



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Detección e identificación de microorganismos patógenos
en crema de leche de vaca en el municipio de Cuautitlán Edo.
de México**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

PRESENTA

DIANA GUADALUPE SÁNCHEZ PÉREZ

ASESOR

DR. ENRIQUE SALAS TÉLLEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2020



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.

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios por brindarme la oportunidad de concluir esta hermosa etapa de mi vida, la cual me lleno de muchas experiencias y aprendizajes que me han ayudado a luchar por lo que quiero y valorar lo que realmente vale la pena en la vida.

A mi familia por el apoyo que me brindo y que a pesar de las diferencias que tenemos quiero mucho, pero principalmente a mi Madre que siempre me ha enseñado a no dejarme vencer por las adversidades y salir adelante aunque el camino no sea fácil, por su paciencia y comprensión. Por ayudarme a ser quien soy gracias a sus oraciones, noches de desvelo y días de trabajo imparable. Nunca olvides lo mucho que te amo.

A mis amigos que son la familia que escogí, por todos los momentos que compartimos, las risas, las pláticas, las tristezas, los regaños y sobre todo su cariño y apoyo.

A Genaro mi amigo incondicional por estar siempre, en las buenas y en las malas, por escucharme y aguantar mis días complicados, por ser esa persona tan hermosa que nunca me ha dejado sola.

A todas las personas que compartieron un pedacito de su vida conmigo.

Al amor por entrar a mi vida, llenarla de alegría y dibujar una sonrisa en mi corazón, gracias por hacerme tan feliz.

A mi asesora Dra. Alma y mi asesor Dr. Enrique por darme la oportunidad y la confianza aunque no nos conocíamos, gracias por todo su apoyo, enseñanzas y sobre todo su paciencia, porque sin su ayuda no lo hubiera logrado... Muchas gracias!!!

INDICE

	PÁGINA
INDICE DE FIGURAS.....	i
INDICE DE TABLAS.....	ii
INDICE DE GRÁFICAS.....	iii
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
ANTECEDENTES.....	3
1.1 La crema.....	3
1.1.1 Composición.....	3
1.1.2 Proceso de obtención.....	4
1.1.3 Valor nutritivo.....	5
1.1.4 Microbiología de la crema.....	6
1.2 Microorganismos indicadores.....	7
1.2.1 <i>Coliformes totales</i>	8
1.2.2 Mohos y levaduras.....	8
1.2.3 <i>Escherichia coli</i>	10
1.2.4 <i>Salmonella spp</i>	13
1.2.5 <i>Staphylococcus aureus</i>	15
JUSTIFICACIÓN.....	17
OBJETIVOS.....	18
METODOLOGÍA.....	18

RESULTADOS.....	31
ANÁLISIS.....	42
CONCLUSIONES.....	45
REFERENCIAS.....	46
ANEXOS.....	51

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

%	Por ciento
/	Por
+	Positivo
<	Menor
°C	Grados Celcius
BP	Baird Parker
Cad	Caducidad
cm	Centimetros
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Caldo E. coli
Fech Cad	Fecha de caducidad
g	Gramos
Hrs	Horas
LT	Caldo Lauril Triptosa

mg	Miligramos
MKTTn	Caldo de Muller-Kauffmann tetracionato novobiocina
ml	Mililitros
NaCl	Cloruro de sodio
NMP	Número más probable
O/F	Oxidación / Fermentación
pH	Potencial de hidrogeno
ppm	Partes por millón
RVS	Medio de Rappaport-Vassiliadis en soya
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. thypi</i>	<i>Salmonella thypi</i>
seg	Segundos
spp	Especies plurales
β	Beta
SS	Agar Salmonella Shigela
UFC	Unidad formadora de colonias
UHT	Ultrapasqueurizada
VB	Verde Brillante
XLD	Agar Xilosa Lisina Desoxicolato

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de la elaboración de crema de leche.....	5
Figura 2. Método para el aislamiento de <i>Salmonella spp</i>	21
Figura 3. Método para la confirmación de <i>Salmonella spp</i>	22
Figura 4. Método para el aislamiento de <i>Coliformes Fecales</i> y <i>E. coli</i>	24
Figura 5. Método para la confirmación de <i>E. coli</i>	25
Figura 6. Método para el aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	27
Figura 7. Método para la confirmación de <i>Staphylococcus aureus</i>	28
Figura 8. Método para la determinación de Mohos y Levaduras.....	30
Figura 9. Prueba presuntiva para la identificación de Coliformes en caldo lauril triptosa...32	
Figura 10. Prueba confirmativa para Coliformes totales en caldo verde brillante lactosa bilis.....	32
Figura 11. Prueba confirmativa para Coliformes fecales en EC.....	34
Figura 12. Prueba presuntiva para <i>E. coli</i>	35
Figura 13. Colonia presuntiva de <i>Salmonella</i> en Agar Verde Brillante y tinción Gram.....	37
Figura 14. Medio para el aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	38
Figura 15. Prueba de coagulasa en tubo para <i>Staphylococcus aureus</i>	39
Figura 16. Agar papa dextrosa acidificado para la cuenta de mohos y levaduras.....	40
Figura 17. Sistema de microbiología AutoSCAN-4.....	58
Figura 18. Panel MicroScan combo negativo.....	59
Figura 19. Método para la identificación bioquímica de bacterias.....	59

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición media de una crema fresca con un 30% de materia grasa.....	6
Tabla 2. Especificaciones microbiológicas para cremas.....	7
Tabla 3. Pruebas bioquímicas para identificar a <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella</i>	14
Tabla 4. Pruebas bioquímicas para identificar a <i>Staphylococcus aureus</i>	16
Tabla 5. Resultados generales de la cantidad de Coliformes, <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> spp y <i>Staphylococcus aureus</i> presentes en la crema de leche de vaca	31
Tabla 6. Resultados de las pruebas bioquímicas para identificar a <i>E. coli</i>	35
Tabla 7. Resultados de las pruebas bioquímicas para la identificación de <i>Salmonella</i>	37
Tabla 8. Especies de <i>Staphylococcus</i> identificadas en las muestras de cada mercado.....	39
Tabla 9. Características para distinguir <i>S. schleiferi subespecie coagulans</i> de <i>S. aureus</i>	60
Tabla 10. Identificación de <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	60
Tabla 11. Identificación de <i>Staphylococcus sciuri</i>	61

INDICE DE GRAFICAS

Grafica 1. Comparación de conteos de Coliformes totales en crema de leche de vaca de los cuatro mercados.....	33
Grafica 2. Comparación de conteos de <i>Escherichia coli</i> en crema de leche de vaca de los cuatro mercados analizados.....	36
Grafica 3. Comparación de conteos de Mohos en crema de leche de vaca de los cuatro mercados.....	41
Grafica 4. Comparación de conteos de Levaduras en crema de leche de vaca de los cuatro mercados.....	41

RESUMEN

El presente trabajo se enfoco en el estudio microbiológico de la crema de leche de vaca vendida a granel en el municipio de Cuautitlán Edo. De México tomando como base la metodología indicada en la NOM-210-SSA1-2014 y la NOM-111-SSA1-1994 que determina las pruebas microbiológicas para identificación de microorganismos patógenos e indicadores.

Dentro de los microorganismos indicadores cuya presencia sugiere la realización de malas prácticas sanitarias durante la elaboración de alimentos se realizo la cuenta de Coliformes totales, determinación de *Escherichia coli*, cuenta de hongos y levaduras. En el caso de los patógenos se busco identificar *Staphylococcus aureus* y *Salmonella spp.*, ya que son patógenos causantes de enfermedades graves en humanos.

La calidad microbiológica se evaluó de acuerdo a las especificaciones establecidas en la NOM-185-SSA1-2002, Productos y servicios. Mantequilla, cremas, producto lácteo condensado azucarado, productos lácteos fermentados y acidificados, dulces a base de leche. Especificaciones sanitarias.

INTRODUCCION

En México los productos lácteos ocupan los primeros lugares de comercialización, por lo que la industria láctea es la tercera actividad más importante dentro de la rama de la industria de alimentos. En la actualidad se observa un incremento en la concentración de la población, lo que provoca un aumento en la demanda de una variedad de alimentos, entre los que se encuentra la leche y sus derivados (Meléndez, 2016), el abastecimiento de la población depende en gran medida de los sistemas especializados debido a que cuentan con una mejor infraestructura y equipamiento para la producción y en menor medida de los sistemas familiares ya que cuenta con instalaciones rudimentarias. Sin embargo los productos artesanales son muy aceptados entre la población por su tradición y sus características organolépticas (Sánchez, Valdez, Colín, 2016).

La crema es un medio propicio para el crecimiento de microorganismos que causan enfermedades gastrointestinales, el aumento de su consumo ha puesto en manifiesto la importancia de evaluar su calidad sanitaria.

Por su composición puede ser un vehículo de bacterias patógenas para el hombre tales como *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella abortus*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.* además que el pH permite el desarrollo de mohos y levaduras.(Pascual, 2000); su presencia depende de la calidad, del tratamiento térmico de la leche, de la limpieza durante el procesamiento, de la temperatura de almacenamiento, además es importante considerar que es uno de los productos artesanales que podemos encontrar a la venta en vía pública o establecimientos donde las condiciones en las que se expenden no son adecuadas así como el transporte y su distribución son factores importantes que pueden desencadenar un proceso de contaminación tanto por microorganismos iniciadores y/o indicadores(Venegas, Rojas, 2014).

ANTECEDENTES

Durante mucho tiempo, la crema solo se utilizó para elaborar mantequilla, pero a partir del siglo XVII, los cocineros y jefes de cocinas reales y nobles comenzaron a interesarse por ella, así empezó a ser apreciada en la cocina, por su untuosidad y ligereza. Tradicionalmente se recogía la crema que, tras la cocción, se separaba de la leche, pero a finales del siglo XIX (1879), la invención de la desnatadora centrífuga permitió al fin obtener grandes cantidades. (Bonet, Dalmau, 2014). Gustaf Laval, científico sueco invento una centrifugadora capaz de separar fácilmente líquidos mezclados entre sí o partículas sólidas de estos líquidos mediante el control de la temperatura y la velocidad centrífuga. (Castillo, 2002).

A lo largo del siglo XX, la crema se ha ido convirtiendo en el ingrediente básico de algunas cocinas regionales formando parte de muchos de sus platos emblemáticos, la crema simboliza lo mejor de la leche, la excelencia y lo más selecto. (Bonet, Dalmau, 2014).

1.1 La crema

La crema de leche se define como un producto en el cual se ha reunido una fracción determinada de grasa y sólidos no grasos de la leche ya sea por reposo, centrifugación o reconstitución sometida a pasteurización o algún otro tratamiento térmico que asegure su inocuidad. (NOM-185-SSA1-2002)

1.1.1 Composición

La crema está constituida por los mismos componentes de la leche pero en diferentes porcentajes:

- Aproximadamente 50% de agua
- 35% de grasa

- Vitaminas liposolubles (A, D, E y K)
- Caseína, lactosa y otras sustancias. (Early, 2006)

1.1.2 Procesos de obtención

La crema es obtenida por descremado natural (efecto de la fuerza de gravedad) o por centrifugación de leche entera.

Al tener los glóbulos grasos una densidad inferior a la del líquido en el que se encuentran emulsificados, tienden a elevarse hacia la superficie, donde forman una capa llamada crema o nata. Sin embargo la separación es incompleta. Este método separa un máximo de 85% de materia grasa, es un proceso poco eficiente y expuesto a contaminaciones, por lo que no se usa de manera industrial a gran escala, ver figura 1(Luquet, 2005).

El procedimiento más usado en el ámbito industrial es someter la leche al proceso de centrifugado, el cual se basa en la aceleración ocasionada en las partículas cuando se les hace girar a alta velocidad. Como la fuerza centrífuga aumenta cuando más grande es el radio de giro, las centrifugadoras tienden a ser aparatos de diámetro grande, de manera que se separen las partículas pesadas (leche) hacia el exterior con mayor rapidez y las ligeras (crema) se vayan acumulando hacia el centro, ver figura 1.

Como el mismo efecto se logra aumentando la velocidad, las centrifugas funcionan girando muy rápido para reducir las dimensiones del equipo. Este tipo de equipos permiten recuperar hasta el 99.5% de materia grasa contenida en la leche. El contenido de grasa se regula por medio de la válvula de descarga de la crema: mientras más cerrada esté, mayor contenido de grasa tendrá la crema que se extraiga. (Secretaría de comercio y fomento industrial, 2000).

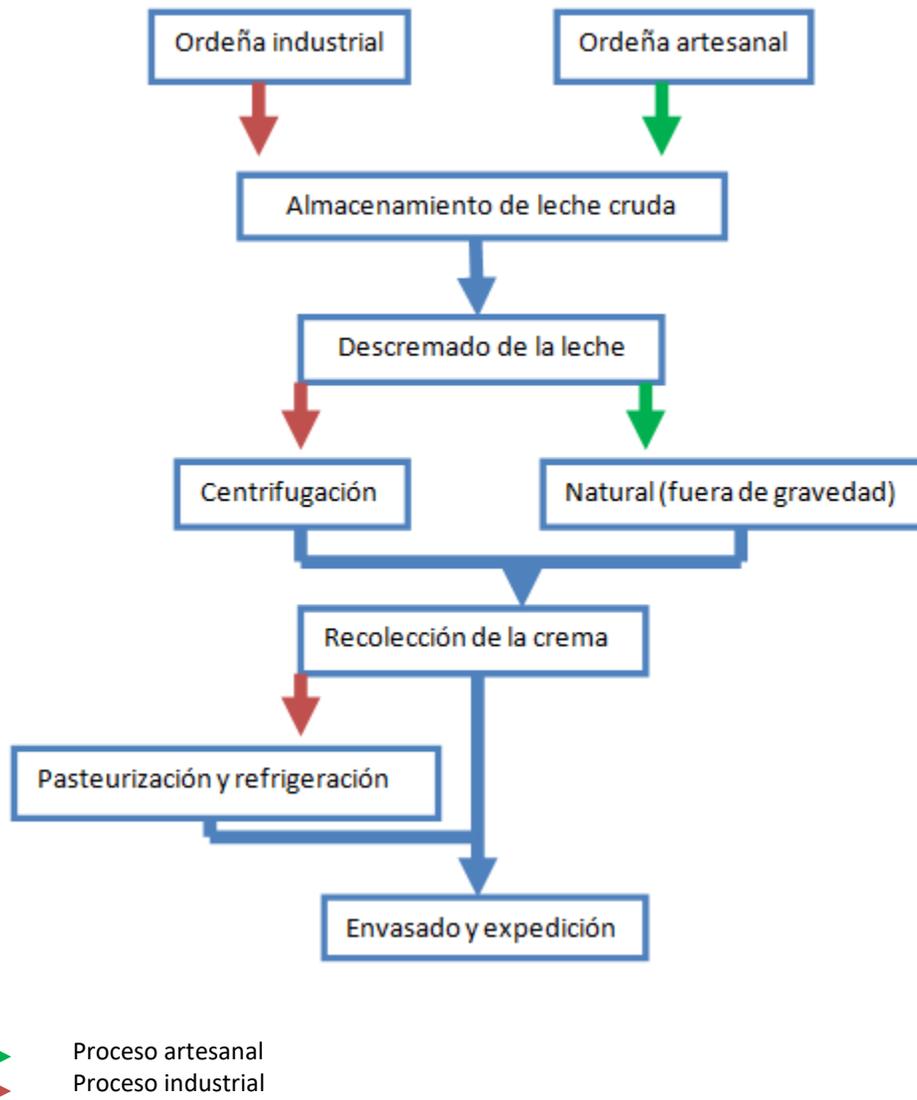


Figura 1. Diagrama de la elaboración de crema de leche

1.1.3 Valor nutritivo

Los nutrientes más importantes que aporta la crema fresca se enlistan en la tabla 1.(Mahaut, 2004).

Tabla 1. Composición media de una crema fresca con un 30% de materia grasa(Mahaut, 2004).

Materia grasa	30%
Lactosa	3.1%
Proteínas	2.3%
Minerales	0.5%
Calcio	90mg/100g
Agua	59%

1.1.4 Microbiología de la crema

La composición de la microbiota de la crema fresca (no procesada) es similar a la de la leche cruda pero la operación de desnatado que se aplica puede conducir a que algunos microorganismos se concentren en la fase grasa, por tanto cabe la posibilidad de que la crema fresca contenga niveles bajos de patógenos.

Debido al elevado contenido de grasa y a su efecto protector en los microorganismos, los tratamientos térmicos que se aplican son normalmente más intensos que los utilizados en la leche líquida.

La calidad de la crema fresca depende de la que tiene la leche a partir de la cual se obtiene y la microbiota es generalmente la misma. (Bravo, 2004)

Normativa

Para distinguir un producto de calidad microbiológica admisible, de uno de calidad inadmisibles, es necesaria la aplicación de los criterios microbiológicos.

Se puede emplear el número o tipo de microorganismos en el producto, para evaluar su calidad y su seguridad microbiológica ó puede evaluarse la presencia de metabolitos como toxinas entre otros. (Bravo, 2004)

La Norma Oficial Mexicana NOM-185-SSA1-2002, Productos y servicios. Mantequilla, cremas, producto lácteo condensado azucarado, productos lácteos fermentados y acidificados, dulce a base de leche. Establece las especificaciones sanitarias que debe cumplir la crema de leche. (NOM-185-SSA1-2002)

En la tabla 2 se indican las especificaciones microbiológicas indicadas en la NOM-185-SSA1-2002 que no deben exceder las cremas, a excepción de los productos lácteos UHT o esterilizados.

Tabla 2. Especificaciones microbiológicas para cremas (NOM-185-SSA1-2002).

ESPECIFICACIONES	LIMITE MAXIMO
<i>Coliformes totales</i>	10 UFC/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 100 UFC/g
<i>Salmonella spp</i>	Ausencia/ 25g

1.2 Microorganismos indicadores

Para conocer las condiciones sanitarias de los alimentos, se han usado organismos indicadores que estiman dos factores: seguridad microbiológica y condiciones de saneamiento durante el procesamiento. Estos microorganismos en alimentos (en determinado número) indican que estos estuvieron expuestos a condiciones que pudieran haber introducido organismos peligrosos y permitido su multiplicación.(Solís, 2012).

Los microorganismos indicadores además son los principales alterantes de los alimentos por ello, además de utilizar a los microorganismos como indicadores de calidad, también sus productos metabólicos pueden ser usados para evaluar y predecir la calidad microbiológica de algunos alimentos. (Solis, 2012)

Los indicadores de calidad más usuales son: *Staphylococcus aureus*, mesófilos aerobios, Coliformes totales, hongos y levaduras.

1.2 .1Coliformes totales

Las bacterias del grupo coliforme se definen como: bacilos cortos, Gram negativos, anaerobios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas. En conjunto, los coliformes están representados por cuatro géneros de la familia *Enterobacteriaceae*: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella*, aunque algunos pueden ser fermentadores tardíos o no fermentadores, como *Citrobacter* y *Serratia*, respectivamente.(ICMSF, 2005)

Son capaces de crecer en sales biliares, que inhiben el crecimiento de las bacterias Gram positivas, el crecimiento de los coliformes se muestra en una escala de pH comprendida entre los valores de 4.4 a 9 . Se ha señalado que se desarrollan a temperaturas tan bajas como -2°C y tan altas como 50°C (Flores, 2014).

La mayoría de los coliformes pueden encontrarse en la flora normal del tracto digestivo del hombre o animales, por lo cual son expulsados especialmente por las heces. Debido a la presencia constante en la materia fecal, los coliformes son el grupo más ampliamente utilizado en la microbiología de alimentos, como indicador de prácticas higiénicas inadecuadas. (ICMSF, 2005).

1.2.2 Mohos y levaduras

Los mohos son organismos eucariontes, carentes de clorofila, que se reproducen sexual y asexualmente, con un cuerpo formado por hifas que en conjunto forman un micelio, se alimentan por absorción y con frecuencia rodeado de paredes celulares que contienen celulosa o quitina, o ambas sustancias. (NOM-111-SSA1-1994)

Los hongos utilizan para su crecimiento una serie de sustancias químicas denominadas metabolitos primarios, como pueden ser ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos mayoritariamente. El uso de estos metabolitos primarios se asocia con la fase de

rápido crecimiento. Los metabolitos secundarios son una serie de compuestos que no son esenciales para el crecimiento vegetativo. Dentro de este grupo tenemos a los antibióticos y a las micotoxinas. Las micotoxinas se suelen formar cuando la fase de crecimiento llega a su etapa final y durante la fase estacionaria, siendo a menudo asociado con la diferenciación y la esporulación. (Soriano, 2007)

Elevados niveles de micotoxinas en la dieta pueden causar efectos adversos agudos y crónicos sobre la salud del hombre. Los efectos adversos pueden afectar a distintos órganos, aparatos o sistemas, especialmente al hígado, riñón, sistema nervioso, endocrino e inmunológico.

El mecanismo de acción de las micotoxinas sobre el sistema inmunitario es diferente, dependiendo del tipo de micotoxina que se trate. La inmunosupresión producida por las micotoxinas se manifiesta como una disminución de los linfocitos T o B, supresión de los anticuerpos, retraso en la actividad de los macrófagos y neutrófilos o disminución de la actividad del complemento. (Soriano, 2007)

Las levaduras son microorganismos cuya forma dominante de crecimiento es unicelular, posee un núcleo y se multiplican de manera sexual o asexual, por gemación o fisión transversal, cuando ocurre la reproducción sexual es por medio de ascosporas en un saco o asca y son aerobias o anaerobias. (Domínguez y Sánchez, 2013)

Están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se pueden encontrar formando parte de la flora normal de un alimento, o como agentes contaminantes en los equipos higienizados de manera incorrecta, provocando el deterioro fisicoquímico de estos, debido a que los mohos y levaduras degradan en su metabolismo los carbohidratos, ácidos orgánicos, proteínas y lípidos, originan mal olor, alteran el sabor y el color en la superficie de los productos contaminados. (NOM-111-SSA1-1994)

1.2.3 *Escherichia coli*

Morfología y estructura

Son bacilos gram negativos, no esporulados, anaerobio facultativo, oxidasa negativo, mótil, termotolerante que fermenta la lactosa, glucosa y sacarosa, produce indol a partir de triptófano y sintetiza B-glucuronidasa. Las pruebas para identificar a *Escherichia coli* se enlistan en la tabla 3.

Existen 700 serotipos (basados en sus antígenos O, H y K). El antígeno O (somático) es un polisacárido termoestable, que forma parte del lipopolisacárido presenta en la membrana externa de la bacteria. El antígeno K corresponde al polisacárido capsular que envuelve a la bacteria. El antígeno H (flagelar). Actualmente se conocen un total de 185 antígenos somáticos, 56 flagelares y 60 capsulares. La combinación específica de los antígenos O y H define el serotipo de una bacteria, en tanto que la identificación del antígeno somático hace referencia al serogrupo de la cepa de *E. coli*.(OMS,2015)

Clasificación

E. coli patógena se puede dividir en seis grupos: enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC).(Franco, Ramírez, Orozco, 2013).

E.coli enterohemorrágica

Puede causar diarrea con sangre, colitis hemorrágica, el síndrome urémico hemolítico y púrpura trombocitopénica.

Las cepas causantes de estos cuadros tienen la capacidad de elaborar una o más citotoxinas. Las citotoxinas que elabora el grupo EHEC originalmente se nombraron verotoxinas (VT), por el efecto citotóxico que causaban sobre cultivos de células Vero (línea celular de riñón de mono).

Otra propiedad de virulencia observada en este grupo de microorganismos es la lesión celular "Adherencia y Esfacelamiento" (A/E). En este evento participan tanto genes

cromosomales como plasmídicos que inducen y/o regulan la expresión de factores de virulencia de la bacteria. (Molina, 2015)

E.coli enteroinvasiva

Las cepas EIEC se internalizan y reproducen dentro del citoplasma de las células epiteliales, a las que destruyen. También penetran a los macrófagos. Estas cepas pertenecen a un grupo reducido de serotipos que se parecen bioquímica y antigénicamente al género *Shigella*. Diversos estudios han concluido que además de genes cromosómicos involucrados en la virulencia, EIEC porta un plásmido de 140 megadaltones (mDa) indispensable para conferir el fenotipo invasivo a estos microorganismos. (Molina, 2015)

E.coli enteropatógena

Se considera una de las principales etiologías de diarrea infantil en países en desarrollo. Entre los factores de virulencia que portan cepas EPEC se encuentra la adherencia a células intestinales dicha adherencia está codificada en un plásmido de 60 mDa, llamado factor adherente EPEC (EAF). También cuenta con genes cromosomales nombrados A y B que operan en combinación con los genes plasmídicos y dan lugar a una proteína de 94 kDa (intimina) asociada a la producción de la lesión de adherencia íntima y esfacelamiento. Esta adherencia íntima de cepas EPEC produce cambios en el citoesqueleto de la célula del hospedero, con proliferación de filamentos de actina por debajo del sitio de pegamiento de las bacterias. Estas cepas tienen genes cromosomales que codifican para una proteína que recibió el nombre de tir, la cual se transfiere a la membrana de la célula hospedera y le sirve como receptor que es reconocido por EPEC. (Molina, 2015)

E.coli enterotoxigénica

EPEC se caracteriza por incluir cepas que elaboran enterotoxinas ya sea termoestable (ST) y/o termolábil (LT). El cuadro clínico que inducen estas bacterias es similar al que se observa en el caso del cólera, presentándose de 8 a 12 evacuaciones al día por un periodo

de cuatro a cinco días. Las cepas ETEC son una causa importante de diarrea en niños menores de cinco años de edad y una de las causas más frecuentes de diarrea del viajero. (Molina, 2015)

E.coli enteroagregativa.

Esta categoría (EAEC) es heterogénea, se asocia con casos de diarrea aguda o persistente en niños y adultos a nivel mundial.

Las cepas EAEC derivan su nombre por la forma de adherencia que presentan en células HEp-2 en cultivo. Esta adherencia se caracteriza por la formación de agregados bacterianos, con apariencia de ladrillos apilados ("stacked brick"), observados tanto sobre las células como en la superficie del vidrio de la preparación en biocapa. (OMS, 2015)

E. coli habita normalmente en el intestino del hombre y animales. Vive en el colon sin provocar trastornos aparentes; sin embargo hay cepas que producen una poderosa toxina que puede causar una infección grave. Es importante como indicador biológico de contaminación fecal en abastecimientos de agua y alimentos, porque abunda en heces, persiste en medios externos y es fácil de descubrir.(Hernández, 2016).

E. coli de adherencia difusa

Las cepas de *E.coli* de adherencia difusa, no forman microcolonias cuando se adhieren a las células Hep-2. Se ha caracterizado una fimbria de superficie, conocida como F1845, involucrada en el fenómeno de adherencia difusa, los genes que codifican para esta fimbria se pueden encontrar en el cromosoma o en un plásmido. In vitro las cepas DAEC tienen la capacidad de inducir la formación de estructuras protuberantes, semejantes a dedos, las cuales confieren protección a las bacterias. (Rodríguez, 2002).

El grupo DAEC se puede aislar tanto de personas sanas como en personas con diarrea, siendo más importante en niños de 4 a 5 años. Los principales síntomas que se presentan son diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos. (Rodríguez, 2002).

1.2.4 *Salmonella* spp

Morfología y estructura

El género *Salmonella* son bacilos Gram negativo, aerobio o anaerobio facultativo, oxidasa negativo no esporulado, generalmente lactosa negativa, móvil, fermenta la glucosa generando ácido y gas, crece en citrato como única fuente de energía, descarboxilan la lisina y la ornitina, suelen producir sulfuro de hidrogeno, urea negativa, presenta un pH de crecimiento óptimo entre 4 y 8, no fermentan lactosa ni sacarosa.(OPS, 2015) Las pruebas para identificar al género *Salmonella* se enlistan en la tabla 3.

De acuerdo con la presencia de los antígenos somáticos (O), que son componentes lipopolisacáridos de la pared celular, polisacárido capsular (Vi) y antígenos flagelares (H), que son proteínas, pueden actualmente serotiparse en más de 2300 serovariedades. Las especies de mayor importancia son *Salmonella typhi*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium* y *Salmonella enteritidis*. *S. typhi* posee un antígeno capsular polisacárido, llamado Vi en la superficie celular que puede bloquear la fagocitosis.(Jurado, Arenas, 2010)

Se definen como bacterias ubicuas poseyendo como principal reservorio el intestino de los animales,también pueden llegar a cursos de agua donde mantienen su viabilidad y su capacidad infectiva durante varias semanas en el agua y alimentos,incluso durante años en el suelo. Los únicos reservorios de infección por *Salmonella typhi* son los seres humanos, portadores convalecientes y portadores crónicos. (Parrilla, 2017)

Mecanismos de transmisión

Las heces de portadores asintomáticos o de personas con enfermedad subclínica no detectada constituyen la fuente más importante de contaminación. Las principales malas prácticas durante la elaboración de los alimentos que originan brotes por salmonelas son: inadecuado conocimiento, uso de ingredientes crudos contaminados y contaminación cruzada.(Andrews, Flowers, Silliker, Bailey, 2001)

La temperatura mínima de crecimiento es importante en los alimentos refrigerados, el ritmo del crecimiento de la mayoría de las salmonellas esta inhibido a temperaturas <7°C. El almacenamiento de los alimentos perecederos a temperaturas por debajo de la mínima de crecimiento es esencial para su inocuidad, la tasa de muerte aumenta a medida que aumenta la temperatura, por lo que la temperatura máxima de crecimiento 49.5°C es importante como valor por encima del cual deben ser mantenidos los alimentos almacenados calientes para impedir el crecimiento de *Salmonella* (ICMSF, 2016).

La fiebre tifoidea es una enfermedad febril aguda de origen entérico producida por *Salmonella typhi*. En raras ocasiones *Salmonella paratyphi A*, *paratyphi B* y *Salmonella paratyphica C* pueden producir un cuadro clínico similar, aunque de menor gravedad. La *Salmonella* causa también salmonelosis no tifoideas, son cualquier infección producida por salmonellas distintas a *S. typhi*. El cuadro clínico más frecuente es la gastroenteritis aguda. (Jurado, Arenas, 2010)

Tabla 3. Pruebas bioquímicas para identificar a *Escherichia coli* y *Salmonella*.(Ordoñez, 2014)

Prueba	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i>
KIA	A/A	K/A
Gas	+	+
H₂S	-	+
Rojo de metilo	+	+
Voges-Proskauer	-	-
Indol	+	-
Citrato	-	+
Fenilalanina	-	-
Urea	-	-
Movilidad	+	+
Lisina	+	+
Arginina	-/+	+/-
Ornitina	+/-	+

KIA: agar de hierro kligler, H₂S: ácido sulfhídrico.

1.2.5 *Staphylococcus aureus*

Morfología y estructura

Los *Staphylococcus* son Gram positivo, forma de coco, anaerobio facultativo, no esporulado, inmóvil, catalasa positiva, son capaces de desarrollarse a altas concentraciones de NaCl, coagulasa positiva, producción de desoxirribonucleasa termoestable. Aparecen aislados, en pares, en cadenas cortas y tienen una fuerte tendencia a formar grupos. Algunas cepas de *S. aureus* poseen cápsulas que inhiben la fagocitosis por los neutrofilos, a menos que se encuentren opsonizados por anticuerpos específicos. (NOM-115-SSA1-1994) Las pruebas para identificar y diferenciar a *Staphylococcus aureus* se muestran en la tabla 4.

La mayoría de los seres humanos son portadores sanos de gran número de *Staphylococcus* y microbios relacionados en la flora normal de la piel y mucosas de las vías respiratorias. *S. aureus* posee un alto grado de patogenicidad, produce lesiones superficiales de la piel, causa infecciones del sistema nervioso central, neumonía, infecciones del tracto urinario y es la principal causa de infecciones nosocomiales, síndrome de shock tóxico, septicemia, impétigo y fiebres. (Bustos, Hamdan, 2006).

La enfermedad alimentaria por estafilococos no es una infección, sino una intoxicación que resulta de la ingestión de alimentos contaminados por toxina preformada. El origen de la contaminación suele ser la manipulación de los alimentos por un individuo portador de *S. aureus*. Los gérmenes crecen con rapidez, incluso a temperaturas de la habitación y se pueden acumular concentraciones peligrosas de enterotoxina en los alimentos en unas pocas horas. Como las toxinas son muy termoresistentes, el calor no hace que los productos que contienen enterotoxina sean seguros para el consumo. (Valenzuela, 2015).

Los síntomas más frecuentes de la intoxicación son dolores abdominales y vómitos, también son comunes las náuseas y la diarrea, mas el proceso no cursa con fiebre, los individuos más susceptibles son los niños y los ancianos. (Bustos, Hamdan, 2006).

Tabla 4. Pruebas bioquímicas para identificar a *Staphylococcus aureus*(NOM-210-SSA1-2014)

Características	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>Micrococcus</i>
Actividad de catalasa	+	+	+
Producción de coagulasa	+	-	-
Producción de termonucleasa	+	-	-
Utilización anaeróbica de: Glucosa	+	+	-
Utilización anaeróbica de: Manitol	+	-	-

^a +, La mayoría de las cepas son positivas (más del 90%), La mayoría de las cepas son negativas (más del 90 %)

JUSTIFICACION

La leche cruda y los productos lácteos proporcionan una gran cantidad de beneficios nutricionales. Sin embargo pueden albergar microorganismos peligrosos que pueden representar serios riesgos de salud. De acuerdo al Centro para el Control y Prevención de Enfermedades se han registrado brotes vinculados a productos lácteos crudos. Causaron 1909 enfermedades y 144 hospitalizaciones. (Food & Drug, 2012)

En México se han reportado que los alimentos potencialmente dañinos son aquellos con alto contenido proteico, baja acidez y alta humedad tales como carnes, marisco y lácteos. (Venegas, Rojas, 2014) Consumir alimentos contaminados, principalmente con materia fecal, provoca enfermedades gastrointestinales; las infecciones agudas del tracto gastrointestinal figuran entre las enfermedades infecciosas más frecuentes. De acuerdo con las estadísticas del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), las infecciones como gastroenteritis, salmonelosis, tifoidea y cólera representan un severo problema de salud pública para nuestro país. (Hernández, Aguilera, 2011).

Las enfermedades pueden presentarse en cualquier época del año, pero el riesgo de sufrirlas se incrementa en época de calor. Las manifestaciones más frecuentes son fiebre, vómito, dolor abdominal y diarrea moderada o intensa. De acuerdo a los reportes emitidos en el Boletín Epidemiológico, en el Estado de México, en el año 2010 se registraron 4,923,459 casos de infecciones intestinales, en el año 2015 se reportaron un total de 1705 casos de salmonelosis y 1020 casos con alguna intoxicación alimentaria bacteriana. (Boletín Epidemiológico, 2016) Sin embargo, no existen reportes específicos de que estos casos hayan sido ocasionados por el consumo de crema, si no de productos lácteos.

Por lo anterior el interés del proyecto fue identificar el grado de contaminación de Coliformes totales, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, mohos y levaduras en la crema de leche de vaca vendida a granel para evaluar su calidad sanitaria y así asegurar la salud de los consumidores.

OBJETIVO

Detectar la presencia de bacterias patógenas en la crema de leche de vaca vendida a granel en el municipio de Cuautitlán Edo. de México, por medio de su aislamiento e identificación microbiológica, para evaluar su calidad sanitaria.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Aplicar los lineamientos indicados en la NOM-210-SSA1-2014 para realizar el aislamiento y caracterización microbiológica (*Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, *coliformes totales* y *E. coli*) en la crema elaborada con leche de vaca y evaluar su calidad sanitaria.
- 2) Determinar si la crema cumple con las especificaciones sanitarias establecidas en la NOM-185-SSA1-2002.
- 3) Mediante la metodología establecida en la NOM-111-SSA1-1994 determinar la cantidad de mohos y levaduras en la crema.

METODOLOGIA

Lugar de trabajo

La metodología del presente trabajo se llevo a cabo en las instalaciones del laboratorio 17 en la UIM de la Facultad de Estudios Superiores CuautitlánCampo 4, UNAM.

Muestras y cepas

Las muestras analizadas fueron obtenidas de 4 mercados municipales diferentes ubicados en el área de Cuautitlán Edo. de México, mientras que las cepas control empleadas para las diferentes pruebas bioquímicas primarias y secundarias las proporciono el laboratorio.

Muestreo

Se identificaron 3 establecimientos por mercado municipal, de los cuales fueron obtenidos semanalmente 1 muestra de crema de leche de vaca vendida a granel; así en total se procesaron 12 muestras.

Las cremas fueron identificadas inmediatamente después de ser compradas con los siguientes datos: fecha, lugar, temperatura de la muestra y las condiciones sanitarias en las que se encontraban. Fueron transportadas en una hielera con refrigerantes hacia el laboratorio 17 de la UIM FESC, donde se refrigeraron hasta la realización de pruebas.

Para la toma de muestra se siguió lo indicado en la NOM-109-SSA1-1994, se llevo a cabo el lavado de manos, la utilización de bata, cubrebocas y guantes para no tener contacto directo con la crema y evitar alguna posible contaminación. El material utilizado para cada una de las determinaciones microbiológicas fue previamente lavado y esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Aislamiento e identificación microbiológica

Para la determinación de *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, *Coliformes fecales* y *Escherichia coli* en las 12 muestras analizadas se utilizo el material y métodos descritos en los apéndices específicos para cada microorganismo en la NOM-210-SSA1-2014, los cuales son: Apéndice normativo A. Método de referencia para el aislamiento de *Salmonella spp*, Apéndice Normativo H. Método para la estimación de la densidad de *Coliformes Fecales* y *E. coli* por la técnica del número más probable presentes en las muestras de alimentos para consumo humano y agua, Apéndice Normativo B. Método de referencia para la estimación de la cuenta de *Staphylococcus aureus*.

Todas las muestras fueron sometidas a un pre-enriquecimiento para recuperar las células estresadas o dañadas, un enriquecimiento selectivo para su aislamiento, finalizando con pruebas bioquímicas primarias y secundarias para la identificación microbiológica.

Para el análisis de las muestras se requirió preparar una suspensión inicial con 25 gramos de crema de leche en 225ml de agua peptonada amortiguada o solución reguladora de fosfatos en condiciones de esterilidad, para obtener una dilución 1:10 como lo indica la NOM-210-SSA1-2014, dejándola incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $18\text{h} \pm 2\text{h}$.

Como lo indica el Apéndice Normativo A. Método de referencia para el aislamiento de *Salmonella spp.* se procedió a transferir 0.1ml del cultivo de pre-enriquecimiento (suspensión inicial) a un tubo de 10ml de caldo RVS y 1ml a un tubo con 10ml de caldo MKTTn como se muestra en la figura 2, incubar el caldo RVS a $41.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24\text{h} \pm 3\text{h}$ y el caldo MKTTn a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24\text{h} \pm 3\text{h}$.

Para el aislamiento se inoculo a partir del cultivo en RVS Y MKTTn tres medios en placa; agar XLD, Verde Brillante y Salmonella Shigella, se incubaron a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{h} \pm 3\text{h}$. la morfología colonial típica de *Salmonella* en cada medio es la siguiente.

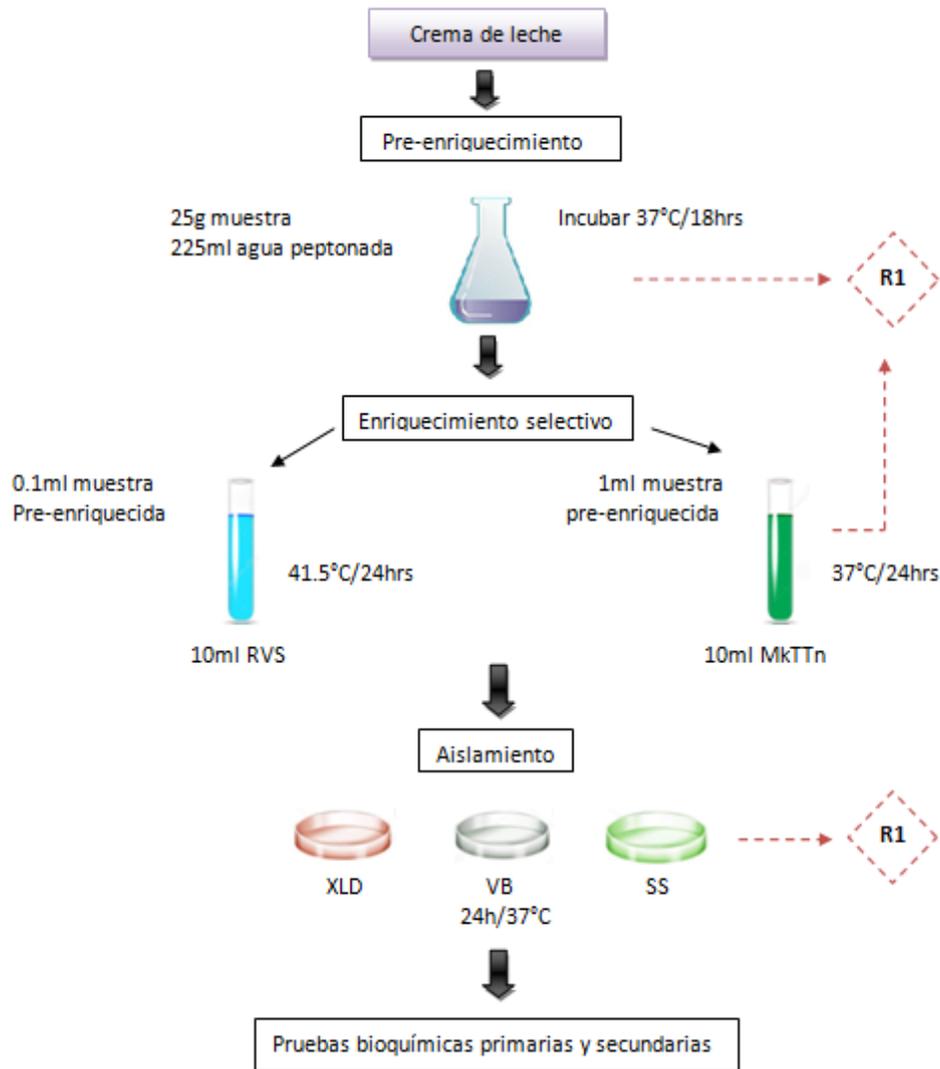
Agar XLD: colonias rosas con o sin centro negro, muchos cultivos de *Salmonella* pueden producir colonias con un centro negro muy grande o completamente negras.

Agar Salmonella-Shigella: colonias incoloras generalmente con centro negro.

Agar Verde Brillante: colonias rosas, blancas o transparentes con fondo rojo.

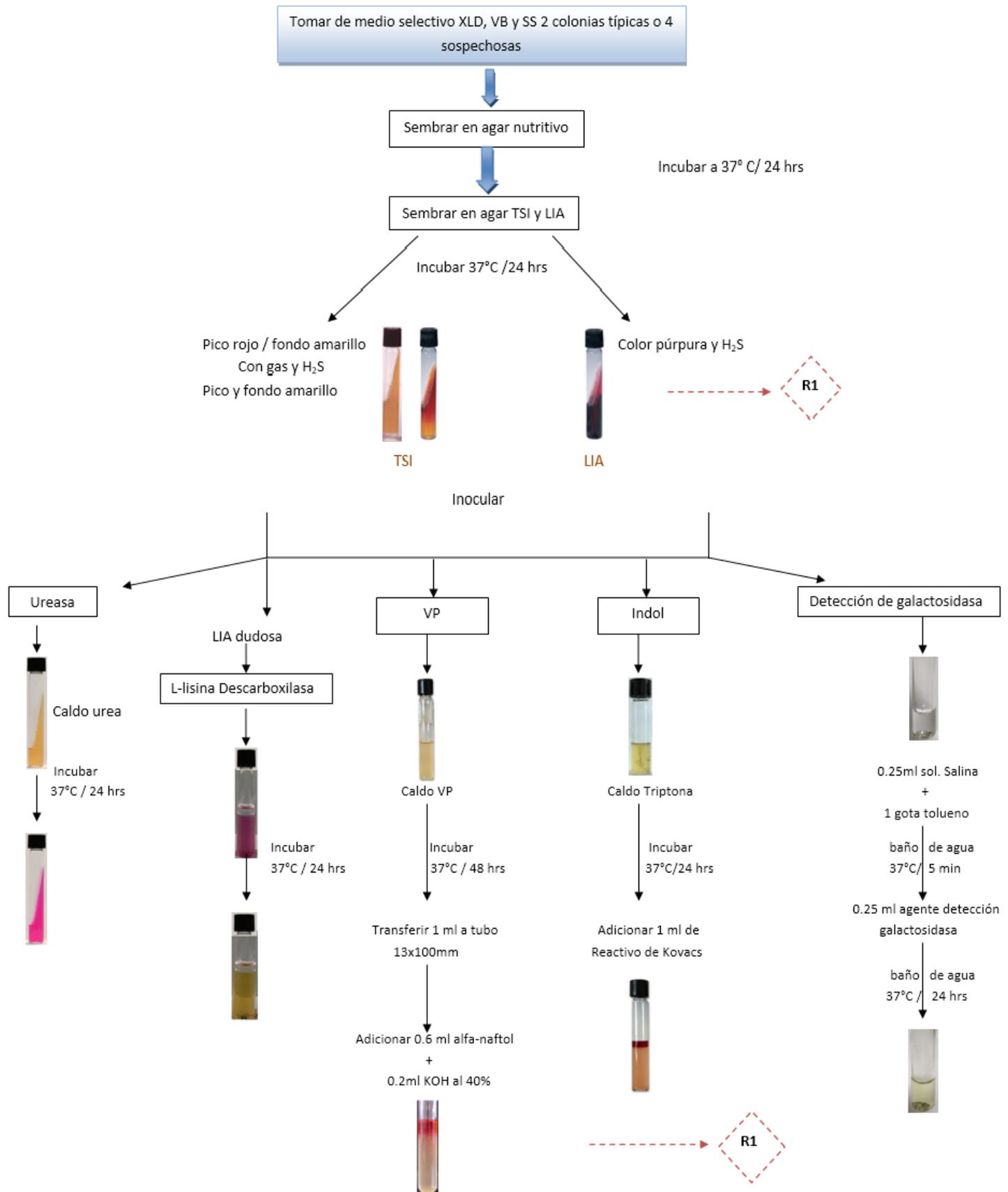
Como se muestra en la figura 3 para la confirmación de *Salmonella* de cada medio en placa se seleccionaron 2 colonias típicas o 4 sospechosas y sembrar en agar nutritivo e incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{h} \pm 3\text{h}$, a partir del agar nutritivo se inoculo con un asa recta, estéril tubos de agar inclinado TSI y LIA.

Se Incubaron los tubos de TSI y LIA a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24 \pm 3\text{h}$, se dejaron los tapones flojos de los tubos para mantener condiciones de aerobiosis mientras se incuban. Todos los cultivos presuntivos de *Salmonella*, fueron sometidos a prueba de ureasa, caldo lisina descarboxilasa en caso de que LIA fue dudosa, detección de galactosidasa, indol y VP.



R1: Desechar en contenedor para RPBI

Figura 2. Método para el aislamiento de *Salmonella spp.*



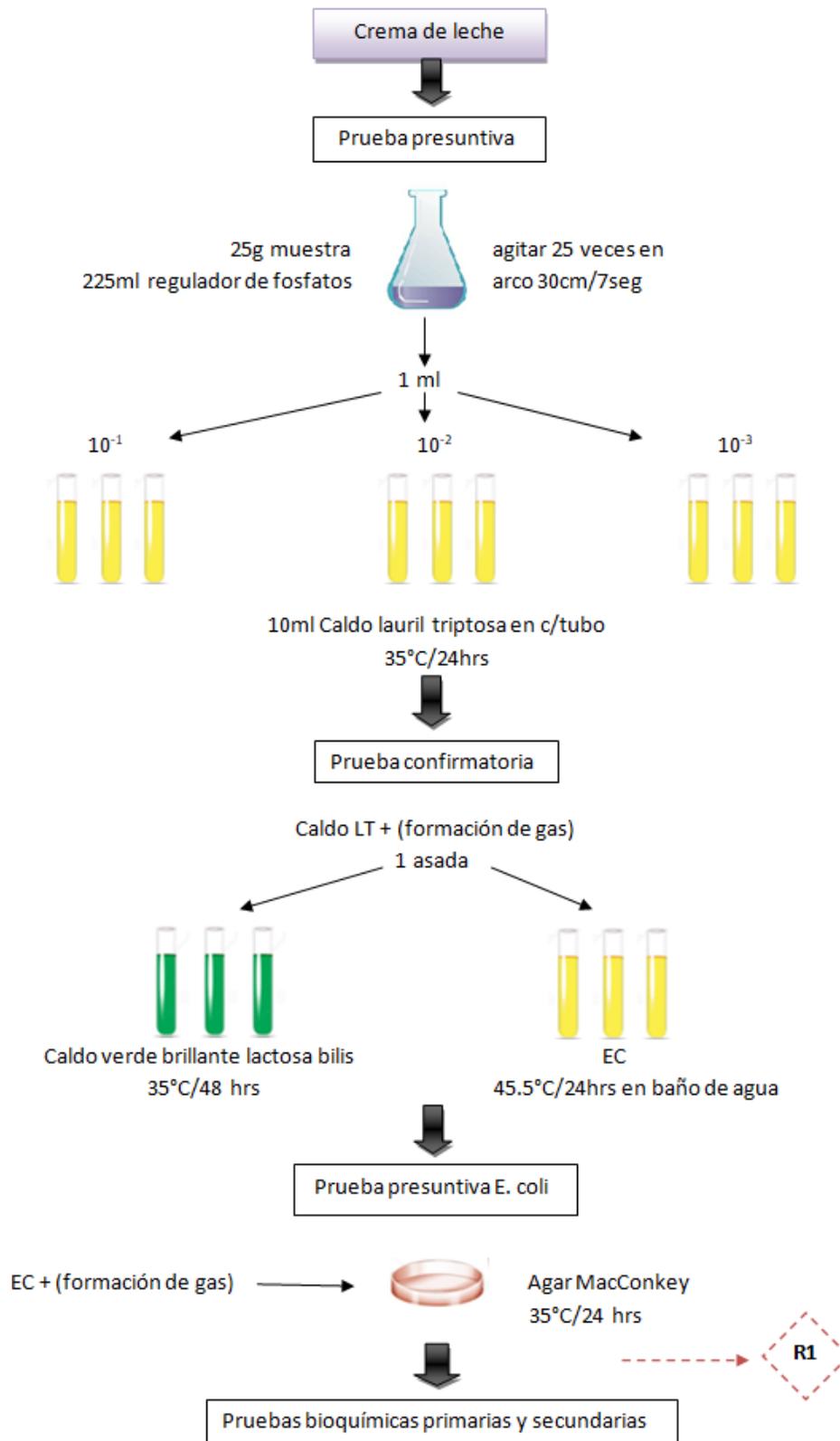
R1: Desechar en contenedor para RPBI

Figura 3. Método para la confirmación de *Salmonella spp.*

De acuerdo con el Apéndice Normativo H. Método para la estimación de la densidad de *Coliformes Fecales* y *E. coli* por la técnica del número más probable presentes en las muestras de alimentos para consumo humano y agua. Se prepararon diluciones decimales con regulador de fosfatos de la suspensión inicial, se transfirieron volúmenes de 1ml a 3 tubos con 10 ml de caldo lauril sulfato de sodio y se realizaron 3 diluciones consecutivas, una vez inoculados se incubaron a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 24hrs, ver figura 4.

De cada tubo con formación de gas se tomo una asada y se inoculo en un número igual de tubos para la prueba confirmativa; para bacterias Coliformes totales se utilizo el caldo Verde brillante lactosa bilis y para Coliformes fecales se utilizo EC.

Para la prueba presuntiva para *E. coli* se tomo una asada de los tubos positivos de caldo EC y se sembró en agar MacConkey para su aislamiento. Se incubaron las placas invertidas a 35°C por 18-24h y se seleccionaron dos colonias de cada placa con la morfología colonial típica, a las cuales se les realizo tinción Gram, producción de indol, rojo de metilo, VP y citrato para confirmar la presencia de *Escherichia* por identificación bioquímica, ver figura 5.



R1: Desechar en contenedor para RPBI

Figura 4. Método para el aislamiento de *Coliformes Fecales* y *E. coli*

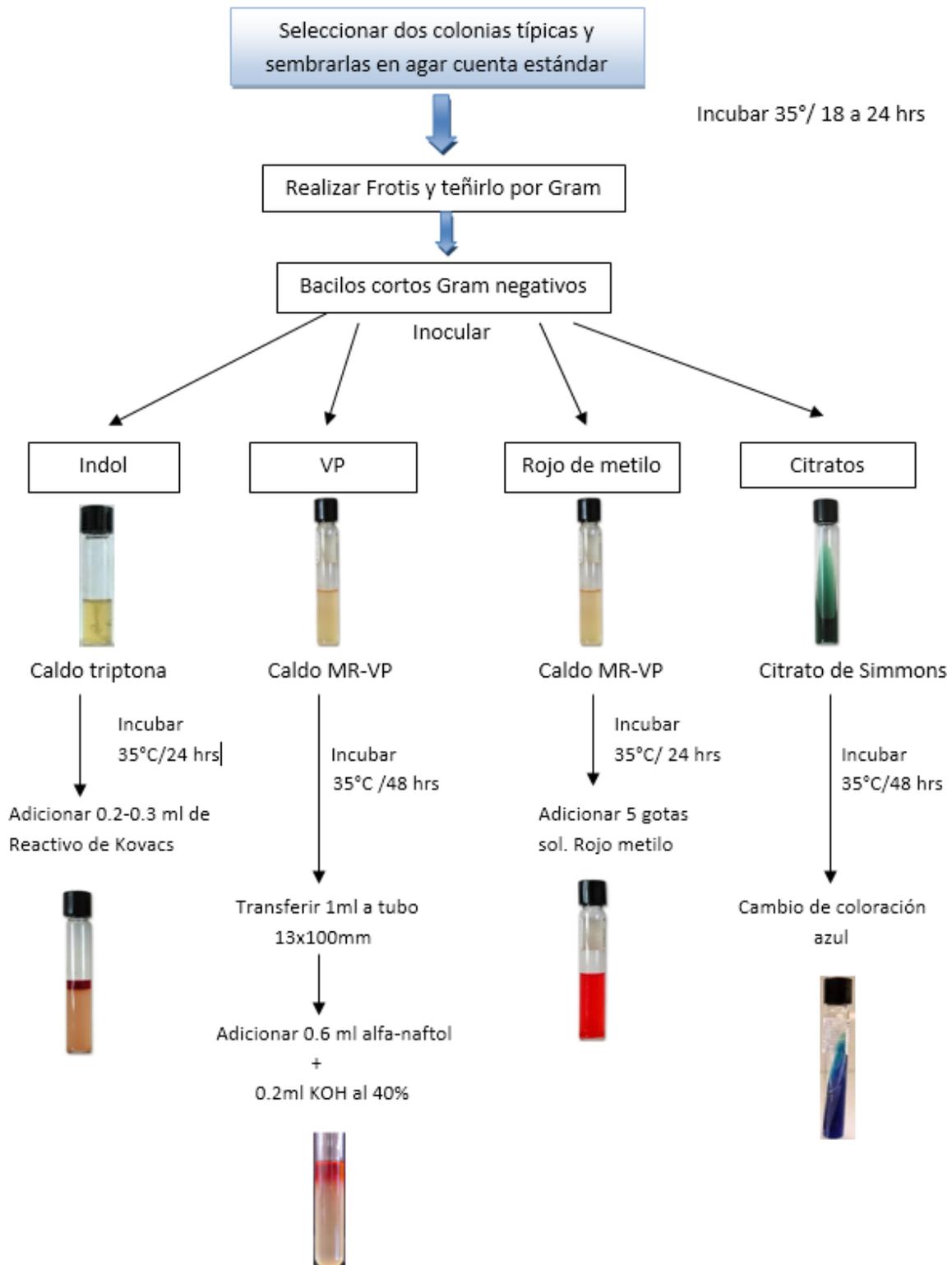


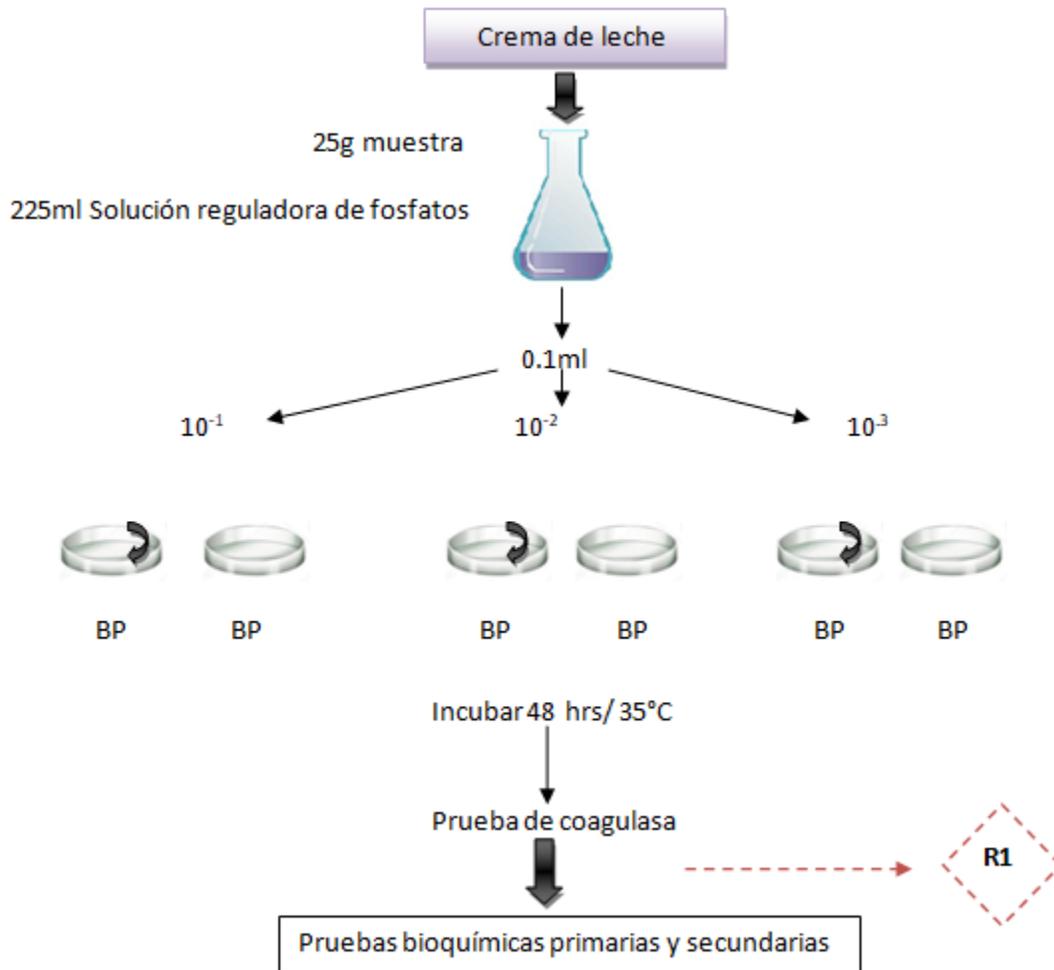
Figura 5. Método para la confirmación de *E. coli*

Como lo indica el Apéndice Normativo B. Método de referencia para la estimación de la cuenta de *Staphylococcus aureus*. Se transfirió por medio de una pipeta estéril, 0.1mL de la suspensión inicial (dilución 10^{-1}), por duplicado a cajas de agar Baird Parker y se repitió el procedimiento para las diluciones siguientes 10^{-2} , 10^{-3} .

El inóculo se distribuyó sobre la superficie del agar con varillas estériles de vidrio, utilizando una para cada placa y dilución. Como se muestra en la figura 6 se incubaron por 48 hrs a 35°C para seleccionar las placas que contengan entre 15 y 150 colonias típicas y atípicas de *S. aureus*.

De cada placa se seleccionaron 5 colonias típicas y 5 colonias atípicas y sembraron en tubos con 0.5ml de BHI y tubos con AST para su confirmación.

A cada colonia se le realizó la prueba de coagulasa, tinción de gram, catalasa, utilización anaeróbica de manitol y glucosa así como la prueba de term nucleasa para su confirmación, ver figura 7.



R1: Desechar en contenedor para RPBI

Figura 6. Método para el aislamiento de *Staphylococcus aureus*

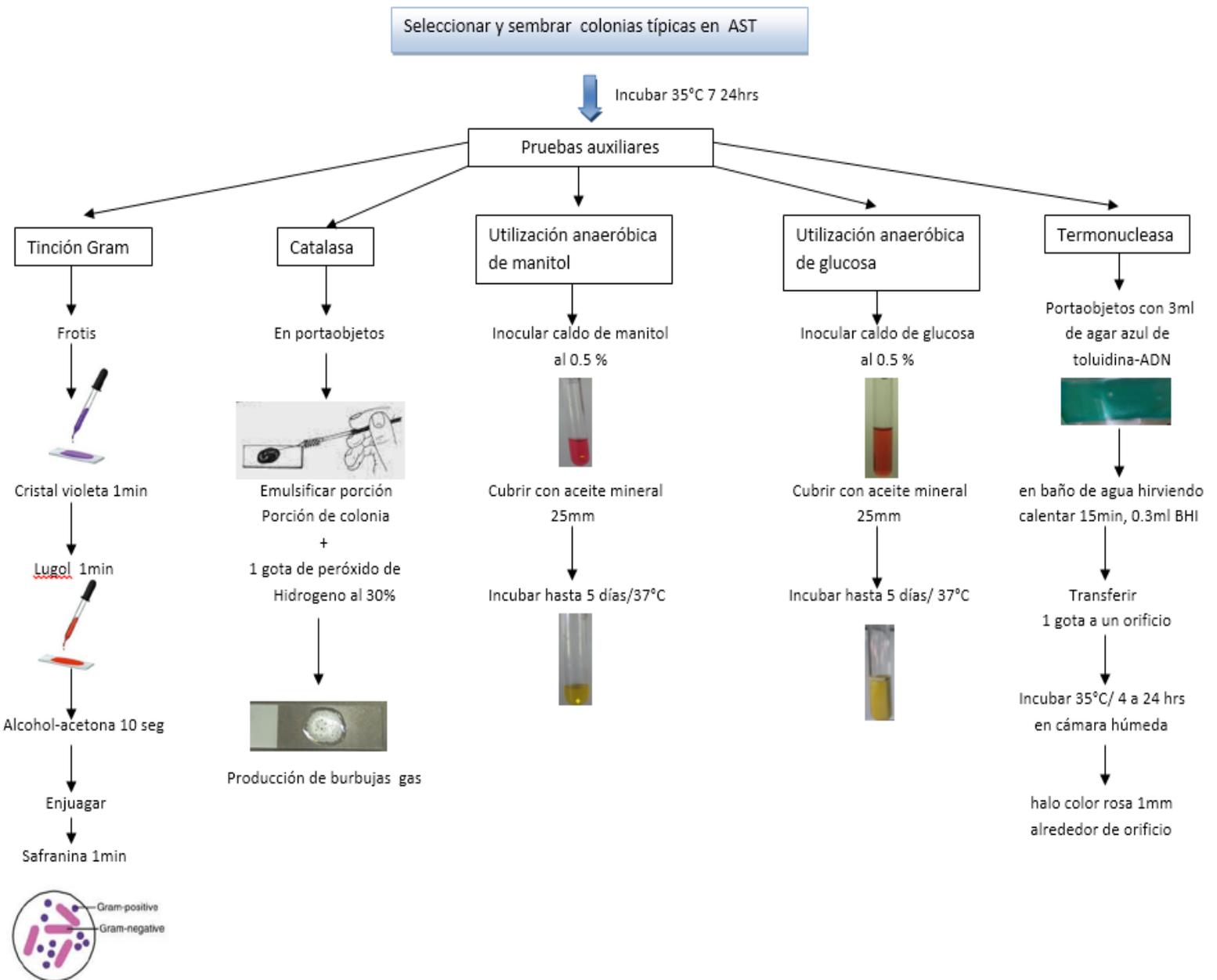
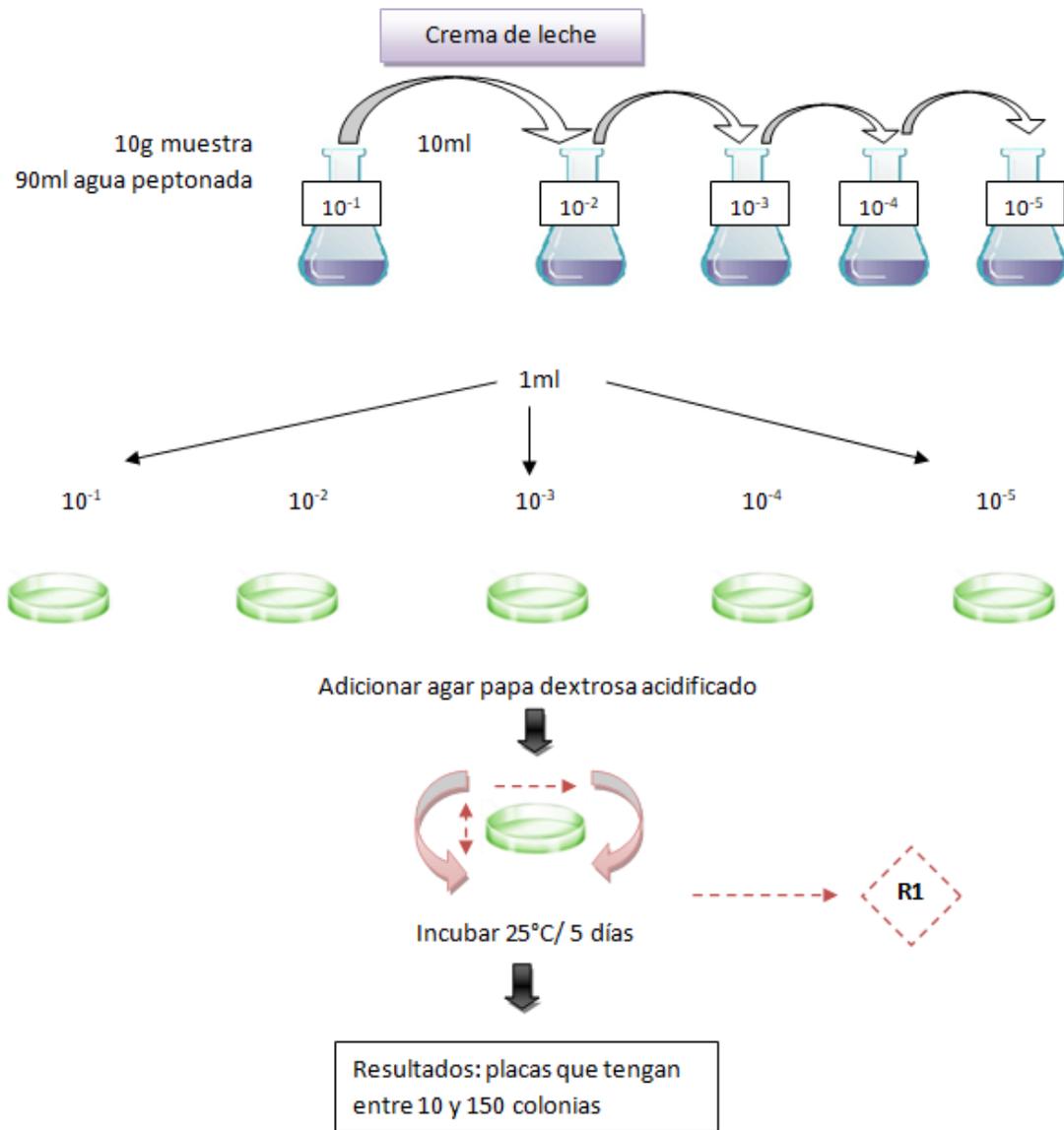


Figura 7. Método para la confirmación de *Staphylococcus aureus*

La determinación de mohos y levaduras se realizó mediante el material y métodos especificados en la NOM-111-SSA1-1994 Método para la cuenta de Mohos y Levaduras en Alimentos. Como se muestra en la figura 8 se prepararon 5 diluciones decimales y se colocó por duplicado en cajas Petri 1 ml de cada dilución, utilizando una pipeta estéril diferente para cada dilución.

Se vertió de 15 a 20 ml de agar papa dextrosa acidificado, fundido y mantenido a 45 ± 1 °C en un baño de agua. El tiempo transcurrido entre la preparación de la dilución primaria y el momento en que es vertido el medio de cultivo, no debe exceder de 20 minutos. Posteriormente se mezcló cuidadosamente el medio con seis movimientos de derecha a izquierda, seis en el sentido de las manecillas del reloj, seis en el sentido contrario y seis de atrás para adelante, sobre una superficie lisa. Una vez solidificado el medio de las placas se incubaron a 25 ± 1 °C.

Se contaron las colonias de cada placa después de 3, 4 y 5 días de incubación y se seleccionaron aquellas placas con 10 y 150 colonias para reportar los resultados.



R1: Desechar en contenedor para RPBI

Figura 8. Método para la determinación de Mohos y Levaduras

RESULTADOS

Aislamiento microbiológico de Coliformes, *E. coli*, *Salmonella* spp y *Staphylococcus aureus*.

Tabla 5. Resultados generales de la cantidad de Coliformes, *E. coli*, *Salmonella* spp y *Staphylococcus aureus* presentes en la crema de leche de vaca.

Microorganismo	Mercado 1		Mercado 2			Mercado 3			Mercado 4			Valores de referencia	
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11		E12
Coliformes totales (NMP/g)	75.1	110	110	110	110	110	110	110	110	2.3	110	110	10 UFC/g
<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)	45.2	1.9	24	110	110	110	110	1.9	110	3	3	3	= 3 NMP/g
<i>Salmonella</i> spp. (Presencia en 25g)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausencia en 25g
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	< 100 UFC/g

Prueba presuntiva para Coliformes

Se obtuvieron resultados positivos para la prueba presuntiva en caldo lauril triptosa en las 12 muestras analizadas, observándose la presencia de turbidez en el medio y gas evidenciado en la campana de Durham como se muestra en la figura 9.



Positiva (formación de gas)

Figura 9. Prueba presuntiva para la identificación de Coliformes en caldo lauriltriptosa

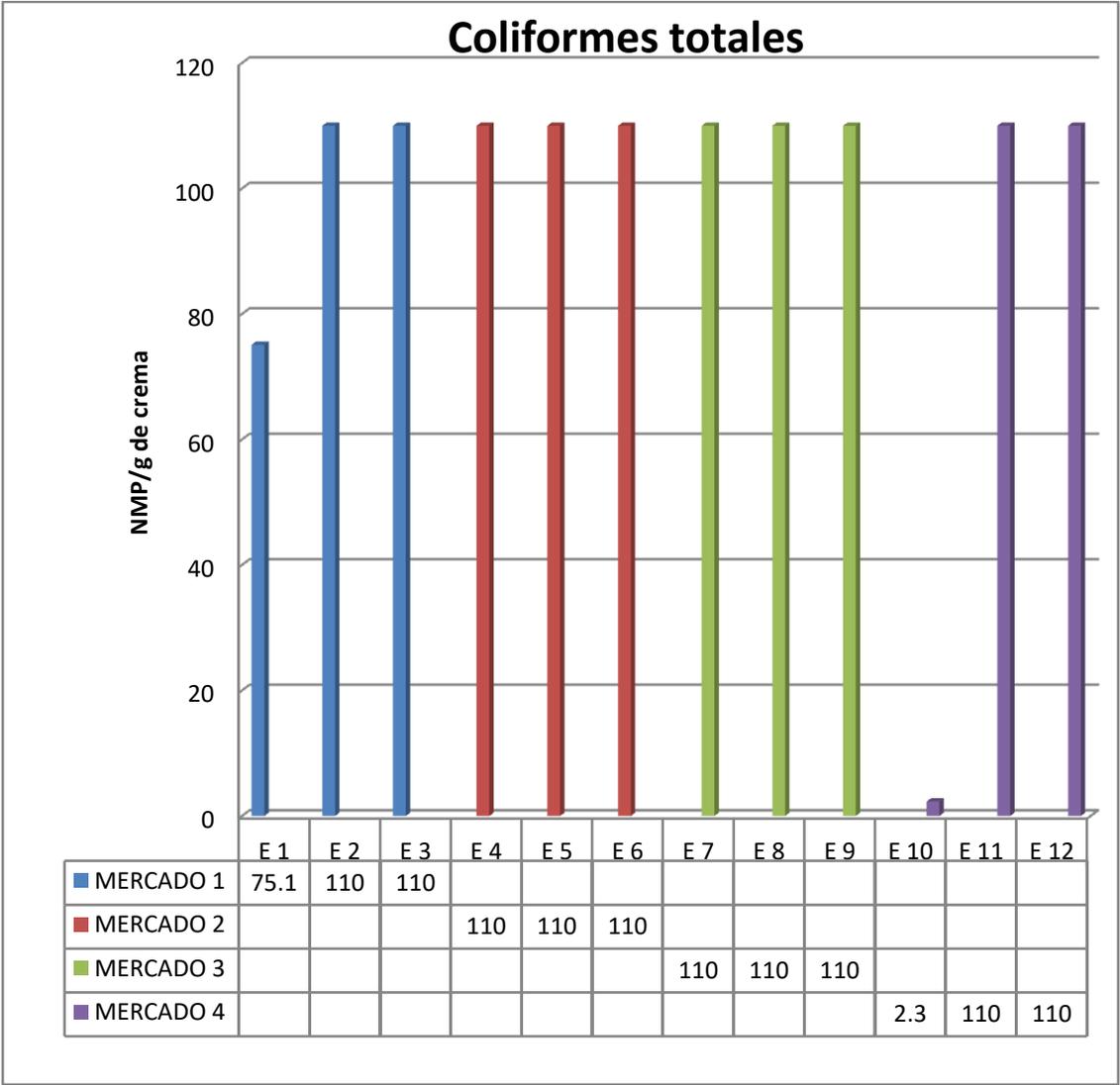
De los tubos con formación de gas se continuó con la prueba confirmativa para Coliformes fecales en caldo verde brillante lactosa bilis, en esta prueba también se obtuvieron resultados positivos en las 12 muestras, de igual forma en la figura 10 podemos observar el resultado de la prueba positiva.



Positiva (formación de gas)

Figura 10. Prueba confirmativa para Coliformes totales en caldo verde brillante lactosa bilis

La grafica 1 muestra un comparativo de la cantidad de Coliformes totales obtenidos en cada muestra de cada establecimiento en los cuatro mercados. La muestra obtenida del establecimiento 10 presenta una cantidad de Coliformes menor a la muestra del establecimiento 1, mientras que las muestras obtenidas de los demás establecimientos presentan una cantidad aun más elevada de Coliformes, evidenciada claramente en la gráfica.



Grafica 1. Comparación de conteos de Coliformes totales en crema de leche de vaca de los cuatro mercados

Escherichia coli

En el medio EC se confirmo la presencia de E. coli en las 12 muestras, la figura 11 muestra el resultado de una prueba positiva con formación de gas y medio turbio.

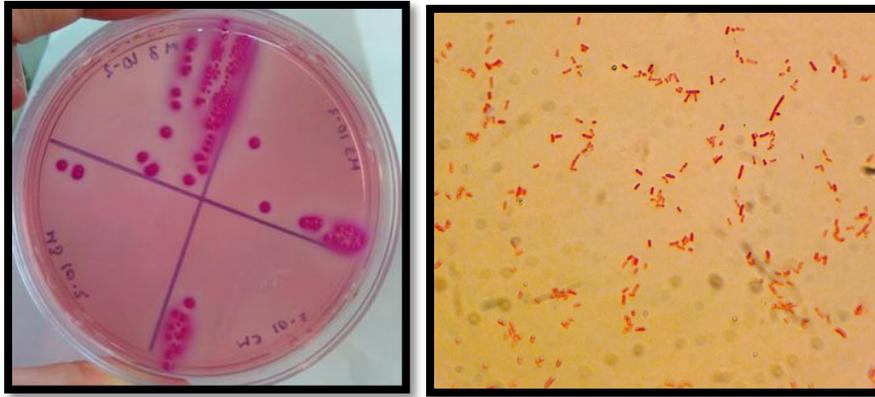


Positiva (formación de gas)

Figura 11. Prueba confirmativa para Coliformes fecales en EC

De los tubos positivos de caldo EC se tomo una azada y se sembró en agar MacConkey para la identificación de microorganismos presentes.

Para el aislamiento se seleccionaron las colonias que presentaron un color rosa, redondas con halo de precipitación, para realizar la tinción Gram, en la tinción Gram se observaron bacilos cortos de color rosa-rojo, confirmando bacterias gram negativas como se observa en la figura 12.



Agar MacConkey

Tinción Gram: bacilos gram negativos

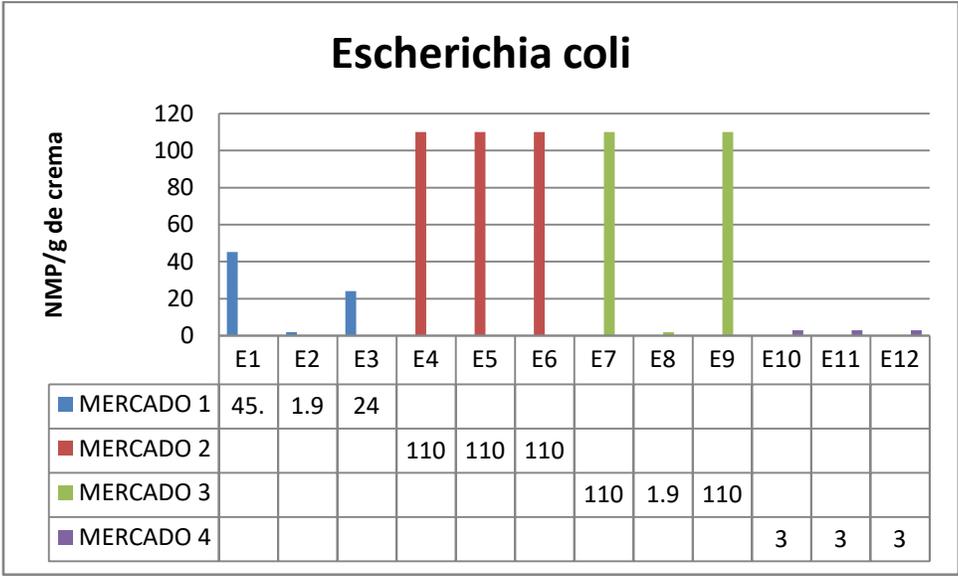
Figura 12. Prueba presuntiva para *E. coli*

De las colonias donde se observó la presencia de bacilos cortos gram negativos se procedió a la identificación bioquímica con la prueba de IMViC para confirmar la presencia de *Escherichia coli*. La tabla 5 muestra los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas realizadas a cada muestra. En la grafica 2 podemos observar la cantidad de *E. coli* en las 12 muestras analizadas y su comparación de acuerdo al establecimiento del que fueron obtenidas.

Tabla 6. Resultados de las pruebas bioquímicas para la identificación de *E. coli*.

Establecimiento	Indol	RM	VP	Citrato
1	+	+	-	-
2	+	+	-	-
3	+	+	-	-
4	-	+	-	-
5	+	+	-	-
6	+	+	-	-
7	-	+	-	-
8	-	+	-	-
9	+	+	-	-
10	+	+	-	-
11	+	+	-	-
12	+	+	-	-

Se observa que las muestras obtenidas del mercado 2 y 3 fueron las que más cantidad de *E. coli* presentaron en comparación con las muestras de los mercados 1 y 4.



Grafica 2.Comparación de conteos de *Escherichia coli* en crema de leche de vaca de los cuatro mercados analizados.

Salmonella

Se llevo a cabo el enriquecimiento selectivo de *Salmonella* en las 12 muestras a partir del medio RVS y Caldo selenito cistina. El Caldo selenito cistina se utilizo en lugar del medio MKTTn ya que no se contaba con él en el laboratorio, este caldo es recomendado en la NOM-114-SSA1-1994 para la determinación de *Salmonella* en alimentos.

Posterior al enriquecimiento de *Salmonella* se realizo el aislamiento en los medios:Agar XLD, Agar Salmonella-Shigella y Agar verde brillante, de los cuales solo en el último se logro seleccionar una colonia sospechosa en la muestra del establecimiento 4.

La colonia presento un color rosa, con fondo rojo (Figura 13), provenía del enriquecimiento previo con caldo RVS, se realizo la tinción gram, donde se observaron bacilos gram negativos.

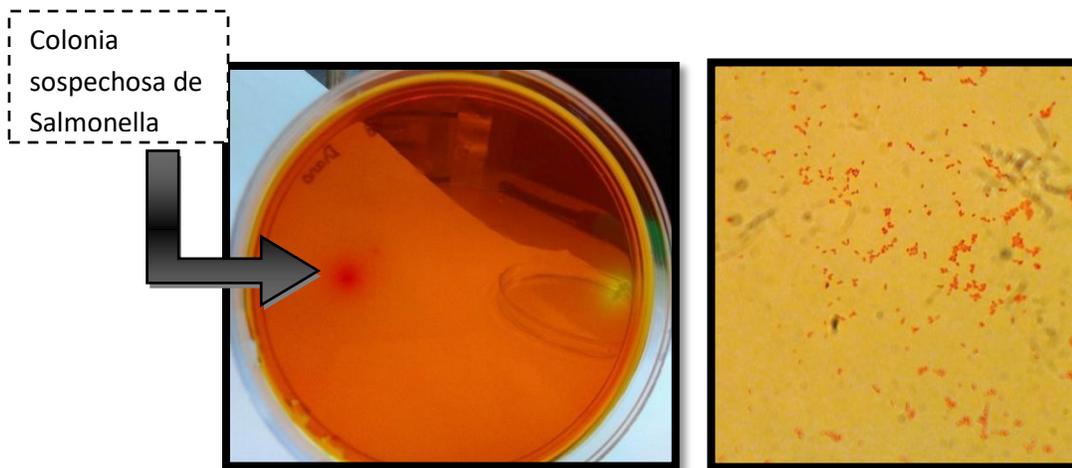


Figura 13. Colonia presuntiva de *Salmonella* en Agar Verde Brillante y tinción Gram

A partir de la colonia desarrollada se realizaron pruebas bioquímicas secundarias con las cuales se identifico y confirmo la presencia de *Salmonella paratyphi A*. La tabla 6 muestra los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas.

Mientras que en los demás establecimientos no se evidencio la presencia de *Salmonella* en las muestras de crema.

Tabla. 7. Resultados de pruebas bioquímicas para la identificación de *Salmonella*.

PRUEBA	RESULTADO
Acido a partir de glucosa	+
Formación de gas a partir de glucosa	+
Acido a partir de lactosa	-
Acido a partir de sacarosa	-
Producción de sulfuro de hidrogeno	-
Hidrólisis de urea	-
Descarboxilación de lisina	-
Reacción Voges-Proskauer	-
Producción de Indol	-

Staphylococcus aureus

Como indica la NOM-210-SSA1-2014 se utilizo el agar Baird Parker para el aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus* en las muestras. Los estafilococos produjeron colonias de color negro y algunas presentaban zonas transparentes alrededor de las colonias y en la tinción Gram se observaron cocos gram positivos agrupados en pares o cadenas como podemos observar en la figura 14.

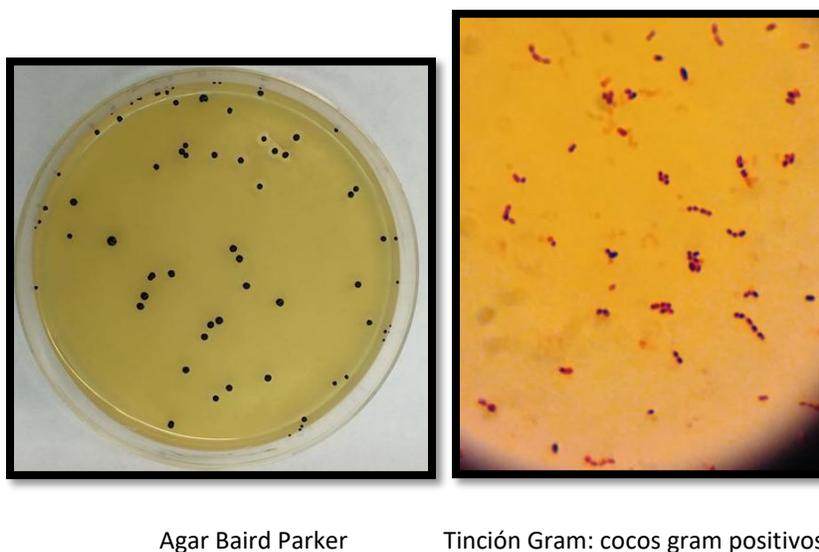


Figura 14. Agar Baird Parker para el aislamiento de *Staphylococcus aureus*.

De cada una de las muestras se seleccionaron preferentemente colonias negras con halo transparente al rededor, circulares y brillantes (colonia típica) o colonias negras, opacas sin halo de precipitación (colonias atípicas). Solo en la muestra del establecimiento 2 logramos encontrar colonias negras, circulares, brillantes y con halo transparente alrededor, mientras que en los mercados 1, 3 y 4 no se encontró ninguna colonia típica.

Tanto las colonias típicas y atípicas seleccionadas fueron sometidas a la prueba de coagulasa con plasma de conejo como establece la NOM-210-SSA1-2014 a partir de un cultivo en BHI, dado que el coagulo formado no fue lo suficientemente firme se procedió a realizar las pruebas de catalasa, utilización anaeróbica de glucosa, manitol y producción de termonucleasa (pruebas auxiliares para su identificación) a partir de un cultivo en AST.

Solo la muestra del establecimiento 2 tuvo un resultado positivo en la prueba de coagulasa como se muestra en la figura 15.



Positiva

Figura 15. Prueba de coagulasa en tubo.

Dado que la lectura de las pruebas auxiliares fue confusa para lograr identificar la especie de *Staphylococcus* en las muestras, se identificaron con la ayuda de un sistema semi-automatizado. El equipo utilizado fue autoScan-4 especial para pruebas de identificación microbiana y susceptibilidad a los antimicrobianos (Véase Anexo). La identificación de los microorganismos se basó en la detección de cambios de pH, utilización de sustratos después de 16-24 hrs de incubación a 35°C.

Las especies encontradas en las muestras de cada establecimiento se encuentran en la tabla 8, la muestra del establecimiento 2 que tuvo un resultado positivo en la prueba de coagulasa se identificó como *S. schleiferi subespecie coagulans* por tanto en ninguna muestra se encontró la presencia de *Staphylococcus aureus*.

Tabla 8. Especies de *Staphylococcus* identificadas en las muestras de cada mercado.

Establecimiento	Especie de <i>Staphylococcus</i>
Mercado 1	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
Mercado 2	<i>Staphylococcus schleiferi subespecie coagulans</i>
Mercado 3	<i>Staphylococcus sciuri</i>
Mercado 4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

Mohos y levaduras

Como indica la NOM-111-SSA1-1994 la identificación de mohos y levaduras presente en las 12 muestras se determino mediante la utilización del agar papa dextrosa acidificado así como la tinción de Gram (figura 16) para distinguir las colonias de levaduras de las bacterias. Con la tinción Gram podemos confirmar la presencia de levaduras gram variable.

Las muestras de crema con mayor cantidad de mohos fue la del establecimiento 3 con una carga de 800 UFC/g en comparación con el establecimiento 5 que presenta <10 UFC/g de mohos en agar papa dextrosa acidificado, incubadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 5 días y el establecimiento con mayor cantidad de levaduras fue el establecimiento 4 con 630 UFC/g de levaduras en agar papa dextrosa acidificado, incubadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 5 días ,y el mercado con menor carga fue el establecimiento 12 con 35 UFC/g.

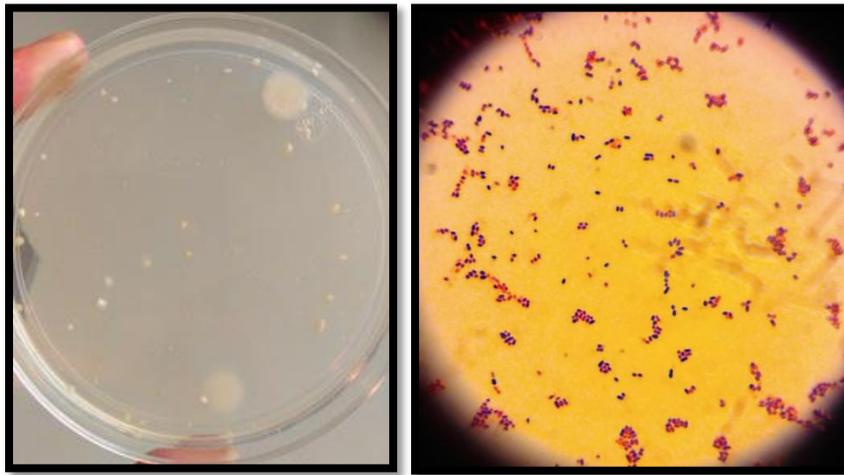
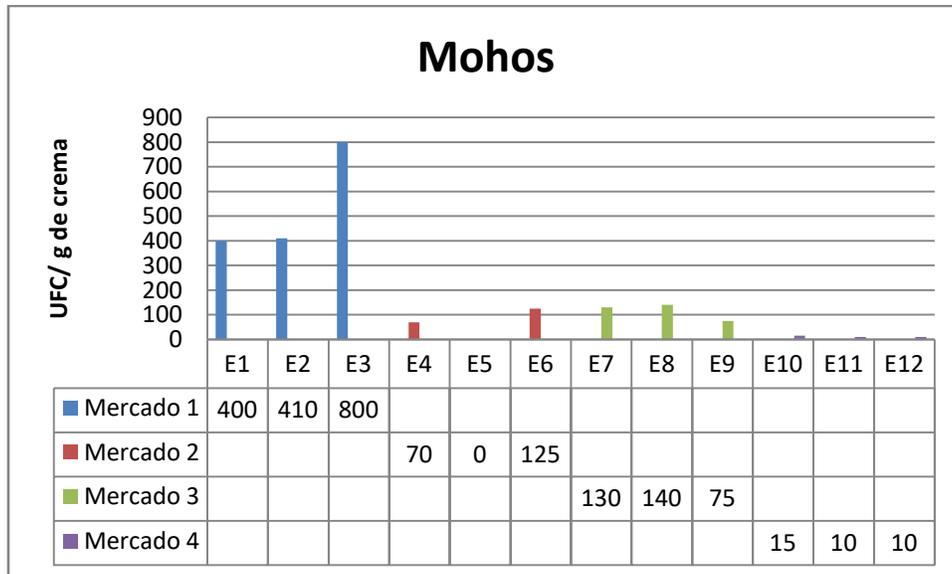
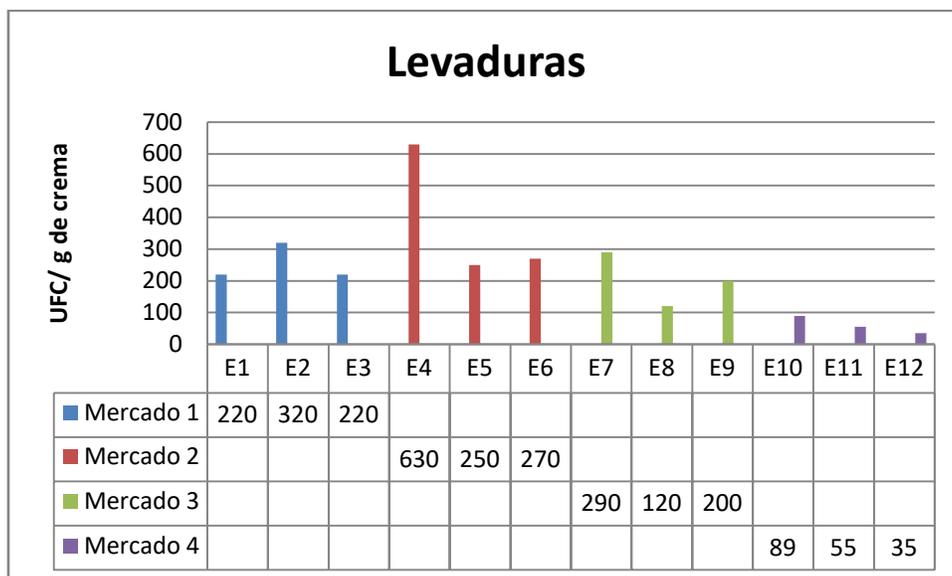


Figura 16. Agar papa dextrosa acidificado para la cuenta de mohos y levaduras

En la grafica 3 y 4 se presentan los recuentos bacteriológicos de mohos y levaduras respectivamente, donde se aprecian las cargas presentes en los diferentes establecimientos muestreados.



Grafica 3. Comparación de conteos de Mohos en crema de leche de vaca de los cuatro mercados



Grafica 4. Comparación de conteos de Levaduras en crema de leche de vaca de los cuatro mercados

ANALISIS DE RESULTADOS

De acuerdo a los resultados obtenidos del análisis microbiológico realizado a la crema de leche de vaca todos los establecimientos a excepción del establecimiento 10 superan la cantidad de Coliformes totales establecida en la NOM-185-SSA1-2002 ya que se reportan conteos arriba de 10 UFC/g de Coliformes totales que es el límite máximo permitido por la norma. La NOM-185-SSA1-2002 señala también que *Salmonella* debe estar ausente en 25g de producto y en el establecimiento 4 se determinó su presencia, la cual se asocia a la elaboración del producto con leche cruda bajo condiciones higiénico-sanitarias deficientes y a la naturaleza del producto ya que presenta un alto contenido de grasa, pues ejerce un efecto protector en las células de *Salmonella* englobadas en las micelas lipídicas. (Chapman & Hall, 2005)

La NOM-185-SSA1-2002 no establece la presencia de *E. coli* en crema por lo que se tomo como referencia las especificaciones de la NOM-243-SSA1-2010 establecidas en el punto 6.1.8.1 que indica como límite máximo permitido $\leq 3\text{NMP/g}$ leche/producto lácteo de este microorganismo. Por lo tanto los establecimientos 1, 3, 4, 5, 6, 7 y 9 no cumplen con dicha norma, mientras que los establecimientos 10, 11 y 12 se encuentran en el límite.

En el análisis para *Staphylococcus aureus* no se determino la presencia de tal especie por lo que se puede considerar dentro de los límites establecidos por la norma sin embargo se identificaron otras especies de *Staphylococcus* que aunque no se encuentran dentro de los marcadores de calidad en los alimentos es de gran importancia su conocimiento: *Staphylococcus haemolyticus*

S. haemolyticus es uno de los *Staphylococcus* coagulasa negativos aislados de infecciones nosocomiales, asociada a bacteriemia, infecciones del tracto urinario y osteomielitis, son resistentes a múltiples microbianos, con más de 80% a meticilina y es el primer *Staphylococcus* que ha mostrado resistencia a vancomicina. (Fariña, 2013).

Staphylococcus schleiferi subespecie coagulans fue descrito por Freney en 1990 y se identificó como el agente causal de otitis externa en perros, también produce infecciones especialmente agresivas, equiparables a las causadas por *Staphylococcus aureus*. Su patogenia todavía se encuentra pendiente de dilucidar por lo que la identificación correcta de estos aislamientos tiene particular importancia. *Staphylococcus schleiferi* no es un microorganismo habitual entre la flora comensal humana lo que podría explicar la baja frecuencia de las infecciones que causa. Sin embargo, es probable que su implicación real en algunas de ellas esté subestimada debido, principalmente, a las dificultades en su identificación. (Shizunobu, 2015)

Staphylococcus sciuri

Los miembros del grupo *Staphylococcus sciuri* tienen una naturaleza generalizada, y pueden aislarse de una variedad de animales de granja, mascotas y animales salvajes, así como de diversos productos alimenticios de origen animal. Aunque están asociados principalmente con animales, los miembros del grupo *S. sciuri* pueden colonizar humanos, *S. sciuri* se puede encontrar como un organismo colonizador en humanos, con tasas bajas de portadores en la nasofaringe, la piel y el tracto urogenital. (Stepanovic, 2005)

Por lo anterior aunque no sean las especies de *Staphylococcus* de interés en el presente trabajo no deberían de encontrarse en la crema de leche por las múltiples infecciones que pueden causar en los humanos.

La presencia de mohos y levaduras indica contaminación y equipos sanitizados inadecuadamente, así como un tiempo de vida menor de la crema ya que dichos microorganismos alterarán más rápido el aroma, sabor y color del producto.

Lo anterior evidencia prácticas higiénicas inadecuadas en la elaboración del producto, empezando por la ordeña, la limpieza deficiente o falta de ella en los contenedores y utensilios, el inadecuado lavado y desinfección de manos del personal que está en contacto directo con el alimento ya que la manipulación facilita la contaminación por patógenos. También se debe considerar que la crema es elaborada a partir de leche cruda

para mantener sus características organolépticas, lo cual incrementa el riesgo, puesto que se sabe que para la elaboración de productos inocuos no solo tiene que ver el proceso, sino también la utilización de materia prima de calidad. Una deficiente refrigeración tanto de la leche o crema favorece el crecimiento de los organismos patógenos que estén presentes en el producto.

En el estudio influyeron algunos factores externos a la composición de la crema, ya que el muestreo fue realizado de forma aleatoria y que el producto analizado se produce a granel. También pudo haber influido en la contaminación de las cremas el manejo durante el envasado y transporte de las mismas a los establecimientos que las expenden.

Hoy en día los alimentos se consideran un vehículo muy importante de transmisión de enfermedades y a medida que pasa el tiempo las enfermedades infecciosas y las intoxicaciones alimentarias se han convertido en un gran problema. El hallazgo y divulgación de patógenos transmitidos por alimentos, ha hecho que los consumidores seamos más conscientes de dichos riesgos, por lo cual, exigimos alimentos cada vez más seguros.

CONCLUSIONES

- A partir de la metodología indicada en la NOM-210-SSA-2014 se logró detectar la presencia de bacterias patógenas (*Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, *coliformes totales* y *E. coli*) en la crema de leche de vaca venida a granel en los establecimientos de cuatro mercados en el municipio de Cuautitlán Edo. de México, lo que nos indica un producto inseguro para el consumidor y deficiencias en la calidad microbiológica del alimento.
- Se demostró que ninguno de los establecimientos muestreados cumple con las especificaciones microbiológicas de la NOM-185-SSA1-2002. Productos y servicios. Mantequilla, cremas, producto lácteo condensado azucarado, productos lácteos fermentados y acidificados, dulces a base de leche. Especificaciones sanitarias. y de la NOM-243-SSA1-210. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias.
- La calidad sanitaria del producto terminado depende de las buenas prácticas de manufactura por lo tanto se sugiere un mejor cuidado en la elaboración de este producto así como las condiciones de almacenamiento ya que también se puede ocasionar descomposición del alimento.

REFERENCIAS

1. Andrews W.H., Flowers R.S., Silliker J., & Bailey S. (2001) "Salmonella". In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. Downs F.P. & Ito K. (Eds.) APHA. Washington: 357-38
2. Boletín Epidemiológico, No. 44, Vol. 33. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica.
3. Bonet, Dalmau, (2015). Productos lácteos insustituibles. Consultado en: http://www.lacteosinsustituibles.es/p/archivos/pdf/monografia_leche_nata_mantequilla_otros.pdf
4. Bravo, F. (2004). El manejo higiénico de los Alimentos: Guía practica para la obtención del distintivo H, Limusa, México.
5. Bustos, Hamdan. (2006). *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, RevBiomed, México.
6. Castillo, C. (2002). Tecnología e Ingeniería de los alimentos, Colombia.
7. Chapman & Hall. (2005) International Commission on Microbiological. Specifications of Foods "Microorganisms in Foods 6". Washington
8. Duran, E. (2016). Estudio del consumo de leche y sus derivados en el municipio de Oaxaca de Juárez, Revista Mexicana de Agronegocios, vol 39, México.
9. Early, R. (2006). Tecnología de los productos lácteos. Editorial ACRIBIA, S.A ZARAGOZA. España.
10. Fariña, N. (2013). *Staphylococcus* coagulasa-negativa clínicamente significativo. Especies más frecuentes y factores de virulencia. Instituto de Investigación en ciencias de la Salud, Paraguay.
11. Flores, N.R. (2014). Evaluación del uso de soluciones desinfectantes sobre calidad sanitaria. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, UNAM, Programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y Salud Animal

12. Franco, Ramírez, Orozco. (2013). Determinación de *Escherichia coli* e identificación de serotipo O157:H7 en carne de cerdo comercializada en los principales supermercados de la ciudad de Cartagena.
13. Food & Drugs, (2012). Los peligros de la leche cruda. Consultado en: <https://www.fda.gov/media/119384/download>
14. Hernández, C., Aguilera, A. (2011). Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. En. Inf. Microbiol.
15. Hernández, M. (2015). Microbiología de los alimentos: fundamentos y aplicaciones en ciencias de la salud. Editorial Médica Panamericana. México, D.F.
16. Hernández, M. (2015). Microorganismos de los alimentos 8: Uso de datos para evaluar el control del proceso y la aceptación del producto 2016. Editorial Médica Panamericana. México.
17. ICMSF, (2005). Microorganismos de los alimentos. Ecología microbiana de los productos alimentarios. Editorial Acribia. Zaragoza.
18. Jurado, R., Arenas, C. (2010). Fiebre tifoidea y otras infecciones por salmonellas. Consultado en: http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Tifoidea_otras_salmonellas_Medicine201o0.pdf
19. Luquet, F. (2005). Los productos lácteos transformación y tecnologías. Editorial ACRIBIA, S.A ZARAGOZA. España.
20. Mahaut, M. (2004). Productos lácteos industriales. Editorial ACRIBA. S.A ZARAGOZA .España.
21. Molina, J. (2015). *Escherichia coli*. Consultado en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichia-coli.html>

22. NOM-115-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos.
23. Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCFI/SSA1-2010, Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados-Información comercial y sanitaria.
24. Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994, Bienes y servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
25. Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
26. Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para cuenta de Mohos y Levaduras en Alimentos.
27. Norma Oficial Mexicana NOM-185-SSA1-2002, Productos y servicios. Mantequilla, cremas, producto lácteo condensado azucarado, productos lácteos fermentados y acidificados, dulces a base de leche. Especificaciones sanitarias.
28. Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-210. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias.
29. NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.
30. OMS, (2015). Peligros biológicos, inocuidad de alimentos. Consultado en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10838:2015-peligros-biologicos&Itemid=41432&lang=es
31. OPS, (2015). Enfermedades transmitidas por alimentos. Consultado en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10836:2015-enfermedades-transmitidas-por-alimentos-eta&Itemid=41432&lang=es

32. Ordoñez, M. (2014). Guías prácticas para laboratorios de bacteriología clínica. Editorial Médica Panamericana. México, D.F.
33. Parrilla, M. (2017). Brotes de toxiinfección alimentaria de origen Microbiano y Parasitario, Salud Publica de México.
34. Pascual, M. (2000) Microbiología Alimentaria: Metodología analítica para alimentos y bebidas, Díaz de Santos, España.
35. Rodríguez, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Consultado en:http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003636342002000500011#cuadro3
36. Sánchez, J., Colín, V. (2016). Diagnostico de la calidad sanitaria en las queserías artesanales del municipio de Zacazonapan, Salud Publica en México, Edo. De México.
37. Secretaria de comercio y fomento industrial. (2000). Yogurt y crema. Editorial LIMUSA S.A. DE C.V, México D.F.
38. Shizunobu, I. (2015). *Staphylococcus scheiferi subsp. Coagulans subsp.* Nov. Isolated from the external auditory meatus of dogs with external ear otitis. International Journal of Systematic Bacteriologi.
39. Solís, Castro B.E. (2012). Detección e identificación de Microorganismos patógenos en carne fresca y congelada. Tesis para obtener el título de Químico de Alimentos, UNAM, Facultad de Química.
40. Soriano, J. (2007). Micotoxinas en Alimentos. Díaz de Santos, España.
41. Stepanovic, I. (2005). Identification and characterization of clinical isolates of members of the *Staphylococcus sciuri* group. Journal Clinical Microbiology.

42. Valenzuela, L. (2015). Búsqueda de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa* negativo en secreción nasal de animales y muestras de alimentos. Tesis Universidad de Chile, Facultad de Ciencias.

43. Venegas C., Rojas J., (2014). Detección de patógenos en alimentos. Consultado en: <http://hipotesis.uniandes.edu.co/hipotesis/images/stories/ed04pdf/Deteccion%20de%20patogenos.pdf>

44. Venegas, C., Rojas, J. (2014) Detección de patógenos en alimentos. Consultado en: <http://hipotesis.uniandes.edu.co/hipotesis/images/stories/ed04pdf/Deteccion%20de%20patogenos.pdf>

ANEXO

Apéndice Normativo A

Método de referencia para el aislamiento de *Salmonella* spp.

La preparación de la suspensión inicial requiere 25g de la muestra en una cantidad suficiente de agua peptonada, para obtener una dilución 1:10

Pre-enriquecimiento.

En general incubar la dilución inicial a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $18\text{h} \pm 2\text{h}$.

Enriquecimiento selectivo.

Transferir 0.1mL del cultivo de pre-enriquecimiento a un tubo del 10mL de caldo RVS y 1mL a un tubo conteniendo 10mL de caldo MKTTn.

Incubar el caldo RVS a $41.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24\text{h} \pm 3\text{h}$ y el caldo MKTTn a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24\text{h} \pm 3\text{h}$.

Aislamiento e identificación.

Para el aislamiento, inocular a partir de los cultivos obtenidos en el punto anterior, tres medios selectivos en placa como sigue:

Agar XLD y cualquier otro medio selectivo sólido complementario al agar XLD y especialmente apropiado para el aislamiento de *Salmonella*.

El agar XLD se incuba a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{h} \pm 3\text{h}$, el segundo y tercero agar selectivo incubar de acuerdo a las recomendaciones contenidas en los manuales de medios de cultivo de los fabricantes.

Morfología Colonial Típica de *Salmonella*.

Seleccionar 2 o más colonias de *Salmonella* de acuerdo con las características en cada agar selectivo:

XLD. Colonias rosas con o sin centro negro. Muchos cultivos de *Salmonella* pueden producir colonias con un centro negro muy grande o completamente negras.

Morfología Colonial Atípica de *Salmonella*.

En ausencia de colonias típicas sospechosas de *Salmonella*, buscar colonias atípicas con las características siguientes:

XLD. Muy pocos cultivos atípicos de *Salmonella* producen colonias amarillas con o sin centro negro.

Nota: Algunas cepas variables de *Salmonella* como: H₂S negativo (ej. *S. Paratyphi* A) crece en XLD como colonias rosas con el centro de un color rosa oscuro. *Salmonella* Lactosa – positiva crece en XLD como colonias amarillas con o sin el centro negro. atípicas.

Selección de colonias para su confirmación.

Para la confirmación, tomar de cada medio selectivo al menos dos colonias consideradas como típicas o 4 colonias sospechosas si no existe la primera posibilidad.

Estriar cada colonia seleccionada en agar nutritivo, Incubar las placas inoculadas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{h} \pm 3\text{h}$.

Utilizar cultivos puros para la confirmación por pruebas bioquímicas.

Confirmación Bioquímica.

A partir del agar nutritivo, con un asa recta, estéril tocar ligeramente el centro de la colonia seleccionada e inocular en tubos de agar inclinado de TSI y LIA. Sembrar por picadura en el fondo y estría en la superficie inclinada. Incubar los tubos de TSI y LIA a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24 \pm 3\text{h}$.

Las colonias típicas de *Salmonella*, producen alcalinidad (color rojo) en la parte inclinada del medio y ácido (color amarillo) en el fondo; con producción de gas y cerca del 90% de los casos producen H_2S (ennegrecimiento del agar). Cuando alguna *Salmonella lactosa* positiva es aislada, el agar de TSI se torna completamente amarillo.

En LIA, *Salmonella* produce reacción alcalina (color púrpura) Considerar como negativos los cultivos que produzcan claramente un color amarillo en el fondo del tubo. La mayoría de los cultivos de *Salmonella* producen H_2S en LIA. Algunos cultivos que no son de *Salmonella*, producen un color rojo ladrillo en la parte inclinada del LIA.

Todos los cultivos que den reacción alcalina en el fondo del medio de LIA, independientemente de la reacción que hayan dado en TSI, deben retenerse como aislamientos presuntivos de *Salmonella*, para someterlos a pruebas bioquímicas adicionales.

Para los cultivos de TSI que se consideran presuntivos para *Salmonella*, continuar como se indica en Identificación de *Salmonella* para determinar la especie, incluyendo *Salmonella arizonae*.

a) Prueba de ureasa (convencional). Con un asa estéril inocular tubos de agar urea de Christensen. Una prueba positiva está dada por el uso de la urea generando amoníaco produciendo un cambio en la coloración del medio a color rojo rosado, una prueba negativa no se produce cambio en la coloración (amarillo anaranjado). Incubar $24 \pm 2\text{h}$ a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

b) Caldo L-lisina descarboxilasa.

Si la prueba de LIA fue satisfactoria, no es necesario repetirla. Si la reacción de LIA fue dudosa, utilizar caldo lisina descarboxilasa para la determinación final de lisina descarboxilasa. Inocular el caldo con pequeña cantidad de cultivo. Cerrar la tapa fuertemente e incubar durante a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24 \pm 3\text{h}$. Las especies de *Salmonella* dan reacción alcalina (color púrpura del medio). La prueba negativa se interpreta por un color amarillo del medio.

c) Detección de -galactosidasa.

Colocar la colonia seleccionada en un tubo conteniendo 0.25mL de solución salina, agitar para obtener una suspensión homogénea. Adicionar 1 gota de tolueno y agitar. Colocar el tubo en un baño de agua a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ dejar reposar por aproximadamente 5 min. Adicionar 0.25mL del agente de detección de la -galactosidasa y mezclar. Colocar nuevamente el tubo en el baño de agua a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y dejar por $24\text{h} \pm 3\text{h}$.

Examinar el tubo a intervalos de tiempo. Un color amarillo es indicativo de reacción positiva, la cual se hace evidente en aproximadamente 20 min. Si se utilizan discos comerciales, seguir las instrucciones del fabricante.

d) Prueba de Indol.

Inocular un tubo conteniendo 5mL del medio triptófano/triptona con una suspensión homogénea de la colonia sospechosa. Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24 \pm 3\text{h}$ después de la

incubación adicionar 1mL de reactivo de Kovacs. La formación de un anillo de color rojo indica una reacción positiva. Un anillo de color amarillo indica una reacción negativa.

e) Prueba de VP.

Re-suspender una asada de la colonia seleccionada en un tubo estéril conteniendo 3mL del medio VP. Incubar $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 3 h. Después de la incubación adicionar 2 gotas de solución de creatinina, 3 gotas de solución 1-naftol y al final 2 gotas de solución de KOH, agitar después de cada reactivo.

La formación de un color rosa a rojo brillante en menos de 15 min indica una reacción positiva.

Apéndice Normativo B

Método de referencia para la identificación de la cuenta de *Staphylococcus aureus*

Tomar diferentes porciones del alimento, transferir 25g o mL a frascos de dilución con 225mL de solución reguladora de fosfatos, para preparar una dilución 1:10.

Transferir por medio de una pipeta estéril, 0.1mL de la muestra directa si es líquida, o 0.1mL de la suspensión inicial (dilución 10⁻¹) en el caso de otros productos, por duplicado a cajas de agar Baird Parker.

Repetir el procedimiento para las diluciones siguientes si son necesarias 10⁻², 10⁻³.

Cuidadosamente distribuir el inóculo tan pronto como sea posible, sobre la superficie del agar con varillas estériles de vidrio en ángulo recto, utilizando una para cada placa y dilución.

Mantener las placas con las tapas hacia arriba hasta que el inóculo sea absorbido totalmente por el agar.

Invertir las placas e incubar por 24 a 35°C ± 1°C, marcar las colonias típicas observadas. Morfología colonial típica colonias negras, circulares, brillantes, convexas, lisas, de diámetro de 1 a 2mm y muestran una zona opaca, húmedas y con un halo claro (de proteólisis) alrededor de la colonia. Reincubar las placas a 35°C ± 1°C, por otras 22 a 24h y marcar las nuevas colonias típicas.

Seleccionar las placas que tengan entre 15 y 150 colonias típicas y atípicas de *S. aureus*; si no es posible, seleccionar las placas de las diluciones más altas no obstante tengan más de 150 colonias. Seleccionar de cada placa 5 colonias típicas y 5 colonias atípicas, para su confirmación.

Cuando las placas tengan menos de 15 colonias típicas se debe agregar la nota de "valor estimado" al reporte de los resultados.

Confirmación: Prueba de Coagulasa.

Seleccionar y sembrar cada colonia típica en tubos con 0.5mL de BHI y en tubos con AST. Utilizar simultáneamente un control positivo de *S. aureus* y un control negativo de *S. epidermidis*. Incubar a 35°C ± 1°C en baño de agua, durante 20 a 24h. Mantener los cultivos en AST a no más de 27°C ± 1°C para pruebas posteriores. Agregar a 0.1mL del cultivo anterior a 0.3mL de plasma de conejo con EDTA (a menos que el fabricante indique otras cantidades). Incubar a 35°C ± 1°C en baño de agua y observar periódicamente a intervalos de 1h durante las primeras 4 a 6h; si no hay formación de coágulo, observar hasta las 24h. Considerar la prueba positiva cuando el coágulo se forma completamente y es firme al invertir el tubo. En otro caso se deberán realizar las pruebas auxiliares.

Pruebas auxiliares.

Realizar una tinción de Gram a cada cultivo observar al microscopio y observar la presencia de cocos Gram positivos.

Prueba de catalasa. A partir de un cultivo en AST realizar la prueba de la catalasa en un portaobjetos, emulsificar una porción del cultivo con 1 gota de peróxido de hidrógeno al 30%. Observar la producción de burbujas de gas.

Utilización anaeróbica del manitol. Inocular un tubo con caldo para la fermentación adicionadode manitol al (0.5%), con un inóculo abundante. Cubrir el caldo con una capa de aceite de parafina o aceite mineral de al menos 25mm. Incubar hasta 5 días a 37°C ±

1°C. Un cambio en la coloración del indicador indica la utilización anaeróbica del manitol y la presencia *S. aureus*. Incluir los controles positivos y negativos.

Utilización anaeróbica de la glucosa. Inocular un tubo con caldo para la fermentación adicionado de glucosa al (0.5%), con un inóculo abundante. Cubrir el caldo con una capa de aceite de parafina o aceite mineral de al menos 25mm. Incubar hasta 5 días a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Un cambio en la coloración del indicador indica la utilización anaeróbica de la glucosa y la presencia *S. aureus*. Incluir los controles positivos y negativos.

Prueba de termonucleasa. Preparar portaobjetos con 3mL de agar azul de toluidina-ADN. Con ayuda de una pipeta Pasteur hacer orificios equidistantes en el agar. En un baño de agua hirviendo calentar durante 15 min, 0.3 mL de cultivo en BHI. Utilizando una pipeta Pasteur transferir una gota del cultivo a un orificio del medio, repetir para cada cepa incluyendo testigos positivo y negativo. Incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en cámara húmeda de 4 a 24h. La aparición de un halo color rosa extendido de por lo menos 1mm alrededor de la perforación se califica como positiva la prueba.

Apéndice Normativo H.

Método aprobado para la estimación de la densidad de Coliformes Fecales y E. coli por la técnica del número más probable presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua.

Pesar 25g o 50g del alimento en 225 o 450mL de regulador de fosfatos

Preparar diluciones decimales con regulador de fosfatos. La cantidad de diluciones dependerá de la densidad de coliformes esperada. Agitar las diluciones 25 veces en un arco de 30cm por 7 seg transferir volúmenes de 1mL a 3 tubos con 10mL de caldo lauril sulfato de sodio por cada dilución por lo menos tres diluciones consecutivas (el volumen que se transfiera nunca debe ser menor del 10% de la capacidad total de la pipeta). Mantener la pipeta en ángulo de tal manera que descansa sobre el borde del tubo. El tiempo entre la homogeneización de la muestra y la inoculación de los tubos no debe exceder de 15 a 20 min.

Utilizar como medio de enriquecimiento caldo lauril triptosa, una vez inoculados incubar a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Examinar los tubos a las 24h y observar si hay formación de gas. Anotar los resultados. Si la formación de gas no se observa, incubar 24h más y anotar los resultados.

Prueba confirmativa. De cada tubo que muestre formación de gas, tomar una asada y sembrar en un número igual de tubos con el medio indicado para la prueba confirmativa; para bacterias Coliformes totales, utilizar el caldo verde brillante lactosa bilis y para coliformes fecales utilizar EC. Inocular en tubos de EC un control positivo de E. coli y un control negativo de Enterobacter aerogenes e incubar con las muestras.

Incubar los tubos para prueba de coliformes totales a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por $48 \pm 2\text{h}$ y para la prueba de coliformes fecales a $45.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ en baño de agua con recirculación continua durante 24h, observar si hay formación de gas, registrar la lectura, en caso de no haber formación de gas, incubar 24h más. Utilizar estos resultados para calcular el NMP de coliformes totales y coliformes fecales respetivamente. Consultar la sección de cálculos.

Prueba complementaria.

Esta es una prueba optativa de calidad para todas las muestras de agua que tiene como objetivo confirmar el 10% de los tubos positivos de coliformes totales en caldo verde brillante. Tomar una asada de cada uno de los tubos positivos de caldo verde brillante y sembrar por estría cruzada en agar Mc Conkey. Incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por $24\text{h} \pm 2\text{h}$. Observar las colonias típicas fermentadoras de color rojo que pueden estar rodeadas de un halo opaco de precipitación de sales biliares.

Seleccionar 1 o más colonias aisladas con las características anteriores o lo más parecido a estadescripción e inocular igual número de tubos de fermentación con caldo lauril triptosa y a tubos con agar nutritivo inclinado; Incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ examinar los tubos a las 24h y observar si hay formación de gas.

Anotar los resultados. Si la formación de gas no se observa, incubar 24h más y anotar los resultados.

Realizar tinción de Gram a partir del crecimiento en el agar nutritivo para observación de la morfología microscópica de las colonias.

La formación de gas en los tubos de caldo lauril sulfato dentro de las $48\text{h} \pm 3\text{h}$ y la observación de bacterias Gram negativas, en forma de bacilos no esporulados constituyen una prueba positiva a la presencia del grupo coliforme.

Prueba confirmativa para *E. coli* (por identificación bioquímica).

Prueba presuntiva.

Tomar una asada de cada uno de los tubos positivos de caldo EC y sembrar por estría cruzada en agar EMB-L para su aislamiento. Incubar las placas invertidas a 35°C por 18-24h. Seleccionar dos colonias de cada plaza con la morfología colonial típica: colonias con centro negro, planas con o sin brillo metálico y sembrarlas en agar cuenta estándar (placa o agar inclinado), para realizar las pruebas de morfología microscópica y pruebas bioquímicas. Incubar las placas o tubos a 35°C por 18 a 24h.

Si no hay colonias con morfología típica, probar una o más colonias lo más parecido a *E. coli* de cada placa. Realizar un frotis y teñirlo por Gram. Observar al microscopio la presencia de bacilos cortos Gram negativos.

Pruebas bioquímicas: Indol, Rojo de metilo, VP, citrato.

Producción de indol. Inocular un tubo con caldo triptona e incubarlo a 35 ± 0.5°C por 24 ± 2h. Adicionar 0.2 – 0.3mL de reactivo de Kovacs. La presencia de una coloración roja en la superficie del tubo se considera una prueba positiva.

VP. Inocular un tubo con caldo MR-VP e incubar a 35 ± 0.5°C por 48 ± 2h. Transferir 1mL a un tubo de 13 x 100mm. Adicionar 0.6mL de solución alfa naftol y 0.2mL de KOH al 40% y agitar. Se considera una prueba positiva cuando se desarrolla un color rojo rosado de 15 a 30 min.

Rojo de metilo. Inocular un tubo adicional con caldo MR-VP e incubar a 35°C ± 0.5°C por 48 ± 2h. Adicionar 5 gotas de solución de solución de rojo de metilo. Se considera una prueba positiva cuando se desarrolla un color rojo. Un color amarillo definido es una prueba negativa.

Citrato. Sembrar citrato de Simmons el cual se debe inocular por estría. Incubar 35°C ± 0.5°C por 48h. Una prueba positiva se observa mediante crecimiento y un cambio a coloración azul; la ausencia de crecimiento se considera una prueba negativa.

Interpretación de resultados de las pruebas bioquímicas.

Todos los cultivos que fermenten la lactosa con producción de gas dentro de las 48h a 35°C, sean bacilos o bacilos cortos Gram negativos no esporulados y se obtengan las siguientes combinaciones para el IMViC:

Pruebas	Biotipo 1*	Biotipo 2*
Indol	+	-
RM	+	+
VP	-	-
Citrato	-	-

* Son consideradas como *E. coli*.

AutoSCAN-4



Figura 17. Sistema de microbiología AutoSCAN-4

Características

Sistema Semi- Automatizado para la Identificación y/o susceptibilidad (MIC) de bacterias y/o levaduras presentes en muestras biológicas (estériles o contaminadas) de pacientes o ambientales.

Principio	Páneles Deshidratados
Tipo de Lectura	Colorimétrica de Paneles
Software	LabPro en Español para procesar información, validación de Identificación y Sensibilidad así como resistencias cruzadas, en ambiente Windows, Control de Calidad Integrado. Además LabPro es un Software capaz de realizar el análisis epidemiológico de los microorganismos aislados en su Hospital y/o Laboratorio en tan sólo minutos sin necesidad de otros dispositivos, puede también exportar a Excel toda la información epidemiológica y procesarla libremente realizando filtros, gráficos y presentaciones en Power Point.

La identificación de los microorganismos se basa en la detección de cambios de pH por la utilización de sustratos.

Se utilizan paneles convencionales deshidratados combo gram-negativo y gram-positivo que contiene 28 pozos con pruebas bioquímicas, los cuales después de 24 hrs de incubación a 35°C, se obtienen resultados.

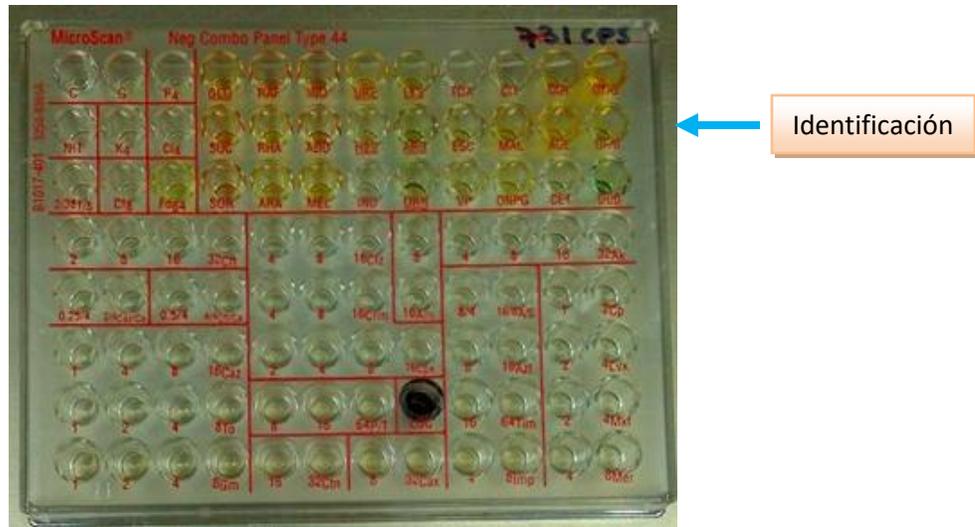
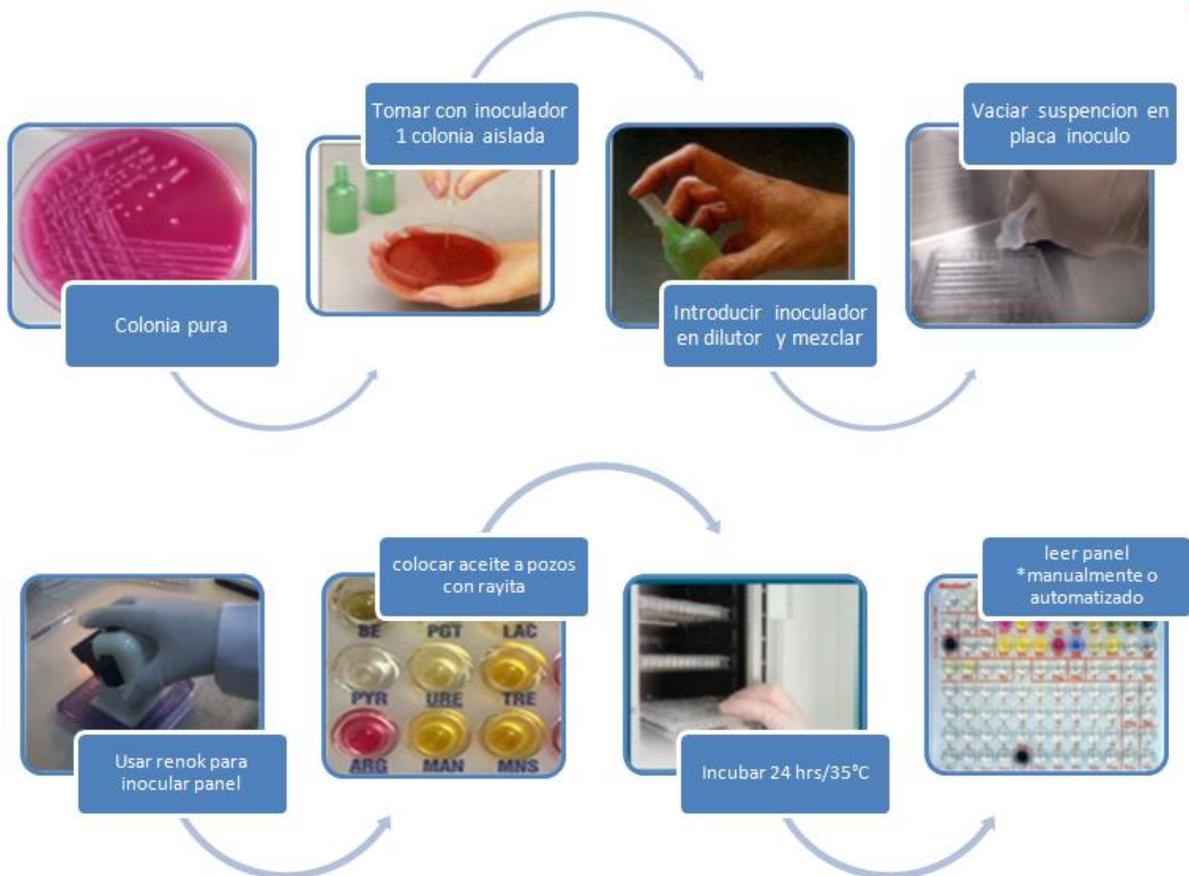


Figura18. Panel MicroScan combo negativo



*Lectura de bioquímicas por cambio de color

Figura 19. Método para la identificación bioquímica

Tabla9. Características para distinguir *Staphylococcus schleiferi subespecie coagulans* de *Staphylococcus aureus*

Característica	<i>Staphylococcus schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Crecimiento aerobico	+	+
Plasma de conejo coagulado	+	+
Nucleasa estable al calor	+	+
Hemolisinas	+	+
Producción de acetoína	+	+
Producción de hialuronidasa	-	+
Acido producido a partir de:		
Sacarosa	d	+
Maltosa	-	+
Galactosa	+	+
D-manitol	d	+
D-trehalosa	-	+
D-ribosa	+	+

d: 89% de las cepas son positivas

Tabla 10. Identificación de *Staphylococcus haemolyticus*

Prueba	Resultado
DNAsa	-
Coagulasa	-
Novoviocina	S
Ureasa	-
PYR	+
Ornitina	-
Manosa	-
Trehalosa	+
Manitol	V

S: Sensible, V:variable +/-

Tabla 11. Identificación de *Staphylococcus sciuri*

Prueba	Resultado
Coagulasa	-
Ureasa	-
Sacarosa	+
D-xilitol	+
D-manosa	+
D-manitol	+
Maltosa	+
Trehalosa	+
D-fructosa	+
V-P	-
Reducción de nitrato	+