permiten el reconocimiento visual de colonias sospechosas. La selección y diferenciación es posible gracias a la acción de enzimas que actúan sobre los sustratos de los medios de cultivo, interpretándose resultados mediante reacciones coloridas o aparición de precipitados.

Para la identificación bioquímica se emplean baterías de medios de cultivo que ponen en evidencia la actividad metabólica del microorganismo, permitiendo la identificación genérica y la eliminación de cultivos sospechosos falsos.

Existen diversos métodos diseñados para la enumeración de los microorganismos en los alimentos, entre los que se encuentran:^{6,27,46}

- a) Vaciado en placa: para determinar el número de células viables.
- b) Número más probable (NMP): determinación estadística de células viables.
- c) Técnicas de reducción de colorantes: para calcular el número de células viables que poseen capacidad reductora.
- d) Recuento microscópico directo: para conteo de células viables y no viables.

a) Vaciado en placa

Mediante este método se mezclan y homogenizan porciones de muestras de los alimentos, se diluyen de forma seriada en un diluyente apropiado, se siembran en agar y se incuban a temperatura apropiada durante un tiempo dado, después del cual se cuentan las colonias visibles. Cuando se hace referencia al número total de células viables por un determinado alimento, se deben tomar en cuenta los siguientes factores: método de muestreo, distribución del microorganismo en el alimento, naturaleza del alimento, temperatura y tiempo de incubación utilizados, tipo de diluyente y la existencia de otros microorganismos competidores.

b) Número más probable

Se preparan diluciones de alimentos de igual forma que en el método de vaciado en placa. Se siembran tres diluciones seriadas en cierto número de tubos de medio apropiado. El número de microorganismos en la muestra original se determina utilizando las tablas convencionales del NMP. Se trata de un método estadístico y por esto, los resultados que con él se obtienen son generalmente más elevados que los que se obtienen con el método de vaciado en placa. Entre los inconvenientes para ser utilizado se encuentra la gran cantidad de material de vidrio que se necesita, la falta de oportunidad para ver la morfología de las colonias y su falta de exactitud.

c) Método de reducción de colorantes

En este método generalmente se emplean dos colorantes: el azul de metileno y la resazurina. Se añaden sobrenadantes preparados de los alimentos a soluciones patrón de cada uno de los colorantes para que éstos sean reducidos: desde el color azul al blanco o del azul al rosa o al blanco según el caso. El tiempo transcurrido para que tenga lugar la reducción del colorante es inversamente proporcional al número de microorganismos existentes en la muestra. Estas pruebas se utilizan desde hace mucho tiempo en la industria de productos lácteos para evaluar la calidad microbiana general de la leche cruda. Entre las ventajas están: es una prueba sencilla, rápida y barata, donde únicamente se cuantifican células viables. Sus inconvenientes son: no todos los microorganismos reducen de igual modo los colorantes y no son aplicables a alimentos que contienen enzimas reductoras.

d) Recuento microscópico directo

Consta de los siguientes pasos: preparación del frotis de muestras, tinción con colorante apropiado, observación y recuento de células con ayuda de microscopio. Es un método rápido y sencillo, en el cual se aprecia la morfología de las células. Entre sus inconvenientes están el hecho de que sea cansado para el analista, se cuentan tanto células viables como no viables, las partículas de alimento pueden interferir con el conteo, las células muchas veces se encuentran en asociaciones y eso dificulta el conteo y algunas veces no todas las células logran teñirse.

MÉTODOS RÁPIDOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO^{10,41,45}

Debido a que el análisis microbiológico en las industrias de alimentos no es sencillo por la complejidad de los productos que se elaboran y además, se busca obtener resultados en el menor tiempo posible, se han hecho grandes esfuerzos por desarrollar métodos rápidos de análisis.

Hasta los años 70s, únicamente se buscaban microorganismos como *Salmonella*, *Clostridium botulinum* y *S. aureus*; actualmente, es importante la detección de *L. monocytogenes*, *E. coli* 0157:H7 y *Vibrio parahemolyticus*, debido a que cada vez con más frecuencia, estos microorganismos se encuentran relacionados con brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. Los métodos convencionales, aunque no carecen de sensibilidad y confiabilidad, son laboriosos y requieren de mucho tiempo para conocer los resultados. Los productos mínimamente procesados tienen vida de anaquel corta, por lo que estos métodos no serían útiles para asegurar la inocuidad del producto.

La microbiología en la industria de los lácteos es de especial importancia al haberse registrado brotes de enfermedades relacionadas con patógenos provenientes de este tipo de alimentos, que han sido contaminados con microorganismos patógenos o sus toxinas, alterándose así la seguridad, calidad e integridad de los productos lácteos. Además, en este tipo de industrias, la microbiología cobra especial importancia debido a que los resultados obtenidos de estos análisis son críticos para determinar la eficiencia de procesos de manufactura, limpieza y sanitización, y para la predicción de la calidad y la vida de anaquel de los productos lácteos. Por tratarse de productos con

corta vida de anaquel debido a su composición, la importancia del empleo de métodos rápidos de análisis ha aumentado, y por ello se han adaptado diversas técnicas de detección, aislamiento, enumeración y caracterización de microorganismos.⁴²

A diferencia de los análisis fisicoquímicos que se le hace a la leche donde se han buscado técnicas automatizadas para reemplazar a las convencionales, los análisis microbiológicos en la industria de los lácteos siguen haciéndose según las técnicas tradicionales. Sin embargo, durante las dos últimas décadas, varios nuevos métodos de análisis han sido aplicados a leche y productos lácteos, obteniéndose resultados comparables con aquellos obtenidos por las metodologías convencionales.^{10,42}

Los métodos alternativos a los convencionales se conocen como “rápidos” porque son automatizados o semi-automatizados, y porque se requiere menos tiempo para preparar y procesar las muestras y para leer e interpretar los resultados. El uso de estos métodos aumenta el número total de muestras que pueden ser analizadas por día, aunque se requieren los mismos tiempos de incubación. Los métodos rápidos desarrollados han demostrado tan confiables como los métodos tradicionales, representando una mejor opción por las ventajas que ofrecen. Así, en la actualidad existen diferentes métodos rápidos de análisis, basados en diferentes técnicas:

a) Métodos rápidos basados en técnicas tradicionales

Son aquellos cuyo fundamento es el mismo que en el caso de los métodos tradicionales, el uso de medios de cultivo con nutrientes adecuados para cada tipo de microorganismo, reemplazando el tradicional agar en placa y buscando economizar tiempo y espacio.

Ejemplos de estos productos son:

Placas Petrifilm de 3M → se basa en el uso de nutrientes mezclados con agentes gelificantes, colocados en placas para su posterior rehidratación con 1 mL de muestra.

HGMF (Hydrophobic Gris Membrane Filter) → se basa en filtración de membrana para posteriormente elegir un medio de cultivo adecuado e incubar, para contar UFC.

SimPlate → es una modificación a la técnica de número más probable (NMP)

En la siguiente tabla, se muestran algunos de los kits de métodos rápidos más empleados actualmente en la industria para detección de bacterias asociadas con alimentos:

Tabla 3. Kits para detección de bacterias asociadas con alimentos

Microorganismo	Nombre comercial	Fabricante
<i>E. coli</i>	Petrifilm	3M
	Redigel (Colichrome)	3M
	Coligel	Charm Science
	E-Colite	Charm Science
	Pathogel	Charm Science
Coliformes totales	Petrifilm	3M
	Redigel (Rojo violeta Bilis)	3M
	Coligel	Charm Science
	E-Colite	Charm Science
	Pathogel	Charm Science
<i>Salmonella</i>	SM ID	BioMerieux
<i>Enterobacteriaceae</i>	Petrifilm	3M
	Pathogel	Charm Science
	Microbase Disk	Remel
	Bactistaph Disk	Remel
	Novobiocin Disk	Remel
<i>S. aureus</i>	Petrifilm	3M

b) Métodos inmunológicos

Los métodos rápidos más ampliamente utilizados en la actualidad son aquellos que se basan en técnicas inmunológicas, pues permiten la identificación de bacterias específicas asociadas a diferentes alimentos. Los microorganismos más frecuentemente detectados mediante estas técnicas son *E. coli* O157:H7, *Listeria* y *Salmonella*.

Todos estos métodos se basan en una reacción antígeno-anticuerpo que forma compuestos coloridos o precipitados que pueden ser detectados. En la tabla 4, se tienen algunos ejemplos de métodos rápidos de este tipo:

Tabla 4. Ensayos inmunológicos más representativos en la industria de alimentos

Microorganismo	Nombre comercial	Fabricante
<i>E. coli</i> O157	Reveal	Neogen
	VIDAS	BioMerieux
	Assurance EHEC EIA	BioControl
	TECRA	TECRA
<i>Salmonella</i> spp	Reveal	Neogen
	1-2 Test	BioControl
	TECRA	TECRA
	UNIQUE	TECRA
<i>Listeria</i>	VIP	BioControl
	TECRA	TECRA
	UNIQUE	TECRA
<i>S. aureus</i>	TECRA	TECRA

c) Métodos Moleculares

Son métodos que se basan en técnicas de DNA y RNA para la diferenciación e identificación de microorganismos patógenos en alimentos. Algunas de estas técnicas incluyen PCR, electroforesis, tipificación de plásmidos, etc. Los métodos más difundidos son aquellos que se basan en PCR, pues existen diferentes modificaciones a esta técnica que permiten versatilidad en los métodos.

A continuación se muestran los métodos moleculares más representativos actualmente empleados en la industria de alimentos:

Tabla 5. Métodos moleculares

Microorganismo	Nombre comercial	Fabricante
<i>Salmonella</i>	PCR-Light Cyler	Biotecon Diagnostics
	Gene-Trak	Probe
	BAX	Qualicon
<i>E. coli</i> O157:H7	BAX	Qualicon
<i>L. monocytogenes</i>	Gene-Trak	Probe
<i>Listeria</i> spp.	BAX	Qualicon
<i>S. aureus</i>	Gene-Trak	Gene-Tak

Se cree que en un futuro los métodos rápidos de análisis se harán en base a la nanotecnología, que permitirá el desarrollo de sensores capaces de detectar a los microorganismos de interés.

PLACAS PETRIFILM^{35,37,38,41}

El análisis microbiológico de alimentos es un asunto complicado, pues éstos son matrices complejas de grasas, carbohidratos, proteínas y diversos aditivos. Además, tienen diferentes propiedades físicas, y todo en conjunto dificulta diseñar un proceso sencillo de análisis.¹⁶

Las técnicas tradicionales de análisis microbiológico no llenan las necesidades actuales de tener resultados rápidos y confiables para poder tomar decisiones durante el proceso de elaboración de alimentos en una planta.¹⁶

En la industria de alimentos, existe la necesidad de liberar el producto en el menor tiempo posible, en especial en lo que se refiere a alimentos perecederos, lo que ha llevado a la necesidad de desarrollar nuevas metodologías que sean confiables y que ofrezcan alta reproducibilidad y resultados confiables, compatibles con los obtenidos mediante técnicas o metodologías oficiales, y que disminuyan el tiempo en el proceso de análisis y aceptación de los productos.

3M Microbiología ha desarrollado material diseñado para ofrecer ahorros de tiempo, incrementar la productividad, garantizar confiabilidad, y sobre todo, para mejorar la eficiencia de las operaciones dentro de la industria, aumentando la productividad: placas PetrifilmTM 3MTM (Petrifilm) y kits de análisis basados en técnicas inmunológicas.



Figura 4. Placas Petrifilm

Las placas Petrifilm son medios de cultivo preparados, listos para usar, que contienen los mismos nutrientes que los medios de cultivo tradicionales más un polisacárido que permite la gelificación del medio al añadir el mililitro de muestra necesario para la inoculación.

El uso de las placas Petrifilm se fundamenta en la capacidad de los microorganismos para crecer en diferentes medios de cultivo, que contienen diferentes nutrimentos, colorantes o sustancias que permiten poner en evidencia ciertas características de su metabolismo para así permitir su identificación. El medio de cultivo que contienen las placas Petrifilm se formula de la misma manera en que se hacen los medios de cultivo en técnicas tradicionales, con la diferencia de que en algunos casos, se utiliza agentes gelificantes solubles en frío. Además, cuentan con un indicador, TTC (clorhidrato de trifenil tetrazolio), que permite visualizar las colonias en casi todos los casos de color rojo. Debido a que los componentes del medio, en especial el TTC, son estables a pH cercano a la neutralidad, se utiliza buffer de fosfatos (pH 7.2)²⁸ para la preparación de la muestra y se espera que ésta, antes de ser inoculada, tenga un pH entre 6.5 y 7.5, ideal para el correcto crecimiento de los microorganismos.

Los tiempos y temperaturas de incubación varían en cada uno de los casos; deben seguirse las condiciones establecidas según métodos oficiales.

Ya que la mano de obra, más que los insumos, es el componente más caro en el análisis microbiológico, la utilización de este tipo de métodos rápidos ayuda a las industrias a controlar costos e incrementar productividad, para una mejor eficiencia en general. En un estudio realizado en 292 plantas procesadoras de alimentos, las empresas que utilizaron placas Petrifilm ahorraron un promedio de 3.7 horas diarias en tiempo de los técnicos.

El uso de placas Petrifilm permiten reducir las pruebas microbiológicas a 3 sencillos pasos:

1. Inocular: las placas se inoculan fácilmente con un mililitro de muestra.
2. Incubar: se maximiza el uso de la incubadora con el diseño de ahorro de espacio.
3. Interpretar y contar

Las placas Petrifilm se basan en Métodos Oficiales AOAC en los que se puede confiar para obtener resultados precisos y reproducibles. Para fines de este estudio se emplearán las siguientes placas:

- Placas para el recuento de aerobios totales (Aerobic Count AC)
- Placas para el recuento de *E. coli*/Coliformes (Placa Petrifilm EC)
- Placas Staph Express para el recuento de *Staphylococcus aureus*/Discos Staph Express Petrifilm.

Placas para el recuento de Aerobios totales

La Placa Petrifilm para Recuento de Aerobios Totales (Aerobic Count AC) es un sistema de medio de cultivo listo para ser empleado que contiene los mismos nutrientes que el Agar Cuenta Estándar, un agente gelificante soluble en agua fría (goma guar) y un colorante que facilita la enumeración de las colonias. Las Placas Petrifilm AC se utilizan en la enumeración de la población total existente de bacterias aerobias.



Figura 5. Placas Petrifilm AC

Placas Petrifilm™ para el Recuento de *E. coli*/Coliformes

Estas placas contienen nutrientes de Bilis Rojo Violeta (VRB), un agente gelificante soluble en agua fría (goma guar), un indicador de actividad de la glucuronidasa y un indicador que facilita la enumeración de las colonias. La mayoría de las cepas de *E. coli* (cerca del 97%) produce beta-glucuronidasa, la que produce una precipitación azul asociada a la colonia. La película superior atrapa el gas producido por *E. coli* y coliformes fermentadores de lactosa. Las colonias de *E. coli* podrán ser identificadas por la producción de gas y por el color de las colonias, que serán azules. Las colonias de coliformes se confirman por la presencia de gas y el color rojo debido a la

producción de ácido por la fermentación de la lactosa, que causa el oscurecimiento del gel por el indicador de pH.



Figura 6. Placas Petrifilm EC

En la siguiente figura se muestra el mecanismo mediante el cual se puede llevar a cabo la identificación de *Escherichia coli* en las placas Petrifilm EC:

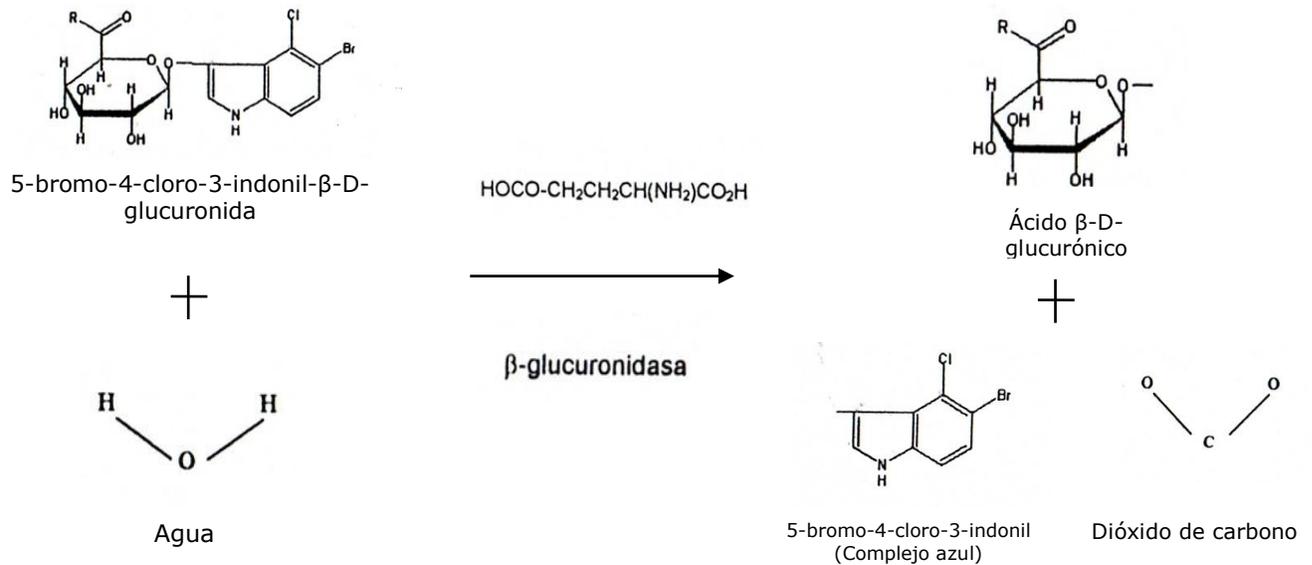


Figura 7. Mecanismo de reacción entre sustrato y enzima en la Placa Petrifilm EC (Amaro,2001)

Placas Staph Express para el Recuento de *Staphylococcus aureus*

La placa Petrifilm Staph Express para recuento de *Staphylococcus aureus* es un sistema de medio de cultivo listo para la muestra que contiene un agente gelificante soluble en agua fría. El medio utilizado es el Baird-Parker, que resulta un medio selectivo y diferencial para *S. aureus*, pues es un microorganismos coagulasa positivo.



Figura 8. Placas Staph Express

Si se encuentra carga microbiana en el fondo de la prueba, es necesario el uso del Disco Staph Express Petrifilm de 3M, que permite diferenciar a *S. aureus* entre todas las colonias sospechosas. El disco contiene un colorante (o-toluidina azul) y un ácido desoxirribonucleico (DNA). *S. aureus* produce desoxirribonucleasa (DNasa), que al actuar sobre su sustrato provoca la formación de zonas rosadas en el medio de cultivo, indicándonos así la presencia de la bacteria.

3M cuenta con Guías para la interpretación de los resultados para toda la gama de Placas Petrifilm.

EL SISTEMA API Y LA IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA ^{14,15,22,47}

Una identificación de microorganismos basada únicamente en método cromogénicos no es la ideal para dar un diagnóstico acerca de la presencia o ausencia de cierta bacteria en un alimento. Por esto, es necesario llevar a cabo identificación bioquímica de las cepas aisladas, aprovechando sus características metabólicas.

BioMerioux es una compañía francesa especializada en la producción de reactivos y equipos de laboratorio que se ha encargado de diseñar pruebas rápidas de identificación, que ahorran tiempo e influyen directamente en la velocidad con la que pueden ser tomadas medidas de prevención.

Actualmente es posible obtener resultados más rápidamente mediante método que emplean un volumen pequeño de sustrato con un inóculo abundante, utilizando sistemas modificados de bioquímicas convencionales como es el sistema API.

Este sistema incorpora reactivos deshidratados dentro de pequeños tubos plásticos en los cuales se coloca una suspensión del organismo en estudio. Los resultados pueden leerse con ayuda de una base de datos y son altamente confiables.

Los sistemas API han sido adoptados por un gran número de laboratorios desde el momento de su introducción al mercado a inicio de los años ochentas y su uso en la identificación de enterobacterias principalmente ha facilitado el reconocimiento de varias especies nuevas y ha permitido a los laboratorios determinar las especies de una forma más precisa. Algunas de las ventajas al utilizar el sistema API son:

- a) Seguridad en el resultado de las pruebas
- b) Cuenta con una base de datos para interpretación de resultados
- c) Se pueden hacer pruebas adicionales, indicadas en el manual de uso
- d) Uniformidad en la línea del producción
- e) Servicio de asesoría técnica
- f) Fácil manipulación e inoculación
- g) Reducción de espacio de almacenamiento e incubación
- h) Fácil lectura e interpretación
- i) Mayor reproducibilidad, precisión y confiabilidad

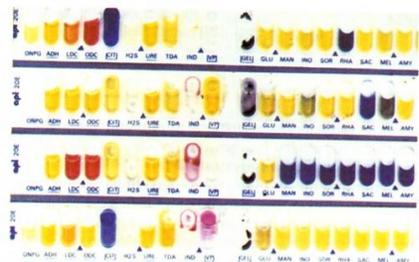


Figura 9. Tiras API para la identificación bioquímica

SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS²²

La resistencia a los antimicrobianos es uno de los principales problemas cuando se trata con muchos de los microorganismos patógenos comunes y se define como la capacidad adquirida de un organismo para resistir los efectos de un agente quimioterapéutico al que es sensible habitualmente. La mayor parte de la resistencia a antimicrobianos es debida a genes de resistencia que se transfieren por intercambio genético. Para protegerse, los productores de antibióticos desarrollan mecanismos de resistencia que neutralizan o destruyen sus propios antibióticos; los genes que codifican dichos mecanismos de resistencia pueden transferirse ocasionalmente a otros organismos.

No todos los antibióticos actúan frente a todos los microorganismos. Algunos de ellos son naturalmente resistentes a algunos antibióticos. Hay varias razones por las que los microorganismos pueden tener una resistencia inherente a un antibiótico: (1) el organismo puede carecer de la estructura que inhibe el antibiótico; por ejemplo, algunas bacterias como los micoplasmas, carecen de una pared celular típica por lo que son resistentes a las penicilinas; (2) el organismo puede ser impermeable al antibiótico, por ejemplo, la mayoría de las bacterias Gram negativas son impermeables a la penicilina G; (3) el organismo puede alterar el antibiótico inactivándolo, como es el caso de muchos estafilococos, que producen β -lactamasas que rompen el anillo β -lactámico de la mayoría de las penicilinas.

La resistencia a antibióticos puede ser genéticamente codificada por el microorganismo en el cromosoma, plásmidos o en factores R (plásmidos de resistencia). Debido a la aparición de resistencias a antibióticos, debe determinarse la sensibilidad a antibióticos de las bacterias aisladas, usando para ello el método de la concentración mínima inhibitoria (CMI) o el método de difusión en agar.

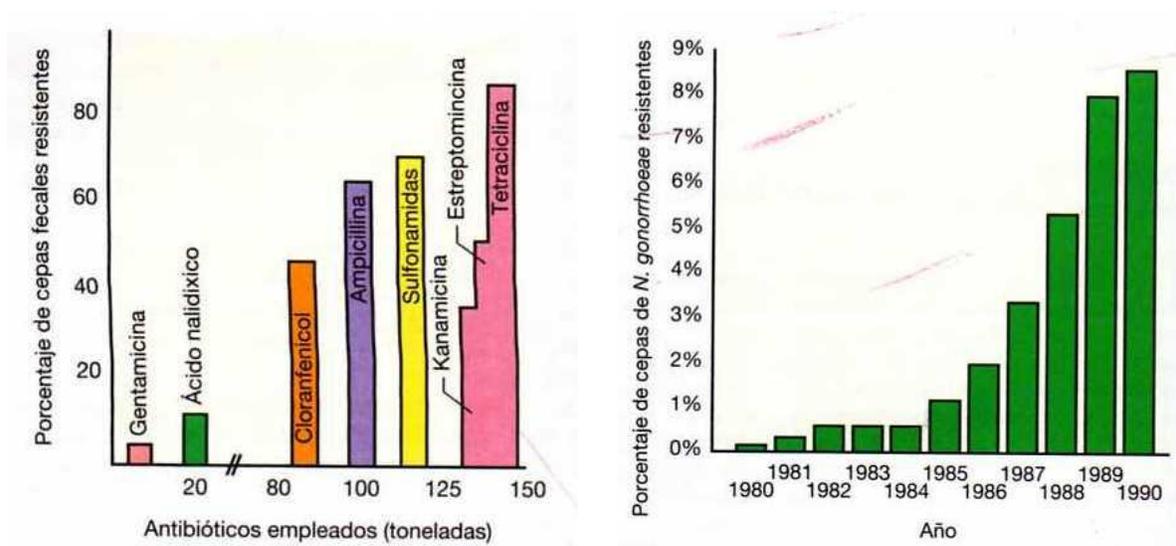


Figura 10. Emergencia de bacterias resistentes a drogas antimicrobianas. (a) Relación entre el uso de antibióticos y el porcentaje de bacterias resistentes a antibióticos aisladas de pacientes con diarrea. Los agentes que se han utilizado en mayores cantidades son los que tienen mayor número de cepas resistentes. (b) Porcentaje de casos registrados causados por cepas resistentes. El número de casos con cepas resistentes en 1985 fue de 9000. Este número subió a 59 000 en 1990.

La abusiva utilización inapropiada de los antimicrobianos está conduciendo al desarrollo rápido de resistencias específicas en microorganismos que producen

enfermedades. El descubrimiento y uso clínico de muchos de los antibióticos conocidos ha sido paralelo a la emergencia de bacterias resistentes a su acción.

El seguimiento y control mundial sugieren que los antibióticos se usan en la práctica clínica con mucha mayor frecuencia de lo necesario. Los datos indican que el tratamiento con antibióticos está garantizado en el 20% de los individuos que acuden al médico por enfermedades infecciosas. A pesar de ello, los antibióticos se prescriben el 80% de los casos. Además, el 50% de las veces, las dosis recomendadas o la duración de los tratamientos no son correctas. Esto se acompaña del incumplimiento de la pauta terapéutica por parte del paciente. Por ello a menudo los patógenos están sometidos a dosis subletales de antibióticos por periodos cortos de tiempo, seleccionándose aquellos que son resistentes. En gran medida, casi todos los microorganismos patógenos han desarrollado resistencia a alguno de los agentes quimioterapéuticos, desde su uso generalizado en los años 1950 (figura 11). La penicilina y las sulfamidas ya no se emplean con tanta frecuencia hoy en día dado que muchos patógenos se han hecho resistentes a ellos. Incluso aquellos microorganismos que siguen siendo sensibles a penicilina necesitan una dosis significativamente superior que hace diez años para que el tratamiento sea eficaz.

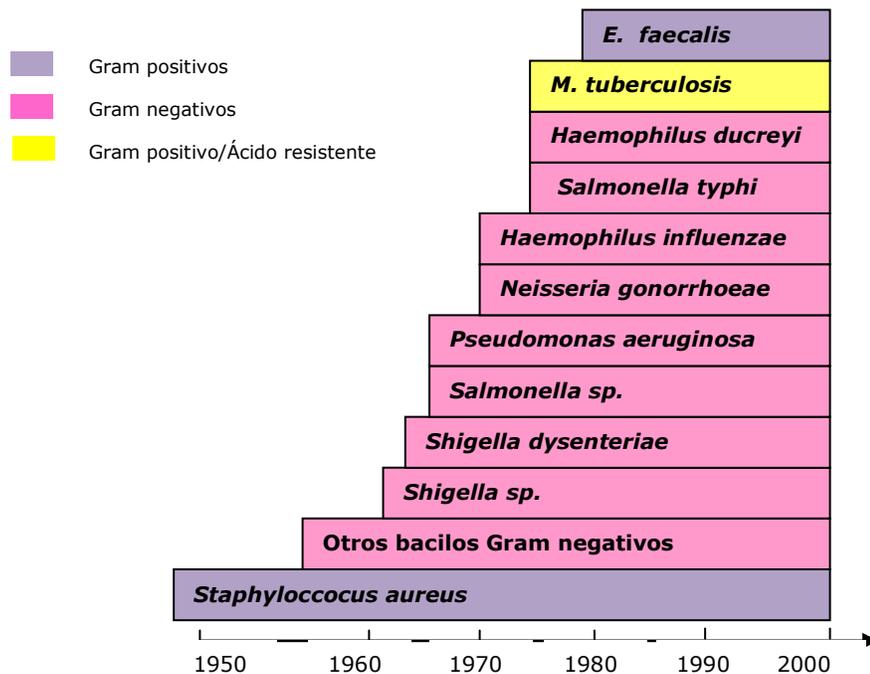


Figura 11. Aparición de resistencia a drogas antimicrobianas en algunos patógenos humanos

Otros usos indiscriminados de los antibióticos también contribuyen a la aparición de cepas resistentes, por ejemplo, los antibióticos que se emplean en agricultura y ganadería. Algunos de los últimos brotes de infecciones transmitidas por alimentos se han atribuido al uso de antibióticos en los animales. Así, si se saturan los diversos ambientes con antibióticos, la resistencia a los mismos se desarrollará rápidamente.

Se ha visto que si se suspende el empleo de un antibiótico determinado, su resistencia desaparecerá con el tiempo. Esto indica que la resistencia es reversible y que la eficacia de algunos antibióticos puede restablecerse eliminando su uso durante algún tiempo y cuidando su prudente y controlada utilización.

Cuantificación de la actividad antimicrobiana²²

La actividad antimicrobiana se mide determinando la cantidad más pequeña que se necesita de un agente para inhibir el crecimiento de un organismo control, valor llamado concentración mínima inhibitoria (CMI). Para determinar la CMI se prepara una serie de tubos de cultivo, cada uno conteniendo un medio con una concentración diferente del agente y después los tubos se inoculan. El tubo que contiene la menor concentración de agente que inhibe completamente el crecimiento del organismo usado como referencia define la CMI. Este procedimiento se denomina *técnica de dilución en tubo*.

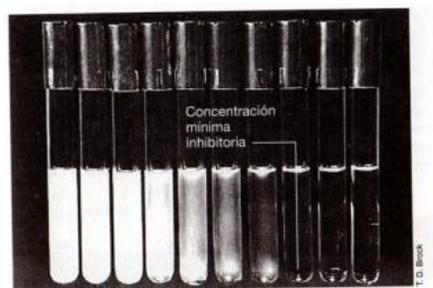


Figura 12. Evaluación de un antibiótico mediante el método de dilución en tubo.

La CMI no es constante para un determinado agente, porque depende del tipo de microorganismo utilizado, el tamaño del inóculo y las condiciones de incubación, como temperatura, pH y aireación. Cuando se estandarizan rigurosamente todas las condiciones, es posible comparar diferentes antimicrobianos y determinar cuál es el agente más eficaz frente a un organismo o calcular la actividad de un único agente

frente a diversos organismos. Este método no distingue entre un agente microbicida o uno microbiostático, dado que el agente está presente en el medio de cultivo durante todo el periodo de incubación.

Otro procedimiento comúnmente utilizado en el estudio de la acción antimicrobiana es el método de difusión en agar (Figura 13). Se prepara una caja Petri con un medio de agar inoculado uniformemente con el microorganismo a ensayar. Cantidades conocidas del agente antimicrobiano se añaden a discos de papel filtro que se colocan en la superficie del agar. Durante la incubación, el agente difunde desde el papel de filtro al agar; la concentración del agente disminuye a medida que aumenta la distancia al papel filtro. A una determinada distancia del disco se alcanza la CMI. A partir de ese punto hay crecimiento, pero en las proximidades del disco no lo hay. Se crea entonces una zona de inhibición; el diámetro de la zona es proporcional a la cantidad de antimicrobiano añadido al disco, la solubilidad del agente, el coeficiente de difusión y la eficacia del agente. Este método se usa de forma rutinaria para ensayar la sensibilidad a los antibióticos en patógenos.

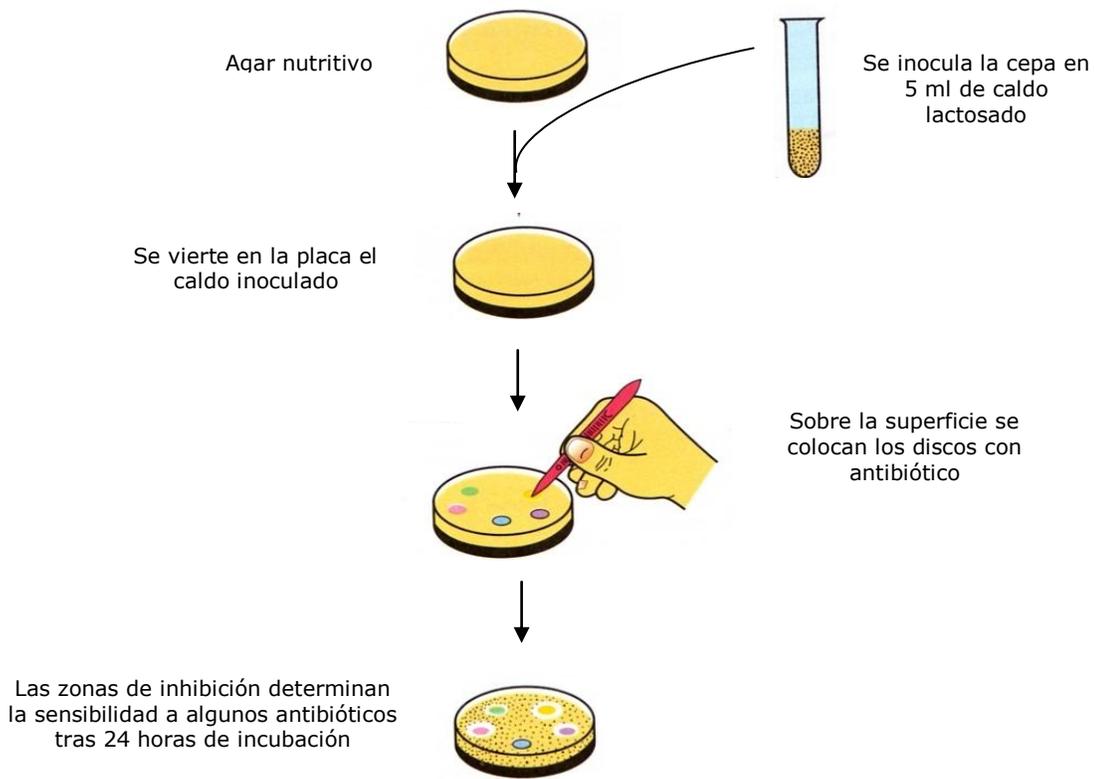


Figura 13. Método de difusión en agar para determinar la actividad de un antibiótico.

La siguiente tabla muestra los tamaños de zonas de inhibición características para distintos antibióticos. Las zonas que se ven sobre las placas se miden y se comparan con datos estándar para establecer si el aislado es verdaderamente sensible a un determinado antibiótico. Los datos en esta tabla son muy útiles para escoger el mejor antibiótico ante una infección bacteriana específica. Por fortuna, muchos microorganismos potencialmente patógenos son susceptibles a distintos antibióticos; sin embargo, existen algunos sensibles a muy pocos antimicrobianos. Otros patógenos han desarrollado resistencia a los antibióticos, de ahí que sea esencial la prueba de sensibilidad antibiótica para estos microorganismos. Estos informes, denominados antibiogramas, indican la sensibilidad de los microorganismos aislados a los antibióticos de uso actual.

Tabla 6. Tamaños de las zonas de inhibición en algunas pruebas de susceptibilidad a discos de antimicrobianos

Antibiótico	Diámetro de la zona de inhibición (mm)			
	Cantidad en el disco	Resistente	Intermedia	Sensible
Ampicilina ^a	10 µg	11 o menos		14 o más
Ampicilina ^b	10 µg	28 o menos	-	29 o más
Cefoxitina	30 µg	14 o menos	15-17	18 o más
Cefalotina	30 µg	14 o menos	15-17	18 o más
Cloranfenicol	30 µg	12 o menos	13-17	18 o más
Clindamicina	2 µg	14 o menos	15-16	17 o más
Eritromicina	15 µg	13 o menos	14-17	18 o más
Estreptomina	10 µg	11 o menos	dic-14	15 o más
Gentamicina	10 µg	12 o menos	13-14	15 o más
Kanamicina	30 µg	13 o menos	14-17	18 o más
Meticilina ^b	5 µg	9 o menos	oct-13	14 o más
Neomicina	30 µg	12 o menos	13-16	17 o más
Nitrofurantoína	300 µg	14 o menos	15-16	17 o más
Penicilina G ^c	10 unidades	28 o menos	-	29 o más
Penicilina G ^d	10 unidades	11 o menos	dic-21	22 o más
Polimixina B	300 unidades	8 o menos	09-nov	12 o más
Tetraciclina	30 µg	14 o menos	15-18	19 o más
Trimetoprim-Sulfametoxazol	1,25/23,75 µg	10 o menos	nov-15	16 o más
Tobramicina	10 µg	12 o menos	13-14	15 o más

a Para microorganismos Gram negativos y enterococos

b Para estafilococos y microorganismos muy sensibles a la penicilina

c Para estafilococos

d Para microorganismos distintos a los estafilococos. Incluye algunos como enterococos y algunos bacilos Gram negativos, que pueden producir algunas infecciones sistémicas, que se tratan con dosis altas de penicilina G.

Se ha visto que *Escherichia coli* es resistente a diferentes antimicrobianos y esta resistencia puede ser adquirida del ambiente mediante plásmidos. En estudios que se han hecho en diferentes países se ha visto que la resistencia a antimicrobianos está ligada directamente con la localización geográfica y el ambiente, pues dependiendo de esto, los microorganismos son susceptibles a diferentes antibióticos. Se forma general y en base a estudios realizados en diferentes países, se ha visto que *E. coli* es resistente principalmente a tetraciclina, ampicilina, gentamicina, kanamicina, estreptomicina y sulfametoxazol/trimetoprim^{26,28,44}. La tetraciclina es el principal antibiótico empleado para tratar enfermedades en animales domésticos y muchas veces es administrado sin conocer antes con certeza la causa de la enfermedad. Esta resistencia a tetraciclina que *E. coli* ha sido capaz de desarrollar está mediada por plásmidos, que se ha visto pueden ser adquiridos por las bacterias directamente del ambiente, y con ellos, esparcirse rápidamente. También se sabe que cuando una cepa es resistente a tetraciclina, es muy probable que también lo sea a otros agentes antimicrobianos, como gentamicina o kanamicina, debido al plásmido que tienen²⁰. Se cree que la multiresistencia a estos antibióticos se debe a que son ampliamente utilizados con fines terapéuticos en granjas donde se crían animales destinados a consumo humano por su relativamente bajo costo y la eficacia que en un principio mostraban⁹.

En la actualidad se sabe que para eliminar infecciones causadas por cepas de *E. coli* multirresistentes, es recomendable combinar antimicrobianos potentes que tengan un efecto sinérgico contra la bacteria. Así, se emplea tetraciclina en combinación con ampicilina, gentamicina, amoxicilina o cloramfenicol⁴⁴.

El caso de *Staphylococcus aureus* es similar. El extensivo uso de antibióticos ha tenido como consecuencia la selección natural de cepas resistentes de *S. aureus*. Por ello, las terapias con antibióticos para infecciones con esta bacteria son problemáticas; ya muy pocas son tratables con penicilina y en la mayoría de los casos es necesario aislar a la bacteria y probar su resistencia a diferentes antimicrobianos para saber su sensibilidad.^{5,22}

Se ha visto que tan rápido como nuevos antibióticos son creados, cepas de estafilococos son capaces de desarrollar mecanismos eficientes para neutralizarlos. Por

esta razón, se ha tenido la necesidad de buscar día con día nuevas alternativas para el tratamiento de enfermedades causadas por *S. aureus*.⁵

De acuerdo con estudios realizados, se sabe que *S. aureus* es resistente principalmente a penicilina, meticilina, quinolonas y vancomicina, teniendo un mecanismo de resistencia diferente para cada uno de estos antibióticos: inserción de genes que codifican para la producción de cierta enzima, mutaciones cromosómicas, plásmidos u operones; todos ellos permiten desactivar el principio activo de los fármacos más comúnmente empleados para combatir a esta bacteria.²¹

Para ambas bacterias se recomienda que el uso de agentes antimicrobianos en animales siga estrictos lineamientos para minimizar la selección y proliferación de cepas bacterianas resistentes y así evitar el riesgo de transferirlas a los humanos. Además, es importante recordar que los fármacos siempre deben estar prescritos por doctores y no es recomendable la automedicación.⁹

Las bacterias patógenas aisladas con más frecuencia a partir de quesos, como *E. coli* y *S. aureus*, han demostrado ser multirresistentes a distintos antibióticos, y con el paso del tiempo esta característica se ha hecho más evidente. De ahí la importancia de determinar la sensibilidad de las cepas aisladas a distintos antimicrobianos, pues al ser microorganismos asociados con mucha frecuencia enfermedades gastrointestinales, se tiende al abuso de ciertos fármacos, potenciando así la aparición de cepas resistentes a aquellos de mayor uso.

III. OBJETIVOS

Objetivo General

- Aislar y determinar la frecuencia de microorganismos potencialmente patógenos en quesos frescos elaborados por métodos artesanales e industriales.

Objetivos Particulares

- Emplear técnicas alternas a los métodos convencionales que permitan economizar tiempo y recursos.
- Llevar a cabo la identificación bioquímica de las cepas aisladas.
- Hacer un ensayo de sensibilidad ante diversos antimicrobianos de los microorganismos identificados.
- Determinar la importancia de los ensayos microbiológicos como pruebas de control de calidad en la industria de los derivados lácteos.

IV. JUSTIFICACIÓN

El objetivo del presente trabajo es mostrar la frecuencia con la que dos de los microorganismos patógenos de mayor importancia de salud pública en México, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, se logran aislar a partir de un alimento muy común en las mesas de hogares mexicanos, el queso fresco.

La importancia de los resultados obtenidos con este proyecto radica en que gracias a ellos, podrá ser posible determinar la calidad higiénico-sanitaria de los quesos analizados y el impacto que tiene la falta de estrictos controles de calidad en la elaboración del queso en la salud de los consumidores. Además, con ello se resalta la importancia de tener un sistema de calidad que permita elaborar alimentos inocuos conservando en la medida de lo posible sus atributos sensoriales.

V. HIPÓTESIS

En las muestras a analizar, debido a su elaboración artesanal y a la falta de un estricto control de calidad en el proceso, se espera encontrar dos de los microorganismos patógenos de mayor importancia en materia de salud pública, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 30 muestras de quesos artesanales de tipo Ranchero y Panela para detectar cuenta total de mesófilos aerobios, coliformes totales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

La investigación se dividió en tres etapas:

1. Análisis presuntivo. Se analizaron las 30 muestras mediante el uso de las Placas Petrifilm.
2. Análisis confirmativo. Pruebas bioquímicas para la confirmación de la presencia de los patógenos.
3. Sensibilidad a antimicrobianos. Se probó la resistencia de las cepas aisladas a diferentes antibióticos.

Diluyentes y reactivos

Para el completo análisis de las muestras fueron necesarios los siguientes reactivos, diluyentes y medios de cultivo (Ver Apéndice 1):

- a) Solución de hidróxido de sodio 1 N
- b) Solución reguladora de fosfatos pH 7.2
- c) Agua destilada estéril
- d) Solución salina isotónica
- e) SIM (Sulfhídrico Indol Movilidad)
- f) Agar hierro de Kligler
- g) Agar Mac Conkey
- h) Citrato de Simmons
- i) Medio basal OF
- j) Agar Rojo Violeta Bilis (RVBA)
- k) Manitol Sal Agar
- l) Caldo Rojo de Metilo / Voges Proskauer
- m) Caldo lactosado
- n) Agar cuenta estándar
- o) Agar Mueller-Hinton

p) Caldo cerebro-corazón (BHI)

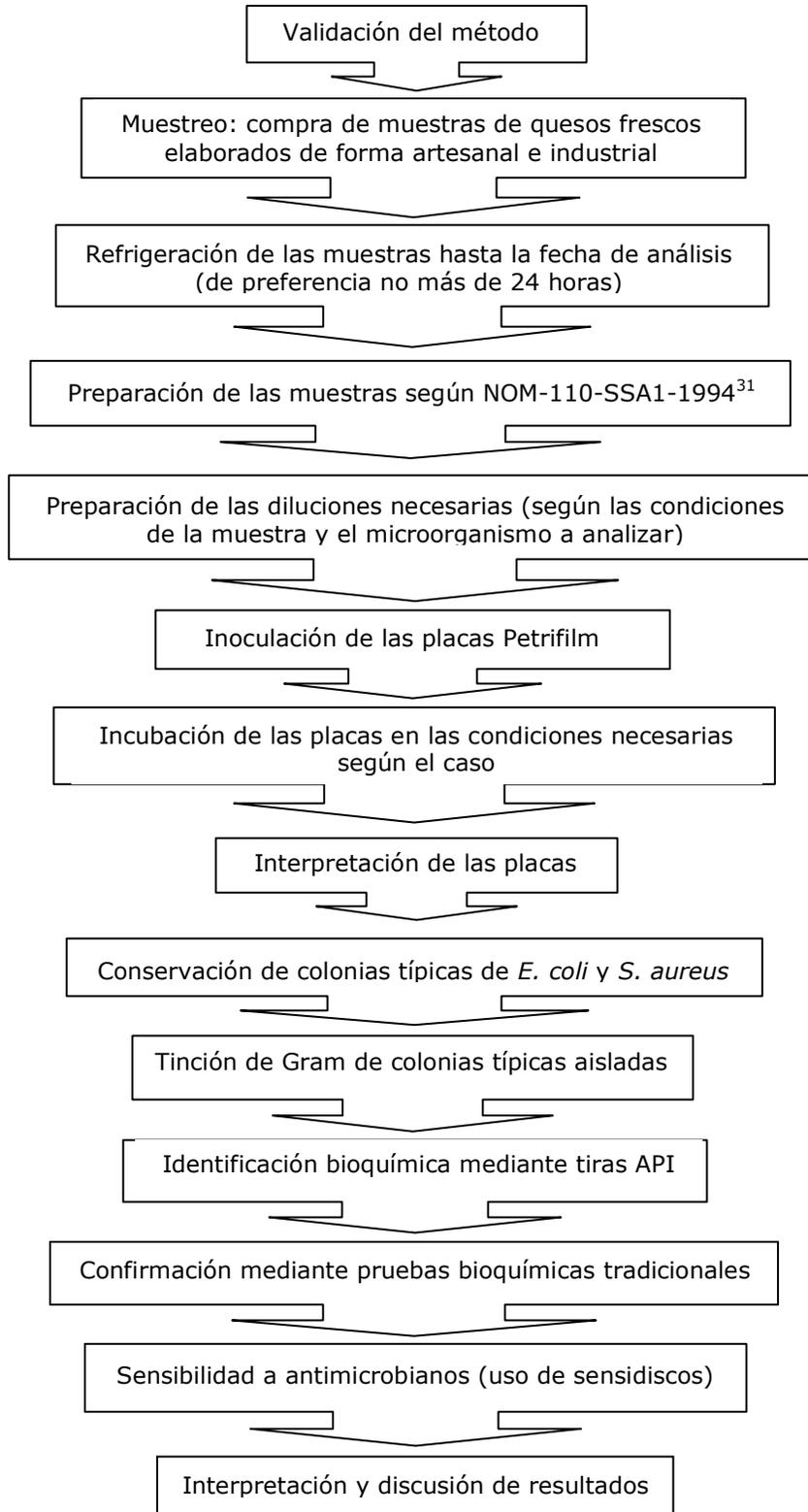
Materia prima

Selección de las muestras

Todas las muestras fueron quesos frescos elaborados de forma artesanal y vendidos bajo condiciones deficientes de higiene y carente de refrigeración y almacenamiento adecuado. El muestreo se hizo de forma aleatoria, comprándose los quesos en diferentes establecimientos en diversas colonias de la Ciudad de México. Las delegaciones donde las muestras fueron compradas fueron: Coyoacán, Benito Juárez, Tlalpan y Álvaro Obregón. Los lugares de compra fueron diversos: desde establecimientos que cuentan con sistemas de refrigeración para sus productos hasta puestos en mercados sobre ruedas, que no cuentan con ningún sistema de conservación de los mismos. Para llevar a cabo el muestro de forma adecuada, se siguió la norma correspondiente, NMX-F-285, Muestreo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico³⁷. Los quesos fueron transportados al laboratorio para su análisis en una hielera con el fin de mantener las condiciones iniciales del producto, como sería la carga microbiana. Las muestras se conservaron en refrigeración a 4° C hasta su análisis, en ningún caso el tiempo entre la recolección de la muestra y el momento del análisis excedió las 24 horas.

Preparación de las muestras

Minutos antes de hacer el análisis, a los quesos se les retiró la envoltura, con cuidado de no tocarlos para no contaminarlos. Se pesaron 10 g de muestra para añadir posteriormente 90 mL de buffer de fosfatos pH 7.2 estéril según la NOM-110-SSA1-1994. Se homogenizó haciendo uso del Stomacher y se procedió de acuerdo a esta norma a realizar diluciones seriadas con incrementos de 10.



A continuación se explica con detalle el procedimiento seguido para cada una de las metodologías aplicadas durante la investigación.

1. Validación del método

Para poder decir que el método de las placas Petrifilm es confiable y reproducible, se tomó como referencia un estudio previamente realizado (Amaro, 2001) donde se concluyó que la técnica es confiable y reproducible. Para apoyar este resultado se llevó a cabo un procedimiento que nos permitiera validarla técnica, identificando *E. coli* mediante un método cromogénico como en el caso de las placas y comparando estos resultados con aquellos obtenidos mediante la técnica tradicional de aislamiento en Agar Rojo Bilis Violeta, según la NOM-113-SSA1-1994, método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.

2. ANÁLISIS PRESUNTIVO: PLACAS PETRIFILM 3M^{23,24,25}

2.1 Almacenamiento

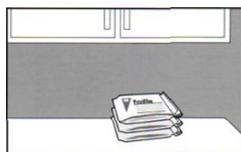
2.1.1 Los paquetes cerrados se almacenaron a una temperatura menor a 8°C. Las placas Petrifilm tienen un tiempo de vida útil de 18 meses desde su fecha de elaboración.



2.1.2 Para cerrar un paquete abierto, se dobló la bolsa y se colocó una cinta adhesiva para evitar el ingreso de humedad y con ella, la alteración de las placas.



2.1.3 Los paquetes cerrados (según el punto 2) se mantuvieron a temperaturas alrededor de 25°C (77 °F). Las placas se utilizaron máximo 1 mes después de abierto el paquete.



2.2. Preparación de la muestra³⁴

2.2.1. Se pesaron 10 g de muestra y se colocaron en una bolsa de plástico con cierre hermético.



2.2.2 Se adicionaron 90 mL de buffer de fosfatos (pH 7.2). Este pH es necesario para el buen funcionamiento de la placa. A esta dilución se le llamó 10^{-1} .

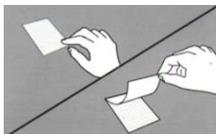
2.2.3. Se homogenizó la muestra utilizando el Stomacher.



A partir de esta primera dilución de la muestra se hicieron diluciones decimales.

- Se prepararon tubos con 9 mL de buffer de fosfatos pH 7.2 y se esterilizaron
- Se tomó 1 mL de la primera dilución (10^{-1}) y se colocó en uno de los tubos de buffer.
- Se agitó hasta homogeneizar y esta dilución se marcó como 10^{-2} .
- Se siguió este mismo procedimiento hasta completar todas las diluciones que fueran necesarias. Esto se decidió en base a las condiciones de almacenamiento y venta de las muestras. El rango de diluciones manejado fue entre 10^{-1} y 10^{-7} .

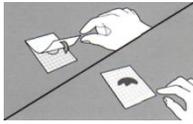
2.3 Inoculación



2.3.1. Se colocó la Placa Petrifilm en una superficie plana y nivelada y en una zona de asepsia se levantó la lámina semitransparente superior.

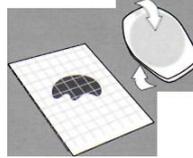
2.3.2 Con una micropipeta perpendicular a la Placa Petrifilm se colocó 1 mL de la muestra en el centro de la película cuadrículada inferior.





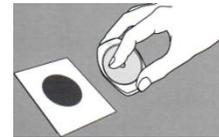
2.3.3 Se liberó la película superior dejándola caer sobre la muestra. Esto se hizo con mucho cuidado para evitar la formación de burbujas.

2.3.4 Con el lado bordeado hacia abajo, se colocó el dispersor sobre la película superior, atrapando el inóculo.



2.3.5 Se presionó suavemente el dispersor para distribuir el inóculo sobre el área circular, cuidando no girarlo ni deslizarlo.

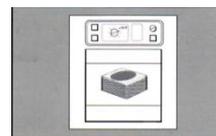
2.3.6 Se retiró el difusor y se esperó aproximadamente 1 minuto a que solidificara el gel.



2.4 Incubación

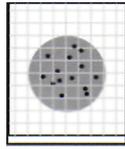
2.4.1 Las placas se Incubaron cara arriba en grupos de hasta 20 unidades de altura. El tiempo y temperatura de incubación varió dependiendo el tipo de microorganismo a detectar.

Mesófilos Aerobios	37°C/48 hs
Coliformes totales	37°C/ 24 hs
<i>Escherichia coli</i>	37°C/ 48 hs
<i>Staphylococcus aureus</i>	37°C/ 24 hs



2.5 Interpretación

Las Placas Petrifilm se contaron en cada uno de los casos para las diferentes diluciones inoculadas.



Las placas se interpretaron de acuerdo con el siguiente criterio:
(Según las guías de interpretación proporcionadas por el proveedor)

Cuenta total de mesófilos aerobios:	Colonias color rojo
Coliformes totales:	Colonias color rojo con presencia de gas
<i>Escherichia coli</i> :	Colonias color azul con presencia de gas
<i>Staphylococcus aureus</i> :	Colonias rojo-violeta

Algunas colonias fueron aisladas para identificación posterior: se levantó el film superior y se tomó la colonia directo del gel.

3. CONSERVACIÓN DE CEPAS CARACTERÍSTICAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*.

Para poder llevar a cabo las pruebas bioquímicas para identificación de los microorganismos, fue necesario resembrar algunas colonias tanto de *E. coli* como de *S. aureus*.

- a) Se resembraron todas las colonias en medio TSA (Agar Trypticaseína – soya) Directamente de las placas se tomaron colonias representativas de *E. coli* y *S. aureus* de acuerdo con la guía de interpretación del proveedor. Esta resiembra se hizo por duplicado, para conservar la cepa y así poder llevar a cabo todas las pruebas bioquímicas y de sensibilidad a antibióticos. Se eligió este medio porque no contiene ningún compuesto que inhiba el crecimiento de alguna de las dos bacterias.

b) Se resembraron colonias de *E. coli* en medio RVBA (ver Apéndice 1)

Este medio es diferencial para el grupo de coliformes por la presencia de sales biliares que sólo estos microorganismos son capaces de utilizar. En él podemos distinguir a *E. coli* de otras bacterias gram negativas por su crecimiento: colonias rojas, de 1 a 2 mm de diámetro, con halo de precipitación rojizo.

c) Se resembró *S. aureus* en agar Manitol Sal, que es un agar selectivo para esta bacteria donde las colonias crecen de color amarillo debido a la fermentación de manitol y por consecuencia, al cambio en el pH.

Después de las resiembras realizadas, se lograron recuperar 20 cepas de *E. coli* y 16 de *S. aureus*.

4. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA. SISTEMA API 20E Y API STAPH

Para comprobar la presencia de patógenos como *E. coli* y *S. aureus* no podemos basarnos únicamente en métodos cromogénicos como lo son las placas Petrifilm; por esto, se llevaron a cabo pruebas bioquímicas mediante el sistema AP. API 20 E es la galería que nos permite la identificación de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*; con API Staph, aquellas de los géneros *Staphylococcus*.

Antes de utilizar el sistema API fue necesario llevar a cabo una tinción de Gram de las colonias para asegurarnos de que estuvieran correctamente aisladas y así evitar errores en la interpretación de las pruebas bioquímicas.

1.1 Utilización de las galerías API 20E y Api Staph^{14,15}

1.1.1 Preparación de la galería

- Se repartieron 5 ml de agua destilada en los alveolos del fondo de la cámara para crear una atmósfera húmeda.
- Se inscribió la referencia de la cepa en la lengüeta lateral de la cámara; no sobre la tapa ya que ésta puede quedar desplazada durante la manipulación.
- Se sacó la galería de su envase.

- Se colocó la galería en la cámara de incubación.

4.1.2 Preparación del inóculo

- Se tomó una sola colonia característica del medio correspondiente y se suspendió en 5 mL de solución salina isotónica (Ver Apéndice 1). En todos los casos se utilizaron cultivos jóvenes (no más de 24 horas).
- Se realizó una suspensión bacteriana homogeneizando cuidadosamente las bacterias en la solución.
- Se leyó con el Densimat hasta alcanzar 4 puntos en la escala de MacFarland, densidad óptica óptima para la realización de las pruebas bioquímicas en API.

4.1.3 Inoculación de la galería

- Se introdujo la suspensión bacteriana en los tubos de la galería con la ayuda de pipetas pasteur estériles. Para evitar la formación de burbujas en el fondo de los tubos, se colocó la punta de la pipeta sobre la pared de la cúpula, inclinando ligeramente la cámara de incubación hacia adelante.
- En aquellas pruebas donde el nombre se encuentra encerrado en un recuadro, fue necesario llenar tubo y cúpula. En las otras, se llenó únicamente el tubo. En el caso de las pruebas cuyo nombre se encuentra subrayado, fue necesario crear una atmósfera anaerobia llenando la cúpula con aceite de parafina.
- Se cerró la cámara de incubación.
- Se incubó a 36°C durante 24 horas.
- Además de las pruebas en la galería, se hicieron ensayos complementarios:
 - o SIM (Sulfhídrico, Indol, Movilidad). Se inoculó un tubo por cepa. La presencia de sulfhídrico fue evidente por la presencia de precipitado negro, la movilidad se evaluó en base al crecimiento de la colonia en el medio y para la prueba de indol se requirió una gota de reactivo de Erlich.
 - o Hugh-Leiffson (Oxidación - Fermentación). Se inocularon dos tubos por cepa, a uno de ellos se le añadió parafina para crear una atmósfera anaerobia. Una tonalidad amarilla en el medio indicó reacción positiva.

- Siembra en MacConkey. Se sembraron las colonias por picadura en este medio.

4.1.4. Lectura e interpretación

- Después de la incubación, la lectura de la galería se hizo en base a la Tabla de Lectura que proporciona el proveedor.
- En los casos en que tres o más ensayos resultaron positivos, se anotaron en la hoja de resultados todas las reacciones espontáneas y después se revelaron los ensayos que requieren adición de reactivos:
 - Prueba TDA: se añadió una gota del reactivo TDA. Un color marrón-rojizo indicó una reacción positiva.
 - Prueba IND: se agregó una gota de reactivo de Erlich. Un color rosado nos dio una prueba positiva.
 - Prueba VP: se añadió una gota de KOH al 40% y una gota de alfa-naftol. Después de 10 minutos, un color rojo o rosa intenso nos dio una reacción positiva.
- La identificación se obtuvo a partir del perfil numérico: en la hoja de resultados los tests están separados en grupos de tres y se indica para cada uno un valor de 1,2 o 4. El perfil numérico se obtuvo sumando los valores correspondientes a las reacciones positivas.
- En el software de identificación *apiweb*TM se introdujeron manualmente mediante el teclado los perfiles numéricos de 7 cifras.
- En la mayoría de los casos también fue necesario llevar a cabo la prueba de nitritos:
 - Se añadió una gota de ácido sulfanílico y una de alfa-naftilamina en el tubo de la prueba de Glucosa (GLU). Después de 5 minutos, una coloración roja indicó una prueba positiva.

La galería API Staph se inocula e interpreta de la misma forma.

5 SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS²⁹

Una vez confirmada la presencia de los patógenos en estudio, se evaluó la resistencia de las cepas aisladas a diferentes antibióticos mediante el siguiente procedimiento:

5.1 Material y reactivos

5.1.1 Agar Mueller-Hinton

Se considera el mejor medio de cultivo para llevar a cabo las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos porque:

- a) Ofrece la posibilidad de buena reproducibilidad
- b) Tiene bajas concentraciones de inhibidores a sulfonamida, trimetoprima y tetraciclina
- c) En él crecen la mayoría de los patógenos
- d) Hay mucha información reportada sobre las pruebas realizadas en este medio de cultivo

5.1.1.1 Preparación del agar

1. Se preparó el medio en base a las indicaciones del proveedor.
2. Se esterilizó y dejó enfriar en un baño de agua entre 45 y 50°C.
3. Se vertió en cajas petri y se dejó enfriar a temperatura ambiente.
4. Se guardó en refrigeración.

5.1.2 Discos antimicrobianos

5.1.2.1 Almacenamiento

- a. Los discos se mantuvieron en refrigeración.
- b. Se sacaron los discos de refrigeración 1 o 2 horas antes de usarlos y se dejaron a temperatura ambiente.
- c. Se retiró el exceso de humedad mediante el uso de un desecador.

5.1.3 Estándar de turbidez

Para estandarizar la densidad del inóculo se empleó un estándar de BaSO_4 .

- A) Se preparó el estándar de BaSO_4 añadiendo 0.5 mL de 0.048 M BaCl_2 a 99.5 mL de 0.18 M H_2SO_4 .
- B) Se distribuyó en porciones de 4 a 6 mL, en tubos iguales a los que se usaron para reproducir el inóculo.
- C) Se sellaron los tubos y se almacenaron en obscuridad a temperatura ambiente.
- D) Se agitó vigorosamente cada tubo en un vortex justo antes de usarse.

5.2 Procedimiento

5.2.1 Inoculación de las cajas petri por el método estándar

1. Se seleccionaron 4 o 5 colonias de las mismas características morfológicas. Se tocó con el asa cada colonia y se transfirieron las bacterias a un tubo con 4-5 mL de un medio de cultivo adecuado, como el caldo soya-caseína.
2. Se incubó a 35-37°C hasta alcanzar la turbidez adecuada.
3. Se ajustó la turbidez con disolución salina estéril o medio de cultivo.
4. Después de 15 minutos de haber ajustado la turbidez del inóculo, se tomó una muestra con un hisopo estéril.
5. Se inoculó la superficie del agar Mueller-Hinton dibujando líneas sobre él con el hisopo. Se repitió el procedimiento al menos dos veces más mientras se rotaba la caja petri para asegurar su correcta distribución. Nunca deben usarse cultivos sin diluir para inocular las placas.

5.2.2 Procedimiento de prueba

1. Se colocó el disco impregnado con los antimicrobianos a probar, con ayuda de pinzas estériles. Se presionó suavemente sobre el agar para asegurar completo contacto. Una vez colocado, ya no debe moverse de posición pues la difusión de los fármacos es casi instantánea.
2. Se invirtieron las cajas y se colocaron en incubadora a 35°C 15 minutos después de haber colocado los discos. Las placas no deben ser incubadas en condiciones de anaerobiosis en presencia de CO₂ pues este compuesto puede modificar significativamente el tamaño de los halos de inhibición.
3. Después de 24 horas se observaron las cajas petri y se midieron los diámetros de las zonas de inhibición, incluyendo el diámetro del disco.
4. Se interpretó el tamaño de las zonas de inhibición, reportando si el microorganismo es susceptible o resistente a los diferentes fármacos probados.

5.2.3 Procedimientos de control de calidad

5.2.3.1 Límites de tamaño de zonas de inhibición

Existe una tabla que se usa como referencia para medir los límites mínimos y máximos que las zonas de inhibición deben tener. Debe saberse que uno de cada

20 pruebas que se hacen puede estar fuera de los límites establecidos. Si llegara a haber más de 1 prueba fuera del límite, es necesario tomar acciones correctivas.

5.2.3.2 Fuentes comunes de error

- Error al medir los diámetros de las zonas de inhibición
- Contaminación de la cepa a probar
- Ajuste incorrecto del inóculo (muy diluido o poco diluido)
- No agitación vigorosa del estándar de turbidez
- Variabilidad en el agar Mueller-Hinton
- Pérdida de potencia de los fármacos en el disco, debida a manipulación o almacenamiento

VII. RESULTADOS

Se realizó una validación del método de las Placas Petrifilm y los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 7. Comparación de la capacidad de recuperación de *E. coli* en el método tradicional y en placas Petrifilm

Muestra	<i>E. coli</i> en agar RVBA	<i>E. coli</i> en placas Petrifilm EC
B	--	+
F	--	+
G	+	--
H	+	+
J	--	+
K	+	+
L	+	+
M	--	+
O	+	+
Q	+	+
AA	+	+
BB	+	+

Después de 48 horas de incubación se analizó la morfología y microscópica macroscópica de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes, pudiéndose recuperar la cepa en el 66.67% de las cajas de RVBA y en el 91.67% de las placas Petrifilm, lo que nos indica que esta técnica rápida es confiable (Figura 14).

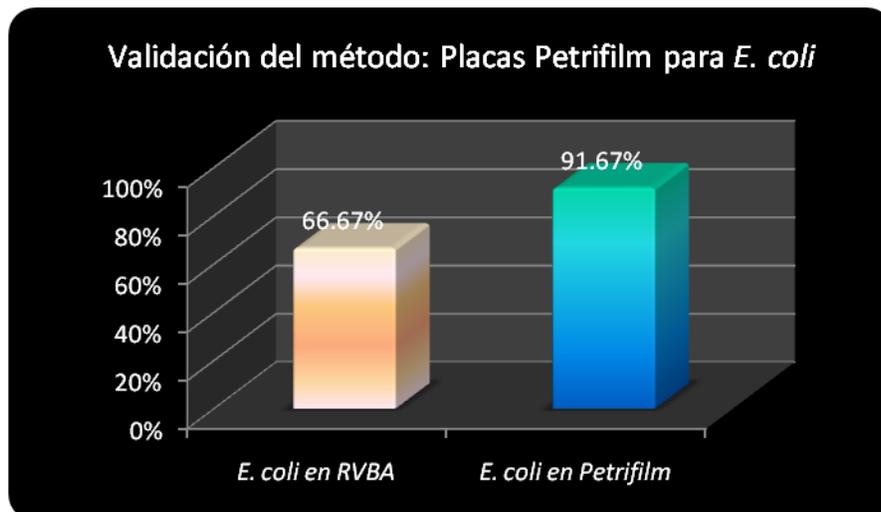


Figura 14. Comparación de la presencia de *E. coli* en medio RVBA y Placas Petrifilm 3M. El método Petrifilm es confiable para la recuperación de *E. coli*. Mediante la técnica tradicional se recuperó *E. coli* en el 66.67% de los casos; las Placas Petrifilm permitieron la recuperación del 91.67% de las cepas, aún más que con el método tradicional.

Así, podemos decir que la técnica de Placas Petrifilm 3M puede ser empleada para los fines de este estudio, al demostrarse que es una técnica rápida confiable para la identificación de *E. coli*.

Análisis de quesos frescos y cuantificación de mesófilos aerobios, coliformes totales, *E. coli* y *S. aureus* mediante el uso de Placas Petrifilm 3M

Se analizó un total de 30 muestras de quesos frescos (panela y rancho). De éstas, 26 fueron muestras elaboradas artesanalmente y 4 fueron de diferentes marcas comerciales (Los Volcanes, Esmeralda, Normex, Bugambilia) compradas en un supermercado, que a diferencia de los artesanales, suponen un proceso de elaboración industrializado, bajo estrictos estándares de calidad e higiene.

Los resultados del conteo de microorganismos indicadores y patógenos en las 30 muestras de queso se muestra en la tabla 8. Cabe aclarar que de cada muestra se hizo una serie de diluciones decimales, y en algunos casos fue necesario hacer hasta 6 diluciones a partir de la muestra original para obtener un número contable de colonias en las placas. El número de diluciones realizadas estuvo relacionado con el lugar de compra, las condiciones del establecimiento y se infiere que también de la materia prima con la que fue elaborado cada queso.

Tabla 8. Análisis microbiológico. Quesos artesanales.

Muestra	Mesófilos aerobios (AC)	Coliformes totales (CT)	<i>Escherichia coli (EC)</i>	<i>Staphylococcus aureus (Staph)</i>
A	1.3x10 ⁴	7.9x10 ³	Ausente	Ausente
B	1.5x10 ⁷	8.8x10 ⁵	1.1x10 ⁶	1.5x10 ⁵
C	1.1x10 ⁷	7.1x10 ³	Ausente	5.0x10 ⁶
D	5.9x10 ⁶	1.4x10 ³	Ausente	1.1x10 ⁶
E	2.6x10 ⁴	2.5x10 ²	Ausente	3.7x10 ²
F	4.0x10 ⁷	1.4x10 ⁶	1.8x10 ⁶	3.8x10 ⁵
G	1.4x10 ⁷	8.5x10 ²	8.0x10 ²	3.0x10 ³
H	5.3x10 ⁴	8.9x10 ³	5.9x10 ³	5.0x10 ¹
J	1.9x10 ⁶	8.9x10 ⁴	7.5x10 ²	1.1x10 ⁴
K	2.1x10 ⁷	1.6x10 ⁶	8.5x10 ²	Ausente
L	4.5x10 ⁷	5.3x10 ⁵	1.6x10 ⁶	1.0x10 ⁵
M	5.4x10 ⁷	7.6x10 ⁶	2.6x10 ⁵	8.9x10 ³
N	7.6x10 ⁶	3.2x10 ⁶	2.0x10 ³	1.5x10 ⁴
O	2.0x10 ⁵	3.2x10 ²	5.8x10 ²	1.0x10 ²
P	1.0x10 ⁷	7.4 x10 ⁵	1.0x10 ³	1.5x10 ⁴
Q	1x10 ⁸	2.1x10 ⁵	4.8x10 ³	3.4x10 ⁴
R	4.9x10 ⁵	1.3x10 ⁵	Ausente	Ausente
S	7.5x10 ⁵	1.0x10 ²	1.0x10 ²	Ausente
T	1x10 ⁸	1.4x10 ³	Ausente	2.0x10 ¹
U	1.3x10 ⁷	5.6x10 ⁶	Ausente	3.0x10 ²
Y	3.7x10 ⁷	6.9x10 ⁶	Ausente	1.0x10 ³
Z	2.0x10 ⁷	3.4x10 ⁶	Ausente	1.0x10 ⁴
AA	1x10 ⁸	1.3x10 ⁷	8.5x10 ²	Ausente
BB	4.7x10 ⁶	1.0x10 ⁶	9.4x10 ⁵	3.0x10 ⁵
CC	4.5x10 ⁶	1.0x10 ²	1.0x10 ²	4.2x10 ³
DD	1x10 ⁸	7.7x10 ⁶	Ausente	Ausente

Tabla 9. Análisis microbiológico. Quesos industriales.

Muestra	Mesófilos aerobios (AC)	Coliformes totales (CT)	<i>Escherichia coli (EC)</i>	<i>Staphylococcus aureus (Staph)</i>
I*	8.6x10 ³	1.5x10 ³	Ausente	8.4x10 ²
V*	1.6x10 ⁷	3.3x10 ⁴	Ausente	Ausente
W*	1.8x10 ⁶	6.3x10 ³	Ausente	5.0x10 ²
X*	2.6x10 ⁵	4.4x10 ¹	Ausente	Ausente

En las siguientes figuras se muestran algunos de los resultados obtenidos para diferentes muestras analizadas:

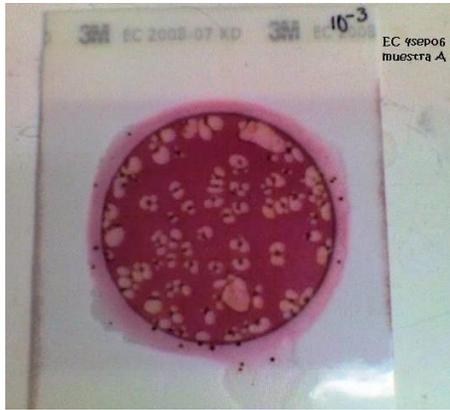


Figura 15. Placa EC. Cuenta de Coliformes totales (muestra 1)

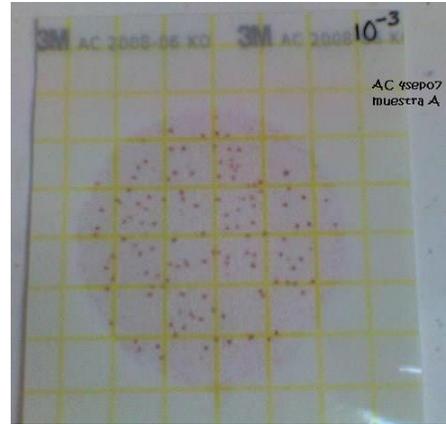


Figura 16. Placa AC. Cuenta de Mesófilos aerobios (muestra 1)



Figura 17. Placa EC. Cuenta de *E. coli* (muestra 2)

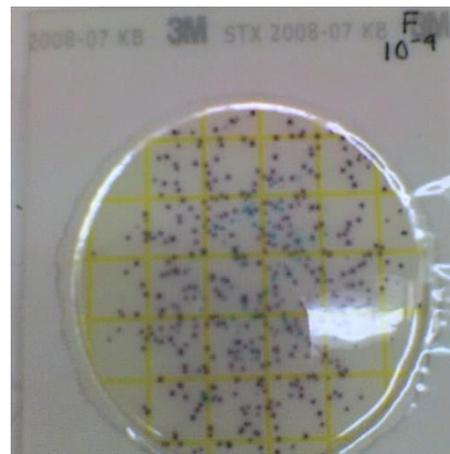


Figura 18. Placa Staph Express. Cuenta de *S. aureus* (muestra 6)

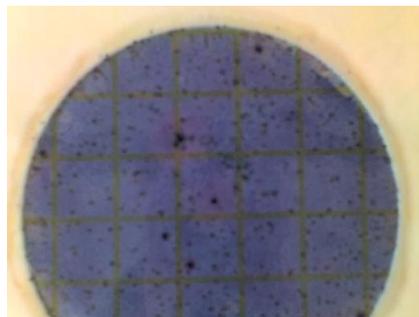


Figura 19. Uso del Disco Staph Express

Según las tablas 11 y 12 vemos que en todas las muestras hubo altas cuentas de mesófilos aerobios y coliformes totales. En el caso de mesófilos aerobios, las cuentas son similares en quesos artesanales e industriales; mientras que las cuentas de coliformes totales son significativamente más pequeñas en las muestras industriales, como se esperaba.

Con los datos mostrados en las tablas 11 y 12, se construyeron los siguientes gráficos:

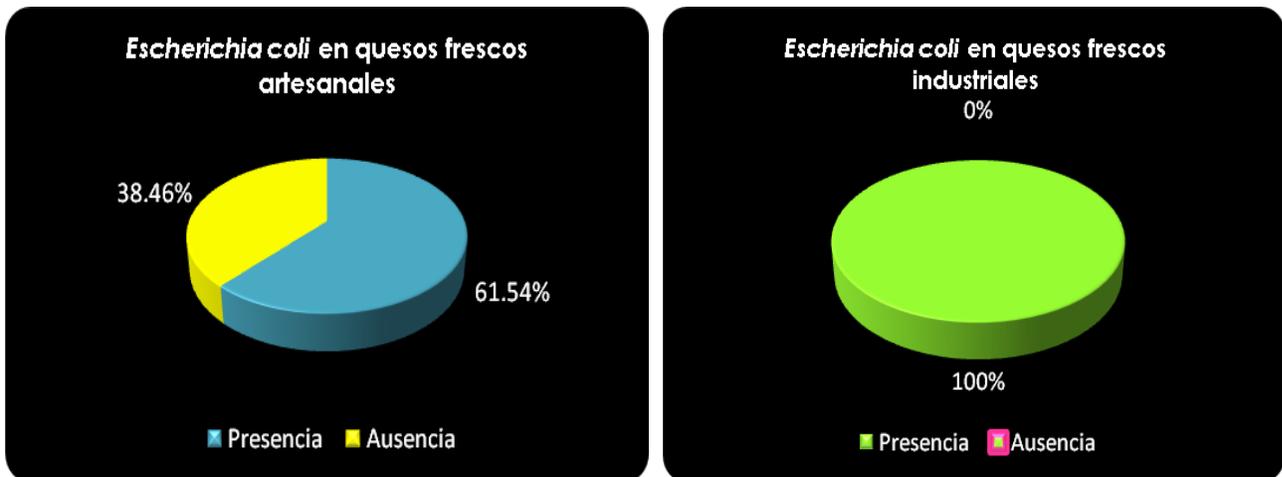


Figura 20. *Escherichia coli* en queso fresco identificado mediante la técnica de Placas Petrifilm. No. muestras: 30. *E. coli* se encuentra presente en el 61.54% de las muestras artesanales, mientras que en las muestras industriales estuvo ausente.

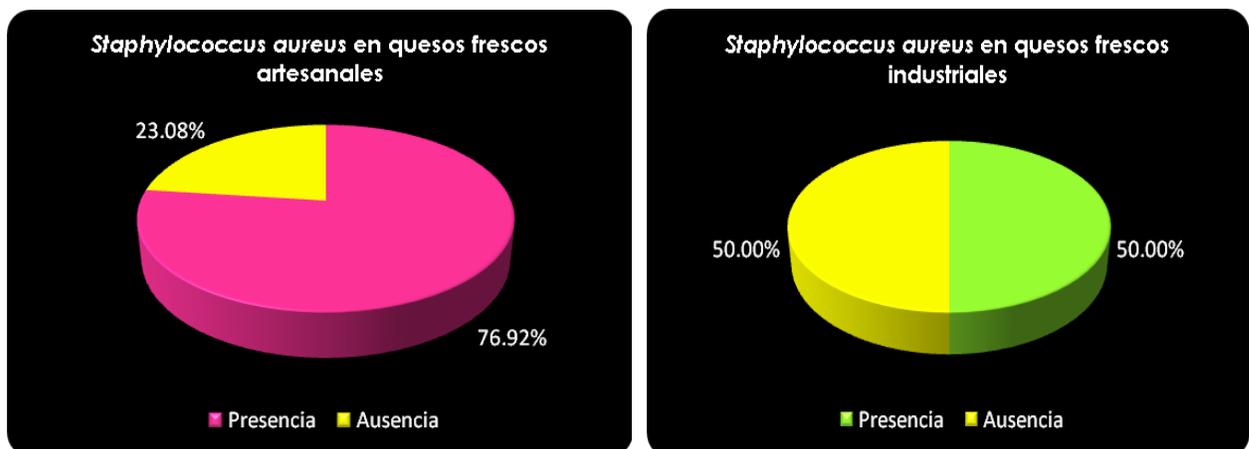


Figura 21. *Staphylococcus aureus* en queso fresco identificado mediante Placas Petrifilm. La presencia de *S. aureus* en queso fresco fue más común que la de *E. coli*. Tanto en muestras artesanales (76.92%) como industriales (50%) se detectó la presencia de este microorganismo patógeno. Técnica de Placas Petrifilm. No. de muestras: 30

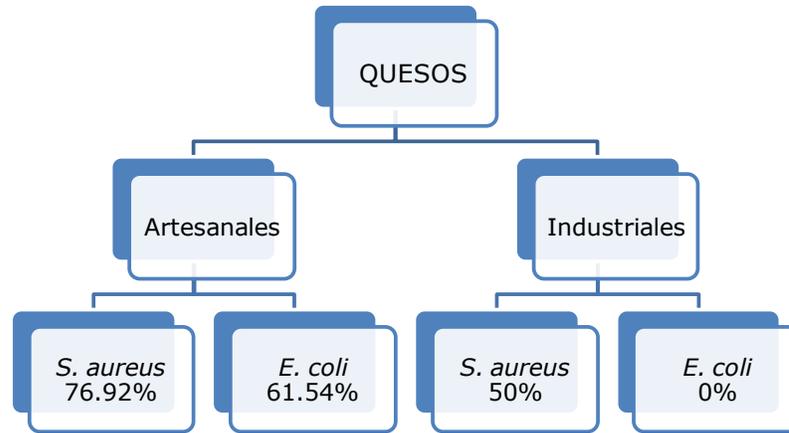


Figura 22. Microbiología de queso fresco. De acuerdo al esquema, la presencia de patógenos es más común en quesos elaborados artesanalmente, encontrándose ambos en más del 50% de las muestras analizadas.

La Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1993, Bienes y Servicios. Quesos: Frescos, Madurados y Procesados. Especificaciones Sanitarias, establece límites máximos permitidos para *Staphylococcus aureus* y Coliformes totales, como índices de calidad:

<i>Staphylococcus aureus</i>	<1000 UFC/g muestra
Coliformes totales	<100 UFC/g muestra

Por lo que de acuerdo a la Norma nuestros resultados señalan que en cuanto a coliformes totales solo el 11.54% de los quesos artesanales cumple con el límite establecido, en tanto que el 25% de los quesos industriales cumple con los parámetros establecidos, como se puede apreciar en la figura 23.

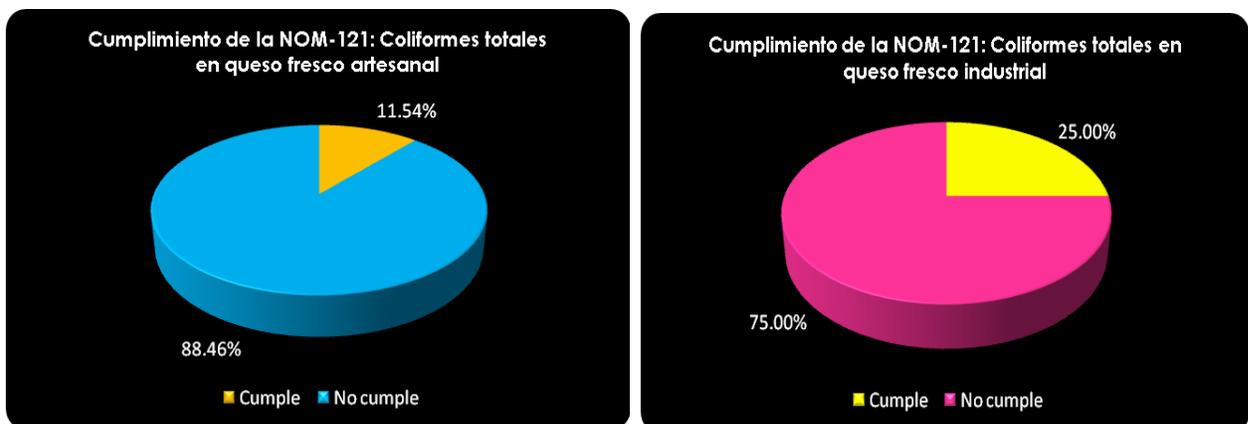


Figura 23. Cumplimiento de la NOM-121-SSA1-1994: Coliformes totales. La minoría de las muestras cumple con la norma correspondiente, tanto en las muestras artesanales como en las industriales; las cuentas son significativamente menores en las muestras industriales (ver tabla 12).

En cuanto a *S. aureus*, el 53.85% de las muestras de quesos artesanales no cumplen con la norma, mientras que, aunque la bacteria se encuentra presente en los quesos industriales, las cuentas no son suficientes para estar fuera de la especificación; esto lo vemos en la figura 24:

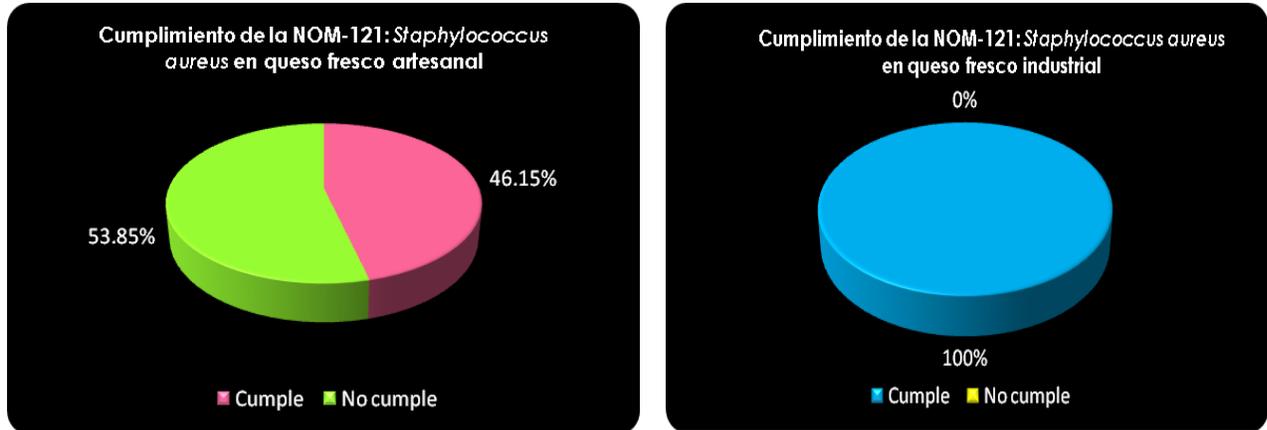


Figura 24. Cumplimiento de la NOM-121-SSA1-1994: *Staphylococcus aureus*. Aunque *S. aureus* se encuentra presente con frecuencia en las muestras, las cuentas no son altas y por lo tanto, la mayoría de los quesos cumplen con las especificaciones establecidas por la norma correspondiente.

Del total de muestras, el 53.33% cumple con la Norma en cuanto a la especificación para *S. aureus* y únicamente el 7%, con aquella establecida para *E. coli*.

Sólo dos muestras (6.67%) cumplen con ambos parámetros de la norma y de forma muy general, se vio que únicamente 5 de las 30 muestras presentaron ausencia de patógenos, siendo considerados como aptos para consumo humano.

Confirmación bioquímica de la identidad de los microorganismos aislados a partir de Placas Petrifilm

En virtud de que los resultados obtenidos señalan que tanto los quesos artesanales como los industrializados tienen altas cuentas de microorganismos potencialmente patógenos haciendo que la mayoría de ellos no cumplieran con la norma correspondiente, se planteó la necesidad de aislar colonias que habían crecido en Placas Petrifilm para llevar a cabo su identificación bioquímica mediante el sistema API, pues este método resulta práctico y muy confiable debido a que lleva a cabo un mayor número de ensayos bioquímicos que aquel sugerido por las técnicas tradicionales.

CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS

Las colonias de *E. coli* que crecieron en las Placas Petrifilm EC se resemebraron en Agar Rojo Violeta Bilis (RVBA), medio de cultivo selectivo para microorganismos del grupo de los coliformes debido a la presencia de sales biliares. A continuación se muestran algunas fotos de los resultados obtenidos:

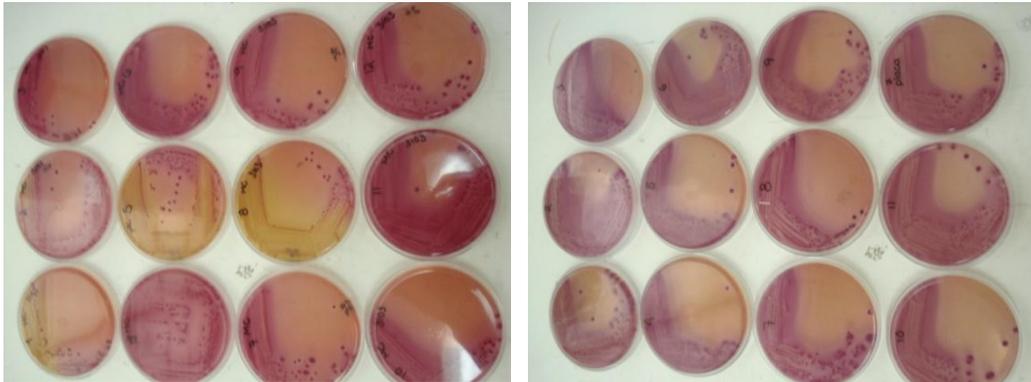


Figura 25. Aislamiento de *E. coli* en Agar Rojo Bilis Violeta (RVBA)

Al aislar las cepas en medios selectivos para coliformes, se encontró que a partir de una misma muestra, crecieron colonias con características morfológicas diferentes, como vemos en la figura 25: unas color rosa/violeta con halo de precipitación alrededor y otras incoloras de aproximadamente el mismo tamaño. Por esta razón se decidió seleccionar al menos 2 colonias diferentes en cada caso donde fuera posible para hacer la identificación de otras especies de enterobacterias presentes en las muestras. Así, se lograron recuperar 20 cepas.

Antes de proceder a la identificación bioquímica de las cepas, se hizo una tinción de Gram a las colonias a estudiar para asegurar la presencia de bacilos cortos Gram negativos, morfología típica de *E. coli*; se comprobó que las 20 cepas aisladas eran bacilos cortos Gram negativo, por lo que se procedió a la identificación bioquímica mediante el sistema API 20E. Los resultados se muestran en la tabla 10:

Tabla 10. Identificación bioquímica de Enterobacterias mediante tiras API 20E

Muestra	% identificación	Bacteria identificada
B	80.5%	<i>Kluyvera spp.</i>
B*	99.1%	<i>Serratia odorífera</i>
F	99.9%	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>
F*	97.1%	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>
G		<i>Klebsiella ornithinolytica</i>
G*		<i>Klebsiella ornithinolytica</i>
H	80.5%	<i>Kluyvera spp</i>
	14.5%	<i>Citrobacter koseri</i>
J	99.9%	<i>Serratia odorífera</i>
J*	99.9%	<i>Serratia odorífera</i>
K	80.5%	<i>Kluyvera spp</i>
	14.5%	<i>Citrobacter koseri/C. farmeri</i>
L	83.9%	<i>Serratia odorífera</i>
	10.9%	<i>Enterobacter sakasakii</i>
L*	96.9%	<i>Enterobacter cloacae</i>
M	66.8%	<i>Serratia liquefaciens</i>
	20.6%	<i>Serratia odorífera</i>
M*	66.8%	<i>Serratia liquefaciens</i>
	20.6%	<i>Serratia odorífera</i>
O	80.5%	<i>Kluyvera spp</i>
	14.5%	<i>Citrobacter koseri</i>
	2.4%	<i>Enterobacter cloacae</i>
O*	84%	<i>Kluyvera spp.</i>
	14.4%	<i>Escherichia coli</i>
Q	80.5%	<i>Kluyvera spp</i>
AA	49.1%	<i>Enterobacter cloacae</i>
	47.7%	<i>Enterobacter sakasakii</i>
BB	98.3%	<i>Kluyvera spp.</i>
BB*	98.3%	<i>Kluyvera spp.</i>

*Muestras con características típicas de *E. coli* en Agar RVBA

En la figura 26 se representan gráficamente los resultados obtenidos mediante el sistema API 20E, mediante el cual se identificaron 5 especies distintas de Enterobacterias:

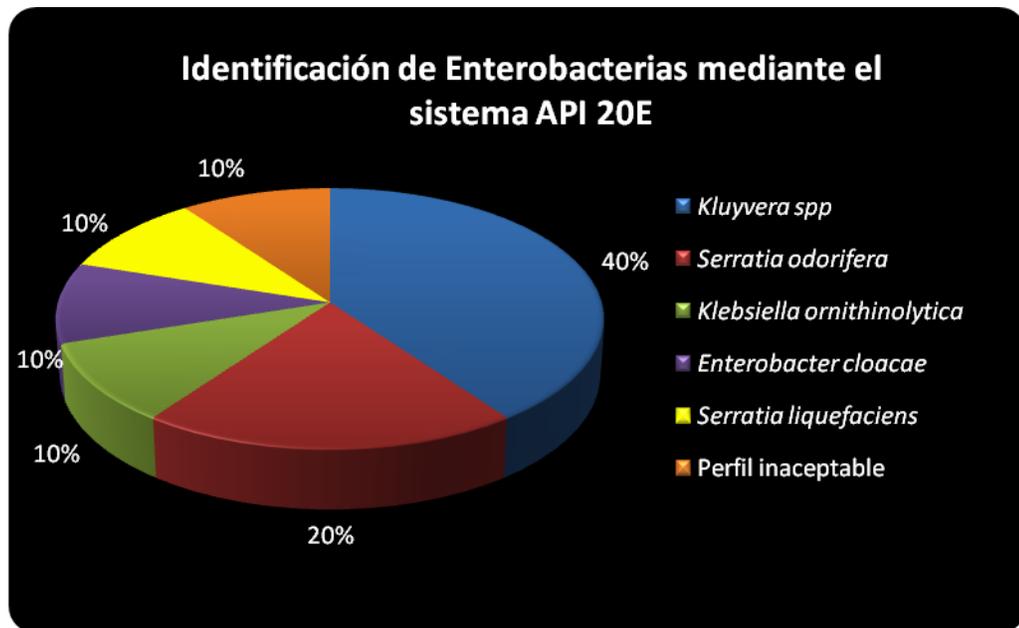


Figura 26. Identificación de Enterobacterias mediante el sistema API 20E. De acuerdo a la gráfica, la mayoría de las cepas aisladas corresponden al género *Kluuyvera*. *Escherichia coli* no se identificó mediante el sistema API 20E, a pesar de que 8 de las cepas presentaron características morfológicas típicas de esta bacteria. No. cepas ensayadas: 20



Figura 27. Sistema API 20E para identificación bioquímica.

Las cepas *S. aureus* seleccionadas de las Placas Petrifilm correspondientes, se resembraron en Agar Manitol Sal, medio de cultivo selectivo para este microorganismo debido a la presencia de manitol como fuente de carbono y al porcentaje de cloruro de

sodio (NaCl) que contiene. *Staphylococcus aureus* crece en MSA como colonias pequeñas a medianas con zonas amarillas alrededor; al adicionar NaCl al 7.5% al medio, se inhibe el crecimiento de otras bacterias.

Después de 48 horas de incubación se observaron dos tipos diferentes de colonias, como observamos en la figura 28: unas de tamaño medio y color amarillo, y otras incoloras de tamaño más pequeño; se eligió una colonia representativa de cada una, con la intención de identificar bioquímicamente todas las especies posibles aisladas a partir de los quesos analizados. Después de las resiembras, se lograron obtener 16 cepas presuntivas de *S. aureus*, a las cuales se les hizo una tinción de Gram para confirmar la presencia de cocos Gram positivos.

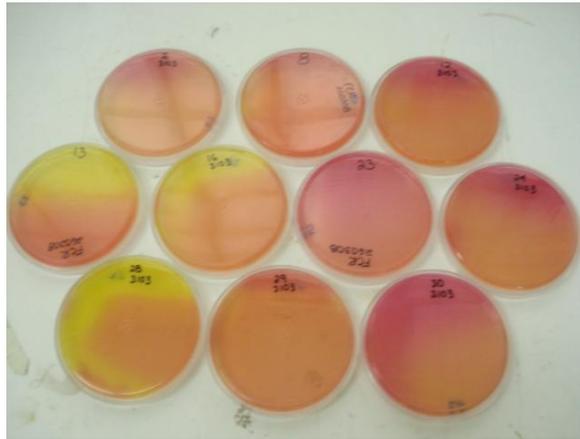


Figura 28. Aislamiento de *Staphylococcus aureus* en Agar Manitol Sal (MSA).

Se comprobó que la mayoría de las cepas (93.75%) se trataba de cocos Gram positivos; se hizo la identificación bioquímica con la galería API Staph, siguiendo las instrucciones del proveedor (ver Metodología); se descartó la muestra donde se encontraron bacilos cortos. Además, cabe mencionar que no fue posible recuperar una de las cepas a pesar de haberse hecho crecer en caldo nutritivo. Estos nos dio un total de 14 cepas a analizar y los resultados fueron los siguientes:

Tabla 11. Identificación bioquímica mediante el sistema API Staph

Muestra	% identificación	Bacteria identificada
B	99.9%	<i>Staphylococcus lentus</i>
H	--	--
L	98.9%	<i>Staphylococcus xylosus</i>
	0.6%	<i>Staphylococcus aureus</i>
L*	98.1%	<i>Staphylococcus xylosus</i>
M	94%	<i>Staphylococcus xylosus</i>
P	99%	<i>Staphylococcus lentus</i>
W	97.4%	<i>Staphylococcus xylosus</i>
W*	98.4%	<i>Staphylococcus lentus</i>
X	56.2%	<i>Staphylococcus xylosus</i>
	19.9%	<i>Staphylococcus sciuri</i>
	11.7%	<i>Staphylococcus cohnii</i>
	9.6%	<i>Staphylococcus hominis</i>
X*	99%	<i>Staphylococcus xylosus</i>
BB	96.1%	<i>Staphylococcus xylosus</i>
CC	70.2%	<i>Staphylococcus aureus</i>
	24.3%	<i>Staphylococcus xylosus</i>
	4.4%	<i>Staphylococcus hominis</i>
	0.7%	<i>Staphylococcus simulans</i>
	0.1%	<i>Staphylococcus chromogenes</i>
CC*	96.1%	<i>Staphylococcus xylosus</i>
DD	81.7%	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
	16.7%	<i>Staphylococcus xylosus</i>

Para comprobar la eficiencia y confiabilidad de las tiras API, se inocularon 2 con cepas conocidas: *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Ambas cepas se identificaron correctamente con un 99.5% de identificación.



Figura 29. Galería API Staph con resultados positivos para *Staphylococcus epidermidis*.

En la siguiente gráfica podemos ver las diferentes especies de *Staphylococcus* identificadas mediante el sistema API Staph:

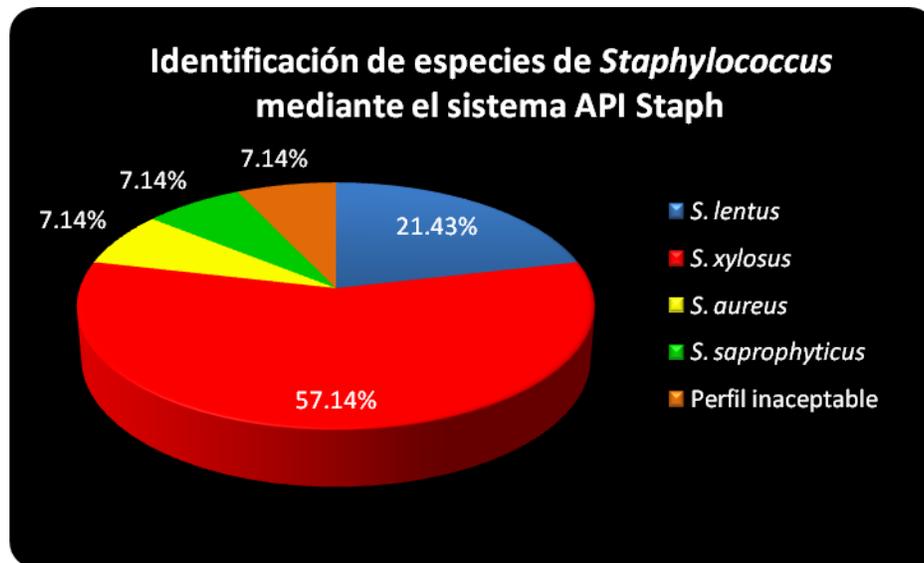


Figura 30. Identificación bioquímica mediante el sistema API Staph. *Staphylococcus xylosus* fue el microorganismo más frecuentemente identificado según el sistema API Staph. *Staphylococcus aureus* se encontró únicamente en el 7.14% de las cepas ensayadas.

Sensibilidad a antimicrobianos

Después de haber identificado bioquímicamente las cepas aisladas se hizo un estudio de sensibilidad a antimicrobianos, mediante sensidiscos Investigación Diagnóstica Multibac I.D., que permite ensayar la resistencia de los microorganismos a 10 diferentes antibióticos, diferentes para cada bacteria dependiendo del Gram.

En el caso de Enterobacterias, los 10 antibióticos evaluados fueron:

AM – Ampicilina

CB – Carbenicilina

CF – Cefalotina

CFX – Cefotaxima

CPF – Ciprofloxacina

CL – Cloranfenicol

NF – Nitrofurantoina

AK – Amikacina

GE – Gentamicina

NET – Netilmicina

NOF - Norfloxacina

STX – Sulfametoxazol/Trimetroprim

Se consideraron cepas multirresistentes aquellas que no mostraron halo de inhibición ante más de 2 antibióticos.

En las siguientes tablas se muestran los halos de inhibición presentes en cada caso, según el género o especie identificada bioquímicamente:

Tabla 12. Sensibilidad de cepas de *Kluyvera spp* aisladas a diversos antimicrobianos

Sensibilidad de <i>Kluyvera spp</i>												
Halos de inhibición (mm)												
Muestra	AM	CB	CF	CFX	CPF	CL	NF	AK	GE	NET	NOF	STX
B	-	1.8	-	2.8	3	1.2	-	3	3	2.8	4	4
H	-	1.6	1.4	3	3	0.4	-	2	1.6	1.5	3.6	3.6
K	-	2.2	1.4	3.4	3.6	1.6	1	2.6	2.2	2.6	3	3.2
O	-	1.8	1.8	3	3	2.6	1.6	1.8	2	2.8	2.6	2.6
O*	-	1.6	2	3.2	3	2.4	1.8	1.4	2.2	3	2.4	2.6
Q	-	-	0.8	2.6	2.6	1.2	0.6	2	2	2.8	2.6	-
BB	-	2.2	2	3	3.2	2	1.4	2.2	2	3.4	4	3.4
BB*	-	2	1.8	3	3	2	1	3	3.6	5	4	3.4
% cepas resistentes	100%	12.5%	12.5%	0%	0%	0%	25%	0%	0%	0%	0%	12.5%

De acuerdo a la tabla, dos cepas de *Kluyvera spp* (B,Q) son multirresistentes; la ampicilina fue el antimicrobiano al que todas las cepas presentaron resistencia.

Tabla 13. Sensibilidad de cepas de *Serratia odorifera* aisladas a diversos antimicrobianos

Sensibilidad de <i>Serratia odorifera</i>												
Halos de inhibición (mm)												
Muestra	AM	CB	CF	CFX	CPF	CL	NF	AK	GE	NET	NOF	STX
B*	-	1.6	-	2.8	2.8	1	-	2.8	3.2	2.4	3.8	4
J	-	2	1.8	2.6	2.8	1	1	1.2	2	3	2	3.2
J*	-	1.2	-	2.6	3	0.6	-	3	2.6	3.4	3.4	2.6
L	-	2	3.6	7.4	8	1.8	2.4	6	6.4	3.8	6	3.8
% cepas resistentes	100%	0%	50%	0%	0%	0%	50%	0%	0%	0%	0%	0%

El 50 % de las cepas de *S. odorifera* aisladas es multirresistente a los mismos tres antimicrobianos: ampicilina, cefalotina y nitrofurantoina. Nuevamente el 100% de las cepas fue resistente a ampicilina.

Las dos cepas de *Serratia liquefaciens* fueron resistentes a ampicilina y cefalotina, patrón muy común entre las enterobacterias aisladas en este estudio.

De las tablas anteriores vemos que, salvo algunos casos, las cepas provenientes de la misma muestra tienen comportamiento similar ante los antibióticos evaluados, a pesar de haber presentado morfología diferente en medios de cultivo selectivos y de haber sido identificadas como cepas diferentes. El 43.75% de las cepas ensayadas resultó multirresistente.

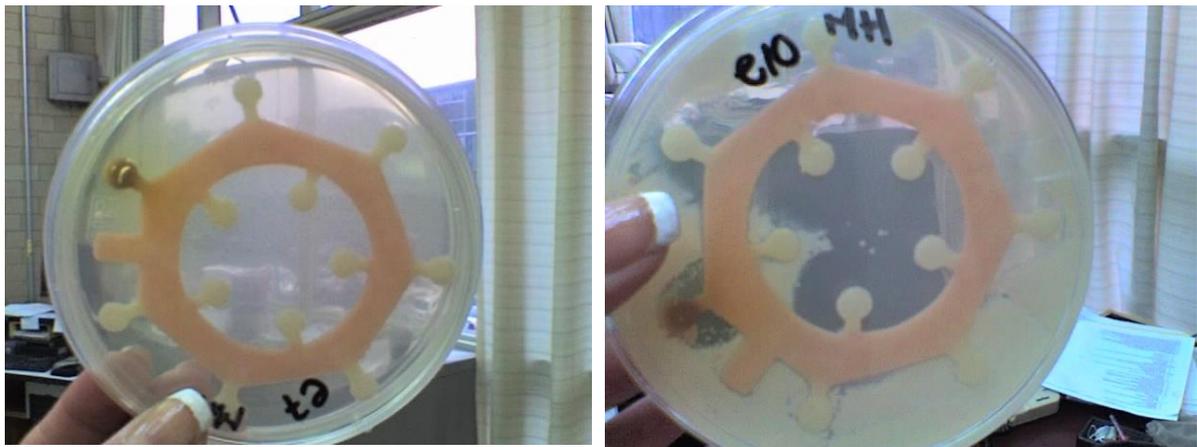


Figura 31. Técnica de difusión en agar y uso de sensibilizadores para la evaluación de sensibilidad de enterobacterias a diferentes antimicrobianos.

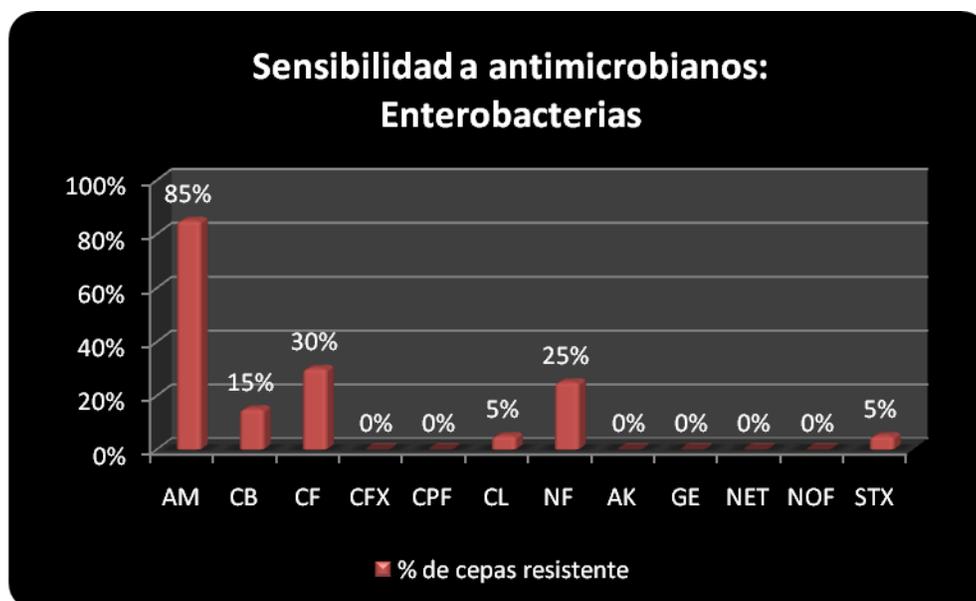


Figura 32. Sensibilidad a antimicrobianos: Enterobacterias. La gran mayoría de las enterobacterias aisladas mostraron resistencia ante la ampicilina (85%), seguida por la cefalotina (30%) y la nitrofurantoína (25%).

De acuerdo a la figura 32, las cepas de Enterobacterias aisladas no presentan resistencia alguna a la mayoría de los antimicrobianos evaluados y el comportamiento de todas las cepas aisladas es muy similar.

Para el caso de *S. aureus*, las condiciones del ensayo de sensibilidad a antimicrobianos fueron iguales que para *E. coli*; tratándose de microorganismos con morfología y gram diferente, los discos contienen algunos antibióticos diferentes:

AM – Ampicilina

CFX – Cefotaxima

CPF – Ciprofloxacina

CLM – Clindamicina

E – Eritromicina

PE – Penicilina

TE – Tetraciclina

CF – Cefalotina

DC – Dicloxacilina

GE – Gentamicina

SXT – Sulfametoxazol/Trimetoprim

VA – Vancomicina

A continuación se encuentran los resultados obtenidos:

Tabla 17. Sensibilidad de cepas de *Staphylococcus lentus* a diferentes antibióticos

Sensibilidad de <i>Staphylococcus lentus</i>												
Halos de inhibición (mm)												
Muestra	AM	CFX	CPF	CLM	E	PE	TE	CF	DC	GE	SXT	VA
B	0.2	2.6	3.6	2.8	4	1.4	4.6	4.4	3	5	5	6
P	0.6	0.4	1.6	2.2	1.6	0.4	3.2	0.8	-	1.4	2.6	2
W*	1	3.4	3.4	1.4	3	0.4	3.2	4	5	4.22	4.2	3.6
% de cepas resistente	0%	0%	0%	0 %	0 %	0%	0 %	0 %	33.33%	0%	0%	0%

Tabla 18. Sensibilidad de cepas de *Staphylococcus xylosus* a diferentes antibióticos

Sensibilidad de <i>Staphylococcus xylosus</i>												
Halos de inhibición (mm)												
Muestra	AM	CFX	CPF	CLM	E	PE	TE	CF	DC	GE	SXT	VA
L	-	-	3	2	3	-	3	2.2	-	1.6	3	1.6
L*	-	-	4	3	3.4	-	4.8	2	0.6	5	6	5
M	-	2.6	4.6	-	-	-	4	3	2	2.6	3.6	3.8
W	-	0.8	3	1.2	3	-	3	2.8	2.8	2.8	2.8	1.6
X	1.4	2	1.2	2.8	3.6	0.4	3.2	4.4	3.2	5	1.4	2.4
X*	-	0.6	3.4	0.6	2.4	-	2.8	3	2.6	2.6	2.8	3
BB	0.6	1.6	4	1.6	2.4	-	4	3.6	3.2	5.2	4.8	5.2
CC*	-	-	3	2.8	3	-	-	2	-	2.6	3	2
% de cepas resistente	75 %	37.5%	0%	12.5%	12.5%	87.5%	12.5%	0%	25%	0%	0%	0%

Tabla 19. Sensibilidad de cepas de *Staphylococcus aureus* a diferentes antibióticos

Sensibilidad de <i>Staphylococcus aureus</i>												
Halos de inhibición (mm)												
Muestra	AM	CFX	CPF	CLM	E	PE	TE	CF	DC	GE	SXT	VA
CC	-	-	3.6	2.4	3.6	-	3.2	-	-	1.2	2.6	2

Tabla 20. Sensibilidad de cepas de *Staphylococcus saprophyticus* a diferentes antibióticos

Sensibilidad de <i>Staphylococcus saprophyticus</i>												
Halos de inhibición (mm)												
Muestra	AM	CFX	CPF	CLM	E	PE	TE	CF	DC	GE	SXT	VA
DD	-	-	3	2	3.6	-	3.8	2	-	1.4	2.4	2.6

De acuerdo con las tablas anteriores, 6 de 14 cepas (42.86%) tienen la característica de ser multirresistentes, entre ellas, la única cepa identificada como *Staphylococcus aureus*.

Vemos que, al igual que sucedió con las Enterobacterias, las cepas provenientes de la misma muestra tienen comportamiento similar ante los antibióticos evaluados, a pesar de haber presentado morfología diferente en medios de cultivo selectivos.

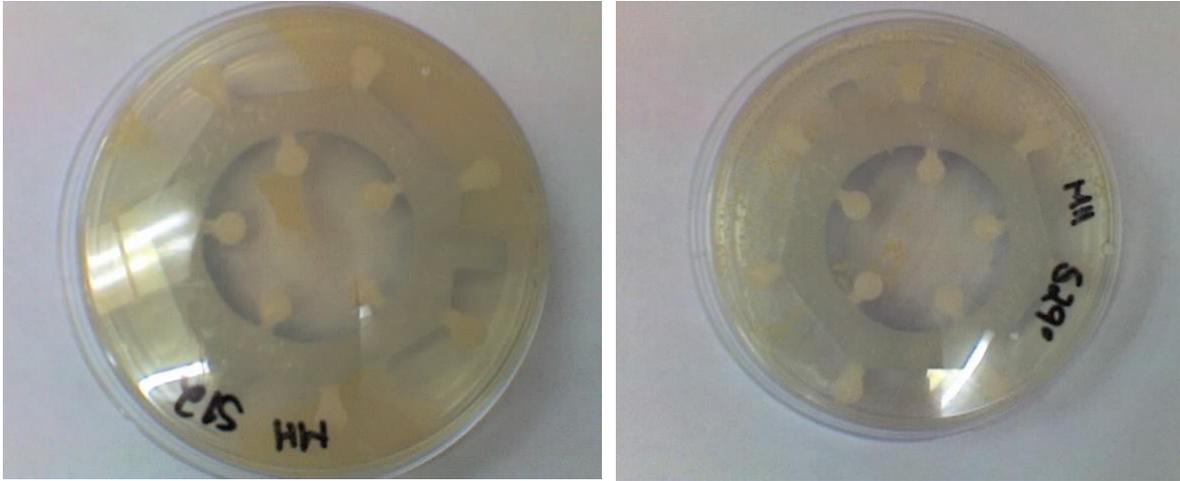


Figura 33. Técnica de difusión en agar y uso de sensibilizadores para la evaluación de sensibilidad de bacterias Gram positivas a diferentes antimicrobianos.

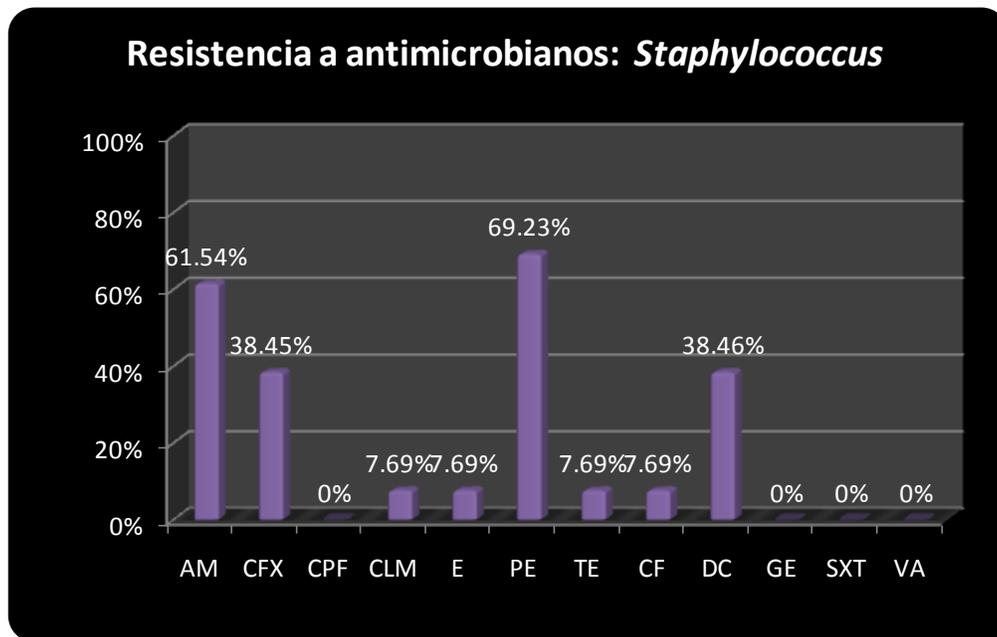


Figura 34. Resistencia a antimicrobianos: *Staphylococcus*. La mayoría de las especies de *Staphylococcus* aisladas (69.23%) mostraron resistencia a penicilina, seguido de ampicilina, cefotaxima y dicloxacilina.

Las cepas de *Staphylococcus* ensayadas no presentan resistencia a 4 de los antimicrobianos presentes en los sensidiscos: ciprofloxacina, gentamicina, sulfametoxazol/trimetoprim y vancomicina. Según la figura 34, para los casos de clindamicina, eritromicina, tetraciclina y cefalotina el porcentaje de resistencia es bajo. Penicilina es el compuesto al que la mayoría de las cepas presentaron resistencia.

VIII.DISCUSIÓN

Dentro del concepto de calidad alimentaria, la inocuidad de los alimentos es uno de los conceptos claves pues con ella se garantiza su seguridad. El enfoque de “*de la granja a la mesa*” se entiende a veces como sólo aplicable a empresas alimentarias o establecimientos gastronómicos, olvidándose a menudo que especialmente en países en desarrollo existen numerosos pequeños productores que obtienen, en el caso del queso, leche de sus propios animales y la utilizan para consumo familiar y para la fabricación de quesos frescos artesanales destinados ya sea a la venta o al consumo, constituyendo así un mercado informal y prácticamente sin controles sanitarios¹¹.

La importancia del análisis microbiológico de los quesos frescos radica en que son productos de corta vida útil en el que los microorganismos se encuentran en condiciones óptimas de crecimiento; así, la importancia del análisis microbiológico de estos productos radica en que gracias a él pueden inferirse diversas cosas:

1. La higiene y controles de calidad seguidos durante el proceso de elaboración
2. La calidad de la materia prima empleada
3. Las condiciones de almacenamiento, distribución y venta del producto
4. El aislamiento e identificación de microorganismos potencialmente patógenos⁴².

Esto tiene un gran impacto en la salud pública por diferentes razones:

- El queso es un alimento ampliamente consumido por la población mexicana, sin importar el nivel socioeconómico al que pertenezca.
- Debido a la condición de “artesanal”, este tipo de productos tiene gran aceptación por la población en general; a la vez, esta característica favorece la contaminación del producto y con ello, la propagación de enfermedades.
- Por su composición y características, el queso es un alimento en el que fácilmente se pueden encontrar todo tipo de microorganismos, incluidos los patógenos.

Al inicio del proyecto se buscó determinar si los quesos artesanales cumplían con la normatividad mexicana correspondiente en cuanto a calidad microbiológica y comparar

estos resultados con los obtenidos a partir de muestras industrializadas. Esto tuvo por objeto determinar la calidad higiénico-sanitaria de los quesos y así evaluar si eran o no aptas para consumo humano. Además, a partir de las condiciones de venta y empaque de los productos, se pudo inferir una serie de factores que favorecen la contaminación de este tipo de productos:

- elaboración artesanal: empleo de leche bronca como materia prima
- pasteurización deficiente o inadecuada
- contaminación post-proceso debido a manipulación, malas condiciones de venta y almacenamiento y empaques inadecuados que no aislen al producto del ambiente.

Lo primero que podría mencionarse respecto a la norma correspondiente es que los productos artesanales analizados no cumplen con los últimos puntos de la norma que se refieren al etiquetado, envase, embalaje, transporte y condiciones en el punto de venta. De forma muy general podemos decir que estos productos carecen de etiqueta, en el punto de venta los encontramos envueltos en hojas de plátano y envasados en bolsas de plástico, materiales que carecen de sanidad y no garantizan la inocuidad del alimento. La exhibición y venta de los quesos analizados no se lleva a cabo en locales con condiciones de higiene y limpieza y tampoco cuentan con equipo de refrigeración por lo que se favorece la reproducción de los microorganismos.

En cuanto a la calidad microbiológica de este tipo de derivados lácteos podemos decir que los quesos, debido a su composición, son muy susceptibles a contaminación microbiana. Además, debido a que su consumo está ampliamente distribuido en todos los sectores de la población, el queso se elabora y vende en las más variadas condiciones, en la gran mayoría de los casos, sin cuidar la higiene.

La NOM 121 no establece parámetro para la cuenta de mesófilos aerobios y sería importante que existiera al tratarse de un grupo de microorganismos indicadores de calidad. Los derivados lácteos que no involucren bacterias en su proceso de elaboración no deberían excluirse de este criterio, pues es importante tener idea de los controles de calidad mediante el conteo de microorganismos indicadores como son los mesófilos aerobios.

Aunque no exista especificación con respecto a este grupo de microorganismos, es importante conocer sus cuentas dentro de los alimentos como los derivados de la leche debido a que los resultados de este análisis permiten verificar la efectividad de los procesos de limpieza y desinfección, determinar si la pasteurización fue realizada adecuadamente, ayudar a determinar el origen de la contaminación si es que hubiera, determinar condiciones óptimas de almacenamiento y transporte y obtener información acerca de su vida útil.

Al comparar las muestras artesanales con las industriales, podemos ver que las cuentas reportadas para mesófilos aerobios son similares. Con este único parámetro no es posible comparar la calidad higiénico-sanitaria de ambos tipos de muestra, pues no es una especificación establecida en la norma.

Por el contrario, el número de coliformes totales sí está regulado pues aunque se sabe que este tipo de microorganismos no siempre son patógenos, están relacionados con la probabilidad de encontrar bacterias que estén asociadas con enfermedades.

De las cuentas de coliformes totales encontradas en las muestras artesanales analizadas se puede inferir que:

1. Hay contaminación de origen fecal, que puede provenir del ambiente, del animal de que se obtuvo la leche o de la persona encargada de la elaboración del alimento.
2. En la elaboración de los quesos frescos analizados, seguramente existieron malas prácticas de sanidad e higiene, tanto en equipos como en el personal.
3. Debido a las altas cuentas presentes en las muestras, existe una alta probabilidad de encontrar patógenos como *Escherichia coli* u otros pertenecientes al grupo de los coliformes.

En el caso de las muestras industriales, comparando con muestras artesanales, se ve que existen cuentas menores de este grupo de microorganismos, lo que indica mayor eficiencia de la pasteurización de la materia prima y mejores controles de calidad en el proceso. Aún así, según los datos reportados en la tabla 12, el 75% de las muestras se encuentra fuera del límite establecido por la NOM-121-SSA1-1994.

Los altos recuentos de ambos grupos bacterianos son una señal clara e inequívoca de la alta ocurrencia de contaminación ambiental y de la manipulación en deficientes condiciones de higiene.

De acuerdo a las condiciones de almacenamiento y venta y a los resultados obtenidos, se puede decir que algunos de los factores que favorecen la contaminación de los quesos son:

- La contaminación inicial de la materia prima, aunada al hecho de que la leche no se pasteurice de forma correcta. En el caso de nuestro análisis, esto se vio claramente reflejado en las cuentas de mesófilos aerobios y coliformes totales, que debieron haber sido menores si la pasteurización se hubiera llevado a cabo o si hubiera sido eficiente. La leche bronca es inherentemente peligrosa y puede contener microorganismos patógenos tales como *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*. Por el peligro que representa, no debe ser consumida bajo ninguna circunstancia, por lo que es necesario que, al ser empleada como materia prima de quesos frescos, sea sometida a una pasteurización eficiente⁴².
- Enfermedades del animal del que provenga la leche. La mastitis es una infección muy común en las vacas y *Staphylococcus aureus* es el responsable de ella. Este pudo ser sin duda, un medio a través del cual este microorganismo haya llegado a las muestras analizadas¹⁷.
- Falta de buenas prácticas de manufactura en el proceso. El personal puede contaminar el producto durante su elaboración si no se tiene la higiene adecuada, además es necesario estar seguros de que no existe suciedad en equipo y materiales¹¹.
- Interrupción de la cadena de frío, que claramente sucedió con las muestras que se analizaron en nuestro caso, pues al menos en el punto de venta, los quesos carecían de refrigeración y por lo tanto, la multiplicación de los microorganismos se vio favorecida, provocando así que se encontraran cuentas más altas a las esperadas. Esto hace más probable la aparición de una toxi-infección al consumirse el producto pues tanto el microorganismo patógeno como la toxina, según sea el caso, podrían estar presentes².
- Mala manipulación, que favorece la aparición de altas cuentas de *Staphylococcus aureus*, pues es una bacteria que se encuentra en la garganta, fosas nasales y piel de las personas, hasta el punto que la casi totalidad de la

población humana podrá ser portadora del microorganismo a lo largo de su vida. Por ello, la probabilidad de contaminar los alimentos es muy alta, no sólo por los manipuladores, también por los clientes al tocar u oler los alimentos².

Al haber muchas formas en las cuales la calidad microbiológica de los quesos puede disminuir, deben tenerse controles de calidad estrictos que garanticen la inocuidad del producto, garantizando el cumplimiento de los parámetros establecidos en la norma correspondiente. Así, llevar a cabo buenas prácticas de manufactura, pasteurizar la leche que se usa como materia prima, cuidar al ganado y conservar la cadena de frío en distribución, almacenamiento y venta del producto son soluciones al problema de contaminación microbiológica de los quesos.

Garcés¹¹ reportó algunas condiciones que favorecen la contaminación de leche y queso artesanal y muchas de ellas podrían ser las mismas que en el caso de nuestras muestras:

- ✓ El ordeño es manual y el material empleado no se sanitiza correctamente.
- ✓ El personal encargado de la fabricación del alimento no se lava las manos antes de iniciar el proceso y no sigue buenas prácticas de manufactura.
- ✓ Se emplean utensilios de madera, cuya limpieza y desinfección no se pueden asegurar por completo debido a la porosidad del material.
- ✓ Pasteurización deficiente de la leche.
- ✓ El empleo de tinajas o recipientes sucios para el procesamiento del queso.
- ✓ No contar con controles adecuados de refrigeración para la conservación de la leche y el producto terminado.
- ✓ Falta de aseo y desinfección del lugar destinado a la producción.

Análisis de estudios epidemiológicos de brotes asociados a quesos frescos han revelado que la mayoría de los brotes de enfermedades asociadas al consumo de estos productos se presenta porque éstos fueron elaborados a partir de leche cruda. Dentro de los agentes biológicos más importantes involucrados están *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*⁴⁸. Por esta razón, por la naturaleza del alimento analizado y por la importancia que tienen en la salud pública de nuestro país, se decidió profundizar más en el análisis microbiológico y llevar a cabo el aislamiento e identificación de *Escherichia coli*, por asociarse a contaminación de materia fecal, y

Staphylococcus aureus, por indicar mala manipulación humana, hablándonos la presencia de ambas bacterias, de falta de buenas prácticas de manufactura y estrictos controles de calidad en el proceso de elaboración. Estos microorganismos son patógenos de importancia de salud pública en nuestro país y fácilmente crecen y sobreviven en quesos debido a su composición, siendo éstos vehículo perfecto para la transmisión de enfermedades. Además, debemos recordar que aunque las células viables son destruidas por el calor, las toxinas que algunas de las cepas de ambas especies producen son termorresistentes y se asocian muy frecuentemente con padecimientos gastrointestinales^{51,52}.

Debido a la importancia que tiene el análisis microbiológico de alimentos, la tecnología en la actualidad ha permitido el desarrollo de métodos de análisis mucho más rápidos, sensibles y específicos que los convencionales. Se conocen como métodos rápidos y formaron parte de nuestro estudio por las ventajas que representan. Por su diseño, que permite la detección de un microorganismo o toxina específicos, los métodos rápidos son ideales para usarse en análisis de control de calidad⁴¹.

Hasta esta parte de nuestro estudio, las placas Petrifilm fueron de gran ayuda, permitiendo mediante reacciones coloridas la identificación rápida y el conteo de los microorganismos en cuestión. Cabe mencionar que la identificación de *E. coli* fue sencilla debido a que crece en las placas EC como colonias de color rosa asociadas a burbujas de gas; sin embargo, el caso de *S. aureus* fue diferente, pues la placa usada para su identificación también permite el crecimiento de otros microorganismos gram positivos como lactobacilos, que dificultan la identificación de la bacteria en cuestión. Por esta razón, fue necesario el uso de Discos Staph Express, lo que alarga más el tiempo de prueba y aumenta los costos.

A pesar de esto, las Placas Petrifilm fueron de gran ayuda en nuestro estudio al permitir grandes ahorros en cuanto a tiempo y recursos. Al evitar la preparación de medios de cultivo y la esterilización de grandes cantidades de material de vidrio se agilizó el proceso de prueba; además, existió un gran ahorro de recursos al no tener que utilizar gran cantidad de medios de cultivo y soluciones para favorecer el crecimiento y facilitar el conteo de los microorganismos en estudio. Además,

permitieron estandarizar el procedimiento, al eliminar la variable que podría proporcionar preparar medios de cultivo.

De acuerdo a los resultados obtenidos de las placas Petrifilm en cuanto a *E. coli* y *S. aureus*, y comparando ambos tipos de muestras, se observa que los quesos industriales no presentan contaminación de origen fecal, al no encontrarse *E. coli* en ellos. Sin embargo, el 50% de las muestras de este tipo presentaron *S. aureus*, lo que nos habla de mala manipulación por parte del personal. Sin embargo, las cuentas encontradas no son suficientes para causar una intoxicación, pues se necesitan al menos 1×10^6 células viables para producir la cantidad de toxina necesaria para ello.

A pesar de las ventajas que esta técnica rápida representa no es posible dar un diagnóstico confiable sobre la presencia de *E. coli* y *S. aureus* sin llevar a cabo pruebas bioquímicas donde se pongan en evidencia características del metabolismo de los microorganismos a identificar. Por la precisión y exactitud que se necesitan para la identificación bioquímica, se eligió el sistema API para llevar a cabo esta etapa del proyecto, pues con ellas es posible decir con exactitud, después de una serie de resiembras, el género y especie de las bacterias aisladas.

Así, después de llevar a cabo la identificación bioquímica de las cepas aisladas, pudimos darnos cuenta de que el método Petrifilm no es 100% confiable y existen varios factores a considerar para poder elegir esta técnica como el método a emplear en análisis microbiológico:

1. Tipo de alimento: Se ha visto que algunos métodos rápidos funcionan mejor en ciertos alimentos que en otros debido a que algunos de sus componentes pueden interferir en el análisis. El queso es un producto que desde su elaboración tiene altas cuentas de microorganismos mesófilos, más aún si las condiciones de almacenamiento no son las indicadas. Esto se traduce en dificultad para el crecimiento de ciertas bacterias que son menos competitivas, como lo vimos en nuestro estudio. Otros componentes del alimento y sus características fisicoquímicas, como el pH, también pueden tener influencia en los resultados, a pesar de que se emplee una solución reguladora de pH para la inoculación de las placas.

2. El microorganismo a identificar, pues en el caso de *S. aureus*, el aislamiento se dificultó por el crecimiento de lactobacilos presentes de forma prácticamente natural en el queso. La placa Staph Express no contiene ningún agente inhibidor de este tipo de microorganismos; además, las bacterias cuentan con poco espacio para crecer, que es ocupado en la gran mayoría de los casos por otras especies de bacterias gram positivas³².
3. El objetivo final del estudio, pues las placas Petrifilm demostraron ser útiles para proveer información rápida y muy general acerca de la calidad microbiológica del alimento en estudio; sin embargo, el aislamiento e identificación bioquímica no se pudieron llevar a cabo con facilidad. Quizá esto se deba a que las placas, por el fundamento que tienen y por los componentes del medio que permiten diferenciar mediante reacciones coloridas a los microorganismos en estudio, no estén diseñadas para llevar a cabo confirmaciones bioquímicas por no considerarse necesario.
4. La disponibilidad de recursos, pues el no utilizar todo el material de Petrifilm disponible para la inoculación de las placas puede aumentar la posibilidad de error en el análisis, disminuyendo así la confiabilidad del método.

Al hacer una serie de resiembras consecutivas en medios selectivos y diferenciales, se buscó aislar y purificar las cepas obtenidas a partir de las placas Petrifilm, para garantizar resultados confiables en la identificación bioquímica mediante tiras API. De esta parte de la metodología se obtuvieron resultados que no se esperaban, pues no se identificó en la gran mayoría de los casos el patógeno esperado; sin embargo fue clara la presencia de microorganismos asociados a enfermedades, algunos comunes, algunos emergentes, pero todos con posibilidad de convertirse en un problema de salud pública. Con esto, se puede decir que la técnica de Petrifilm no es la ideal para el análisis microbiológico de quesos, pues debido a su composición y naturaleza, se dificultan los pasos posteriores de identificación.

De acuerdo con las pruebas bioquímicas realizadas, en el caso de los coliformes se aislaron a partir de las muestras diferentes microorganismos pertenecientes a este grupo, como *Klebsiella* o *Enterobacter*, que aunque no son microorganismos con frecuencia asociados a enfermedades, son considerados emergentes pues ya se tiene registros de brotes de enfermedades relacionadas a ellas. *Klebsiella ornithinolytica* es

una bacteria raramente aislada de humanos, cuyo hábitat son secreciones del aparato respiratorio, heridas y orina principalmente, pero a la cual se han asociado casos de bacteremia en personas adultas. *Enterobacter cloacae* es un microorganismo asociado con infecciones del tracto urinario y en heridas quirúrgicas; es un microorganismo oportunista, pues se ha visto que causa enfermedad en personas con inmunidad suprimida. *Kluyvera* fue la especie aislada con mayor frecuencia a partir de las muestras estudiadas, y aunque no pertenece al grupo de los coliformes, su identificación es importante pues ha sido considerado como un microorganismo comensal de las vías respiratorias altas y del tubo digestivo; en ocasiones, puede tener un papel oportunista y, aunque su relevancia clínica es escasa, se han descrito algunos casos de infecciones urinarias. Las especies del género *Serratia*, identificada en el 30% de los casos, tampoco pertenecen al grupo de los coliformes, sin embargo, se han registrado casos de enfermedades como conjuntivitis e infecciones en heridas, riñones y vías urinarias, así como infecciones respiratorias, meningitis y endocarditis, y al igual que las cepas del género *Enterobacter*, son microorganismos oportunistas; así, debe evitarse al máximo su difusión a través del ambiente, para evitar que se convierta en problema de salud pública con el paso del tiempo.

Las especies de *Staphylococcus* identificadas fueron *S. lentus*, *S. xylosus*, *S. saprophyticus* y el más importante aunque en menor porcentaje, *S. aureus*. Esta última es por mucho la más estudiada debido a que comúnmente se asocia con diversas enfermedades como neumonía, artritis, endocarditis, abscesos, síndrome del shock tóxico y gastroenteritis, entre otras; además, ha adquirido especial importancia su resistencia a una gran diversidad de antimicrobianos, lo que hace más difícil controlarla y combatirla. *S. lentus* es el de menor importancia clínica y por lo tanto, del que se tiene menos registro, pues se ha visto que es poca su difusión en ambientes. Las otras especies de *Staphylococcus* identificadas bioquímicamente son capaces de sobrevivir incluso en condiciones de deshidratación, manteniéndose vivos en el polvo durante largos periodos de tiempo, y causan una importante variedad de enfermedades incluyendo acné, forúnculos, granos, neumonía, entre otras, razón suficiente para controlar y monitorear su presencia en alimentos como el queso²².

Toxiinfecciones y enfermedades de transmisión alimentaria son enfermedades producidas por la ingesta de alimentos contaminados por agentes biológicos

(bacterias, parásitos) o sus toxinas. Estos agentes y toxinas llegan a los alimentos por una inadecuada manipulación o por una mala conservación. Infección se refiere a cualquier situación en la que un microorganismos se está desarrollando y estableciendo en un hospedador, causando o no en él un daño. Infección no es sinónimo de enfermedad porque no siempre conduce a daño en el hospedador. Toxicidad es la capacidad de un microorganismo patógeno de causar daño debido a que secreta toxinas capaces de interaccionar con funciones del hospedador o matar a las células.²²

Las cuatro toxiinfecciones alimentarias más frecuentes son las causadas por *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens*^{8,48,53}, siendo dos de ellos microorganismos objeto de nuestro estudio. Todas ellas producen síntomas de gastroenteritis aguda: malestar general, náuseas, vómitos y diarreas más o menos abundantes con o sin fiebre. Sus diferencias principales radican en su periodo de incubación, duración de los síntomas y la gravedad de ellos. De aquí la importancia la llevar a cabo un procedimiento para determinar la resistencia a antimicrobianos, pues las enfermedades infecciosas se tratan la mayoría de las veces de forma empírica por dificultad de acceso a los estudios microbiológicos o por la lentitud de los mismos. El consumo, uso y/o abuso, de los antibióticos influye en las resistencias, no sólo de las bacterias patógenas, sino también de las saprofitas y oportunistas. En la actualidad el consumo mayor de antibióticos en el hombre y también en los animales con fines terapéuticos o de engorde, hacen imprescindible el conocimiento de su estado de resistencia para aconsejar un tratamiento⁹.

Así, después de todos estos pasos del proceso y ver que se habían identificado con altos porcentajes de confiabilidad distintas bacterias asociadas a enfermedades, se pensó que hacer antibiogramas de las cepas aisladas sería conveniente para determinar la sensibilidad de estos microorganismos a diferentes antibióticos pues aunque no todos representan un riesgo para la población, podrían volverse de importancia pública si logran difundirse entre la población a través de alimentos o el ambiente.

Se decidió emplear la técnica de difusión en agar porque es una técnica muy empleada para determinar la resistencia a antimicrobianos debido a las ventajas que presenta:

es sencilla, no se requiere gran cantidad de material, se pueden evaluar varios antibióticos al mismo tiempo y los resultados se pueden obtener en 24 horas. Gracias a esta técnica, se puede obtener valiosa información acerca de la sensibilidad de una cepa a diferentes antibióticos, resultados que se conocen como antibiogramas que sirven para elegir el mejor medicamento ante una infección bacteriana específica.²²

En cuanto a la técnica hay en particular un aspecto a discutir. Fue necesario someter a las cepas a un proceso de enriquecimiento y acondicionamiento en caldo lactosado, incubándose a 37°C con agitación a 120 rpm durante 24 horas, tiempo después del cual las cepas estuvieron listas para sembrarse de forma masiva en agar. Esto fue necesario debido a que en las múltiples resiembras los microorganismos crecían en forma de colonias muy pequeñas, quizá debido al estrés al que estuvieron sometidas debido al tiempo que pasó entre las múltiples resiembras y las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos, periodo que permanecieron en congelación.

En los resultados podemos ver que las cepas de bacterias, tanto Gram negativas como Gram positivas, resultaron resistentes a los antibióticos más comúnmente utilizados para tratar infecciones. Esto se debe al amplio uso de estos antimicrobianos con y sin autorización de un médico. Hay que tomar en cuenta que también los animales de los cuales proviene la leche han sido medicados contra infecciones por lo que estos tratamientos también contribuyen a la resistencia de las cepas; el uso de antibióticos en ganadería es una práctica de la cual muy comúnmente se abusa y esto contribuye a la resistencia a antimicrobianos encontrada en nuestro estudio.

Aunque no todos los microorganismos aislados resultaron ser *E. coli* o *S. aureus* como se esperaba, es importante conocer los microorganismos presentes en un alimento tan común como es el queso y su resistencia a diversos antibióticos, pues algunos de ellos también podrían ser causantes de enfermedades como por ejemplo especies de los géneros *Klebsilla*, *Serratia* o *Enterobacter*. Si la resistencia a antibióticos sigue aumentando como lo ha hecho hasta ahora, pronto habrá más bacterias consideradas como patógenos asociados a problemas de salud pública.

Se consideró una cepa como multirresistente cuando resultó no ser sensible a 3 o más antibióticos. Así, vemos que el 35% de las cepas de enterobacterias y el 46.15% de

especies de *Staphylococcus* aislados resultaron con esta característica. Las altas cuentas encontradas de estos microorganismos se relacionan con la sensibilidad a antibióticos porque los mercados son lugares de compra muy frecuentes que carecen de buenas condiciones de almacenamiento y venta del producto. Debido a las altas cuentas presentes en el queso, es probable que se haya presentado alguna enfermedad en el consumidor y éste haya sido tratado con los antibióticos más usados para infecciones bacterianas; así la resistencia puede ir aumentando cada vez que una situación así suceda, teniendo en cuenta que la automedicación se trata de una tendencia generalizada entre la población mundial.

En la siguiente tabla se hace una comparación entre la resistencia teórica y la experimental de las cepas de enterobacterias aisladas:

Tabla 21. Resistencia antimicrobiana de Enterobacterias

Microorganismo	Resistencia teórica	Resistencia experimental
<i>Kluyvera spp.</i>		Ampicilina, nitrofurantoína, carbenicilina, cefalotina, sulfametoxazol/trimetoprim
<i>Serratia odorífera</i>		Ampicilina, cefalotina, nitrofurantoína
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	Ampicilina	Ampicilina, cefalotina, cloranfenicol, carbenicilina, nitrofurantoína
<i>Enterobacteri cloacae</i>	Ceftazidima, ceftriaxona	Ampicilina
<i>Serratia liquefaciens</i>	Penicilina, cefalosporinas	Ampicilina, cefalotina

En el caso de estos microorganismos se vio que el antibiótico al que más cepas son resistentes es la ampicilina, seguido de CF y NF. Seis antibióticos (CFX, CPF, AK, GE, NET, NOF, STC) resultaron efectivos contra todas las cepas aisladas para estas bacterias gram negativas.

Moredo⁹ reporta que la ampicilina es un antimicrobiano al que 74% de las cepas estudiadas fueron resistentes, porcentaje cercano al que se reporta en este estudio. Este autor menciona la tetraciclina como el antibiótico al que más cepas de *E. coli* es resistente, por ser el principal antibiótico empleado para tratar enfermedades en animales domésticos, siendo administrado muchas veces sin conocer antes con certeza

la causa de la enfermedad. Sin embargo, no fue posible evaluar mediante la técnica empleada la sensibilidad a este antimicrobiano.

En estudios anteriores se ha visto que las enterobacterias en general han mostrado aumento en la resistencia a gentamicina, ampicilina y ciprofloxacina. De este último fármaco, se sabe que por sus múltiples aplicaciones clínicas y su comprobada eficacia, es bien conocido que se abusa en su prescripción para tratar infecciones en las que pudieran ser utilizadas otras opciones terapéuticas; ello y la habitual automedicación justifica el aumento en la resistencia a este compuesto. En la comparación mostrada en la tabla 24 vemos que la ciprofloxacina es uno de los antibióticos a los que las cepas aisladas mostraron mayor sensibilidad, pues ninguna cepa resultó resistente a este fármaco. Aunque ciertos estudios demuestren que la resistencia de las enterobacterias a este antimicrobiano ha ido en aumento, aquellas aisladas de este tipo de quesos aún pueden ser combatidas con él.

De acuerdo a los resultados (Ver Resistencia a Antimicrobianos) se ve que el 35% de cepas son multirresistentes. La bibliografía reporta que el porcentaje de cepas resistentes de enterobacterias ha aumentado con el paso del tiempo. Por esta razón es importante tomar medidas en cuanto a la utilización indiscriminada de antimicrobianos y debe considerarse la posibilidad de prevenir enfermedades infecciosas que se puedan manifestar debido a fallas en puntos críticos de elaboración y manipulación del producto a través de la mejora en estos puntos y no del abuso de antibióticos. Así, se limitaría la cantidad de microorganismos resistentes y sus posibles consecuencias adversas para la salud pública. Ahora se sabe que para eliminar infecciones causadas por cepas de enterobacterias multirresistentes, lo mejor es administrar una combinación de antimicrobianos potentes que tengan un efecto sinérgico contra la bacteria.

Al evaluar la sensibilidad a antimicrobianos de las diferentes cepas aisladas del género *Staphylococcus*, vimos que los perfiles son parecidos y comparando con la bibliografía tenemos que:

Tabla 22. Resistencia antimicrobiana de *Staphylococcus*

Microorganismo	Resistencia teórica	Resistencia experimental
<i>S. aureus</i>	Penicilina, meticilina, quinolonas, vancomicina, tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprim, cloramfenicol ^{16,23}	Ampicilina, cefotaxima, penicilina, cefalotina, dicloxacilina
<i>S. lentus</i>	Florfenicol, cloramfenicol, ²⁶ tetraciclina ²⁵	Dicloxacilina
<i>S. xylosus</i>		Ampicilina, clindamicina, eritromicina, penicilina, tetraciclina, dicloxacilina
<i>S. saprophyticus</i>	Sulfametoxazol-trimetoprim ²⁴ , meticilina ²⁵	Ampicilina, cefotaxima, penicilina, dicloxacilina

Se reporta⁹ que en el 2005, *S. aureus* resultó ser resistente en primer lugar a la penicilina, antibiótico ampliamente difundido y empleado en todo el mundo. Este resultado es igual al obtenido en este estudio, donde 69.23% de las cepas aisladas resultaron resistentes a este antimicrobiano. También se reporta⁹ que la resistencia observada para los restantes antibióticos supera casi en todos los casos el 30%; sin embargo se vio en este estudio que en algunos casos como gentamicina, sulfametoxazol/trimetoprim, vancomicina y ciprofloxacina, ninguna cepa fue resistente. Esta diferencia puede deberse a que en este caso no sólo estamos hablando de *S. aureus* sino también de otras bacterias de morfología similar, pertenecientes al grupo de los Gram positivos. También debemos tomar en cuenta que las cepas, con el paso del tiempo modifican su resistencia a diferentes antibióticos.

IX. CONCLUSIONES

- ✓ Se encontró *E. coli* en 53% de las muestras. *S. aureus* estuvo presente en 73% de los quesos analizados.
- ✓ Dos de los quesos analizados cumplen con los dos parámetros de la norma correspondiente, tanto para Coliformes como para *S. aureus*. Estos quesos serían recomendables para consumo humano.
- ✓ 53% de las muestras cumple con la especificación de *S. aureus* según la NOM. En el caso de Coliformes totales, sólo el 7% cumple con el parámetro establecido.
- ✓ En las muestras artesanales hubo mayor incidencia de *E. coli* y *S. aureus*. Se piensa que las posibles causas son: materia prima, elaboración, interrupción de la cadena de frío y manipulación.
- ✓ En las muestras industriales no se encontró *E. coli*, pero *S. aureus* estuvo presente en el 50% de los casos.
- ✓ Cinco de los quesos analizados (17%) tuvieron ausencia de los dos patógenos en estudio.
- ✓ Mesófilos Aerobios y Coliformes totales son indicadores de calidad en los procesos de elaboración de productos lácteos como el queso. Altas cuentas generalmente se asocian con presencia de patógenos como *E. coli* y *S. aureus*.
- ✓ Aunque la norma no lo contemple, la identificación de *E. coli* en quesos es importante pues nos indica malas prácticas sanitarias durante el proceso de elaboración y en manipulación del producto terminado. También podría pensarse en una mala calidad de la leche empleada como materia prima.
- ✓ La técnica de Petrifilm 3M, aunque representa un gran ahorro de tiempo y recursos con resultados confiables, no es el método ideal para el análisis microbiológico de quesos debido a su composición y naturaleza de la materia prima.
- ✓ En quesos elaborados artesanalmente, encontramos diferentes microorganismos pertenecientes al grupo de las enterobacterias, como aquellas de los géneros *Kluyvera*, *Enterobacter*, *Kluyvera sp* y *Serratia*. Aunque no deberían estar presentes en el alimento, no son considerados aún problema de salud pública.
- ✓ Especies del género *Staphylococcus* también fueron identificados con alto porcentaje de confiabilidad: *S. aureus*, *S. lentus*, *S. xylosus* y *S. saprophyticus*.

S. aureus es el más conocido por ser responsable de un gran porcentaje de toxiinfecciones asociadas con alimentos.

- ✓ Mediante el sistema API se obtienen resultados confiables al permitir hacer la identificación bioquímica con un gran número de ensayos e interpretando resultados mediante un software exclusivo para este fin.
- ✓ En cuanto a la resistencia a antimicrobianos, el 35% de las cepas de enterobacterias es multirresistente; el 100% de las aisladas fueron resistentes a ciprofloxacina, cefotaxima, amikacina, gentamicina, netilmicina y nofloxacina; mientras que el menor porcentaje de resistencia se presentó ante la ampicilina, siendo únicamente del 5%.
- ✓ Ninguna de las cepas de *Staphylococcus* fue resistente a ciprofloxacina, gentamicina, sulfametoxazol-trimetoprim y vancomicina; el 46.15% de las cepas resultó multirresistente y la mayor resistencia se presentó ante la penicilina, siendo el 69% de los microorganismos resistente a este antimicrobiano.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Adams, Moss; MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS; Edit. Acribia; Zaragoza, España, 1997; págs. 2, 4, 227-239, 258-263.
2. Adoumeru, Joseph; CURRENT MICROBIAL CONCERNS IN THE DAIRY INDUSTRY; Food Safety Magazine, Febrero-Marzo, 2002, 19-22.
3. Amaro Berzunza, Sonia; VALIDACIÓN ESTADÍSTICA DEL MÉTODO PETRIFILM EC PARA DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS COLIFORMES EN LA INDUSTRIA QUESERA; Tesis Licenciatura, Universidad Autónoma de San Luis Potosí; Febrero 2001, págs. 1-4, 14-22.
4. Ansay S.E., Kaspar C.W.; SURVEY OF RETAIL CHEESES, DAIRY PROCESSING ENVIRONMENTS AND RAW MILK OF *Escherichia coli* O157:H7; Letters in Applied Microbiology 1997, 25, 131-134.
5. Araujo V.S., Pagliares V.A., Queiroz M.L.P. and Freitas-Almeida A.C.; OCCURRENCE OF *Staphylococcus* AND ENTEROPATHOGENS IN SOFT CHEESE COMMERCIALIZED IN THE CITY OF RIO DE JANEIRO, BRAZIL; Journal of Applied Microbiology 2002, 92, 1172-1177.
6. Banwart, George; BASIC FOOD MICROBIOLOGY; 2nd. ed.; Avi Books, Van Nostrand Reinhold; New York, USA, 1989; págs. 49-51, 101, 195-219, 278-285, 297-298, 725-738.
7. Bustos-Martínez Jaime; *Staphylococcus aureus*: LA REEMERGENCIA DE UN PATÓGENO EN LA COMUNIDAD; Rev. Biomed 2006; 17:287-305.
8. Código de Prácticas de Higiene para la leche y los Productos Lácteos (CAC/RCP 57-2004); CODEX ALIMENTARIUS
9. Daza Pérez R.M; RESISTENCIA BACTERIANA A ANTIMICROBIANOS: SU IMPORTANCIA EN LA TOMA DE DECISIONES EN LA PRÁCTICA DIARIA; Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud; Vol. 22.N.o 3-1998, 57-67.
10. Doyle, Michael; FOOD MICROBIOLOGY, FUNDAMENTALS AND FRONTIERS; USA; 1997, págs. 101-104.
11. Garcés, et.al.; DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE CRUDA Y DEL QUESILLO ARTESANAL ELABORADO EN UNA COOPERATIVA DE CAMPESINAS EN UNA ZONA DEL CENTRO-SUR DE CHILE; Revista de tecnología e higiene de los alimentos No. 326, 2005. 62-69.

12. Hauschild, Lüthje, Schwarz; STAPHYLOCOCCAL TETRACYCLINE-MLS^B RESISTANCE PLASMID PSTE2 IS THE PRODUCT OF AN RSA-MEDIATED IN VIVO RECOMBINATION; *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2005) 56, 399-402.
13. Higashide et. al.; METHICILIN-RESISTANT *Staphylococcus saprophyticus* ISOLATES CARRYING STAPHYLOCOCCAL CASSETTE CHROMOSOME mec HACE EMERGED IN UROGENITAL TRACT INFECTIONS; *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, June 2008, Vol. 52, No. 6, 2061-2068.
14. Inserto tiras API 20E para Coliformes y *Escherichia coli*.
15. Inserto tiras API Staph para *Staphylococcus aureus*.
16. Jay, James; MICROBIOLOGÍA MODERNA DE LOS ALIMENTOS; 3ª ed.; Edit. Acribia; Zaragoza, España; 1994; págs. 115-126, 670-677.
17. Jones et. Al.; STAPHYLOCOCCUS AUREUS MASTITIS: CAUSE, DETECTION AND CONTROL; Virginia State University; Publication Number 404-229; Marzo 1998.
18. Karlowsky; PREVALENCE OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE AMONG URINARY TRACT PATHOGENS ISOLATED FROM FEMALE OUTPATIENTS ACROSS THE US IN 1999; *Internal Journal of antimicrobial agents*; vol. 18:2, Agosto 2001; 121-127.
19. Kehrenberg, Schwarz; *fexA* A NOVEL *Staphylococcus lentus* GENE ENCODING RESISTANCE TO FLORFENICOL AND CHLORAMPHENICOL; *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*; Feb. 2004, 615-618.
20. Kikvi Et Al.; ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN ESCHERICHIA COLI ISOLATES FROM FAECES AND CARCASS SAMPLES OF SLAUGHTERED CATTLE, SWINE AND CHICKENS IN KENYA; *Israel Journal of Veterinary Medicine*.
21. Lowy, Franklin; ANTIMICROBIAL RESISTANCE: THE EXAMPLE OF *Staphylococcus aureus*; *Journal of Clinical Investigation* 111: 1265-1273 (2003).
22. Madigan, Martinko, Parker; BROCK BIOLOGÍA DE LOS MICROORGANISMOS; 10ª ed.; Pearson Prentice Hall; Madrid, España, 2004; págs. 377, 378, 399, 711-717, 732-740, 803-808, 885, 886.
23. Manual de uso de Placas Petrifilm AC (Mesófilos Aerobios)
24. Manual de uso de Placas Petrifilm EC (*Escherichia coli* y coliformes totales)
25. Manual de uso de Placas Petrifilm Staph (*Staphylococcus aureus*)
26. Mile et. al; ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF *Escherichia coli* ISOLATES FROM BOILER CHICKENS AND HUMANS; *BMC Veterinary Research* 2:7, 2006.

27. Montville, Matthews; FOOD MICROBIOLOGY, AN INTRODUCTION; 1st. ed.; ASM Press; USA, 2005, págs. 53-63; 111-126; 159-172; 175-185.
28. Moredo et al.; RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS DE AISLAMIENTOS DE *Escherichia coli* OBTENIDOS DE CERDOS DE LA REPÚBLICA DE ARGENTINA; Revista Argentina de Microbiología, 2007, 39 (4).
29. NCCLS: Performance International Supplement 24, 2004, 140.
30. Norma Mexicana MNX-F-285-1977. Muestreo y transporte de muestras de alimentos para su análisis.
31. Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
32. Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.
33. Norma Oficial Mexicana NOM-115-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos.
34. Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Quesos: Frescos, Madurados y Procesados. Especificaciones Sanitarias.
35. RECuento DE *Staphylococcus aureus* EN QUESO FRESCO UTILIZANDO LA TÉCNICA CONVENCIONAL Y LA DE PETRIFIL^{MTM}; Manual de uso Petrifil^{mTM}.
36. Rosmini, Signorini, Schneider, Bonazza; EVALUATION OF TWO ALTERNATIVE TECHNIQUES FOR COUNTING MESOPHILIC AEROBIC BACTERIA IN RAY MILK; Food Control 15 (2004) 39-44.
37. Silbernagel Et Al; 3M PETRIFILM STAPH EXPRESS COUNT PLATE METHOD FOR THE ENUMERATION OF *Staphylococcus aureus* IN SELECTED DAIRY FOODS: COLLABORATIVE STUDY; Journal of AOAC International; vol. 86, No. 5, 2003, 963-970.
38. Silbernagel, Lindberg; EVALUATION OF THE 3M PETRIFILM *Enterobacteriaceae* COUNT PLATE METHOD FOR THE ENUMERATION *Enterobacteriaceae* IN FOODS; Journal of Food Protection; Vol. 65, No. 9, 2002; 1452-1456.
39. Soomro, et.al.; ISOLATION OF *ESCHERICHIA COLI* FROM RAW MILK AND MILK PRODUCTS IN RELATION TO PUBLIC HEALTH SOLD UNDER MARKET CONDITIONS AT TANDOJAM; Pakistan Journal of Nutrition 1(3): 151-152, 2002.
40. Torres Aguilar, Arnulfo; CUENTA DE LEVADURAS Y MOHOS EN ALIMENTOS POR LA TÉCNICA EN PLACA PETRIFILM Y LA TÉCNICA CONVENCIONAL DE CULTIVO; Instituto Politécnico Nacional; Octubre 1995; págs. 51-53.

- 41.U.S. Food and Drug Administration; RAPID METHODS FOR DETECTING
FOODBORNE PATHOGENS; Bacteriological Analytical Manual Online; Appendix 1.
- 42.U.S. Food and Drug Administration; TESTIMONY OF JOHN F. SHEEHAN, RAW
MILK IS INHERENTLY DANGEROUS; Division of Plant and Dairy Food Safety;
Marzo 2007.
- 43.Valsangiacomo C., Dolina M., Peduzzi R. and MJaggi M.; ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITY OF *Staphylococcus aureus* ISOLATES FROM HOSPITALIZED
PATIENTS AND DAIRY FOOD (FRESH CHEESE): A SURVEY OVER A DECADE IN
SOUTHERN SWITZERLAND; Clinical Microbiology and Infection, Volume 6
Number 7, July 2000.
- 44.Varela et al.; EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS POR EL
SISTEMA DIRAMIC; Revista Panamericana de Infectología, 2005, 7(4); 28-32.
- 45.Vasavada, Purnendu; RAPID METHODS AND AUTOMATION IN DAIRY
MICROBIOLOGY; Journal of Dairy Science; Vol 76, No. 10, 1993.
- 46.Wehr, Frank; STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF DAIRY
PRODUCTS; 17th ed.; American Public Health Association; USA, 2004; págs. 95,
154, 155, 177, 212-214.
- 47.Biomerieux
www.biomerieux.com
- 48.Énfasis Alimentación On Line; LA PARTICIPACIÓN DE LOS LÁCTEOS EN BROTES
DE ETA: EPIDEMIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR
QUESOS; Septiembre, 2007.
<http://www.alimentacion.enfasis.com/notas/7222-epidemiologia-las-enfermedades-transmitidas-quesos>
- 49.Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura
www.fira.gob.mx
- 50.Food Safety Research Information Office
www.nal.usda.gov/fsrio
- 51.Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook:
Escherichia coli.
http://www.cfsan.fda.gov/*mow/intro.html
- 52.Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook:
Staphylococcus aureus.
http://vm.cfsan.fda.gov/*mow/chap3.html

- 53.Industria Alimenticia: The information source for Latin American food and beverage processors
www.industriaalimenticia.com
- 54.International Food Information Council Foundation.
<http://ific.org/sp>
- 55.Secretaría de Salud
www.salud.gob.mx
- 56.Statement of Dr. Merle Pierson Acting USDA Under Secretary For Food Safety, January 4, 2005.
http://www.fsis.usda.gov/News_&_Events/NR_010405_01/index.asp
- 57.University of Guelph, Ontario, Canada.
www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/micro.html
- 58.U.S. Food and Drug Administration; **FOODBORNE ILLNESS-CAUSING ORGANISMS IN THE U.S. ;** Octubre 2008
<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/sff15bug.html>

Anexo 1. Reactivos, Soluciones diluyentes y Medios de Cultivo

Solución de hidróxido de sodio 1 N ¹

Hidróxido de sodio	4.0 g
Agua	100.0 mL

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

Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada) ¹

Fosfato de sodio monobásico	34.0 g
Agua	1 litro

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 + 1.0°C. Conservar en refrigeración (solución concentrada).

Tomar 1.25 mL de la solución concentrada y llevar a un litro con agua (solución de trabajo). Distribuir en porciones de 99, 90 o 9 mL según se requiera. Esterilizar a 121 + 1°C durante 15 minutos. Después de la esterilización, el pH y volúmenes finales de la solución de trabajo deberán ser iguales a los iniciales.

SIM (Sulphídrico, Indol, Movilidad)

Proveedor: BIOXON

Formula aproximada en gramos por litro de agua destilada

Peptona de caseína	20.0 g
Peptona de carne	6.1 g
Sulfato de hierro y amonio	0.2 g
Tiosulfato de sodio	0.2 g
Agar	3.5 g

pH final del medio listo para usarse: 7.3

Se suspenden 30 gramos del material seco en un litro de agua destilada. Mezcla bien y cuando se obtenga la suspensión uniforme, caliente agitando frecuentemente, hierva durante 1 minuto. Distribuya y esterilice en autoclave a 121°C y 15 libras de presión durante 15 minutos.

Agar Hierro de Kligler

Proveedor: MERCK

Fórmula aproximada en gramos por litro de agua destilada

Extracto de carne	3.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Peptona de caseína	15.0 g
Peptona de carne	5.0 g
Lactosa	10.0 g
D-glucosa	1.0 g
Amonio y hierro (III) Citrato	0.5 g
Sodio cloruro	5.0 g
Sodio tiosulfato	0.5 g
Rojo de fenol	0.024 g
Agar-agar	12.0 g
pH del medio listo para usarse: 7.4 ± 0.1	

Suspender 55 g en un litro de agua recién destilada o desmineralizada, dejar remojar por 15 minutos y hervir hasta completa disolución. Después de vaciarlo en tubos, esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C. Después de esterilizar solidificar en los tubos inclinados de tal forma que se obtenga una superficie de inclinación de 3 cm y un fondo de la misma medida.

Agar MacConkey

Proveedor: MERCK

Fórmula aproximada en gramos por litro de agua destilada

Peptona de caseína	17.0 g
Peptona de carne	34.0 g
Lactosa	10.0 g
Mezcla de sales de bilis	1.5 g
Sodio cloruro	5.0 g
Rojo neutro	0.03 g
Violeta cristal	0.0001 g
Agar agar	13.5 g

pH del medio listo para usarse: 7.1 ± 0.1

Suspender 50 g en un litro de agua recién destilada. Dejar remojar por 15 minutos y hervir con agitación continua hasta completa disolución. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C. El medio se vacía en cajas petri permitiendo que se forme una capa gruesa. Las cajas deben dejarse secar bien antes de usarse.

Citrato de Simmons

Proveedor: BIOXON

Fosfato dihidrogenado de amonio	1.0 g
Fosfato dipotasico	1.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Citrato de sodio	2.0 g
Sulfato de magnesio	0.2 g
Agar	15.0 g
Azul de bromotimol	0.08 g

pH final: 6.9 ± 0.2

Suspender 24.2 gramos de polvo en un litro de agua destilada. Dejar remojar durante 5-10 minutos. Mezclar bien; calentar suavemente agitando frecuentemente hasta que el medio hierva durante 1 minuto. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se deja enfriar en posición inclinada aunque también se puede emplear en placas.

Rojo Violeta Bilis Agar

Proveedor: DIFCO

Extracto de levadura	3.0 g
Peptona	7.0 g
Sales biliares	1.5 g
Lactosa	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar	15.0 g
Rojo neutro	0.03 g
Cristal violeta	0.002 g
pH final:	7.4 ± 0.2

Suspender 41.5 g en un litro de agua destilada y calentar hasta disolver completamente, no hervir durante más de 2 minutos. No autoclavar. Dejar enfriar a 45°C y verter en cajas petri.

Caldo lactosado

Proveedor: BIOXON

Peptona de gelatina	5.0 g
Extracto de carne	3.0 g
Lactosa	5.0 g
pH final:	6.9 ± 0.2

Suspender 13 g de polvo en un litro de agua purificada. Disolver y distribuir en tubos con campana Durham. Esterilizar a 121°C de 12 a 15 minutos.

Medio basal OF

Proveedor: BIOXON

Peptona de caseína	2.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato dipotásico	0.3 g
Agar	2.5 g
Azul de bromotimol	0.03 g
pH final:	7.1 ± 0.2

Disolver 9.8 g de polvo en un litro de agua destilada. Remojar durante 5 minutos; calentar agitando hasta obtener una solución. Se puede añadir los carbohidratos deseados en concentraciones del 1% antes de esterilizar. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 118°C durante 10 min.

Caldo Rojo de Metilo / Voges Proskauer

Proveedor: BIOXON

Peptona de caseína	3.5 g
Peptona de carne	3.5 g
Dextrosa	5.0 g
Fosfato dipotásico	5.0 g
pH final:	6.9 + 0.2

Suspender 17 g de polvo en un litro de agua purificada. Si es necesario calentar ligeramente hasta disolución. Distribuir y esterilizar a 118°C durante 15 minutos.

Manitol Sal Agar

Proveedor: MERCK

Suspender 10.8 g en un litro de agua destilada; dejar remojar por 15 minutos y calentar ligeramente hasta completa disolución. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121°C; vaciar con agitación continua.

Agar recuento en placa estándar (APHA)

Proveedor: OXOID

Extracto de levadura	2.5 g
Digerido pancreático de caseína	5.0 g
Glucosa	1.0 g
Agar	15.0 g
pH: 7.0 + 0.2	

Agregar 23.5 g a un litro de agua destilada. Llevar a ebullición hasta disolución completa. Repartir en recipientes y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

¹ Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Preparación y Dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.