



**UNIVERSIDAD POPULAR AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE PUEBLA**

FACULTAD DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**BÚSQUEDA, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR
DE *Staphylococcus aureus* ENTEROTOXIGÉNICA EN QUESOS
FRESCOS DE ELABORACIÓN ARTESANAL EN LA CIUDAD DE
PUEBLA**

**TESIS PROFESIONAL
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

Abril Monserrat Arauz Ojeda

Director:

cDr. Alfredo Cesar Benítez Rojas

Co- Director:

Dr. Elie Girgis El Kassis

Puebla, Pue., México

Abril 2019



UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyla**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de textos, imágenes, gráficas, 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 de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis padres, grandes ejemplos a seguir, por todo el apoyo, confianza, amor y comprensión que me brindaron durante mi periodo académico, por formar mi persona, porque sin su motivación, valores y consejos no podría haber hecho esto posible y concluir mis estudios y proyectos de vida de manera exitosa.

A mi director de tesis Alfredo Cesar Rojas Benítez por el tiempo que me dedico para poder aclarar mis dudas, por la confianza que depósito en mí para realizar el proyecto juntos y por el apoyo económico para poder realizar la investigación, ya que sin ello no podría haberlo concluido.

A mi codirector Elie Girgis El Kassis por apoyarme en la parte molecular del proyecto, por sus enseñanzas, paciencia y tiempo dedicado en el laboratorio para aclarar mis dudas cuando me estancaba.

A mi coordinadora Beatriz Pérez Armendáriz y el departamento de investigación y posgrados de la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla por las facilidades que me proporcionaron durante el desarrollo del proyecto en el laboratorio de investigación.

A la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla por ser mi casa de estudios, con la cual quedo totalmente agradecida por tan buenos catedráticos, estancia y aprendizaje que me brindo para terminar forjar la persona quien soy.

Finalmente, quiero agradecer a mis amigos ya que han sido una parte fundamental en mi vida, por ser más que amigos, hermanos que siempre estuvieron apoyándome y alentándome en mis metas profesionales y personales, sin ellos a mi lado no hubiera sido lo mismo.

RESUMEN

Staphylococcus aureus es el microorganismo responsable de muchas infecciones atópicas tanto a nivel intestinal como de la piel. Se considera como uno de los principales agentes causantes de intoxicación alimentaria por la variedad de sus enterotoxinas (Singh S., Anwar S., Sharma H., Chaudhary U., Verma S., 2014) por lo que su presencia en el alimento representa un alto riesgo a la salud pública. El objetivo del presente trabajo fué realizar la búsqueda, aislamiento e identificación con métodos moleculares de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénica en quesos frescos de elaboración artesanal en el municipio de Puebla. Para ello se monitorearon 23 piezas de queso de elaboración artesanal recolectadas de 6 de los principales mercados de la ciudad de Puebla y mediante siembra directa en placa sobre agar Baird-Parker con pruebas confirmatorias tradicionales como la tinción de Gram, prueba de la catalasa y prueba de la coagulasa, se seleccionaron aquellas muestras que fueron catalasa y coagulasa positivas para posteriormente, por medio de PCR punto final se identificó la presencia del gen FemA, gen de referencia para cepas *S. aureus* positivas. Finalmente se realizó la detección de las enterotoxinas A, B, C, D y E, principales causantes de la infección estafilocócica. De las 23 muestras analizadas, 7 muestras de queso fresco artesanal fueron positivas a *S. aureus* enterotoxigénica donde 4 muestras resultaron positivas a la presencia de la enterotoxina A y 5 resultaron positivas a la presencia de la enterotoxina C, presentándose ambas enterotoxinas en 2 muestras en particular. De los resultados obtenidos se concluyó que hubo incumplimiento de la **NOM-243-SSA1-2010** que establece que los quesos frescos de elaboración artesanal deben ser negativos a la enterotoxina estafilocócica para su comercio y se propone un método molecular de detección de *S. aureus* en alimentos con nuevas condiciones para PCR.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas, queso fresco artesanal, salud pública.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is the microorganism responsible for many atopic infections both intestinal and skin. It is considered as one of the main causative agents of food poisoning by the variety of its enterotoxins (Singh S., Anwar S., Sharma H., Chaudhary U., Verma S., 2014) so its presence in the food represents a high risk to public health. The objective of this work was to search, isolate and identify molecular enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in fresh cheeses made in the city of Puebla. To this end, 23 pieces of hand-crafted cheese collected from 6 of the main markets of the city of Puebla were monitored and by direct plating on Baird-Parker agar with traditional confirmatory tests such as Gram stain, catalase test and coagulase test, samples were selected that were catalase and coagulase positive for later, by means of PCR the presence of the FemA gene was identified, reference gene for *S. aureus* positive strains. Finally, the detection of enterotoxins A, B, C, D and E, the main cause of staphylococcal infection, was carried out. Of the 23 samples analyzed, 7 samples of artisanal fresh cheese were positive for enterotoxigenic *S. aureus*, where 4 samples were positive for the presence of enterotoxin A and 5 were positive for the presence of enterotoxin C, both enterotoxins being present in 2 samples in particular. From the results obtained, it was concluded that there was a noncompliance with **NOM-243-SSA1-2010** that establishes that fresh artisanal cheeses must be negative for staphylococcal enterotoxin for trade and a molecular method of detection of *S. aureus* in foods with new conditions for PCR is proposed.

Key words: *Staphylococcus aureus*, enterotoxins, artisanal fresh cheese, public health.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
Índice general	3
Índice de diagramas y tablas.....	6
Índice de imágenes y figuras	7
INTRODUCCIÓN	9
CAPITULO 1. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES.....	11
1.1. Inocuidad en los alimentos.....	12
1.1.1. ETAs (Enfermedades Transmitidas por Alimentos).....	14
1.1.2. Intoxicación alimentaria por <i>Staphylococcus aureus</i>	15
1.2. Microorganismos de la leche y productos lácteos.....	18
1.2.1. Microbiota inicial.....	19
1.2.2. Procesado inicial	21
1.2.3. Producto lácteo: Queso.....	23
1.2.3.1. Clasificación y criterios de clasificación.....	24
1.2.4. Queso fresco	24
1.2.4.1. Elaboración artesanal del queso fresco	25
1.2.4.2. Disposiciones y especificaciones sanitarias	27
1.2.4.3. Especificaciones microbiológicas	28
1.2.5. Comercio de queso fresco en México	29
1.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	30
1.3.1. Historia	30
1.3.2. Taxonomía.....	32
1.3.3. Patogenicidad (enterotoxinas)	32
1.4. Búsqueda e identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> en alimentos.....	36
1.4.1. Pruebas Bioquímicas: Prueba de la Catalasa	37
1.4.2. Pruebas Bioquímicas: Prueba de la Coagulasa	37

1.4.3.	Pruebas Moleculares: ELISA.....	40
1.4.4.	Pruebas Moleculares: Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	41
1.4.5.	Electroforesis	46
1.4.5.1	Electroforesis Convencional	46
1.4.5.2.	Electroforesis Capilar.....	48
2.	Capítulo 2. JUSTIFICACIÓN	50
3.	Capítulo 3. HIPÓTESIS	52
4.	Capítulo 4. OBJETIVO GENERAL	53
5.	Capítulo 5. OBJETIVOS PARTICULARES	53
6.	Capítulo 6. ALCANCES Y LIMITACIONES	54
7.	Capítulo 7. METODOLOGÍA.....	55
7.1.	Metodología del muestreo y preparación de muestras	55
7.2.	Estandarización de los métodos de conteo de bacterias	55
7.3.	Búsqueda y aislamiento de cepas <i>Staphylococcus aureus</i> presentes en alimentos.	
7.4.	Identificación y determinación de genes de enterotoxinas (A, B, C, D, E y FemA)	55
7.4.1.	Extracción de DNA.....	55
7.4.2.	Identificación de genes de enterotoxinas por PCR punto final	55
7.4.3.	Determinación de enterotoxinas mediante electroforesis en gel de agarosa	56
7.5.	Análisis de los resultados y conclusiones	57
7.5.1.	Análisis de los resultados mediante estadísticas.....	57
7.5.2.	Observar cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1- 2010.....	57
	Capítulo 8. Discusión y resultados.....	58
	Capítulo 9. BIBLIOGRAFÍA	86
	ANEXOS.....	92

ANEXO A1. NORMA Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba	93
ANEXO A2.- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-110-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	122
ANEXO A3.- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-092-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA	131
ANEXO A4.- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-115-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN ALIMENTOS.....	140
ANEXO A5.- E. Protocolo de purificación de ADN genómico de bacterias gram positivas	155
ANEXO A6. - Thermo Scientific GeneRuler 100 bp & 1 Kb DNA Ladder	157

ÍNDICE DE TABLAS Y DIAGRAMAS.

DIAGRAMAS

Diagrama 1.- Esquema general de las intoxicaciones alimentarias más frecuentes	16
--	----

TABLAS

Tabla 1. Inhibidores bacterianos en leche	28
Tabla 2. Temperaturas y tiempos para tratamiento térmico de la leche, fórmula láctea o producto combinado.....	28
Tabla 3. Límites máximos de contenido microbiano para quesos frescos.....	29
Tabla 4. Límites para el crecimiento de <i>S. aureus</i> y la producción de enterotoxina	35
Tabla 5. DNasa de <i>S. aureus</i> subespecie <i>aureus</i>	39
Tabla 6. Lista de mercados y quesos de elaboración artesanal muestreados en el municipio de Puebla	60
Tabla 7. Límites máximos de contenido microbiano para quesos frescos.....	61
Tabla 8. Secuencias de nucleótidos, ubicación de genes y tamaños anticipados de productos de PCR para <i>primers</i> de oligonucleótidos específicos de genes de <i>S. aureus</i> utilizados en este estudio	70

ÍNDICE DE IMÁGENES Y FIGURAS

IMAGENES

Imagen 1. Electroforesis convencional	47
Imagen 2. Electroforesis capilar	49
Imagen 3. Aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i> en Baird-Paker con emulsión de yema de huevo y telurito de potasio	62
Imagen 4. Tinción Gram de cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i>	63
Imagen 5. Prueba de la catalasa positiva con peróxido de hidrogeno al 30%.....	64
Imagen 6. Formación de coagulo en plasma de conejo confirmando prueba de la coagulasa como positiva.....	67
Imagen 7. Presencia de gen FemA mediante PCR en muestras positivas a la prueba de la coagulasa	72
Imagen 8. Multiplex PCR para la detección de enterotoxinas A, B, C, D, E y gen de referencia FemA	75
Imagen 9. PCR punto final para detección de la enterotoxina A	77
Imagen 10. PCR punto final para detección de la enterotoxina C.....	80

FIGURAS

Figura 8.1 Recuento del número de quesos artesanales muestreados en el municipio de Puebla.....	59
Figura 8.2. Comparación de resultados de la prueba de la catalasa a partir de muestras de colonias S. aureus seleccionadas	65
Figura 8.3. Comparación de resultados de la prueba de la coagulasa a partir de muestras de colonias S. aureus catalasa positiva	68
Figura 8.4. Recuento de muestras positivas a <i>Staphylococcus aureus</i> enterotoxigénica por Mercado.....	69
Figura 8.5. Recuento de muestras positivas para la enterotoxina estafilocócica A.....	79
Figura 8.6. Recuento de muestras positivas para la enterotoxina estafilocócica C	82

Figura 8.7. Recuento total de muestras positivas para las enterotoxinas estafilocócicas A, B, C, D y E 83

INTRODUCCIÓN

Los brotes de infección alimentaria por bacterias en alimentos son muy comunes hoy en día, dentro de las ETAs (Enfermedades Bacterianas producidas por Alimentos) uno de los microorganismos que con mayor frecuencia ocasiona intoxicación alimentaria es *Staphylococcus aureus*, el cual es un coco Gram positivo con súper antígenos tóxicos y hemolisina (Chans G., 2002). Entre los alimentos implicados contaminados más habitualmente se encuentran los productos lácteos y aquellos que requieren de la manipulación de quien los produce.

En este trabajo se hará referencia a un tipo de alimento que es el queso fresco elaborado artesanalmente, en los cuales dentro de las malas prácticas que se cometen, destacan el empleo de materia prima inadecuada y sin ningún tratamiento de higienización, condiciones sanitarias inapropiadas durante el proceso, deficiente refrigeración en el producto terminado y ausencia de empaque adecuado. (Ramírez Miranda I., 2011)

Debido a que *Staphylococcus aureus* es un patógeno con gran potencial para causar múltiples infecciones en el humano y que los quesos de elaboración artesanal comercializados en el país , no cuentan con estándares higiénicos y sanitarios mínimos requeridos por la industria alimentaria, es posible que estos sean un vehículo de transmisión de cepas enterotoxigénicas de *S. aureus*. (Ramírez Miranda I., 2011) Por lo tanto se hará la búsqueda, aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénica en quesos frescos de elaboración artesanal y comercializados en el municipio de Puebla por medio de pruebas bioquímicas y moleculares que busquen al microorganismo enterotoxigénico en piezas de queso de elaboración artesanal provenientes de 6 de los principales mercados comerciales en el municipio de Puebla.

La metodología de identificación del microorganismo estará basada en 3 Normas Oficiales Mexicanas, la **NOM-110-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO**, la cual se basa en la preparación de diluciones primarias, para obtener una distribución lo más uniforme posible de los microorganismos presentes en la porción de muestra, la **NOM-092-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO**

PARA LA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA, esta norma nos ayuda a estimar la cantidad de microorganismos viables presentes en un alimento, incubado aeróbicamente y finalmente la **NOM-115-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. METODO PARA LA DETERMINACION DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN ALIMENTOS**, la cual permite hacer una estimación del contenido de *Staphylococcus aureus* en alimentos. Dentro de la norma se encuentra la prueba de la catalasa y la prueba de la coagulasa, las cuales se consideran pruebas de confirmación donde se identificará la presencia de *S. aureus* enterotoxigénica en quesos elaborados artesanalmente como objetivo, posteriormente se buscaran los genes responsables de la producción de enterotoxinas en muestras de cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* en queso fresco mediante la técnica molecular de PCR y así rectificar que los resultados obtenidos en nuestras cepas aisladas son correctos.

Finalmente con los resultados obtenidos se hará un análisis estadístico donde se va observar el cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, productos lácteos combinados y derivados lácteos en los productos analizados y así deducir la peligrosidad que tiene su consumo para la salud pública.

CAPITULO 1

MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

1.1. Inocuidad en los alimentos

De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), todos los países necesitan contar con programas de control de alimentos para garantizar que los suministros nacionales sean inocuos, de buena calidad y estén disponibles en cantidades adecuadas y precios asequibles, para asegurar que todos los grupos de la población puedan gozar de un estado de salud y nutrición aceptable.

El control de alimentos incluye todas las actividades que se lleven a cabo para asegurar la calidad, la inocuidad y la presentación honesta del alimento en todas las etapas, desde la producción primaria, pasando por la elaboración y almacenamiento, hasta la comercialización y el consumo. El control de alimentos incluye todas las iniciativas nacionales que se emprenden de conformidad con un procedimiento integrado, en el que participan el gobierno y todos los segmentos y sectores de la industria alimentaria. El control de alimentos está vinculado con la mejora de la salud de la población, el potencial de desarrollo económico del país y la disminución del deterioro y de las pérdidas de alimentos.

El Instituto de Salud Pública define la inocuidad de un alimento como la garantía de que no causará daño al consumidor, cuando sea preparado o ingerido y de acuerdo con el uso a que se destine. Es uno de los cuatro grupos básicos de características que junto con las nutricionales, organolépticas y comerciales componen la calidad de los alimentos.

Existen diferentes formas por las cuales se puede contaminar un alimento, contaminación química, contaminación física y contaminación biológica, para esto se define contaminación como toda materia que se incorpora al alimento sin ser propia del mismo y que tiene la capacidad de producir enfermedades a quien lo consume. (FAO, 2016)

La contaminación química generalmente ocurre en el lugar de producción primaria del alimento, ya sea por residuos que quedan de sustancias utilizadas para controlar plagas en cultivos o sustancias como drogas veterinarias en animales enfermos que posteriormente

son sacrificados, también puede darse de manera accidental durante etapas como de transporte, almacenamiento o elaboración propiamente del alimento al hacer contacto con sustancias tóxicas como plaguicidas, combustibles, lubricantes, pinturas, detergentes, desinfectantes u otros.

La contaminación física puede surgir por diferentes tipos de materias extrañas que pueden contaminar el alimento como partículas de metal desprendidas por utensilios o equipos, pedazos de madera procedentes de empaques o de tarimas, anillos, lapiceros, pulseras u otros objetos que pueden caer en el alimento y contaminarlo. Algunos contaminantes físicos como del tipo metal o vidrio son potencialmente capaces de producir heridas a quien ingiere el alimento contaminado por este tipo de objetos.

La contaminación biológica es otro tipo de contaminación en alimentos que incluye a las bacterias, parásitos y virus, principalmente constituido por bacterias por su capacidad de reproducirse sobre un alimento a tal cantidad que enferma a la persona que lo consume o por la producción de toxinas que provocan la enfermedad. La capacidad de reproducción de una bacteria hace que en pocas horas se formen grupos o colonias de millones de bacterias que aun en esa cantidad resultan imposibles de ver a simple vista en el alimento que se ha contaminado. Existen diversas maneras por las cuales se puede contaminar el alimento, puede ser por medio de las manos del hombre, por contacto con alimentos contaminados o por superficies como mesas, recipientes, utensilios o equipos contaminados. También, puede llegar a través de plagas que posan sus patas sobre el alimento o tienen contacto con el cómo es el caso de moscas, hormigas, cucarachas, ratas o incluso animales domésticos.

Según la OMS, cada año enferman millones de personas, muchas de las cuales mueren, por ingerir alimentos insalubres. En el decenio pasado hubo brotes graves de enfermedades transmitidas por los alimentos en todos los continentes, y en muchos países la frecuencia de esas enfermedades está aumentando de forma significativa es por ello que este tema es de gran interés a nivel mundial.

En un informe de la Secretaria de la OMS, se comunicó que los centros de control y prevención de enfermedades, de los Estados Unidos de América, estimaban que esas enfermedades pueden afectar cada año hasta a un 30% de la población de los países industrializados; se calculaba que cada año, 1,7 millones de niños de entre cero y 15 años mueren de diarrea causada por microorganismos presentes en el agua o alimentos.

Geoffrey C. Mrema, director de la división de Infraestructura Rural y Agroindustrias, menciona que las enfermedades transmitidas por los alimentos son un problema que debe ser considerado en un ámbito de carácter social, tecnológico, económico, cultural y político. (Koooper, G., Calderón, G., Schneider, S., Domínguez, W., Gutiérrez, G., 2009).

1.1.1. Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs)

Las ETAs son aquellas enfermedades que se originan por la ingestión de alimentos infectados con contaminantes en cantidades suficientes para afectar la salud del consumidor. Existen numerosos tipos de ETAs que presentan diferentes sintomatologías, dependientes del tipo de contaminación y de la cantidad de alimento contaminado consumido. Los signos más comunes son vómitos y diarreas pero también pueden presentarse dolores abdominales, dolor de cabeza, fiebre, síntomas neurológicos, visión doble y otros. Además, ciertas ETAs pueden generar enfermedades crónicas a largo plazo tales como daños renales, artritis, meningitis, aborto y, en casos extremos, la muerte. Las ETAs se pueden manifestar de diversas formas y se debe distinguir entre infección alimentaria e intoxicación. (Kopper, 2009).

Las infecciones alimentarias son enfermedades causadas por la ingestión de alimentos que contienen microorganismos vivos perjudiciales, generalmente son determinadas por la invasión, multiplicación y alteraciones de los tejidos del huésped producidas por los gérmenes transportados por los alimentos. Una infección de origen alimentario puede ocurrir de dos maneras.

La primera ocurre cuando se ingiere un alimento contaminado por un microorganismo, se establece en el organismo de la persona y se multiplica. Las bacterias en general penetran la

mucosa intestinal y allí es donde se multiplican causando daños, algunas permanecen solamente en esa mucosa y otras invaden al sistema circulatorio diseminándose por distintos órganos. Las bacterias además poseen factores de adherencia o colonización que les permite multiplicarse en sitios específicos no siendo alteradas ni por el peristaltismo ni por el flujo de mucus o alimentos en suspensión. Cabe mencionar que no todos los alimentos contaminados llegan a ser infecciosos. La segunda manera se da si el alimento contaminado constituye un sustrato adecuado para la multiplicación microbiana y tiene las condiciones ambientales adecuadas, entonces se transforma en infeccioso dado a que la dosis es suficiente para causar una enfermedad. Los virus por ser parásitos intracelulares, no se replican en los alimentos.

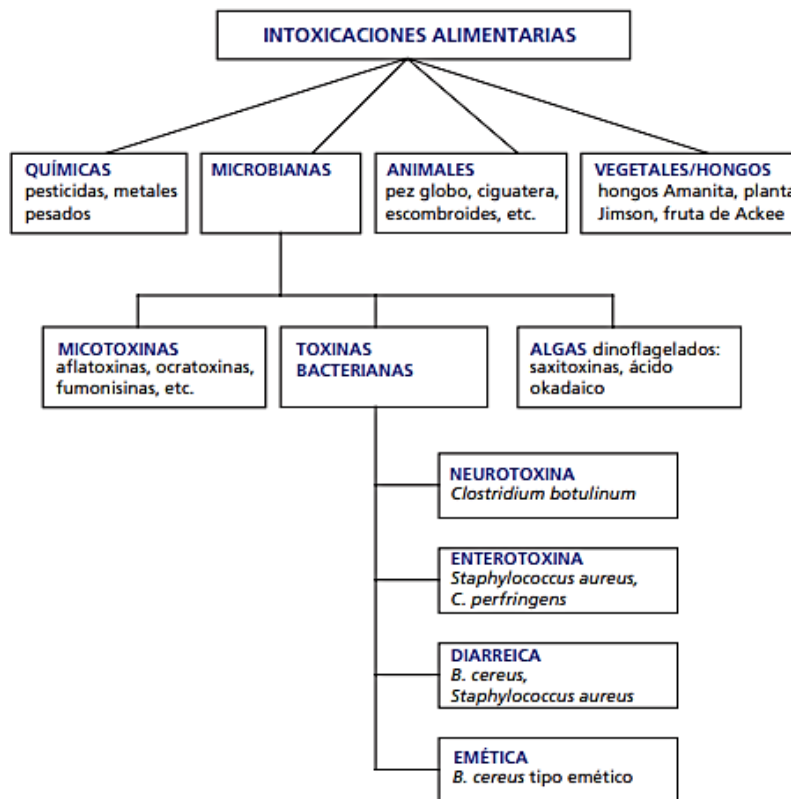
Ahora, las intoxicaciones alimentarias, son las enfermedades generadas al ingerir un alimento en el que se encuentra la toxina o veneno formado en tejidos de planta o animales o como metabolito de los microorganismos. Dentro de estas intoxicaciones podemos encontrar el botulismo, la intoxicación estafilocócica o por toxinas producidas por hongos o especies marinas. Las intoxicaciones causadas por sustancias químicas también son incluidas ya que estas son incorporadas al alimento en forma accidental o intencionalmente.

Un alimento es intoxicante cuando ha sido contaminado con microorganismos que al multiplicarse producen una exotoxina, en estos casos el alimento debe presentar condiciones apropiadas para permitir la reproducción del microorganismo y la liberación de toxinas. Un ejemplo de microorganismos presentes en esta categoría destacan *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* tipo emético.

1.1.2. Intoxicación alimentaria por *Staphylococcus aureus*

La FAO en el 2009 muestra en un diagrama general, las intoxicaciones alimentarias más frecuentes y dentro de las microbianas destacan 4 toxinas bacterianas, la primera es la neurotoxina de *Clostridium botulinum*, la segunda por enterotoxina de *Staphylococcus aureus* y *C. perfringes*, la tercera por una toxina diarreica en *B. cereus* y *Staphylococcus aureus* y finalmente la toxina emética de *B. cereus*, puede observarse en el Diagrama 1.

Diagrama 1.- Esquema general de las intoxicaciones alimentarias más frecuentes



FAO, (2009) *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico* [Diagrama].

Recuperado de: https://guzlop-editoras.com/web_des/med01/nutricion/pld1807.pdf

De los brotes de intoxicación que se presentan, en promedio, el 20% se debe al consumo de alimentos contaminados con *S. aureus*. El corto período de incubación de 1-6 horas orienta a la sospecha de enfermedad producida por ingestión de una o más enterotoxinas preformadas en el alimento que ha sido contaminado con cepas de *S. aureus* productor de la misma. Es predominantemente en verano, y el organismo responsable es generalmente aislado de personas involucradas en la preparación del alimento.

La enfermedad estafilocócica transmitida por alimentos, resulta de la ingestión de enterotoxinas termoestables preformadas por una cepa toxigénica de *Staphylococcus aureus*

que contaminó y desarrolló en el alimento y que una vez ingerida causa la secreción intestinal de agua e iones. No se absorbe en el intestino por lo que no produce inmunización. Los individuos que sufren intoxicación estafilocócica presentan náuseas, vómitos, calambres abdominales, ocasionalmente diarrea, malestar general y dolor de cabeza, pero no fiebre. Estos signos y síntomas pueden aparecer entre los 30 minutos y las 8 horas después de haber consumido el alimento. Esta intoxicación no es considerada como una enfermedad grave; sin embargo, se han presentado muertes, principalmente en ancianos y niños. Su grado de severidad depende de la cantidad de enterotoxina ingerida, el estado inmunológico del individuo y su edad, de tal manera, que no se tiene un dato exacto de la cantidad de enterotoxina que produce la intoxicación, aunque se han estimado que es desde 100 ng hasta 1 mg. Las cepas que lo producen con más frecuencia son la A y con menos frecuencia B, C, D, E, pero no la F. No existe riesgo de transmisión secundaria, y no es necesario eliminar los estafilococos ingeridos. El diagnóstico se hace por cultivo del vómito o las heces.

Debido a esto, actualmente la OMS busca mejorar la calidad y el control sanitario de muchos productos con el objetivo de mejorar la inocuidad del alimento. Es importante realizar las buenas prácticas agropecuarias y de manufactura ya que son procedimientos que se aplican en la producción primaria y elaboración para garantizar alimentos inocuos. Son varios los factores que intervienen en la presentación de brotes de intoxicación. En primer término pueden señalarse las temperaturas de conservación, por negligencia o descuido, debido principalmente a fallas en los sistemas de refrigeración o congelación. Otro factor es el equipo contaminado, éste representa un peligro cuando hay deficiencias de limpieza o desinfección, así como los utensilios para la elaboración de alimentos. Un factor más se refiere a las deficiencias en la higiene personal. La mayoría de estos problemas podrían evitarse por parte de quienes manejan o preparan los alimentos, ya sea en una industria o lugar de elaboración. Entre los alimentos implicados contaminados más frecuentemente se encuentran: ensaladas de papas y huevos, pastelería, jamón, pollo, cremas heladas, y en algunos lácteos como el queso.

El queso fresco artesanal se elabora a partir de leche cruda por lo general de vacas criollas, con fermentación espontánea y corta maduración usando metodologías muy rudimentarias,

no estandarizadas. El queso fresco artesanal, dentro de la gama de productos lácteos elaborados, es el que cuenta con mayor número de microorganismos patógenos al momento de ser comercializado. Por esta razón se le asocia con mayor frecuencia con brotes de intoxicaciones alimentarias. El objetivo de la presente investigación fue el de estudiar el queso fresco artesanal alimento de la canasta básica y su calidad sanitaria en el municipio de Puebla, México.

Los productos lácteos y aquellos que requieren de la manipulación del que los produce, cuando están listos para consumo humano pueden presentar cepas enteroxigénicas de *S. aureus*.

1.2. Microorganismo de la leche y productos lácteos

La leche y productos derivados de ello tienen propiedades relevantes y de gran importancia en microorganismos. “La leche sintetizada en la glándula de los mamíferos, ha sido diseñada por la naturaleza para cubrir necesidades nutritivas específicas del lactante recién nacido. La leche de vaca tiene una composición media de aproximadamente un 87,3% de agua, 4,2% de lactosa, 3,25% de proteínas y un 0,65% de sustancias minerales”. (Ordoñez, 2001) Es importante mencionar que la composición de la leche varía ampliamente entre razas, así como entre individuos de la misma raza, esto depende de la alimentación, edad y fases de la lactación.

La importancia de los microorganismos en los productos lácteos se debe a tres razones, la primera es porque los microorganismos son los agentes responsables de sabores, aromas y características físicas de productos lácteos, como en quesos y leches fermentadas. La segunda es porque también pueden ocasionar la alteración debido al crecimiento o la producción de enzimas. Finalmente, porque en los productos lácteos contaminados con microorganismos patógenos o sus toxinas pueden constituir un gran riesgo a la salud. (Ordoñez, 2001)

Por ello, se necesita conocer y comprender las vías de contaminación de los microorganismos no deseables y los factores que influyen en su desarrollo y destrucción,

así como las tecnologías del procesado y los nuevos productos que deben ser evaluados para garantizar su seguridad.

El procesado realizado en muchas industrias lácteas está destinado a elaborar productos microbiológicamente seguros con una vida útil aceptable. Los métodos que implican este procesado son mediante la aplicación de calor o frío o ambos (pasteurización baja), el tratamiento UHT que es a temperaturas más altas, la esterilización, el enfriamiento o refrigeración y la congelación del producto. También, están los tratamientos mecánicos, la eliminación de agua, la fermentación microbiológica o bioquímica como por ejemplo en los quesos, y la combinación de estos métodos. Los diferentes productos que se obtienen de la leche se elaboran siguiendo tecnologías y procesos que en gran parte se fundamentan en el control de los riesgos microbiológicos.

1.2.1. Microbiota Inicial

La microbiota inicial en la leche se da desde que se encuentra en condiciones crudas debido a la flora mixta que deriva de diversas fuentes. Hablando desde el interior de la ubre, durante el ordeño, fenómenos hormonales junto a la presión que se aplica sobre el pezón fuerza a la leche a pasar a través del orificio del mismo, el cual puede ser una puerta de entrada de microorganismos al interior del pezón. La microbiota habitual en la ubre incluye estreptococos, estafilococos y micrococos (normalmente >50%). Sin embargo, la recontaminación puede presentarse debido a una insuficiente limpieza y desinfección del exterior de la ubre o debido a la penetración de microorganismos a través de los conductos. (Ordoñez, 2001) Se toma en cuenta que el número de bacterias en leche obtenida asépticamente de animales sanos varía ampliamente, desde unos cientos a unos miles por mililitro. De otro modo, situaciones anormales debidas a infecciones, enfermedades o hábitos de ordeño deficientes pueden afectar la microbiota de la leche recién ordeñada. Un ejemplo de ello son las vacas con mastitis, una enfermedad inflamatoria del tejido mamario, que presentan microorganismos tales como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Strep. Dysgalactiae* y *Strep. Uberis*, *E. coli* y *Actinomyces pyogenes* que son los más frecuentemente implicados en las mastitis, y estos pueden observarse directamente

al microscopio en preparaciones teñidas de leche mastítica, pudiéndose advertir con frecuencia bacterias atrapadas por leucocitos polimorfonucleares (PMN) y macrófagos.

La contaminación también se da desde superficies externas de los animales implicados, los materiales que normalmente se encuentran en el entorno del animal como el suelo, yacija, restos de alimentos y estiércol pasan, en mayor o menor extensión, a la superficie de la ubre, pezones y piel de la vaca. Por ejemplo enterobacterias del estiércol así como otros microorganismos alcanzan fácilmente la leche, por lo tanto la contribución de microorganismos de estas fuentes al recuento de la leche recién ordeñada varía dependiendo de las precauciones que se tomen en la limpieza y desinfección de dichas superficies antes del ordeño.

Por otro lado, el equipo de lechería contribuye poderosamente a la tasa total de microorganismos de la leche cruda., el cual incluye piezas de máquinas ordeñadoras, cántaras, cambiadores de calor, tanques refrigerantes para la leche de granel, tuberías para el transporte, tanques de los vehículos y otros equipos y accesorios. Muchas veces los residuos lácteos que quedan en la superficie del equipo proporcionan abundantes nutrientes para el crecimiento de muchos microorganismos, la temperatura ambiente en la que el equipo o material se almacenan es favorable para el crecimiento de los mismos y cuando el equipo se vuelve a utilizar, los microorganismos contaminan la leche siendo una negligencia ocasional que da lugar a una rápida multiplicación microbiana de microorganismos de crecimiento más veloz como lo son los lactococos, coliformes y Gram negativos. Estos llegan a ser termolábiles y se destruyen fácilmente por los desinfectantes clorados, por lo tanto, una limpieza adecuada los elimina eficazmente de las superficies evitando su acumulación. En algunos casos, las aguas muy duras o el uso de agentes de limpieza muy alcalinos favorecen la formación de costras lácteas que protegen a los microorganismos de la acción deletérea de detergentes y desinfectantes. Los micrococos, enterococos, formadores de esporas y algunos lactobacilos quedan atrapados en esta matriz e incluso se multiplican en la misma, muchos de estos son termodúricos o termorresistentes pudiendo, más tarde, causar la alteración de productos pasteurizados.

Ahora, es importante mencionar que el crecimiento de microorganismos patógenos no ocurre solamente por estas fuentes si no existen fuentes diversas tales como el aire del entorno de la sala de ordeño. Más importante que el número, es el tipo de bacteria que llega a la leche procedente del aire, que pueden sobrevivir a los tratamientos térmicos, ocasionando sabores anómalos y defectos físicos en productos procesados. Las aguas de suministro de muchas granjas contienen con frecuencia coliformes y microorganismos psicrótrofos que cuando se utiliza para enjuagar el equipo de lechería y el lavado de las vacas contribuye a ser una fuente de contaminación para la leche. También, el personal que manipula la leche y el equipo, puede aportar diversos tipos de microorganismos incluyendo los patógenos, un ejemplo de ellos son los micrococcos y estafilococos de la piel y de fosas nasales que pueden pasar a la leche sobre todo cuando se esta ordeñando.

1.2.2. Procesado inicial

El procesado inicial tiene como objetivo detener la actividad microbiana que deteriore el alimento y no permita su consumo, es una tarea que se realiza en origen, por regla general en la industria de la alimentación, y que es previa a su comercialización.

La leche contiene factores antimicrobianos inherentes que pueden inhibir o minimizar el desarrollo de microorganismos durante el transporte y el almacenamiento bajo ciertas condiciones. La lisozima es una enzima que rompe enlaces del peptidoglucano, componente principal de la pared celular bacteriana, y varía entre las diferentes bacterias. Las bacterias Gram negativas son más resistentes que las Gram positivas debido al bajo nivel de peptidoglucano que contienen en su pared celular y el lipopolisacárido de la capa más externa que ejerce un efecto protector.

La composición de la leche hace que sea un excelente medio de cultivo para muchos microorganismos al menos que se congele o se procese para destruir o prevenir su crecimiento. Cuando existen largas distancias entre granjas productoras de leche, esta debe enfriarse por debajo de los 4 °C, o más, en las 2 horas siguientes del ordeño, una recomendación viable es que se mantenga más cerca de 0° C para mejorar la calidad microbiológica.

La filtración procede a eliminar, al menos, partículas macroscópicas fecales o procedentes del suelo, sin embargo, no mejora la calidad higiénica de la leche e incluso podría hasta originar un incremento del contenido microbiano debido a contaminaciones cruzadas a través del mismo filtro. Cuando la leche cruda alcanza el sitio donde se va a procesar, lo habitual es que se purifique, se enfríe y se almacene a una temperatura no superior a los 7 °C hasta su procesado.

La homogenización de la leche cruda acelera la hidrólisis de la grasa láctea por lipasas inherentes, esto da lugar a la aparición de sabores rancios que muchas veces pueden confundirse con la alteración de origen microbiano, un ejemplo es en los quesos donde la actividad enzimática se utiliza para acelerar el desarrollo del sabor y aroma de los mismos.

La leche cruda se somete frecuentemente a un tratamiento suave el cual se le denomina termización que tiene como objetivo aumentar la vida útil de la leche cruda durante su almacenamiento a bajas temperaturas. Este tratamiento no permite un control total de los patógenos vegetativos aunque su número puede disminuir con lo que se reduce el riesgo potencial. Posteriormente se aplica la pasteurización para conseguir la seguridad microbiológica y ampliar la vida útil de la leche refrigerada ($< 6^{\circ}\text{C}$). De acuerdo a la OMS y la FAO, los productos lácteos se deben pasteurizar para lograr su seguridad minimizando el número de patógenos vegetativos, para esto se utilizan la Pasteurización Baja (LTH, por sus siglas en inglés) que va de 30 minutos más, a temperaturas entre 61 y 66 °C y Tratamientos a Alta Temperatura durante un tiempo corto (HTST, por sus siglas en inglés) es decir que van de $\geq 71^{\circ}\text{C}$ a $\leq 78^{\circ}\text{C}$ durante al menos 15 segundos, o un calentamiento muy breve, de unos pocos segundos a 85°C. Bajo estas condiciones se alcanza a reducir poblaciones bacterianas vegetativas patógenas a un nivel que se considera seguro para la salud pública.

Entre los microorganismos termodúricos se encuentran bacterias vegetativas que muestran una gran termorresistencia por lo cual los tratamientos mínimos de los procesos LTH y HTST pueden permitir la supervivencia de microorganismos esporulados y termodúricos, en particular si se están presentes en tasas elevadas, dificultando cubrir las normas

establecidas para productos pasteurizados. Los tratamientos a temperaturas elevadas se efectúan tanto en sistemas discontinuos en recipientes cerrados como de forma continua con el subsiguiente envasado aséptico. Por esta razón la esterilización de la leche debe ser bajo tratamientos de 119,5- 120 ° C durante 10 – 30 minutos, aplicándose a un nivel más bajo cuando un tratamiento UHT procede al llenado del envase.

Las superficies que contactan los alimentos pueden ser una fuente muy importante de contaminación, pero las que no contactan si están sucias pueden contribuir también. Por ello la limpieza manual debe aplicarse usando detergentes ácidos o alcalinos seguidos de un lavado y desinfección para instrumentos empleados en la manipulación y elaboración de leche y productos lácteos.

En conclusión, la operación adecuada de los programas de limpieza y desinfección debe registrarse y poner un especial cuidado en minimizar la producción de agentes contaminantes. Dicho registro puede ser manual o mediante el uso de cartas apropiadas que garanticen el registro de características físicas y químicas como lo son el tiempo, la temperatura, la velocidad de flujo, la concentración de desinfectante, el pH entre otras.

1.2.3. Producto lácteo: Queso

Uno de los alimentos mayormente consumidos por la sociedad son los quesos, ya que este producto forma parte de la pirámide nutricional, es ligero y algunos de éstos son de precio muy accesible. El queso es la modalidad más antigua de transformación industrial de la leche, proporciona proteínas ricas en aminoácidos esenciales no sintetizables por el organismo.

Los quesos son productos elaborados de la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida de 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. Algunos quesos, posterior a su proceso de elaboración, requieren mantenerse durante determinado tiempo a una temperatura específica, así como también requieren distintas condiciones que generen cambios físicos y químicos con el fin de definir su sabor particular.

1.2.3.1. Clasificación y criterios de clasificación del Queso

Hoy en día existe una gama muy amplia de quesos, los cuales Carolina Ramírez los clasifica por sus características, texturas, sabores, grado de añejamiento, curado, leche usada o contenido graso.

- a) Por contenido de humedad, se clasifican en quesos duros (20-42%), semiduros (44-55%) y blandos o suaves (aprox. 55%)
- b) De acuerdo a su estado de maduración: frescos (6 días), semi-madurados (40 días) y madurados (>70 días)
- c) De acuerdo al método de coagulación de la caseína, se clasifican en quesos al cuajo (enzimáticos), queso de coagulación láctica (ácido láctico), queso de coagulación de ambos métodos.
- d) De acuerdo al microorganismo utilizado en la maduración y la textura del queso, se clasifican en quesos de ojos redondeados, granulares y quesos de textura cerrada. (Ramírez C., 2012)

1.2.4. Queso fresco

Manuel González define queso fresco como el producto obtenido por coagulación de la leche pasteurizada, integral o parcialmente descremada, constituido esencialmente por caseína de la leche en forma de gel más o menos deshidratado, que retiene un % de la materia de grasa, según el caso, un poco de lactosa en forma de ácido láctico y una fracción variable de sustancias minerales.

La producción de queso fresco consiste esencialmente en la obtención de la cuajada, que no es más que la coagulación de la proteína de la leche (caseína) por la acción de la enzima renina o cuajo.

Esta operación se da en dos etapas:

1. Formación del gel de la caseína,
2. Deshidratación parcial de este gel por sinéresis (desuerado). (González M., 2002).

1.2.4.1. Elaboración artesanal del queso fresco

La FAO en el 2011 publicó en su manual 3 de procesos para la elaboración de productos lácteos que el queso fresco artesanal se elabora a partir de leche cruda de vaca, con fermentación espontánea y corta maduración usando prácticas muy rudimentarias y que no están estandarizadas. Los pasos para obtener un queso fresco con una buena calidad son los siguientes:

1. **PASTEURIZACIÓN:** La leche es pasteurizada a 72°C por espacio de 15 seg , aquí se asegura la destrucción de organismos patógenos, la eliminación de los microorganismos más termo sensibles, como los coliformes, inactivación de la fosfatasa alcalina, pero no así las esporas o la peroxidasa, ni las bacterias un poco más termorresistentes, como las lácticas; es decir, la leche pasteurizada todavía tiene una determinada cuenta microbiana, principalmente de bacterias lácticas (no patógenas pero si fermentativas) , y requiere de manejos estrictos de higiene y conservación.
2. **ADECUAR LA TEMPERATURA:** Antes de agregar el cloruro de calcio y el cuajo, hay que adecuar la temperatura a 37°C ya que la leche drenada del pasteurizador a la tina de cuajada tiene una temperatura mayor o menor que la requerida.
3. **AGREGAR EL CLORURO DE CALCIO:** En el proceso de pasteurización hay perdida de calcio por lo tanto esta carencia se resuelve con cloruro de calcio líquido, se dosifica 25 ml por cada 100 L de leche a una temperatura de 37°C, se le agrega a

la leche ya diluido en tres partes de su volumen en agua destilada y se distribuye en la leche mezclándolo hasta que este esté totalmente distribuido.

4. **COAGULACIÓN:** La coagulación de la leche se lleva acabo a 37 °C después de darse la pasteurización. La dosis empleada es de 7 ml por cada 100 L de leche, este cuajo antes de agregárselo a la leche se diluye en tres partes de su volumen en agua destilada. Diluido el cuajo, lo agregamos a la leche distribuyéndolo y mezclándolo bien. Agregado el cuajo, tomamos el tiempo de inicio de coagulación y esperamos 45 min.
5. **ROMPIMIENTO Y DESUERADO DE LA CUAJADA:** Este procedimiento se hace con suavidad utilizando la lira vertical y horizontal que dejará trozos de 2 cm², hay que esperar 10 min para después proceder a romper la cuajada en granos más pequeños. La cuajada debe reposar 15 min para luego drenar el 70% del suero.
6. **SALADO:** El salado se hace bajo suero. Luego de drenar el 70% del suero de la cuajada se agrega sal yodada refinada libre de impurezas, la cantidad de sal se agrega al gusto.
7. **MOLDEO:** Una vez salada la cuajada se moldea rápidamente, el moldeo se hace de forma manual bajo estrictas medidas de higiene.
8. **PRENSADO:** Como el queso elaborado es un queso fresco con un gran contenido de humedad procedemos al prensado, esto permite bajar la humedad de la cuajada, la consistencia es más firme, elimina bolsas de aire y dará cortes más lisos.
9. **EMPAQUE:** Entre el moldeo y el prensado no se debe llevar más de 30 min, tiempo clave para disminuir los riesgos de contaminación y crecimiento microbiano por manipulación y tiempo, este aspecto es muy importante para determinar el tiempo de vida de un queso dentro del empaque. El queso se empaqueta en bolsas de polietileno esterilizado con agua caliente y otros por estrategia de mercadeo y

presentación en envases plásticos de 10 oz. Estos son etiquetados con la fecha visible de elaboración y la fecha de expiración del queso.

10. ALMACENAMIENTO: El queso es almacenado dentro de un cuarto frío a temperaturas de 4°C hasta su distribución.

11. DISTRIBUCIÓN: Se distribuye a 4°C, cumpliendo así con la cadena de frío.

12. VIDA ÚTIL DEL PRODUCTO: El producto bajo temperaturas no mayores de 4°C tiene una vida útil de 12 días. (FAO, 2011)

1.2.4.2. Disposiciones y especificaciones sanitarias

La Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, productos lácteos combinados y derivados lácteos, nos confiere ciertos límites para la buena inocuidad del alimento que en este caso es para queso fresco.

Especificaciones sanitarias

La leche, que se comercialice para su consumo humano o que se emplee como materia prima para la elaboración de productos lácteos debe cumplir con lo siguiente:

- No presentar materias extrañas, conservadores ni sustancias neutralizantes.
- No coagular por ebullición.
- Presentar prueba de alcohol al 68% negativa (sólo para leche de bovino).
- Presentar prueba de inhibidores bacterianos, negativa; detectados por métodos fisicoquímicos y microbiológicos, de conformidad con la tabla 1 del presente ordenamiento.

Tabla 1. Inhibidores bacterianos en leche.

PRODUCTO	Derivados Clorados	Sales cuaternarias de amonio	Oxidantes	Formaldehído	Antibióticos
Pasteurizados	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Fuente: NOM-243-SSA1-2010. (2010). Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, productos lácteos combinados y derivados lácteos. Diario oficial de la Federación. (Ver anexo 1)

El equipo empleado para la pasteurización rápida debe contar, por lo menos, con un sistema de control y registro automático de la temperatura y tiempo del proceso, que no permita el paso del producto cuando no se haya alcanzado la temperatura mínima establecida, así mismo, un sistema en que el flujo del producto cumpla con el tiempo mínimo determinado. Termómetro de mercurio o su equivalente funcionando y calibrado, colocado al final de la "zona de sostenimiento" del equipo, en el que la terminal tenga contacto con el producto.

Tabla 2. Temperaturas y tiempos para tratamiento térmico de la leche, fórmula láctea o producto combinado.

Tratamiento	Temperatura y tiempo*
Pasteurización	Lenta 63°C / 30 min.
	Rápida 72°C / 15 seg.

Fuente: NOM-243-SSA1-2010. (2010). Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, productos lácteos combinados y derivados lácteos. Diario oficial de la Federación. (Ver anexo 1)

1.2.4.3. Especificaciones Microbiológicas

El producto objeto de esta norma no debe exceder los límites del microorganismo como objetivo de estudio (*Staphylococcus aureus*) señalados a continuación:

Tabla 3. Límites máximos de contenido microbiano para quesos frescos

Microorganismo	Límite máximo
<i>Staphylococcus aureus</i>	≤ 100 UFC/g o mL
Enterotoxina estafilococcica	Negativa

Fuente: NOM-243-SSA1-2010. (2010). Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, productos lácteos combinados y derivados lácteos. Diario oficial de la Federación. (Ver anexo 1)

Sabiendo que esto se determinará únicamente en situaciones de emergencia sanitaria, cuando la SSA de acuerdo a los resultados microbiológicos detecte su presencia, y ordene la realización de un plan de trabajo por parte del fabricante o importador para controlar la presencia.

1.2.5. Comercio de queso fresco en México

En el siglo XX, al inicio de la década de los sesenta, el crecimiento de la población urbana y el incremento de su poder adquisitivo, por efecto de la industrialización, modificaron el consumo tradicional de alimentos de la población mexicana (basado en granos básicos) y lo direccionaron hacia la demanda de productos lácteos, cárnicos y de pollo.

El escenario anterior, aunado a la expansión de la red carretera, contribuyó a ampliar la comercialización de quesos a poblaciones vecinas y, posteriormente, a las grandes ciudades del país, favoreciendo el establecimiento de vínculos sociales, económicos y culturales, entre los espacios rurales y urbanos.

El tiempo permitió consolidar las técnicas de elaboración y las convirtió en una tradición. Simultáneamente, los sabores, aromas y texturas de los quesos mexicanos genuinos se incorporaron a la gastronomía nacional, logrando de esta manera su reconocimiento como patrimonio cultural.

Estos quesos también son importantes en el desarrollo rural de México, ya que ofrecen más oportunidades a pequeños y medianos productores de leche que generalmente no

encuentran cabida en las cadenas industriales, aportan estabilidad al precio de la leche ante los efectos de la estacionalidad y, con ello, contribuyen a ampliar la oferta de empleos y la generación de valor agregado en los espacios rurales, además de que permiten mejorar los ingresos familiares en los territorios donde se producen.

En México, como en otros países en desarrollo, a la par con la economía del estado existe una economía informal vinculada a la utilización de recursos genéticos locales, entre cuyas actividades se encuentra la venta de alimentos en la vía pública. Esta forma de ofrecer los alimentos a los consumidores puede ser de alto riesgo sanitario, ya que las condiciones en que se expenden dichos productos no son apropiadas, porque favorecen la contaminación microbiológica. Por esta razón, resulta de particular importancia tratar de determinar el impacto que la venta de alimentos artesanales como el queso fresco resulta al venderlos en tianguis, y consecuentemente la presencia de enfermedades por su consumo. Los productos artesanales por su tradición y el compendio de características sensoriales que poseen, gozan de una alta aceptación entre la población Mexicana.

1.3. *Staphylococcus aureus*

1.3.1. Historia

La denominación *Staphylococcus* que tiene por significado “racimos parecidos a los de la uva”, fue mencionada por primera vez por el cirujano escocés Sir Alexander Ogston en una serie de artículos clásicos publicados entre los años 1879 y 1882 donde describió la presencia de este organismo en pus obtenido de abscesos humanos con lo cual demostró que causaba una enfermedad piógena cuando se inyectaba a ratones. Dos años después de este suceso, Rosenbach descubrió su crecimiento en un cultivo puro, se trataba de un coco que formaba colonias de color naranja al que llamó *Staphylococcus aureus*.

La primera observación registrada que asocio los estafilococos con la intoxicación alimentaria fue hecha probablemente por Vaughan y Sternberg quienes en 1884 descubrieron por medio de una investigación de un brote enfermedad importante en Michigan que se creía, había sido causado por comer queso. Para esto realizaron un examen microscópico en el cual mediante los resultados descubrieron que el queso estaba

contaminado con un organismo esférico al que le denominaron micrococo, consumieron extractos de este queso y provocaron enfermedad. Por lo tanto llegaron a la conclusión de que no parecía improbable que el principio toxico fuera una ptomaina formada en el que como consecuencia de la actividad vital del micrococo mencionado o de algunos otros microorganismos que le precedieron y que tal vez fueron destruidos por sus propios productos tóxicos. Sin embargo en 1914, cuando Barber demostró claramente la intoxicación alimentaria estafilocócica por beber leche que se había guardado sin refrigerar que procedía de una vaca con mastitis estafilocócica. En ese momento no se tomó la importancia suficiente de dicha investigación y el papel de los estafilococos en la intoxicación alimentaria fue redescubierto en 1930 por Dack y sus colegas. (ICMSF, 2001).

Ellos demostraron que el filtrado estéril de un cultivo de un estafilococo amarillo aislado de un pastel de Navidad a base de bizcocho relleno de nata, causaba los síntomas típicos de intoxicación alimentaria en personas voluntarias. A partir de ese descubrimiento, se ha demostrado que *Staphylococcus aureus* es un organismo habitual con una enterotoxina que constituye un papel importante en la intoxicación alimentaria.

S. aureus pertenece al género *Staphylococcus* el cual se presenta en forma de cocos Gram positivos de 0.5-1.5 μm de diámetro y catalasa positivos que se dividen en más de un plano para formar racimos tridimensionales de células. Presenta una temperatura óptima de 35 – 37 °C y un pH óptimo de 4.5 - 9 para su crecimiento. “*S. aureus* fermenta glucosa y manitol, generalmente habita en el hombre como en mucosas nasales, piel y nasofaringe y también en animales”. (Zendejas-Manzo Guadalupe Socorro, Avalos-Flores Héctor, Soto-Padilla Marisela Yadira., 2014).

Este microorganismo desde el punto de vista morfológico es parecido al género *Micrococcus*, pero en contraposición al metabolismo estrictamente respiratorio de los micrococos aerobios, crece en anaerobiosis mostrando que presenta un metabolismo anaerobio facultativo. Ambos géneros comparten un poco más de su morfología pero se diferencian claramente por sus características químicas y bioquímicas tales como el ácido nucleico, el mol % de G+C en el DNA de *Staphylococcus* es de 30 – 37 mientras que el de

Micrococcus es de 66 – 75, conforme a la pared celular se encuentra que *Staphylococcus* presenta ácido teicoico y glicerina en el puente interpeptídico del péptido glucano y en *Micrococcus* no hay presencia de ninguno de los dos, en cadena respiratoria la presencia de citocromos c y d no se hace presente en *Staphylococcus* y en *Micrococcus* sí, en menaquinonas principales, *Staphylococcus* las presenta insaturadas mientras que *Micrococcus* presenta menaquinonas hidrogenadas parcialmente. (ICMSF, 2001)

1.3.2. Taxonomía

La taxonomía de los estafilococos ha experimentado un cambio importante en los últimos años y en la edición del *Bergey's Manual* de 1986 en la cual se admitían 19 especies de estafilococos en contraposición a los tres grupos de especies que se encuentran únicamente y que figuraban en la 8ª edición pero de 1974. Hoy en la actualidad se admite un total de 30 especies de *Staphylococcus* las cuales se diferencian por la homología del DNA y por los estudios inmunoquímicos que dan como resultado las descripciones y características de las especies. En base a pruebas bioquímicas y patrones de resistencia se ha demostrado que *S. aureus* se puede dividir en varios biotipos y ecotipos, también se puede clasificar mediante fagotipado y serotipado, esto mediante el análisis de plásmidos y ribotipado. (ICMSF, 2001). El Comité Internacional responsable de las recomendaciones taxonómicas ha indicado que los estafilococos se deben encuadrar en una familia independiente de los micrococos, a saber, en la familia *Staphylococcaceae*.

1.3.3. Patogenicidad (enterotoxinas)

S. aureus es responsable de muchas infecciones nosocomiales, además de ser la principal agente causante de intoxicación alimentaria en virtud de su variedad de enterotoxinas. El síndrome de choque tóxico en los humanos y en animales es causado también por la presencia de *S. aureus*. (Singh S., Anwar S., Sharma H., Chaudhary U., Verma S., 2014)

Singh S., Anwar S., Sharma H., Chaudhary U. y Verma S. explican que *S. aureus* produce diferentes tipos de factores de virulencia que facilitan la unión, colonización, interacciones célula-célula, invasión inmune y daño tisular. Tienen una capacidad diferencial para propagarse y causar brotes en hospitales. Sin embargo, el tratamiento de estas infecciones

se ha vuelto problemático debido al desarrollo de la resistencia a la meticilina en aislamientos de *S. aureus*.

El interés actual del estudio de este patógeno deriva, bien de su elevada frecuencia, o por representar, en el caso de cepas resistentes a meticilina (SARM). Aunque el término resistencia a meticilina incluye resistencia a derivados β -lactámicos, las cepas SARM presentan, en general, resistencia múltiple a varios grupos de antibióticos. (Johnson S., Krüger D., Labischinski H., 1995)

El género *Staphylococcus* incluye actualmente 32 especies y 8 subespecies aerobias y anaerobias facultativas,

De éstas, sólo aproximadamente 12 se encuentran normalmente colonizando al huésped humano, siendo *S. aureus* sin duda, la principal dentro del mencionado género (Johnson S., Krüger D., Labischinski H., 1995)

Johnson S., Krüger D., Labischinski H. en su estudio analizaron varias cepas de *S. aureus* en diferentes condiciones de crecimiento por inmunotransferencia Western (Western Blot). La inmunodetección reveló que todas las cepas investigadas, ya sea resistentes a la meticilina o susceptibles, expresaron FemA durante la fase de crecimiento exponencial en cantidades variables.

También, mencionan que FemA, es una proteína citoplásmica necesaria para la expresión de la resistencia a la meticilina en *Staphylococcus aureus* y también involucrada en la biosíntesis de las paredes celulares de estafilococos. Dicha proteína también estuvo presente en aislamientos resistentes a la meticilina, aunque no fue tan pronunciada como en las cepas susceptibles. Dicha proteína de 48 kDa se ha implicado en el metabolismo de la pared celular y se encuentra en grandes cantidades en cultivos de crecimiento activo. (Mehrotra, M., Wang, G., & Johnson, W. M., 2000).

Es por ello que la detección del gen FemA en muestras supuestamente *S. aureus* resulta de gran impacto ya que dicha proteína se relaciona con la patogenicidad que tienen sus enterotoxinas y el desarrollo de la resistencia a antibióticos por sus características

confirmando que la presencia del gen FemA es positiva en muestras del genero *Staphylococcus* especie *aureus*.

Las enterotoxinas tienen acción en el intestino delgado, los síntomas de intoxicación alimentaria por este microorganismo tiene aparición entre 1 y 7 horas, generalmente se da de 2 a 4 horas después de la ingestión del alimento contaminado que contiene enterotoxinas estafilocócicas. Algunos ejemplos de estos síntomas son náuseas, vómitos, arcadas, espasmos abdominales y diarrea que en casos más graves se puede presentar cefalalgia y colapso. Estos síntomas se presentan por mecanismos no totalmente conocidos, la interacción inicial se lleva a cabo en el receptor del linfocito T y el complejo mayor de suprantígenicos del sistema inmunitario provocando una importante pérdida de agua. Las enterotoxinas *Staphylococcus aureus* clasificadas serológicamente como SEA a SEU son proteínas simples, termotolerantes y de bajo peso molecular que va de 26.000 a 34.000 Da. La curación es generalmente en un plazo de 2 días (Brizzio A., Tedeschi F., Zalazar F., 2013).

Los estafilococos son comensales de las superficies corporales de animales de sangre caliente. *S. aureus* produce una amplia gama de sustancias como agresinas y exotoxinas asociadas con la infecciosidad y enfermedad, estas sustancias varían desde componentes en la pared celular hasta una amplia gama de exoenzimas que incluyen la estafiloquinasa, hialorinas, fosfatasas, coagulasas, catalasas, proteasas, nucleasas y lipasas, leucocidinas y hemolisinas, así como enterotoxinas causantes de intoxicación alimentaria. Dichas enterotoxinas son proteínas de cadena sencilla que incluyen una cadena polipeptídica que contiene cantidades relativamente grandes de lisina, tirosina y ácido aspártico y glutámico que se caracterizan por tener solamente dos restos de hemicistina y uno o dos restos de triptófano.

También son resistentes a las proteasas gastrointestinales como la pepsina, lo que explica su capacidad para mantenerse activas después de la ingestión. (Pelisser, M. R., Klein, C. S., Ascoli, K. R., Zotti, T. R., & Arisi, A., 2009). Las principales enterotoxinas detectadas en intoxicaciones alimentarias son SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED y SEE, por lo que se necesita la detección de genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* y *see* de *S. aureus*. (Manfredi E. A., 2010).

El 38% de los seres humanos son portadores asintomáticos de *S. aureus* que albergan genes de resistencia a antibióticos y SEs. SEA, SEB, SEC, SED y SEE son proteínas bacterianas conocidas por ser pirogénicas, están conectadas a enfermedades humanas como intoxicación alimentaria y síndrome de shock tóxico. Por la composición de aminoácidos en las enterotoxinas se dividen en dos partes, por una parte SEA, SED y SEE y por otra parte SEB, SEC, SEC₂, SEC₃. Se ha indicado que la producción de las enterotoxinas producidas por el organismo se da por lo menos en dos formas diferentes. La producción de los tipos SEB y SEC se da bajo el control plasmídico/cromosómico y son producidas al final de la fase estacionaria del crecimiento como metabolitos secundarios. Por otro lado los tipos SEA y SEE se hallan bajo control cromosómico y son producidos durante toda la fase logarítmica del crecimiento. (ICMSF, 2001). Las diferencias se encuentran reflejadas en la formación de los diferentes tipos de alimentos, la mayoría que pertenecen al grupo de intoxicación alimentaria implican a las enterotoxinas A y D en alimentos con una gama de valores más amplia de pH, actividad de agua (a_w) y potencial redox (Eh) a comparación de las enterotoxinas B y C, esto a base de pruebas bioquímicas y moleculares. (ICMSF, 2001)

Tabla 4. Límites para el crecimiento de *S. aureus* y la producción de enterotoxina

	Crecimiento Bacteriano		Producción de Enterotoxina	
	Optimo	Rango	Optimo	Rango
Temperatura	37	7-48	40-45	10-48
pH	6-7	4-7	7-8	4.5-9.6
Actividad de agua (a_w)	0.98	0.83->0.99	0.98	0.87->0.99

Fuente: ICMSF (2011) Microorganisms in Foods 8: Use of Data for Assessing Process Control and Product Acceptance.

“El modo en que acciona la toxina no ha sido esclarecido del todo, por lo que se cree que tanto los vómitos como la diarrea son el resultado de la estimulación de neuroreceptores locales existentes en el tracto intestinal y de la transmisión de los estímulos al centro del vomito del cerebro a través del vago y de otras partes del sistema nervioso simpático” (ICMSF, 2001). La cantidad de toxina depende del peso y de la sensibilidad individual,

pero generalmente existe la coincidencia de que 0,1-1 µg/kg causa enfermedad en la persona implicada.

1.4. Búsqueda e identificación de *Staphylococcus aureus*

Para el recuento de *Staphylococcus aureus* se usa el método de elección por el medio de cultivo agar Baird-Parker ya que es un medio utilizado usualmente en microbiología de alimentos, comúnmente para el recuento de estafilococos en especiales aquellas cepas que son coagulasa positivas en alimentos. (Allaert V. C., Escolá R. M., 2002).

El principio del medio de cultivo Baird-Paker se basa en el uso de agentes como glicina, piruvato sódico y cloruro de litio y puede ser adicionado con telurito de potasio y yema de huevo para coadyuvar la regeneración de células dañadas. (NOM-115-SSA1-1994, 1994)

El cloruro de litio y el telurito de potasio son importantes en este medio de cultivo ya que inhiben la flora acompañante a *S. aureus*. El telurito de potasio es el responsable de la coloración negra que adquieren las colonias que son capaces de reducirlo en el medio. La glicina y el piruvato sódico estimulan el crecimiento de los estafilococos. También la adición de la yema de huevo se usa para evidenciar la acción bacteriana sobre la lecitina y sobre la lipovitelinina (lipoproteína), siendo responsable de la opacidad del medio. (Allaert V. C., Escolá R. M., 2002) Otra de las principales características diagnosticas es la licuación de la yema de huevo en donde ocurre la hidrólisis de la lipovitelenina que es una proteína globular hidrosoluble que forma parte de la composición química de la yema de huevo. (Escartín E., 2000)

Para la identificación de *S. aureus* se realizan pruebas bioquímicas donde se debe diferenciar de otros estafilococos mediante las dos pruebas utilizadas con mayor frecuencia. La primera prueba es la prueba de la catalasa donde se observara la presencia de oxígeno, la segunda prueba es la prueba de la coagulasa donde ocurre la coagulación del plasma del conejo. La detección de catalasa y coagulasa se utiliza como método de rutina, esto es porque existe relación entre ambas y por la capacidad para encontrar enterotoxinas estafilocócicas. (NOM-115-SSA1-1994, 1994)

1.4.1. Pruebas Bioquímicas: Prueba de la catalasa

Al observar en microscopio es complicado diferenciar los estafilococos de los estreptococos, ambos son cocos gram positivos (color púrpura, de forma esférica y en agrupaciones). Los estafilococos y los micrococos se diferencian de los estreptococos, los enterococos y las bacterias “tipo-estreptococos”, ya que los estreptococos son negativos a la prueba de la catalasa mientras que los estafilococos son positivos a la prueba. (W. Koneman E., Allen S., 2008)

La catalasa es una enzima hemoproteica antioxidante presente en la mayoría de las bacterias aerobias estrictas. Esta enzima manifiesta la actividad de la peroxidasa, cataliza la oxidación de sustratos acoplada a la reducción de peróxido de hidrógeno formando agua y oxígeno. En la prueba de la catalasa la reacción se efectúa con dos moléculas de peróxido de hidrógeno, una de las cuales actúa como sustrato reducido mientras que la otra actúa como donador de átomos de hidrógeno, es por eso que cuando tenemos una prueba de catalasa positiva observamos formación de agua (sustrato reducido) y presencia de oxígeno (donador oxidado). Reacción de la catalasa:



Es importante mencionar que el peróxido de hidrógeno es una sustancia tóxica para las bacterias en especial a aquellas que carecen de citocromos y de catalasa.

La prueba se hace generalmente en una lámina o portaobjetos donde se coloca una cantidad de muestra a analizar y posteriormente se le agregan unas gotas de peróxido de hidrógeno, que puede realizarse a partir de peróxido de hidrógeno al 3%, que reaccionaran dependiendo el tipo de bacteria que se tenga. Esta prueba se usa con frecuencia para diferenciar ciertas cepas de bacterias tales como *Streptococcus* (-) de *Staphylococcus* (+) y *Micrococcus* (+), así como *Bacillus* (+) de *Clostridium* (-). (MacFaddin Jean F., 2003)

1.4.2. Pruebas Bioquímicas: Prueba de la coagulasa

La prueba de la coagulasa tiene como objetivo separar *S. aureus* coagulasa positivo de las otras especies de estafilococos que por dicha prueba se les denomina estafilococos

coagulasa negativos. *Staphylococcus aureus* posee dos diferentes tipos de coagulasa la cual es una proteína que permite la conversión del fibrinógeno en fibrina permitiéndole al microorganismo protección contra el sistema inmunológico de animales y humanos.

El primer tipo de coagulasa se refiere a una endocoagulasa o coagulasa ligada que ésta unida a la pared celular, actúa directamente sobre el fibrinógeno, proteína que con la enzima trombina permite la formación de los coágulos de sangre, provocando la formación de coágulos o grumos cuando se mezcla una suspensión bacteriana con plasma citratado, esto sucede cuando se hace el test en lámina donde se emulsionan una o más colonias en una gota de suero fisiológico para posteriormente agregarle una gota de plasma citratado de conejo y mezclarlo. Por lo tanto un test positivo se evidencia por la formación de grumos (López M. J., Cárdenas M., Osuna A., 2012).

El segundo tipo hace referencia a una exocoagulasa o coagulasa libre que actúa mediante la activación de un factor sérico (CRF), este factor promueve la secreción de corticotropina ayudando al cuerpo a reaccionar ante situaciones de estrés, una vez que se activa, se forma un complejo coagulasa-CRF, que reacciona con el fibrinógeno produciendo un coágulo de fibrina (proteína que desempeña un importante papel en el proceso de coagulación), esto sucede cuando se realiza el test del tubo donde se emulsionan varias colonias de *S. aureus* en un tubo con 0.5 ml de plasma citrado de conejo, si a las 4 horas no se observa la formación de un coágulo se reincuba para revisarlo a las 18 horas, es importante porque en alguna oportunidad puede suceder que las fibrinolisin de *Staphylococcus aureus* lisen el coágulo y se obtenga un test falso negativo, por lo tanto para un resultado positivo se debe observar la formación total o parcial de un coágulo. (Seija V., 2002)

Mientras el test de tubo es definitivo, en el test de lámina beneficia ya que constituye a una rápida y económica técnica de tamizaje aunque también tiene una desventaja, entre un 10% a 15% de las cepas donde se identifica *S. aureus* se muestran negativas en el test en lámina, por estos motivos siempre se recomienda hacer el test en tubo. (López, M.J., Cárdenas M., Osuna A., 2012)

Cabe destacar que la prueba de la coagulasa es importante en la metodología ya que nos ayuda a diferenciar subespecies de *Staphylococcus*, para su posterior estudio, si en la

prueba tenemos una coagulasa positiva estamos hablando de *Staphylococcus aureus* en cambio si es coagulasa negativa tenemos *Staphylococcus epidermis*.

Existen otras pruebas que pueden ayudar a diferenciar las cepas enterotoxigénicas de las que no lo son y de otras especies del género *Staphylococcus* ajenas a *St. aureus* que dan también reacción a la coagulasa positiva. Una de ellas es la prueba de la termonucleasa (TNasa) la cual es particularmente útil y tiene como principio determinar la estabilidad de la termonucleasa, sometida a calentamiento. Esta prueba constituye como una prueba auxiliar de la coagulasa la cual no sustituye si no que la apoya en pruebas cuando las reacciones son dudosas. A diferencia de la prueba de coagulasa, la termonucleasa se puede investigar también en extractos alimenticios porque la enzima persiste después de la muerte de los *S. aureus* enterotoxigénicos que lo han producido, por estas razones se ha propuesto como medio indirecto para la determinación de la posible presencia de enterotoxinas en alimentos fermentados tales como el queso. (Pascual M., Calderón V., 1999)

S. aureus a diferencia de otras subespecies posee más actividad de DNasa. Esta DNasa presenta un pH óptimo más alto (8,6 – 9,0), degrada el ADN ampliamente, presenta una marcada termoestabilidad y su actividad se correlaciona en alguna medida con la de coagulasa. (MacFaddin Jean F., 2003)

Ciertos estafilococos saprofíticos relacionados pueden producir DNasa, sin embargo, la termoestabilidad de la nucleasa producida por todas las cepas de *S. aureus* es una propiedad constante y singular, la producción de nucleasa termoestable parece ser tan precisa como la producción de coagulasa para ser considerada un indicador *Staphylococcus aureus*, ninguna cepa de *S. epidermidis* mostró actividad de nucleasa termoestable, la DNasa de este microorganismo puede resistir la ebullición (100 °C) durante 15 minutos.

Tabla 5. DNasa de *S. aureus subespecie aureus* (MacFaddin Jean F., 2003)

<i>S. aureus subesp. Aureus</i>	
Iones requeridos para la activación	Ca ²⁺
Límites de pH	8, 6-9, 0
pH óptimo	
Calentamiento, 44 °C o mayor	Termoestable (resistente al calor)
Tipo de sustrato de DNA preferido	Desnaturalizado

Principales productos formados	Mononucleótidos y dinucleótidos
Productos terminales	3'- fosfato

Los resultados que nos proporciona esta prueba se deben interpretar con precaución ya que hay la probabilidad de que pueda ocurrir que en un alimento exista enterotoxina y la reacción de la TNasa sea negativa.

1.4.3. Pruebas moleculares: ELISA (detección de enterotoxina estafilocócica)

El procedimiento clásico para detectar la enterotoxina estafilocócica en un alimento es una combinación de extracción, concentración y detección final de la toxina utilizando la técnica de Ouchterlon y en portaobjetos descubierta por Crowle, este método puede detectar 0,1 µg de toxina en 100 g de alimento. ELISA ha sustituido dicha técnica, ya que es una prueba más rápida y menos laboriosa porque puede realizarse empleando al mismo tiempo muchas muestras de suero distintas. Estas pruebas son más sensibles que las pruebas con partículas de látex pero de ejecución menos fácil, aun así otorgan resultados más fiables.

El enzimioinmunoanálisis (ELISA) es un método sensible para la detección de antígenos microbianos o bien para anticuerpos contra agentes infecciosos, es una prueba similar a la prueba de inmunofluorescencia y al radioinmunoensayo, excepto que en este caso los anticuerpos indicadores se unen a una enzima en vez de hacerlo a una molécula fluorescente o a un isótopo radioactivo. (Ingraham J., Ingraham C., 1998)

Las pruebas que utilizan enzimas son preferibles a las que utilizan isotopos, esto sucede porque se pueden detectar a simple vista. La prueba directa de ELISA se emplea para la detección de antígenos, por otro lado, la indirecta detecta anticuerpos. El fundamento de ambas pruebas es el mismo pero tienen la desventaja por ser pruebas cualitativas y no cuantitativas.

El principio básico es el uso de anticuerpos o antígenos conjugados con una enzima que al reaccionar con el sustrato específico producen una reacción de color que se puede cuantificar con un equipo llamado espectrofotómetro a una longitud de onda apropiada para la prueba. El ensayo para la detección de antígenos microbianos en muestras líquidas es

suero que utiliza celdas de plástico sensibilizadas en su base con anticuerpos monoclonales para un antígeno específico, si en la muestra se encuentra presente el antígeno, este será reconocido por el anticuerpo formando un complejo antígeno-anticuerpo que permanecerá intacto después del lavado de la celda. Enseguida se le añade un conjugado (anticuerpo unido a una enzima) que se integra al complejo para reconocer el antígeno, al final, se añade un sustrato cromógeno para la enzima específica y la reacción antígeno – anticuerpo se pone de manifiesto con el desarrollo de color cuya intensidad será proporcional a la concentración de antígenos en la muestra. (Martínez R., 2012)

La confiabilidad y reproducibilidad de los resultados dependen de diferentes aspectos técnicos que son importantes en el diseño, manejo y estandarización de esta técnica. Estos son 5, el primero es la fase sólida, uno de los elementos más importantes porque es el soporte de la reacción. El segundo son los conjugados, por ejemplo en ELISA se utilizan anticuerpos o antígenos unidos a enzimas, lo que se conoce como conjugados. El tercer aspecto son los sustratos, donde el aspecto que debe tenerse en cuenta en la selección del sustrato óptimo es que la acción de la enzima sobre el sustrato genere un producto soluble que pueda ser cuantificable, otros factores son la sensibilidad, la estabilidad del componente, la toxicidad y el costo. El cuarto pertenece al análisis del producto coloreado, algunas reacciones pueden ser visualizadas por el cambio de color, esto pasa cuando solo se requiere conocer si el resultado es positivo o negativo para el problema en cuestión. El quinto y último aspecto es la expresión de los resultados, una vez que se cuantifica el color resultante, este debe transformarse en un dato que permita comprender el resultado final de la prueba. (Gutiérrez S., 2006)

Se considera positiva aquella prueba que va a mostrar un valor de absorbancia superior al valor del punto de corte y negativo cuando esté se encuentre por debajo.

1.4.4. Pruebas Moleculares: Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Las técnicas de Biología molecular aplicadas a la detección de patógenos en alimentos consisten básicamente en el análisis del DNA de los microorganismos que contaminan dicho alimento.

Algunas secuencias de nucleótidos que forman la molécula de DNA son únicas y propias para cada especie. Si disponemos de un buen método adecuado para identificar secuencias de DNA concretas podremos identificar la especie a la que pertenece ese DNA, e incluso podemos distinguir poblaciones o cepas de una especie dada.

Algunas técnicas de biología molecular, se han ido simplificado y automatizando en los últimos años permitiendo obtener el resultado de un análisis en poco tiempo. Por otro parte son técnicas muy sensibles ya que son capaces de detectar la presencia de un microorganismo concreto aunque este se encuentre en el alimento en muy baja concentración. (Morcillo O. G., Cortés R. E., García L. José Luis, 2013)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica utilizada para hacer muchas copias de una región en particular del ADN. Esta región de ADN puede ser cualquier cosa que al experimentador le interese. Tiene como objetivo producir suficiente ADN de la región a estudiar para que pueda analizarse o usarse en cualquier estudio que se necesite. Esto hace que la PCR sea utilizada en muchas áreas de la biología y la medicina, como la investigación en biología molecular, el diagnóstico médico e incluso algunas ramas de la ecología. La técnica de PCR desplaza muchas técnicas tales como la hibridación con sondas de DNA o la hibridación en colonia con sondas específicas para identificar patógenos en un alimento, esto se debe a la creciente disponibilidad y a la fácil adquisición de cebadores específicos gracias a los avances de secuenciación en ácidos nucleicos que han permitido el conocimiento de muchos genes de microorganismos. Actualmente existen muchas empresas que comercializan estos cebadores. (Morcillo O. G., Cortés R. E., García L. José Luis, 2013)

Los genes o secuencias en la PCR son específicos a estos microorganismos. Por lo tanto si se detecta la presencia de una secuencia específica de un patógeno en una muestra de alimento nos indica que el alimento está contaminado con el microorganismo correspondiente. Es por eso que la detección de las enterotoxinas de *S. aureus* es posible con la optimización de la técnica de PCR.

Algunas ventajas de usar la técnica de PCR a diferencia de otras técnicas bioquímicas e incluso moleculares aparte de su alta sensibilidad y especificidad en microorganismos con baja concentración de DNA, es que es un procedimiento bastante rápido que otros métodos tradicionales, es sencillo aplicarlo y presenta un alto grado de automatización lo que permite que el análisis de un gran número de muestras al mismo tiempo.

Otra ventaja de la PCR es que puede detectar bacterias vivas como bacterias muertas, ya que el DNA está presente en células vivas como en células no viables, tal es el caso de *S. aureus* que es capaz de producir toxinas termorresistentes, esto nos da una idea de que la detección de tal bacteria aun cuando ha sido sometida a tratamientos térmicos, podría haber contaminado el alimento y haber sintetizado las toxinas previamente, lo cual indican un riesgo potencial para los consumidores de alimento, es este caso de queso fresco de elaboración artesanal. Una vez que se realizó y visualizó la PCR, la presencia de amplicones del tamaño esperado se considera frecuentemente como una prueba positiva. (Morcillo O. G., Cortés R. E., García L. José Luis, 2013)

Existen varios tipos de PCR ya que pueden ser de carácter cualitativo, cuantitativo y semicuantitativo.

La PCR cualitativa nos permite detectar la presencia o ausencia de un fragmento de ADN determinado, es decir que solo nos confiere la información sobre si una muestra es positiva o negativa ante la presencia de una determinada secuencia de ADN. Este tipo de PCR es ideal para confirmar la presencia o ausencia de un determinado agente patógeno. (Borunda A., Socorro J., 2011)

La PCR semicuantitativa permite conocer los niveles de expresión de un gen (ARNm) en particular, y normaliza los niveles encontrados de este gen con los encontrados en uno de expresión constitutiva, que expresa de manera constante en la célula. Al realizar una relación entre la expresión del gen de interés con la expresión del gen constitutivo el índice que se obtenga nos permitirá conocer la expresión real del gen de interés y se reporta como

porcentaje de expresión. Esto nos permite la comparación con otras muestras que ya han sido analizadas de la misma manera. (Borunda A., Socorro J., 2011)

La PCR cuantitativa, permite reportar en números absolutos la cantidad de un microorganismo o del ARNm de un gen en una muestra por medio de una curva que reporta los resultados. Para la cuantificación absoluta se amplifica al mismo tiempo una curva con una muestra conocida del ADN que se quiere analizar, esta funciona como un control positivo, de esta forma se analizan los resultados traslapando los valores de ambas curvas para poder conocer la concentración de la muestra. (Borunda A., Socorro J., 2011)

Como en este trabajo se quiere conocer solamente la presencia de una o más enterotoxinas en el ADN de *S. aureus* para determinar si es *S. aureus* enterotoxigénica o no, se trabajara con una PCR cualitativa, en otras palabras una PCR de punto final. El uso de la técnica de PCR punto final es ideal para la búsqueda de *S. aureus* enterotoxigénica en las muestras de queso de elaboración artesanal, ya que si se detecta la presencia de por lo menos una de las 5 principales toxinas estafilocócicas en la muestra, la prueba es positiva.

La PCR de punto final consta de 3 etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión. Estas se corren a través de 25 a 35 ciclos en el cual el resultado final de la PCR se analiza mediante un gel de electroforesis.

En la desnaturalización, las cadenas ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95 °C durante 20-30 segundos, el tiempo depende y puede variar según la secuencia de templado que necesite el ADN para poder romper sus uniones debido a que el apareamiento G-C está formado por 3 enlaces, uno más que las bases de A-T, por lo tanto si el porcentaje de G-C es muy alto, necesitará un mayor tiempo para poder romper dichas uniones. (Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C., 2013)

La segunda etapa es la hibridación, es la etapa en la que los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-primers, es importante que la temperatura de

hibridación o temperatura *melting* (T_m) sea la óptima, ésta oscila entre los 50-60 °C. El diseño de los *primers* debe ser correcto y la temperatura debe ser la adecuada ya que de ser así la estabilidad y especificidad de la prueba será la adecuada. (Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C., 2013). Un *primer* es una secuencia corta de nucleótidos que proporciona un punto de partida para la síntesis de ADN. Los *primers* para PCR son pedazos cortos de ADN de cadena sencilla, generalmente de unos 20 nucleótidos de longitud. En cada reacción de PCR se usan dos *primers* un *forward* y un *reverse* los cuales son secuencias opuestas a la secuencia de ADN que se desea amplificar, estas se unirán al fragmento de ADN por los extremos de la secuencia que se desea copiar por medio de la complementariedad de bases. (Eberhard P., 2009)

Los *primers* pueden ser diseñados por el investigador o se pueden mandar a hacer a alguna empresa que se empeñe en el diseño de “primers”. Para este trabajo se mandaron a diseñar los “primers” con la empresa UNIPARTS. Por lo tanto, la PCR funciona como una herramienta fácil, practica y sensible para la detección de los genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* y *see* de *S. aureus* y para caracterizar un conjunto de aislamientos de *Staphylococcus spp.* asociados a intoxicaciones alimentarias.

La tercera etapa es la extensión en la cual la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida, agregando dNTP's complementarios para crearlas cadenas completas de ADN. La Taq polimerasa es una enzima termoestable aislada de *Termus aquaticus* (Taq), una bacteria que soporta altas temperaturas. Esta enzima ha simplificado enormemente la técnica de la PCR, ya que ha permitido su automatización (desarrollo del termociclador). (Eva M., Julio P., Jesús C., Pilar Z., Rosario O., Clementina R., 2001) La temperatura máxima puede encontrarse entre los 75-80 °C pero la temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Para el final del ciclo, se habrán formado los amplicones con el tamaño dictado por el número total de pares de bases que deberá ser conocido por el investigador. (Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C., 2013)

Existen dos pasos adicionales las cuales son una elongación final y una etapa de conservación. La elongación final, se lleva a cabo a una temperatura de 70-74 °C durante 5-15 minutos tras el último ciclo de PCR. Con ella se asegura que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente ampliado. Y finalmente la conservación la cual se lleva a cabo de 4-15 °C durante un tiempo indefinido para conservar la reacción a corto plazo. (Borunda A., Socorro J., 2011)

Al final de la PCR, para saber si la reacción transcurrió eficientemente, los amplicones son visualizados a través de una electroforesis en geles de agarosa.

1.4.5. Electroforesis

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas que se basa en la movilidad de cada molécula. Cada molécula tiene diferente tamaño (kb o pb) por lo tanto tiene diferente carga eléctrica, eso hace que la migración de cada molécula sea diferente, esta migración puede ser medida con la ayuda de un marcador de peso molecular el cual nos indicara el tamaño de la molécula que se está analizando, el marcador puede ser de diferentes tamaños dependiendo el tamaño de la muestra que se desea amplificar, entre mayor sea el peso de la molécula la migración será más corta en cambio si la molécula es de menor tamaño esta migrara más rápido a lo largo de la corrida. Es importante mencionar que si la electroforesis se hace en gel, la carga eléctrica depende de la concentración y el pH con el que se prepare.

La electroforesis tiene como fundamento proporcionar información visual ya sea cualitativa o cuantitativa de un estudio determinado. Existen 3 tipos de electroforesis:

1.4.5.1. Electroforesis convencional

- **Electroforesis en gel de agarosa:** polisacárido, producto purificado de algas (composición similar al agar-agar) compuesto principalmente por D-galactopiranosas y 3,6 anhidrido-L-galactopiranosas unidos por iones glucosídicos. Se disuelve en caliente (50-60°C) y al enfriarse a 38 °C se solidifica formando un gel, de alta porosidad. Se usa para amplificar ácidos nucleicos (Carmen C., 1998)

- **Electroforesis en gel de poliacrilamida:** el gel es el resultado de la polimerización química de una mezcla de acrilamida y bis-acrilamida. La reacción necesita de un iniciador y un catalizador denominado agente entrecruzante. Los iniciadores más comunes son el persulfato amónico o potásico y el agente entrecruzante la N,n,n',n'-tetrametilendiamina (TEMED). Regulando la concentración de los compuestos y su proporción se consiguen distintas porosidades, siempre menores que la de los geles de agarosa. (Cruces B. C., 1998)

Estas separaciones por electroforesis convencional han sido y siguen siendo muy eficaces y de muy extensa aplicación, principalmente en la separación y posterior identificación o cuantificación de macromoléculas, comúnmente más usada para proteínas o ácidos nucleicos de pequeño tamaño. (Cruces B. C., 1998)

Imagen 1. Electroforesis convencional.

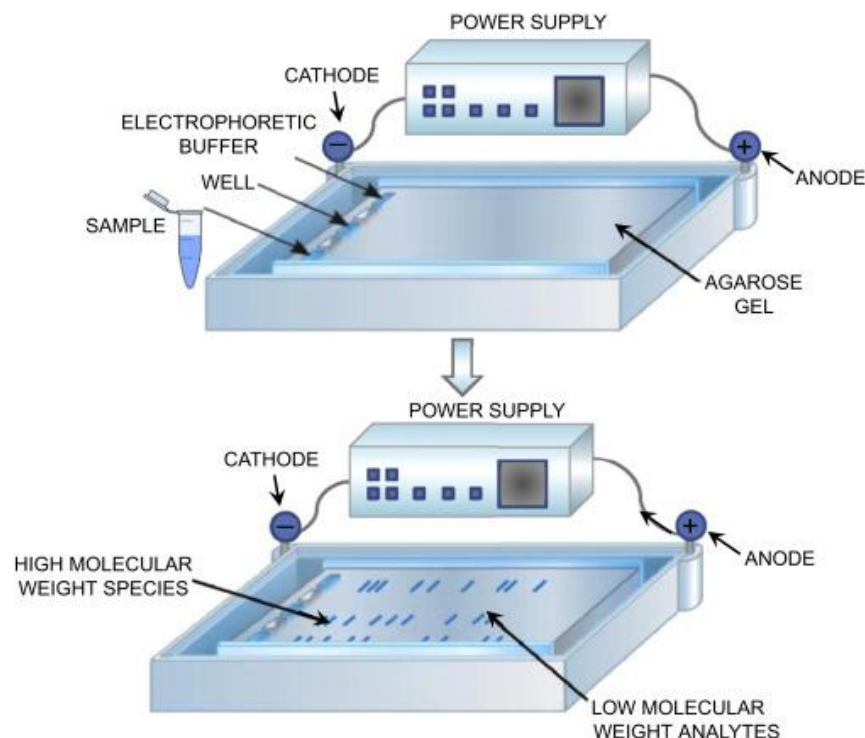


Imagen 1. Sistema de electroforesis convencional: P. Ciborowski y J. Silberring (2016).
 Perfil proteómico y química analítica. Recuperado de:
<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/gel-electrophoresis>

Una vez que la electroforesis haya concluido se procede a una tinción con bromuro de etidio (EtBr). El bromuro de etidio se une a las bases del ADN y la fluorescencia bajo luz UV para permitir la visualización del tamaño relativo de los fragmentos producidos en el gel.

El gel se deja en un baño de agua bidestilada con una concentración de bromuro de etidio de 10 mg/ml (dilución de 0.1%) y después se enjuaga en un baño con agua destilada para ser observado posteriormente en un transiluminador UV que como su nombre lo dice emite luz UV que hace visibles los fragmentos amplificados con ayuda de una cámara conectada a una maquina la cual tiene instalado un software para guarda la imagen como evidencia visual. (Badal S., Delgoda R., 2017)

1.4.5.2. Electroforesis capilar

Técnica que usa celdas capilares con amortiguadores donde ocurre la separación electroforética. Por medio de una fuente de alto voltaje se forza la migración de iones a través de un capilar muy fino y con ayuda del polímero en el capilar se separan las moléculas según su densidad de carga, tamaño y forma. Las moléculas son detectadas al final del capilar y la intensidad de su señal es registrada en forma de un electroferograma. El cargado de la muestra al capilar ocurre también por electroforesis, y puede llegar a cargar un mayor número de muestras. Una desventaja de este tipo de electroforesis es la presencia de un nivel alto de concentraciones de sales puede reducir la sensibilidad de detección, es por ello que antes de analizar las muestras, estas deben purificarse.

Imagen 2. Electroforesis capilar.

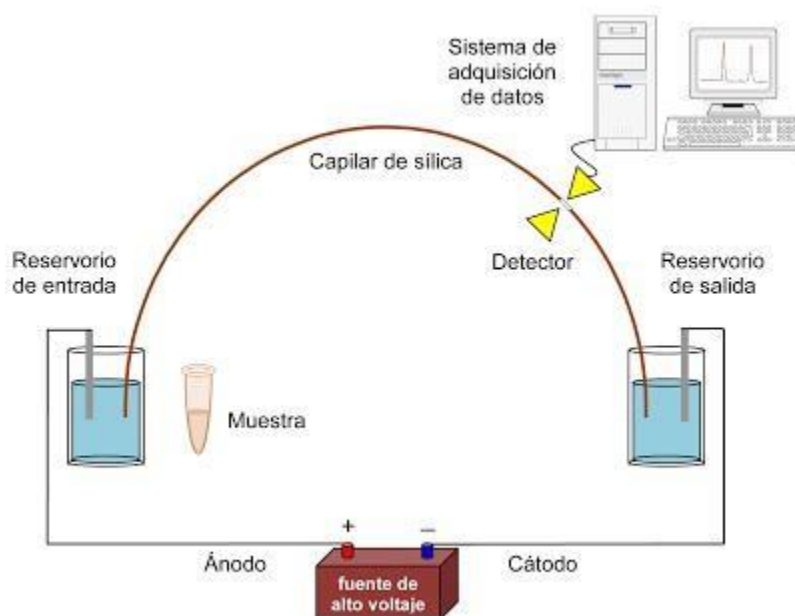


Imagen 2. Electroforesis capilar: Sandoval Junior E. (2017). Grupo de Investigación en Separaciones Analíticas. Recuperado de: <http://sepan.correounivalle.edu.co/>

Se puede elegir un tipo de electroforesis para cada diferente estudio, la decisión puede depender de la sensibilidad de la prueba y el tamaño de la muestra. En este estudio, la electroforesis que se realizara será con gel de agarosa debido a que esta técnica en particular resulta fácil, accesible, rápida preparación de los geles y la posibilidad de fraccionamiento de muestras de DNA o RNA de alto y bajo peso molecular, aparte de su gran uso en el área de la investigación clínica. (P. Ciborowski y J. Silberring, 2016)

2. JUSTIFICACIÓN

En México, como en otros países en desarrollo, a la par con la economía del estado existe una economía informal vinculada a la utilización de recursos genéticos locales, entre cuyas actividades se encuentra la venta de alimentos en la vía pública. Esta forma de ofrecer los alimentos a los consumidores puede ser de alto riesgo sanitario, ya que las condiciones en que se expenden dichos productos no son apropiadas, porque favorecen la contaminación microbiológica.

Datos recientes mostraron que se obtuvieron 103,860 muestras de alimento, de las cuales el 26.6 por ciento se encontraron fuera de especificación. Por grupo de alimento, los productos lácteos muestran el mayor porcentaje de muestras fuera de especificación con 41.8 por ciento, esto sucede por la mala inocuidad en alimentos que requieren mucha manipulación durante su preparación y que necesitan mantenerse por largos periodos de tiempo a temperaturas adecuadas. (Félix A., Campas O., Meza M., 2005).

En el último censo se reportó que la población de México fue de más de 112 millones de habitantes. De los cuales 9.5 millones son niños de 5 años o menos y 9.4 millones adultos de 60 años o más, esto representa casi el 20% de población altamente vulnerable a los peligros alimentarios, sin incluir a mujeres embarazadas y enfermos crónicos o con patologías inmunosupresoras. (Ramírez I., 2015)

Además, recientemente la secretaria de salud decomiso 1.2 toneladas de queso fresco proveniente del Estado de Chiapas a través de varios distribuidores, el cual se encontraba contaminado con la toxina producida por *Staphylococcus aureus*, que causó la intoxicación de 122 personas, en su mayoría niños. (Ramírez I., 2015)

Los productos artesanales por su tradición y el compendio de características sensoriales que poseen, gozan de una alta aceptación entre la población Mexicana. Por otro lado, estos brotes están surgiendo de manera alarmante en la mayoría de los países industrializados y dicho aumento puede ser debido a la gran cantidad de personas que habitan en dichos países. De esta manera, al ser una especie bacteriana relativamente común, es natural que surjan investigaciones para mantenerse al tanto de la evolución de este patógeno, y la investigación epidemiológica en México, no es está al corriente, por lo tanto la información

obtenida es poco actualizada. (Zendejas-Manzo, G., 2014). Por esta razón resulta de particular importancia tratar de determinar el impacto que la venta de alimentos artesanales como el de quesos fresco resulta al venderlos en tianguis, y consecuentemente la presencia de enfermedades por su consumo, considerando que la FAO indica que la infección estafilocócica es una de las 4 ETAs principales por lo que resulta de gran interés en el sector salud tomando en cuenta que se han encontrado casos de intoxicación por enterotoxina de *S. aureus* en la ciudad de Puebla y que la situación se ve agravada debido a que el patógeno ha ido desarrollando múltiple resistencia contra los antibióticos, propiciando que cada vez sea mucho más difícil el tratamiento y la curación de las enfermedades ocasionadas por esta bacteria.

3. HIPÓTESIS

Dado que los quesos de elaboración artesanal comercializados en el municipio de Puebla, no cuentan con estándares higiénicos y sanitarios mínimos requeridos por la industria alimentaria, es posible que estos sean un vehículo de transmisión de cepas enterotoxigénicas de *S. aureus*.

4. OBJETIVO GENERAL

Búsqueda, aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénica en quesos frescos de elaboración artesanal por medio de pruebas bioquímicas y moleculares para evaluar el riesgo microbiológico de la cepas encontradas.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

- Búsqueda y aislamiento de cepas del género *Staphylococcus* tentativamente de la especie *aureus* presentes en quesos de elaboración artesanal del municipio de Puebla.
- Realizar pruebas confirmatorias de cepas aisladas presuntamente de *S. aureus*.
- Identificación del gen FemA, como indicador de la presencia de genes de enterotoxina por PCR.
- Identificación y determinación de genes de enterotoxina estafilocócica A, B, C, D, y E por PCR.
- Observar el cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, productos lácteos combinados y derivados lácteos en los productos analizados.

6. ALCANCES Y LIMITACIONES

Alcances:

Población de estudio, quesos frescos de elaboración artesanal comercializados en los mercados del municipio de Puebla.

Limitaciones:

El presente estudio no tomó en cuenta a otros microorganismos productores de ETAs, así como otros tipos de quesos ni tampoco aquellos comercializados fuera del municipio de Puebla.

7. METODOLOGÍA

En el presente capítulo se muestra la metodología utilizada en el desarrollo del trabajo de investigación: incluye todas las etapas y objetivos específicos.

ETAPA 7.1 - Método de muestreo y preparación de muestras a través de la NOM-110-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO. (Ver Anexo 2)

ETAPA 7.2 - Estandarización de los métodos de conteo de bacterias a través de la NOM-092-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA. (Ver Anexo 3)

ETAPA 7.3 - Búsqueda y aislamiento de cepas de *Staphylococcus aureus* presentes en alimentos por medio de la NOM-115-SSA1-1994 para la determinación en quesos de elaboración artesanal en los principales mercados de la ciudad de Puebla. (Ver Anexo 4)

ETAPA 7.4 - Identificación y determinación de genes de enterotoxina (A, B, C, D, E) estafilocócica productora de intoxicación alimentaria mediante PCR de punto final para su análisis.

7.4.1 Extracción de ADN (Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit) (Ver Anexo 5)

7.4.2 Identificación de genes de enterotoxinas por la prueba de PCR punto final. (modificado)

- Se van a preparar 6 mezclas de “primers” que se usaran en el proyecto: GSEAR, GSEB, GSECR, GSEDR, GSEER Y GFEMAR.
- Para cada mezcla añadir 10 µL de GSEX-1, 10 µL GSEX-2 y 80 µL de agua MilliQ teniendo un volumen final de 100 µL por cada mezcla de “primer”.
- Para cada muestra positiva de *S. aureus* preparar 6 mezclas de reacción PCR (toxina A, B, C, D, E y FemA).

- Tomar 6 tubos PCR y agregar a cada uno: 11 μ L de agua MilliQ, 1 μ L de muestra (ADN de *S. aureus*), 0.5 μ L de “X” mezcla de primer y 12.5 μ L de “Prime Star Max” teniendo un volumen final de 25 μ L.
- En un tubo PCR nuevo preparar un “primer mix” con 0.5 μ L de cada mezcla de “primer” teniendo un volumen final de 3 μ L.
- Preparar un tubo PCR adicional a la corrida como control negativo. Añadir 9.5 μ L de agua MilliQ, los 3 μ L de “primer mix” y 12.5 μ L de “Prime Star Max”.
- La amplificación de ADN se lleva a cabo en un termociclador de PCR punto final. Con el siguiente programa: 35 ciclos de amplificación con una desnaturalización a 98 ° C durante 4 minutos, alineamiento a 57 ° C durante 10 segundos, extensión a 72 ° C durante 10 segundos, finalizando con una extensión final a 72 ° C durante 2 segundos.
- Al finalizar la corrida de PCR, guardar los tubos para su almacenamiento en congelador a -20 °C para su posterior uso.

7.4.3 Determinación de enterotoxinas mediante electroforesis en gel de agarosa. (modificado)

- Pesar 1 gr de agarosa D1.
- En un molde para gel de agarosa correctamente balanceado, añadir la mezcla y colocar un peine de pocillos (puede ser de 8 o 16 pocillos dependiendo el número de muestras a amplificar).
- Esperar aproximadamente 20 minutos hasta observar que se haya gelificado completamente.
- Desmontar el molde del gel con el gel encima y llevar a la cámara de electroforesis.
- Llenar la cámara de electroforesis con Tae 1X hasta cubrir completamente los pocillos del gel.
- Identificar las muestras de PCR obtenidas y en tubos PCR nuevos rotular adecuadamente cada tubo para cada muestra de PCR.
- En los tubos nuevos de PCR agregar 5 μ L de la muestra de PCR y 1 μ L de “Loading Dye 6X”
- Preparar un tubo extra de PCR agregar 5 μ L de marcador de peso molecular de 1kb o 100 bp y 1 μ L de “Loading Dye 6X”.

- Añadir los 6 µL de mezcla de muestra PCR/marcador y “Loading Dye 6X” en cada pocillo del gel de agarosa tomando en cuenta el orden de las muestras.
- Cerrar la cámara y correr la electroforesis a 120 V durante 55 min.
- Preparar dos baños para revelar el gel, un baño con bromuro de etidio 1 x, donde se toma 2 mL de la solución stock de bromuro de etidio 1000 X y se dissolve en 200 mL de agua desionizada; y otro con solamente 200 mL de agua destilada.
- Colocar los baños sobre un agitador orbital electrónico.
- Al finalizar la electroforesis, llevar el gel al baño de bromuro de etidio y encender el agitador orbital a 25 r.p.m. durante 10 min.
- Pasar el gel al segundo baño con agua destilada y encender el agitador orbital a 25 r.p.m. durante 10 min.
- Encender el transluminador UV.
- Colocar el gel en la base del transluminador UV y encender para observar el gel de agarosa con las amplificaciones.
- Guardar imagen para evidencia de resultados.

ETAPA 7.5 - Con el análisis de los resultados y mediante la NOM-243-SSA1-2010 observar el cumplimiento de la norma que confiere disposiciones y especificaciones sanitarias para la venta comercial de productos y derivados lácteos. (Ver Anexo 5)

7.5.1 - Análisis de resultados

- Se realizara una tabla de datos en la cual se presentan los resultados de la enterotoxinas presentes en cultivos de *S. aureus* enterotoxigénica.
- Se hará un análisis estadístico con los resultados mediante graficas de barras.
- Se analizan los resultados obtenidos.
- Se concluye una hipótesis.

7.5.2 - Observar cumplimiento de la NOM-243-SSA1-2010 en el apartado 6. Especificaciones sanitarias se observa si el producto se encuentra dentro de las especificaciones sanitarias. (Ver Anexo 5, apartado 6)

CAPITULO 8

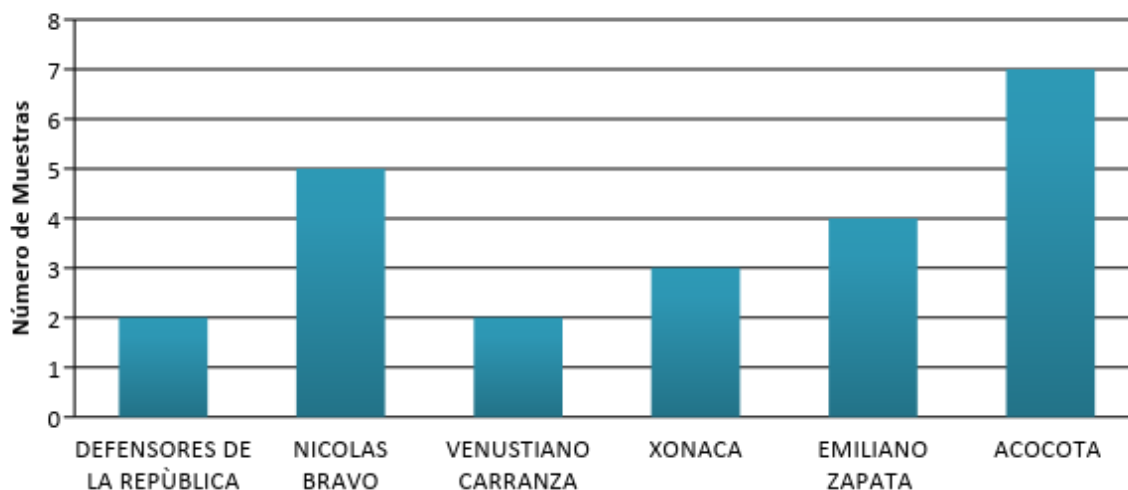
DISCUSIÓN Y RESULTADOS

A partir de la NOM-109-SSA1-1994, Bienes y servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Procedimiento (Anexo 8). Habla sobre el correcto análisis microbiológico de alimentos, la adecuada selección de la muestra, la toma correcta, los medios de conservación y su transporte al laboratorio, se realizó el muestreo de los quesos artesanales como objeto de estudio del proyecto.

Se muestrearon 6 mercados municipales de la ciudad de Puebla, Defensores de la República, Nicolás Bravo, Venustiano Carranza, Emiliano Zapata, Xonaca y Acocota en ese orden.

El número de muestras tomadas de cada expendio, fueron seleccionadas de forma aleatoria, cuyas características son lo más similar posible a las del expendio del que procede.

Figura 8.1 Recuento del número de quesos artesanales muestreados en el municipio de Puebla



Como se muestra en la figura 8.1, en cada mercado se tomó diferente número de muestras dependiendo el número de expendios donde se vendía el queso artesanal. A las muestras de

queso se les nombró de la siguiente manera, de acuerdo al mercado, fecha de muestreo (año/mes/día) y número de muestra como lo muestra la Tabla 6:

Tabla 6. Lista de mercados y quesos de elaboración artesanal muestreados en el municipio de Puebla.

MERCADOS	QUESOS
DEFENSORES DE LA REPÚBLICA	DR30081701
	DR30081702
NICOLAS BRAVO	NB05091701
	NB05091702
	NB12091703
	NB19091704
	NB26091705
VENUSTIANO CARRANZA	VC12091701
	VC12091702
XONACA	XN03101701
	XN03101702
	XN03101703
EMILIANO ZAPATA	EZ14061701
	EZ14061702
	EZ14061703
	EZ14061704
ACOCOTA	ACO17101701
	ACO17101702
	ACO17101703
	ACO17101704
	ACO17101705
	ACO17101706
	ACO17101707

Bajo la NOM-110-SSA1-1994 Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico, a todas las muestras se les hizo 1 dilución primaria y 3 diluciones secundarias para tener un mejor aislamiento de colonias de *S. aureus*.

La Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, productos lácteos combinados y derivados lácteos, nos confiere ciertos límites para la buena inocuidad del alimento que en este caso es para lácteos y derivados lácteos: queso fresco. En la tabla 7 se puede observar una tabla con los límites máximos permitidos en esta norma oficial.

Se eligieron aquellas placas de cultivo que excedían los límites permitidos en la búsqueda del microorganismo.

Tabla 7. Límites máximos de contenido microbiano para quesos frescos

Microorganismo	Límite máximo
<i>Staphylococcus aureus</i>	≤100 UFC/g o mL
Enterotoxina estafilococcica	Negativa

De cada placa de cultivo se eligieron las UFC con las características típicas de *S. aureus* en medio Baird-Paker con yema de huevo y telurito de potasio conforme la NOM-115-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. METODO PARA LA DETERMINACION DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN ALIMENTOS. Procedimiento (Anexo 9). Las colonias típicas deben ser negras, circulares, brillantes, convexas, lisas, de diámetro de 1 a 2 mm y muestran una zona opaca y un halo claro alrededor de la colonia.

En la Imagen 3, se muestra el crecimiento típico de colonias *S. aureus* en medio Baird-Paker adicionado con yema de huevo y telurito de potasio.

Imagen 3. Aislamiento de Staphylococcus aureus en Baird-Paker con emulsión de yema de huevo y telurito de potasio.

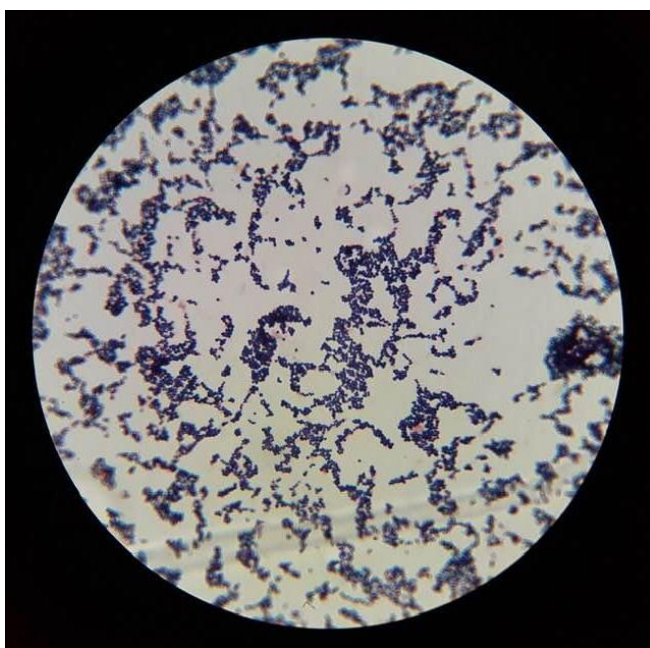


Según Rodríguez C. E., Gamboa C. M., Hernández C. F. y García H. J., las colonias de *S. aureus* después de 30 horas de incubación se deben observar negras y brillantes, rodeadas de una zona clara distinguible del resto del medio opaco y generalmente con un borde delgado opaco alrededor de las colonias. El color negro de las colonias se debe a la reducción del telurito a telurito metálico; cuando los estafilococos utilizan la lipovitелina reducen el tamaño de la molécula, le restan opacidad al medio, por lo que quedan áreas claras bajo y alrededor de las colonias.

También comentan en su libro de “Bacteriología General” que podemos tener el crecimiento ocasional de otras especies de estafilococos pero las colonias no presentan las características descritas como lo es con *S. epidermidis* que son colonias de color negro pero no brillantes y rara vez producen aclaración. Por otro lado podemos tener otras bacterias tales como *Proteus* y *Bacillus* pero sus colonias no son negras si no de color marrón por lo que son fácilmente distinguibles de las colonias estafilocócicas.

Por lo tanto se seleccionaron las placas de muestras de queso con colonias que confirmaban las características típicas de *S. aureus* en cultivo agar Baird-Parker. A las colonias seleccionadas se les realizó una Tinción gram para posteriormente observarlas en el microscopio. Al observar las muestras en microscopio con un objetivo de 100x y posteriormente al ser analizadas las diferentes placas seleccionadas, se seleccionó ahora aquellas colonias que presentaban las características en tinción Gram del género de la bacteria tales como cocos Gram positivos con un diámetro de 0.5 a 1.5 μm , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas, tal como lo muestra la Imagen 4. (Cervantes-García, 2014).

Imagen 4. Tinción Gram de cultivo de Staphylococcus aureus



Es importante mencionar que la disposición en racimos se favorece tras el cultivo en medios sólidos o líquidos, sin embargo en tinciones directas de muestras *S. aureus* puede aparecer como células aisladas o agrupadas en parejas, tétradas o cadenas cortas; estas agrupaciones se asemejan a las que presentan los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*, por lo que resulta difícil realizar una identificación presuntiva de género cuando se observan cocos gram positivos en el examen directo de muestras. Es por ello que se

necesita de una siguiente prueba confirmatoria para poder diferenciar los generos *Streptococcus* y *Staphylococcus*, es por eso que la prueba de la catalasa es ideal para el siguiente proceso. (Pahissa B. A., 2009)

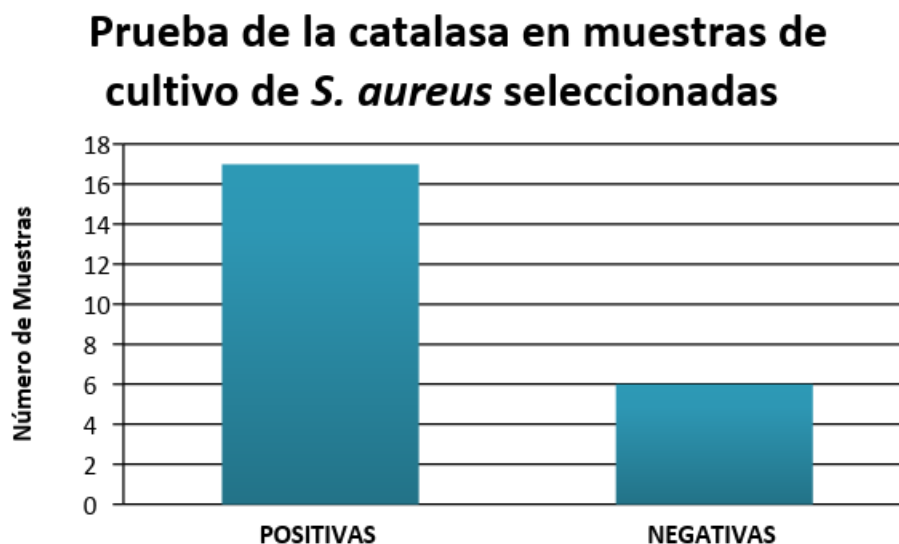
Se aislaron las colonias de bacterias que cumplieran con las características para posteriormente hacerles la prueba de la catalasa. La enzima catalasa cataliza la liberación de agua y oxígeno a partir del peróxido de hidrogeno. La presencia de la enzima se determina por medio de un análisis directo de un cultivo bacteriano donde la producción instantánea de burbujas (efervescencia) se forma en el momento que se pone en contacto el cultivo con el peróxido de hidrogeno, como se observa en la Imagen 5. (MacFaddin Jean F., 2003)

Imagen 5. Prueba de la catalasa positiva con peróxido de hidrógeno al 30%.



Si la efervescencia no se produce o se produce débilmente la muestra se toma como catalasa negativa. De las muestras analizadas se obtuvieron los siguientes resultados tal como lo muestra la Figura 8.2:

Figura 8.2. Comparación de resultados de la prueba de la catalasa a partir de muestras de colonias *S. aureus* seleccionadas.



Se analizaron 23 cultivos representativos para cada muestra de queso artesanal. De las 23 muestras se obtuvo que 17 muestras fueron catalasa positiva, siendo las que mayor cantidad presentaron a comparación de las que dieron catalasa negativa teniendo como resultado un total de 6 muestras.

Enseguida se muestra la lista de las muestras de queso artesanal que dieron positiva la prueba de la catalasa:

- | | |
|---------------|-----------------|
| 1. DR30081701 | 9. XN03101703 |
| 2. DR30081702 | 10. EZ14061701 |
| 3. NB05091701 | 11. EZ14061703 |
| 4. NB05091702 | 12. EZ14061704 |
| 5. NB12091703 | 13. ACO17101701 |
| 6. NB19091704 | 14. ACO17101703 |
| 7. NB26091705 | 15. ACO17101705 |
| 8. XN03101701 | 16. ACO17101706 |

17. ACO17101707

A las muestras que dieron la prueba de la catalasa positiva, se les hizo la prueba de la coagulasa como segunda prueba selectiva para la búsqueda de *Staphylococcus aureus* subespecie *aureus*.

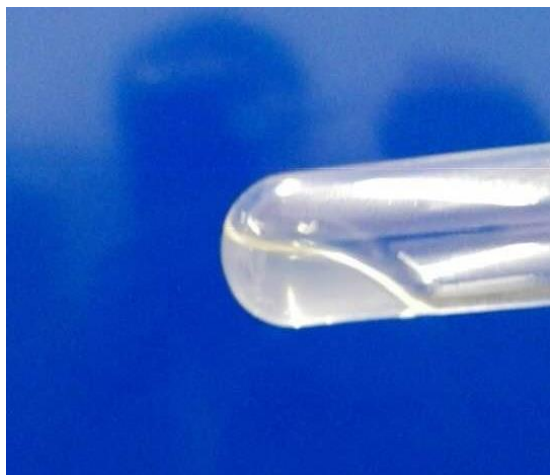
La prueba de la coagulasa se utiliza de manera específica en la diferenciación de especies pertenecientes al género *Staphylococcus*, nos ayuda a identificar la cepa *Staphylococcus aureus* de la cepa *Staphylococcus epidermis*.

En la prueba de la coagulasa los estafilococos coagulan el plasma de conejo, como la coagulasa es una sustancia semejante a la protrombina por lo tanto reacciona con los factores plasmáticos normales para formar un compuesto parecido a la trombina, que a su vez activa el fibrinógeno para formar fibrina que produce la formación de un coagulo. (MacFaddin Jean F., 2003).

Esta prueba es utilizada comúnmente para detectar el índice de virulencia o patogenicidad en esta bacteria, una reacción positiva a la coagulasa nos confirma la presencia de *S. aureus* enterotoxigénica como objeto de estudio en este estudio.

En la imagen 6 se puede apreciar la formación de un coagulo en el plasma de conejo dando como resultado una prueba positiva a *S. aureus* enterotoxigénica.

Imagen 6. Formación de coagulo en plasma de conejo confirmando prueba de la coagulasa como positiva.



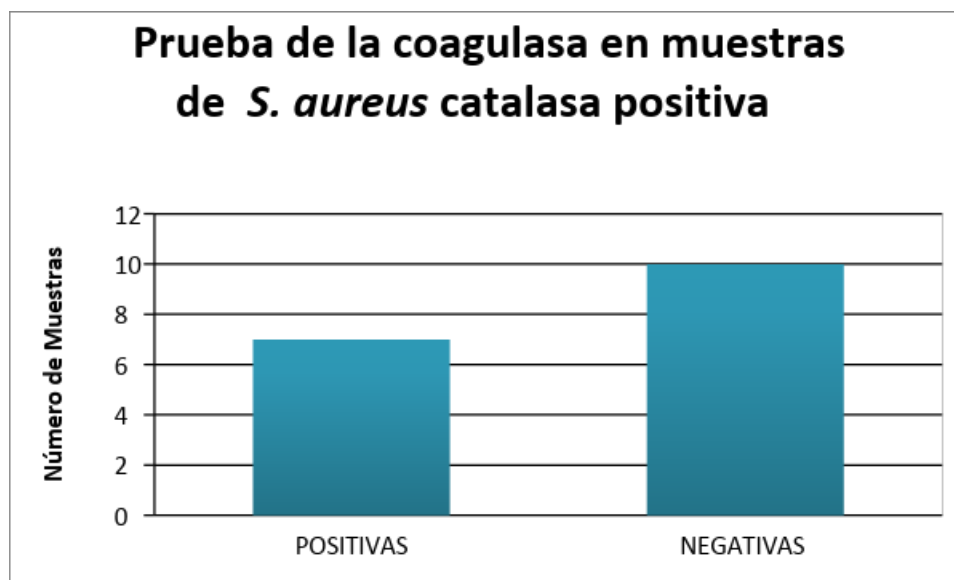
De 17 muestras catalasa positivas analizadas, 7 dieron positivas a la formación de un coagulo y 10 negativas, siendo mayor el número de muestras negativas que positivas para la prueba de la coagulasa, a comparación de la prueba de la catalasa donde sobre salió el número de muestras positivas.

Los quesos que resultaron ser positivos en la prueba fueron los siguientes:

1. DR30081702
2. NB05091701
3. XN03101703
4. EZ14061701
5. ACO17101705
6. ACO17101706
7. ACO17101707

En la figura 8.3 se puede apreciar la comparación de resultados.

Figura 8.3. Comparación de resultados de la prueba de la coagulasa a partir de muestras de colonias *S. aureus* catalasa positiva



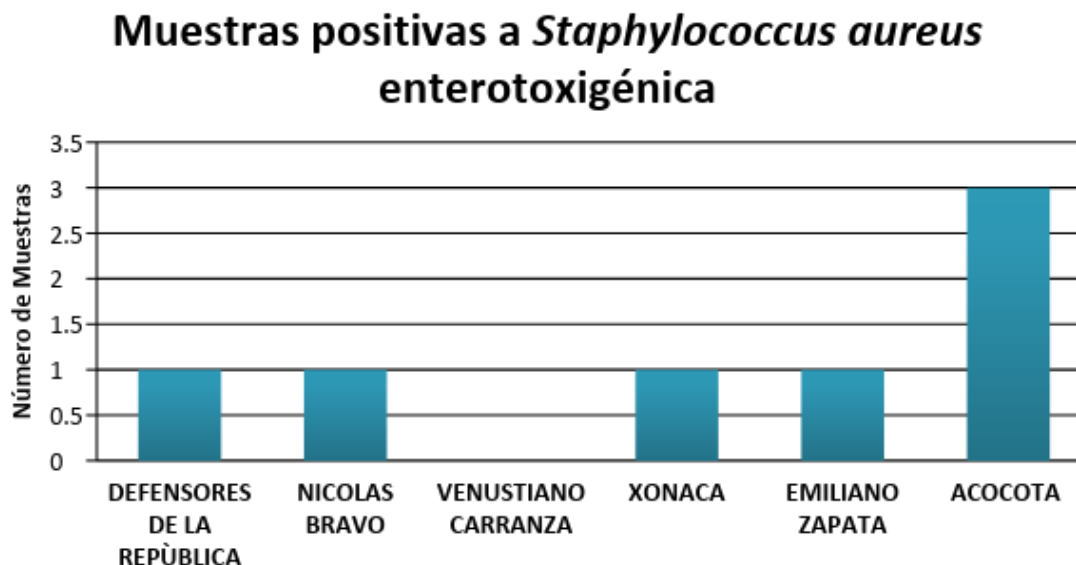
Las muestras positivas se aislaron y seleccionaron para su siguiente prueba.

El número total de muestras analizadas fue de 23 quesos frescos, de los cuales finalmente 7 muestras confirmaron la presencia de *Staphylococcus aureus* subespecie *aureus* (enterotoxigénica) como agente causal de una enfermedad de origen alimentario, de acuerdo a la NOM-115-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. METODO PARA LA DETERMINACION DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN ALIMENTOS.

Las 7 muestras positivas a *Staphylococcus aureus* enterotoxigénica fueron:

1. Defensores de la Republica: DR30081702
2. Nicolas Bravo: NB05091701
3. Xonaca: XN03101703
4. Emiliano Zapata: EZ14061701
5. Acocota: ACO17101705, ACO17101706, ACO17101707

Figura 8.4. Recuento de muestras positivas a *Staphylococcus aureus* enterotoxigénica por Mercado.



En la figura 8.4, se observa la comparación de los mercados muestreados. De los resultados obtenidos el mercado Acocota presenta un total de 3 muestras positivas siendo el mercado con mayor número de muestras positivas a comparación de los otros. Por otro lado el mercado Venustiano Carranza fue el que presento el menor número de muestras positivas con un equivalente a 0. Los mercados defensores de la república, Nicolás Bravo, Xonaca y Emiliano Zapata tuvieron el mismo resultado con un total de 1 muestra positiva.

Para la identificación de las cepas de *S. aureus* por PCR, se amplifica una secuencia del gen *FemA* la cual funciona como gen de referencia presentándose en cepas de *S. aureus* coagulasa positivas. (Tabla 6).

Tabla 8. *Secuencias de nucleótidos, ubicación de genes y tamaños anticipados de productos de PCR para primers de oligonucleótidos específicos de genes de S. aureus utilizados en este estudio.*

Gene	Primer	Secuencia de Oligonucleotidos (5'-3')	Ubicación dentro del gen	Tamaño del producto de amplificación (bp)
<i>sea</i>	GSEAR-1	GGTTATCAATGTGCGGGTGG	349-368	102
	GSEAR-2	CGGCACTTTTTTCTCTTCGG	431-450	
<i>seb</i>	GSEBR-1	GTATGGTGGTGTAAGTACG	666-685	164
	GSEBR-2	CCAAATAGTGACGAGTTAGG	810-829	
<i>sec</i>	GSECR-1	AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG	432-455	451
	GSECR-2	CACACTTTTAGAATCAACCG	863-882	
<i>sed</i>	GSEDR-1	CCAATAATAGGAGAAAATAAAAG	492-514	278
	GSEDR-2	ATTGGTATTTTTTTTCGTTC	750-769	
<i>see</i>	GSEER-1	AGGTTTTTTCACAGGTCATCC	237-257	209
	GSEER-2	CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC	425-445	
<i>femA</i>	GFEMAR-1	AAAAAAGCACATAACAAGCG	1444-1463	132
	GFEMAR-2	GATAAAGAAGAAACCAGCAG	1556-1575	

Recuperado de: Mehrotra, M., Wang, G., & Johnson, W. M. (2000). Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), 1032–1035.

Según Pelisser, M. R., Klein, C. S., Ascoli, K. R., Zotti, T. R. y Arisi, A., el 95% de los brotes de envenenamiento son causados por las enterotoxinas clásicas: A, B, C, D y E como ya mencionamos, siendo la enterotoxina A la más frecuente. Y se sabe que las enterotoxinas SEB y SEC causan el 50% de los casos de síndrome de choque tóxico. (Rocha G. Rosa del Carmen., Lozano Z. Patricia, Martínez L. Ygnacio, 2004).

Algunas pruebas han demostrado que SEF se asocia al síndrome de Shock tóxico, SEG y SEI no están bien estudiadas pero se asocian con intoxicación alimentaria en Taiwán, SEH se asoció también con intoxicación alimentaria pero esta por consumo de leche reconstituida en Osaka, Japón, en el 2000. (Muñoz M., 2015)

La cantidad de enterotoxinas estafilocócicas requeridas para el establecimiento de síntomas típicos de intoxicación alimentaria es muy baja, que oscila entre 20 ng y 1 µg. Lo que corresponde a aproximadamente 105 unidades formadoras de colonias de estafilococos por gramo de alimento. (Pelisser, M. R., Klein, C. S., Ascoli, K. R., Zotti, T. R., & Arisi, A., 2009)

El empleo de técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha permitido superar diversas dificultades siendo una herramienta eficaz y sencilla para establecer la presencia de genes de enterotoxinas en cepas de *S. aureus*.

Se tiene como objetivo presentar una estrategia rápida, fiable y de bajo costo, basada en una reacción de cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para que simultáneamente se pueda identificar *S. aureus* y la detección de genes de las enterotoxinas clásicas de *S. aureus* aisladas de alimentos, en este caso de queso fresco de elaboración artesanal.

La evaluación genotípica se hace utilizando *primers* para el gen FemA (gen específico para *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva) que funciona como control interno y SEA-SEE para detección de enterotoxina.

Las muestras coagulasa positivas se aislaron y cultivaron en caldo nutritivo para su posterior extracción de ADN. Al ADN de las muestras aisladas se les realizó primero la prueba de la PCR para determinar el gen FemA, gen de referencia representativo a cepas de *S. aureus* catalasa y coagulasa positivas. (Mehrotra, M., Wang, G., & Johnson, W. M., 2000)

El programa de PCR punto final que se optimizó para la búsqueda del gen *FemA* y las 5 enterotoxinas fue de 35 ciclos: 98 °C por 4 minutos, 98 °C por 10 segundos, 57 °C por 10 segundos y 72 °C por 2 segundos.

De las 7 muestras analizadas todas resultaron presentar el gen FemA, gen que confirma la detección de por lo menos una de las 5 enterotoxinas principales que producen la infección

estafilocócica a excepción de dos diluciones de menor concentración de una muestra que fueron negativas.

Imagen 7. Presencia de gen FemA mediante PCR en muestras positivas a la prueba de la coagulasa.



De izquierda a derecha se observa en el gel de la Imagen 7:

- Carril 1: Sin muestra.
- Carril 2.- Marcador de peso molecular de 1 kb.

- Carril 3.- Muestra de queso DR30081702 con *primer mix* de FemA.
- Carril 4.- Muestra de queso NB05091701 con *primer mix* de FemA.
- Carril 5.- Muestra de queso XN03101703 con *primer mix* de FemA.
- Carril 6.- Muestra de queso EZ14061701 con *primer mix* de FemA.
- Carril 7.- Muestra de queso ACO17101705 con *primer mix* de FemA.
- Carril 8 y 9.- Muestra de queso ACO17101705 (dilución menor) con *primer mix* de FemA, el resultado fue que no amplificó FemA, por lo que se siguió trabajando con la muestra que contenía una mayor concentración (la del pocillo no. 7).
- Carril 10.- Muestra de queso ACO17101706 con *primer mix* de FemA.
- Carril 11.- Muestra de queso ACO17101707 con *primer mix* de FemA.
- Carril 12.- Control positivo para FemA a partir de cepa de *S. aureus* ATCC 25923.
- Carril 13.- Control negativo con *primer mix* de FemA (sin DNA de *S. aureus*).
- Carril 14.- Marcador de peso molecular de 100 bp.

En el gel de agarosa de la imagen 7, se observó que las muestras que amplificaron tenían un tamaño de aproximadamente 120 pb ya que como se observa la banda de amplificación del gen FemA se encuentra entre los 250 pb del marcador de peso molecular de 1 Kb y los 100 pb del marcador de peso molecular de 100 pb (Anexo 6) acercándose mas a este.

Por lo tanto analizado los resultados como se observa en la Imagen 4.5, las muestras de queso que amplificaron positivas al gen FemA fueron las 7 muestras que dieron catalasa y coagulasa positivas y su resultado no se debe a una contaminación ya que el control negativo no amplifica nada.

“La importancia de la detección del gen FemA en muestras supuestamente *S. aureus* resulta de gran impacto ya que dicha proteína se relaciona con la patogenicidad que tienen sus enterotoxinas y el desarrollo de la resistencia a antibióticos por sus características confirmando que la presencia del gen FemA es positiva en muestras del género *Staphylococcus* especie *aureus*”. (Johnson S., Krüger D., Labischinski H., 1995). Es así como la presencia del gen FemA en las muestras nos determina que cada muestra tiene por lo menos la presencia de una de las 5 enterotoxinas principales que provocan la infección

estafilocócica y a su vez que no cumplen con la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, productos lácteos combinados y derivados lácteos, que nos confiere que el producto debe ser negativo a la presencia de cualquier enterotoxina estafilocócica para su comercio.

Como todas las muestras que fueron analizadas dieron positivo a la presencia del gen FemA, se les hizo una multiplex PCR. Una multiplex PCR se hace con la mezcla del ADN de todas las muestras positivas y se hace reaccionar con cada *primer mix* de enterotoxina estafilocócica diferente. Este método nos ayuda a detectar la presencia de por lo menos una enterotoxina en una de las 7 muestras. Si en la prueba amplifica la presencia de una enterotoxina, se le hace a las 7 muestras por separado una PCR de punto final con el primer de la toxina que amplificó como positiva en la multiplex PCR para determinar cuántas y cuales muestras tienen la enterotoxina.

Al hacer la multiplex PCR, como lo muestra la imagen 4.6, se observa que amplificaron las enterotoxinas A y C y que las toxinas B, D, y E, fueron negativas a la prueba. Esto corrobora lo que dice la ICMSF, que la mayoría de las toxinas que pertenecen al grupo de intoxicación alimentaria implican a la enterotoxina A y en este caso también a la C.

Por otro lado Mehrabi F. y Asgari A. mencionan que en su estudio “*Resistant Strains of Enterotoxigenic Staphylococcus aureus; Unknown Risk for Multiple Sclerosis Exacerbation*” que 90 de 200 muestras nasales (45%) dieron positivo para *S. aureus*. Los niveles más altos de colonización nasal se observaron en el grupo de exacerbación de la esclerosis múltiple (68,33%), de las cuales las enterotoxinas más comúnmente detectadas fueron SEA (30%), SEC (15.55%) y SEB (11.11%), siendo la toxina A y la C las que mayormente se detectaron.

Imagen 8. Multiplex PCR para la detección de enterotoxinas A, B, C, D, E y gen de referencia *FemA*



De izquierda a derecha observamos en el gel de agarosa de la Imagen 8:

- Carril 1: Sin muestra.
- Carril 2: Marcador de peso molecular de 1 kb.
- Carril 3: DNA Mix de muestras con *Primer mix* para SEA.
- Carril 4: Control negativo con *Primer mix* para SEA.
- Carril 5: DNA Mix de muestras con *Primer mix* para SEB.
- Carril 6: Control negativo con *Primer mix* para SEB.

- Carril 7: DNA Mix de muestras con *Primer mix* para SEC.
- Carril 8: Control negativo con *Primer mix* para SEC.
- Carril 9: DNA Mix de muestras con *Primer mix* para SED.
- Carril 10: Control negativo con *Primer mix* para SED.
- Carril 11.- DNA Mix de muestras con *Primer mix* para SEE.
- Carril 12.- Control negativo con *Primer mix* para SEE.
- Carril 13.- DNA Mix de muestras con *Primer mix* para FemA.
- Carril 14.- Control negativo con *Primer mix* para FemA.
- Carril 15.- Marcador de peso molecular de 1 kb.

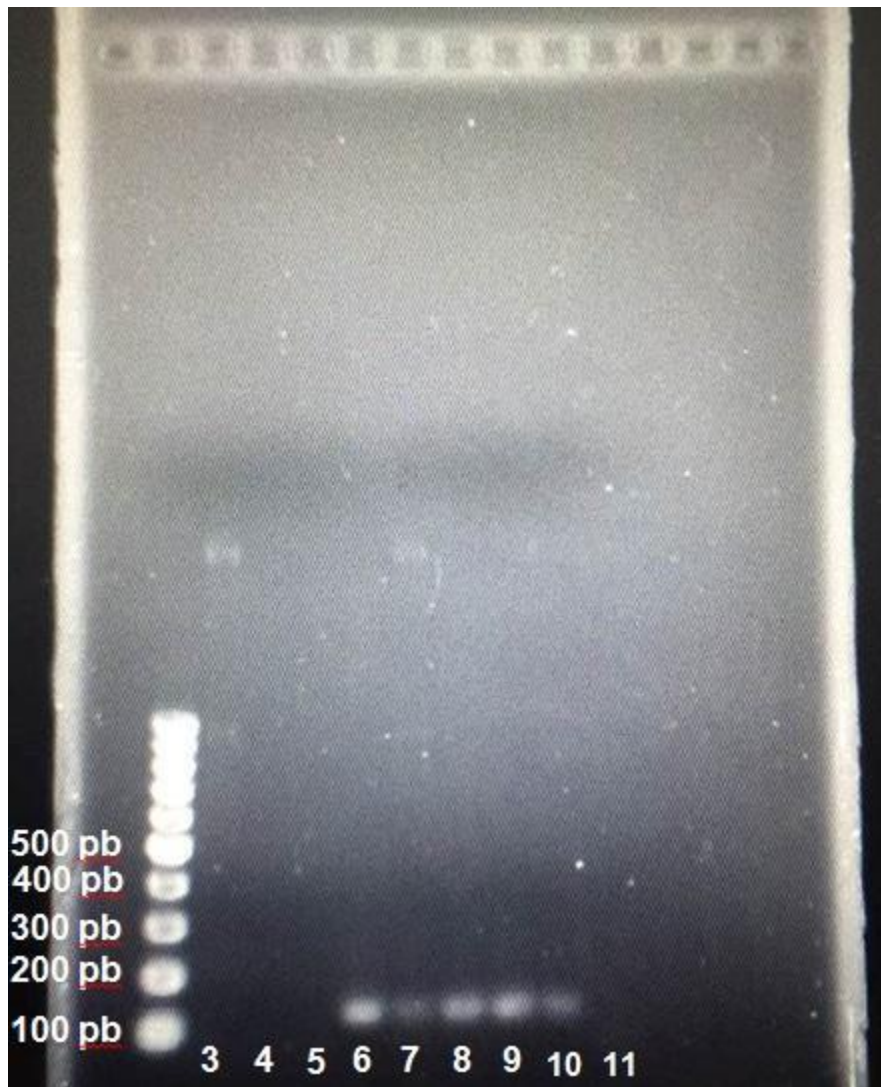
En el gel de agarosa de la imagen 8, se observa que las muestras que amplificaron fueron la del carril 3, DNA Mix de muestras con *Primer mix* para SEA, de que en la Tabla 6 menciona que tiene un tamaño de 102 pb y la muestra del carril 7, DNA Mix de muestras con *Primer mix* para SEC, que en la Tabla 6 dice que tiene un peso molecular de 445 pb. Con los marcadores de peso molecular de 1 kb (Anexo 6) se puede observar que el tamaño de las bandas coincide aproximadamente con los tamaños que se observan en la Tabla 6.

Para saber cuántas muestras de las 7 muestras de DNA mezcladas tiene la enterotoxina A y cuántas la enterotoxina C se hizo una PCR de punto final por separado a cada muestra y así analizar el tamaño de las amplificaciones más detalladamente. Se hizo una corrida para detectar la presencia de la enterotoxina A y otra corrida para la enterotoxina C.

Las muestras para la detección de las enterotoxinas mediante PCR punto final, se corrieron con el mismo programa que se usó para la detección del gen FemA.

Al hacer la corrida de la enterotoxina A se observa que de las 7 muestras analizadas solo 4 dieron positivas a la presencia de la enterotoxina estafilocócica A, como lo muestra la Imagen 9.

Imagen 9. PCR punto final para detección de la enterotoxina A



En el gel de agarosa de la Imagen 9 podemos observar de izquierda a derecha:

- Carril 1: Sin muestra.
- Carril 2: Marcador de peso molecular de 100 bp.
- Carril 3: Muestra DR30081702 con *primer mix* para SEA.
- Carril 4: Muestra NB05091701 con *primer mix* para SEA.
- Carril 5: Muestra XN03101703 con *primer mix* para SEA.
- Carril 6: Muestra EZ14061701 con *primer mix* para SEA.

- Carril 7: Muestra ACO17101705 con *primer mix* para SEA.
- Carril 8: Muestra ACO17101706 con *primer mix* para SEA.
- Carril 9: Muestra ACO17101705 con *primer mix* para SEA.
- Carril 10: Control positivo para SEA.
- Carril 11: Control negativo para SEA.

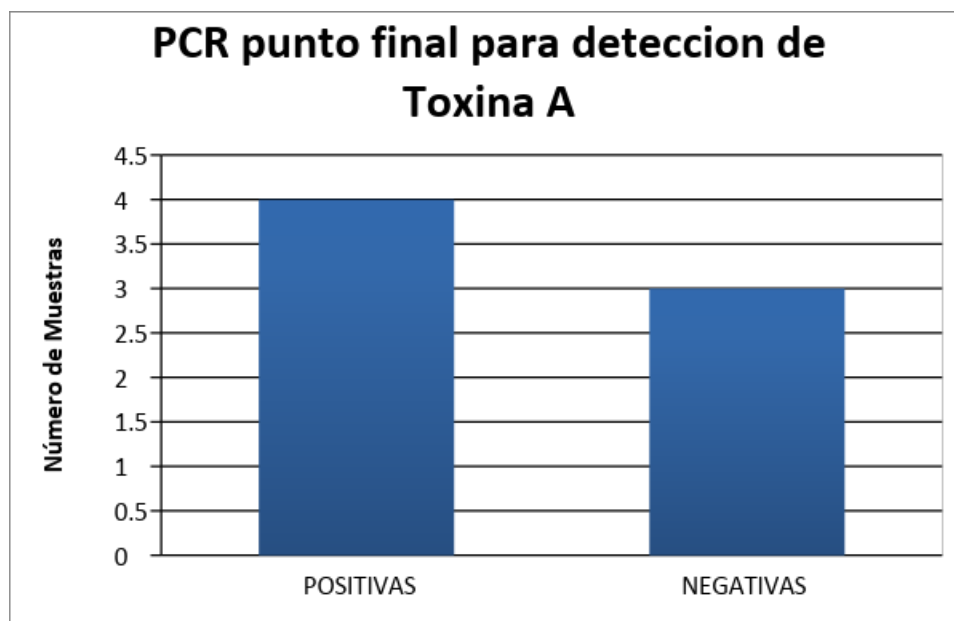
En el gel de agarosa de la imagen 9, se puede apreciar que el carril 6, 7, 8 y 9 amplificaron al mismo tamaño que el control positivo para el gen FemA, se observa una amplificación con un tamaño aproximado de 102 pb, tomando en cuenta que se encuentra muy cerca de los 100 pb del marcador de peso molecular de 100 bp (Anexo 6) lo que nos comprueba que efectivamente se trata del gen FemA presente en al menos 4 muestras de las 7 que fueron analizadas.

Por lo tanto las muestras que dieron positivas a la enterotoxina A fueron:

1. EZ14061701
2. ACO17101705
3. ACO17101706
4. ACO17101707

Mientras que DR30081702, NB05091701 y XN03101703 dieron negativas, siendo mayor el número de muestras positivas que negativas para la prueba con la toxina A, como se muestra en la Figura 8.5.

Figura 8.5. Recuento de muestras positivas para la enterotoxina estafilocócica A.



Es importante mencionar que según Gloria Morcillo O., Estrella Cortés R., José Luis García L., la enterotoxina A es la que más frecuentemente está asociada a los brotes de intoxicación alimentaria estafilocócica. Su presencia en los alimentos indica casi siempre una manipulación incorrecta del producto, debido generalmente a prácticas higiénicas inadecuadas. Por otro lado, Acha Pedro N. y Szyfres B., mencionan que la enterotoxina A es la más prevalente en los brotes de infección estafilocócica y que algunas investigaciones arrojan que una alta proporción de cepas aisladas de vacas con mastitis estafilocócicas producen la enterotoxina A.

También, respecto de la prevalencia, cabe resaltar que la enterotoxina A es extremadamente potente y con una cantidad tan pequeña como 100 ng es suficiente para causar síntomas de intoxicación. (Zendejas-Manzo G., Avalos-Flores H., Soto-Padilla M., 2014)

Para la corrida de las muestras con la enterotoxina SEC se obtuvieron otros resultados, la presencia de la enterotoxina se encontró que amplificó en 5 de las 7 muestras analizadas, como se observa en la Imagen 10.

Imagen 10. PCR punto final para detección de la enterotoxina C.



En el gel de agarosa de izquierda a derecha se puede observar:

- Carril 1: Sin muestra.
- Carril 2: Sin muestra.
- Carril 3: Marcador de peso molecular de 100 bp.
- Carril 4: Muestra DR30081702 con *primer mix* para SEC.
- Carril 5: Muestra NB05091701 con *primer mix* para SEC.
- Carril 6: Muestra XN03101703 con *primer mix* para SEC.

- Carril 7: Muestra EZ14061701 con *primer mix* para SEC.
- Carril 8: Muestra ACO17101705 con *primer mix* para SEC.
- Carril 9: Muestra ACO17101706 con *primer mix* para SEC
- Carril 10: Muestra ACO17101705 con *primer mix* para SEC
- Carril 11: Control positivo para SEC.
- Carril 12: Control negativo para SEC.

Las muestras que amplificaron como se observa en el gel de agarosa de la imagen 10 fueron la de los carriles 3, 4, 5, 8 y 9, que se encuentran a la altura de la banda del control positivo para la enterotoxina C. Las amplificaciones tienen un tamaño aproximado de 510 pb, por lo que no concuerdan con el de la Tabla 6 que menciona que la enterotoxina C debe tener un tamaño de 451 pb. La diferencia entre los tamaños es de 50 pb por lo que puede tratarse de alguna variante de la enterotoxina C o de otra enterotoxina similar a la enterotoxina C, ya que como lo mencionan Marr James C., Lyon Julie D., Roberson Jerry R., Lupher Mark, Davis William C. y Bohach Gregory A., las enterotoxinas estafilocócicas tipo C (SEC) son un grupo de proteínas altamente conservadas con una reactividad cruzada inmunológica significativa y a pesar que la literatura ha descrito tres subtipos de SEC antigénicamente distintos (SEC1, SEC2 y SEC3), se observa que los puntos isoeléctricos de SEC de varios aislamientos de *Staphylococcus aureus* son diferentes de los de cualquiera de estos tres subtipos, lo que llega a proponer que puede que existan variantes moleculares SEC adicionales. Tendría que hacerse un estudio más preciso como lo es la secuenciación de los genes amplificados para conocer información sobre los fragmentos de la secuencia que está amplificando como positiva al *Primer Mix* de la enterotoxina C.

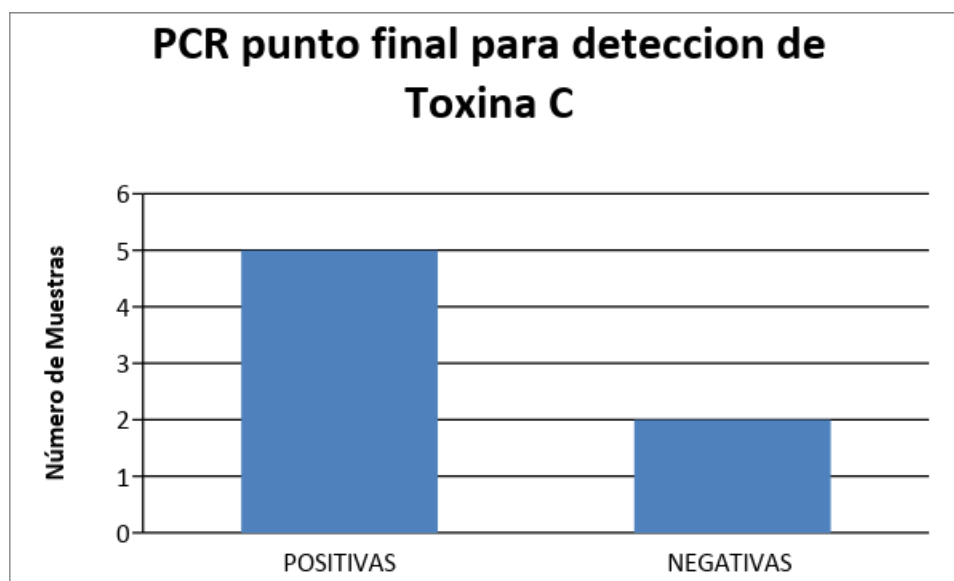
Por lo tanto el análisis de los resultados en las muestras que dieron positivas a la enterotoxina C fueron:

1. DR30081702
2. NB05091701
3. XN03101703
4. ACO17101706

5. ACO17101707

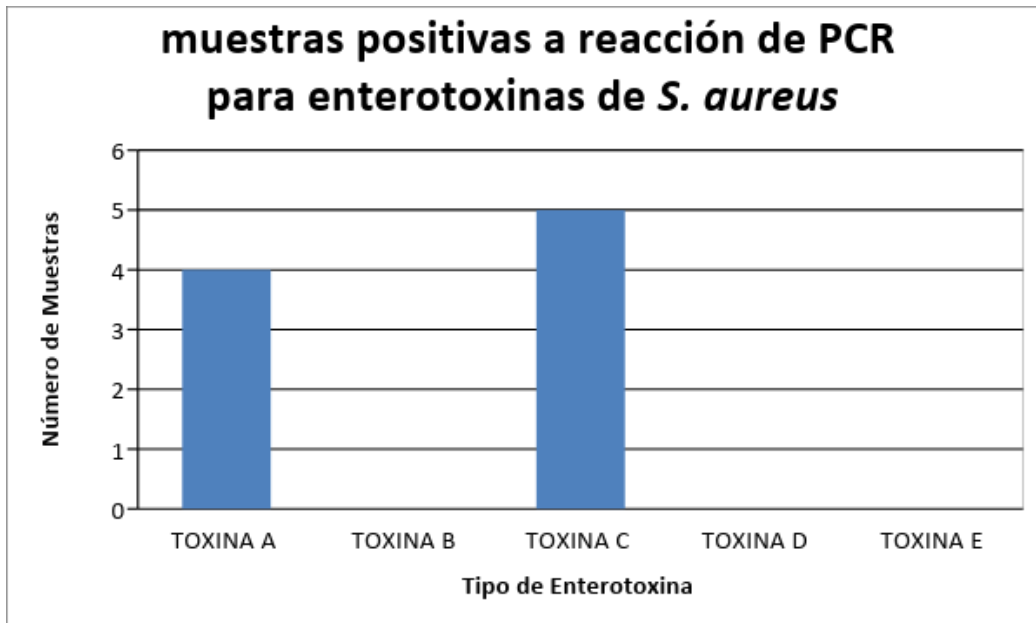
Dando como resultado que EZ14061701 y ACO17101705 fueron negativas para la presencia de la toxina estafilocócica C. Por lo tanto fue mayor el número de muestras positivas que negativas en esta prueba tal y como se aprecia en la Figura 8.6.

Figura 8.6. Recuento de muestras positivas para la enterotoxina estafilocócica C.



En conclusión, de las 23 muestras representativas, 7 fueron positivas a la prueba de la catalasa y a la prueba de la coagulasa, así mismo esas 7 muestras fueron positivas a la detección del gen FemA y al haber realizado las pruebas de PCR para las toxinas A, B, C, D y E, se observó que la toxina con mayor presencia fue la toxina C a comparación de la toxina A que tuvo un total de 4 muestras positivas y de las toxinas B, D y E que fueron negativas para las 7 muestras, tal y como se observa en la Figura 8.7.

Figura 8.7. Recuento total de muestras positivas para las enterotoxinas estafilocócicas A, B, C, D y E.



Consultando la **NOM-243-SSA1-2010**, en el apartado 6 (Especificaciones sanitarias), se tiene la **Tabla 5**. Límites máximos de contenido microbiano para leche y derivados lácteos., donde dicta que para su comercio el alimento, en este caso quesos de elaboración artesanal debe ser negativo para la enterotoxina estafilocócica por lo que no cumple con la Norma Oficial Mexicana, ya que por lo menos 7 muestras de quesos presentaron 1 o 2 enterotoxinas. Por medio del análisis de los resultados mediante pruebas bioquímicas y la prueba de PCR, se demostró que 4 muestras fueron positivas a la enterotoxina A y 5 muestras fueron positivas a la enterotoxina C, presentándose ambas enterotoxinas en 2 de las 7 muestras analizadas y confirmando lo que Morcillo O. G., Cortés R. E. y García L. José Luis mencionan, que la enterotoxina A y C son la que más frecuentemente están asociadas a los brotes de intoxicación alimentaria estafilocócica.

Con estos resultados se puede concluir que al menos en 6 de los principales mercados municipales de la ciudad de Puebla no cumple con la **NOM-243-SSA1-2010**. Siendo así que no debería permitirse la venta de alimentos contaminados por la bacteria *Staphylococcus aureus* enterotoxigénica, ya que según la FAO es una de las 4 principales

bacterias que producen enfermedades por transmisión en alimentos, sin mencionar que la OMS publicó una lista de las principales bacterias resistentes a antibióticos en la que se incluyen las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana donde *S. aureus* se consideró de prioridad 2 (ELEVADA), por lo cual resulta de interés para el área de investigación clínica y patológica.

Por ello es importante tener una comprensión más profunda de lo que promueve la producción de las enterotoxinas estafilocócicas, especialmente en entornos alimentarios. Así como determinar qué enterotoxinas de *S. aureus* son responsables de la infección estafilocócica y cuáles están presentes mediante pruebas moleculares, resultando más confiable ya que pueden detectar directamente los genes y las regiones de las enterotoxinas y por ende la presencia física de la toxina en alimentos sospechosos contaminados. “La capacidad de cultivar y caracterizar con precisión el *S. aureus* causante de infección estafilocócica ayudará significativamente a comprender la verdadera incidencia y prevalencia de la intoxicación.” (Fisher E. L., Otto M., Cheung G., 2018)

Por otro lado la prevención como uno de los objetivos de este trabajo es considerar que los quesos siendo los de más alta demanda en nuestro país, deban tener un tratamiento térmico eficaz y un mantenimiento en condiciones estrictas de sanidad, ya que por ser productos poco fermentados, ligeramente ácidos (pH en torno a 5,3), con alta humedad (actividad del agua de 0,9), con un bajo porcentaje de sal (menor al 3%) y con un potencial de óxido-reducción electronegativo (ausencia de oxígeno), se vuelven alimentos que promueven el desarrollo de microorganismos patógenos. Así como tomar conciencia en la continuidad de la cadena fría del producto terminado la cual es muy importante para los consumidores, puesto que son los que tendrán que mantener esa continuidad en casa, a la par de exigir su mantenimiento en los centros de distribución y venta.

También, a partir del 20 de enero del 2009, las autoridades de Estados Unidos prohibieron la entrada de productos derivados de quesos mexicanos en la frontera. De acuerdo a las nuevas restricciones, todos los quesos provenientes de México deben ser declarados ante el agente federal estadounidense que solicita la documentación migratoria en el momento de

ingresar a suelo estadounidense. La decisión se basó en que se percibe como riesgo para la salud, los productos procesados posiblemente contaminados, de allí que se prohíba su ingreso a suelo estadounidense. La FDA publica un artículo en el que explica que estos quesos contaminados llegan principalmente de México y Centroamérica. (Ramírez Miranda I., 2011)

Considerando estos puntos se tendría que analizar acerca de los beneficios de los cambios establecidos en la **NOM-243-SSA1-2010**, hacia nosotros los consumidores, y evaluar la capacidad de las autoridades competentes de llevar a cabo inspecciones sanitarias realmente efectivas por parte de los verificadores. Finalmente lo más importante de una norma es que se aplique para que cumpla su objetivo, y el objetivo de esta norma es proteger a la población.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Acha Pedro N., Szyfres Boris. (2005). Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals, Volumen 1. Pan American Health Org.
- Allaert V. C., Escolá R. M. (2002). Métodos de análisis microbiológicos de alimentos. Ediciones Díaz de Santos.
- ArgenBio (2007). Introducción a técnicas de biología molecular y de ingeniería genética. Recuperado de: <http://www.porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1¬e=67>
- Badal S., Delgoda R. (2017). Farmacognosia: Fundamentos, Aplicaciones y Estrategias. Elsevier Inc. Páginas 687 – 716.
- Bergdoll, M. s. The enterotoxins. Cohen, J.O., ed The Staphylococci. New York: Wiley 1972.
- “BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA”. NOM-092-SSA1-1994. Diario Oficial de la Federación, 12 de diciembre de 1995.
- “BIENES Y SERVICIOS. METODO PARA LA DETERMINACION DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN ALIMENTOS”. NOM-115-SSA1-1994. Diario Oficial de la Federación, 25 de septiembre de 1995.
- “BIENES Y SERVICIOS. PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO”. NOM-110-SSA1-1994. Diario Oficial de la Federación, 10 de mayo de 1995.
- Brizzio, A., Tedeschi, F., Zalazar, F. (2011). Description of an staphylococcal alimentary poisoning outbreak in Las Rosas, Santa Fe Province, Argentina. Revista Argentina De Microbiología, 43(1), 28-32. Recuperado de <http://bibliotecavirtual.unad.edu.co:2051/login.aspx?direct=true&db=edselc&AN=edselc.2-52.0-79953213006&lang=es&site=eds-live>

- Brizzio A., Tedeschi F., Zalazar F. (2013). Estrategia de PCR múltiple para la caracterización molecular simultánea de *Staphylococcus aureus* y enterotoxinas estafilocócicas en aislamientos de brotes de origen alimentario. marzo 25, 2016, de SciELO Sitio web: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572013000100015
- Borunda A., Socorro J. (2011). Biología molecular. McGraw Hill Mexico.
- Chans G. (2002). Estafilococos. Marzo 4 del 2016, de Instituto de Higiene - Universidad de la República Uruguay Sitio web: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2017.pdf>.
- Cruces B. C. (1998). Electroforesis capilar. Universidad Almería. Recuperado de: https://books.google.com.mx/books?id=TUSWtthmCc0C&printsec=frontcover&dq=electroforesis&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjgr431_dzgAhUqmeAKHZw_DjsQ6AEINzAD#v=onepage&q=electroforesis&f=false
- Escartín F. E. (2000). Microbiología e inocuidad de los alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Félix A., Campas O., Meza M., (2005). CALIDAD SANITARIA DE ALIMENTOS DISPONIBLES AL PÚBLICO DE CIUDAD OBREGÓN, SONORA, MÉXICO. abril 6, 2016, de RESPYN Sitio web: http://www.respyn.uanl.mx/vi/3/articulos/calidad_sanitaria.htm
- FAO. (2010). GUÍA PARA MUESTREO DE ALIMENTOS. América central y América del Sur: FAO.
- FAO. (2016). Mejoramiento de la calidad y seguridad de los alimentos. abril 22, 2016, de FAO Sitio web: <http://www.fao.org/docrep/006/w0073s/w0073s12.htm>
- FAO. (2011). Procesos para la elaboración de productos lácteos. marzo 21, 2016, de FAO Sitio web: http://coin.fao.org/coin-static/cms/media/11/13305375675880/manual_lacteos_3_atinar_ii.pdf
- Fisher, E. L., Otto, M., & Cheung, G. (2018). Basis of Virulence in Enterotoxin-Mediated *Staphylococcal* Food Poisoning. *Frontiers in microbiology*, 9, 436. doi:10.3389/fmicb.2018.00436

- F. P. Downes. (2001). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4° Edition. APHA.
- González M. (2002). Tecnología para la Elaboración de Queso Blanco, Amarillo y Yogurt. marzo 21,2016, de ARGENBIO Sitio web: http://www.argenbio.org/doc/tecnologia_para_la_elaboracion_de_queso.pdf
- Guadalupe Socorro Zendejas-Manzo, Héctor Avalos-Flores, Marisela Yadira Soto-Padilla. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. Universidad de la Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo, México. Rev Biomed 2014; 25:129-143
- Gutiérrez S. (2006). Fundamentos de ciencias básicas aplicadas a la odontología. Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.
- ICMSF. (2001). *Staphylococcus aureus*. En Microbiología de los alimentos - Características de los patógenos microbianos (pp. 349-356). España: ACRINIA S.A.
- Ingraham J., Ingraham C. (1998). Introducción a la microbiología. II Volume 2 of Introducción a la microbiología, Harriett Prentiss, ISBN 8429118691, 9788429118698. University of California, Davis: Reverte.
- Johnson S., Krüger D., Labischinski H. (1995). FemA of *Staphylococcus aureus*: isolation and immunodetection. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. PMID: 7590176. DOI:10.1111/j.1574-6968.1995.tb07837.x
- Khan Academy. (2019). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Khan Academy. AMGEN Foundation. Recuperado de: <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr>
- Kopper G. (2009). Estudio de Caso – Enfermedades Transmitidas por Alimentos en Costa Rica. Costa Rica: FAO.
- Kopper, G., Calderón, G., Schneider, S., Domínguez, W., Gutiérrez, G. (2009). Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Roma: ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN.

- López M. J., Cárdenas M., Osuna A. (2012). Manual de laboratorio de microbiología para el diagnóstico de infecciones genitales. España: OmniaScience.
- MacFaddin J. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Montevideo, Uruguay: Editorial Médica Panamericana S. A.
- Manfredi, E. A., Leotta, G. A., & Rivas, M. (2010). PCR múltiple para la detección de los genes sea, seb, sec, sed y see de *Staphylococcus aureus*: Caracterización de aislamientos de origen alimentario. *Revista argentina de microbiología*, 42(3), 212-215.
- Marr James C., Lyon Julie D., Roberson Jerry R., Lupher Mark, Davis William C. y Bohach Gregory A. (1993). Caracterización de nuevas enterotoxinas estafilocócicas tipo C: implicaciones biológicas y evolutivas. Department of Bacteriology and Biochemistry, University of Idaho, Moscow, Idaho , and Department of Veterinary, Clinical Medicine and Surgery and Department of Veterinary Microbiology and Surgery. American Society for Microbiology.
- Washington State University, Pullman, Washington 99164
- Martínez R. (2012). Salud y enfermedad del niño y del adolescente. México: Editorial El Manual Moderno.
- Mehrabi F., Asgari A. (2015). Resistant Strains of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus*; Unknown Risk for Multiple Sclerosis Exacerbation. Iran Red Crescent Med J. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4601249/>
- Mehrotra, M., Wang, G., & Johnson, W. M. (2000). Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance.[Tabla 6] *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), 1032–1035.
- Moral I. (2012). Comparación de medias. España: Sociedad Española de Enfermería Nefrológica.
- Morcillo O. G., Cortés R. E., García L. José Luis. (2013). Biotecnología y alimentación. CUADERNOS UNED. Editorial UNED.
- Muñoz M. (2015). DETECCIÓN DE GENES DE ENTEROTOXINAS EN AISLAMIENTOS CLINICO. 25 marzo, 2016, de Universidad del Zulia Sitio web:

<https://prezi.com/h6qjuo98vn4i/deteccion-de-genes-de-enterotoxinas-en-aislamientos-clinico/>

- Ordoñez, J., ICMSF. (2001). Leche y productos Lácteos. En Microbiología de los alimentos (pp. 496-502). España: ACRINIA S.A.
- Pahissa Berga A. (2009). Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. MARGE BOOKS.
- Pascual M., Calderón V. (1999). Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas. Madrid, España: Díaz de Santos S.A.
- Pelisser, M. R., Klein, C. S., Ascoli, K. R., Zotti, T. R., & Arisi, A. C. M. (2009). Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex pcr detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(1), 145–148. <http://doi.org/10.1590/S1517-838220090001000025>
- “Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba”. NOM-243-SSA1-2010. Diario Oficial de la Federación, 27 de septiembre del 2010.
- Ramírez Miranda I. (2011). Inocuidad en la elaboración de quesos con respecto a la nueva NOM-243-SSA1-2010. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM.
- Ramírez, I. (2015). Inocuidad en la Elaboración de Quesos con Respecto a la NOM-243-SSA1-2010. abril 6, 2016, de BMeditores mx Sitio web: <http://bmeditores.mx/inocuidad-en-la-elaboracion-de-quesos-con-respecto-a-la-nom-243-ssa1-2010/>
- Ramírez-López C. (2012). Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. marzo 21, 2016, de UDLAP Sitio web: <http://web.udlap.mx/tsia/files/2013/12/TSIA-62Ramirez-Lopez-et-al-2012.pdf>
- Rocha G. Rosa del Carmen., Lozano Z. Patricia, Martínez L. Ygnacio. (2004). Mecanismos de Patogenicidad e Interacción: Parásito-Hospedero. Enterotoxinas. BUAP. Rodríguez C. E., Gamboa C. M., Hernández C. F. y García H. J. (2016). Bacteriología General: Principios Y Prácticas de Laboratorio. Editorial Universidad de Costa Rica.
- Rodríguez Evelyn. (2005). Bacteriología general: principios y prácticas de laboratorio. (pp. 217). Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica.

- Sandoval Junior E. (2017) Grupo de Investigación en Separaciones Analíticas. Recuperado de: <http://sepan.correounivalle.edu.co/>
- Singh Shashank Kr, Anwar Saleha, Sharma Hemant Kr, Chaudhary Upendra, Verma Sunil Kr. (2014) FemA gene in Indian isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* – isolation and amplification through real time PCR. Deptt. of Biotechnology, Delhi Technological University, New Delhi, India Dept. of Biosciences, Faculty of Applied Science, Integral University, Amity Institute of Biotechnology, Amity University, U.P., Lucknow Campus, India. European Journal of Experimental Biology.
- Seija V. (2002). COCOS GRAM POSITIVOS: Aspectos prácticos. marzo 25, de Instituto de Higiene, Universidad de la República Uruguay Sitio web: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2019.pdf>
- W. Koneman E., Allen S. (2008). Koneman. Diagnostico Microbiologico/ Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/ Text and Color Atlas. Ed. Médica Panamericana.
- Zilinskiene J. (2016). Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit #K0721. Thermo Fisher Scientific Inc. Recuperado de: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012663_GeneJET_Genomic_DNA_Purification_Kit_UG.pdf

ANEXOS

A1.- NORMA Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.

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

MIGUEL ANGEL TOSCANO VELASCO, Comisionado Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en el artículo 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 4 de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo; 3 fracción XXIV, 13 apartado A fracciones I y II, 17 bis fracción III, 17 bis 2, 114, 115, fracción VII, 194 fracción I, 197, 199, 201, 205, 210, 212, 214, 215 fracción I, 216 de la Ley General de Salud; 3 fracción XI, 38 fracción II, 40 fracciones I, II y XI, 41, 43, 46, 47 fracción IV de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 28 del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 1 fracción I, 4, 8, 13, 15, 25, 30, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 52, 53, 54, 55 y 56 del Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios; 2 inciso C fracción X del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud; 3 fracción I inciso C y fracción II y 10 fracciones IV y VIII del Reglamento de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, y

CONSIDERANDO

Que en cumplimiento a lo previsto en el artículo 46 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, el Subcomité de Productos y Servicios presentó en el año de 2005 al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, el anteproyecto de Norma Oficial Mexicana.

Que con fecha 23 de junio de 2008, en cumplimiento del acuerdo del Comité y lo previsto en el artículo 47 fracción I, de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, se publicó el Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-243-SSA1-2005, PRODUCTOS Y SERVICIOS. LECHE, FORMULA LACTEA, PRODUCTO LACTEO

COMBINADO Y DERIVADOS LACTEOS. DISPOSICIONES Y ESPECIFICACIONES SANITARIAS. METODOS DE PRUEBA en el Diario Oficial de la Federación, a efecto que dentro los sesenta días naturales posteriores a dicha publicación, los interesados presentaran sus comentarios al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario.

Que con fecha previa, fueron publicadas en el Diario Oficial de la Federación, las respuestas a los comentarios recibidos por el mencionado Comité, en los términos del artículo 47 fracción III de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

Que en atención a las anteriores consideraciones, contando con la aprobación del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, he tenido a bien expedir y ordenar la publicación de la siguiente:

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-243-SSA1-2010. PRODUCTOS Y SERVICIOS. LECHE, FORMULA LACTEA, PRODUCTO LACTEO COMBINADO Y DERIVADOS LACTEOS. DISPOSICIONES Y ESPECIFICACIONES SANITARIAS. METODOS DE PRUEBA

PREFACIO

En la elaboración de la presente Norma Oficial Mexicana participaron las siguientes unidades administrativas, organismos e instituciones:

SECRETARIA DE SALUD

Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Programa Universitario de Alimentos

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

LICONSA, S.A. DE C.V.

CONSEJO PARA EL FOMENTO DE LA CALIDAD DE LA LECHE Y SUS DERIVADOS A.C.

CAMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DE TRANSFORMACION

CAMARA NACIONAL DE INDUSTRIALES DE LA LECHE

ASOCIACION DE GANADEROS PRODUCTORES DE LECHE PURA, S.A DE C.V.
DANONE DE MEXICO, S.A. DE C.V.

GRUPO CHEN

UNILEVER DE MEXICO, S DE R.L. DE C.V.

INDICE

1. Objetivo y Campo de Aplicación
2. Referencias
3. Definiciones
4. Clasificación
5. Símbolos y Abreviaturas
6. Especificaciones sanitarias
7. Muestreo
8. Métodos de prueba
9. Etiquetado
10. Concordancia con normas internacionales
11. Bibliografía
12. Observancia de la norma
13. Vigencia

Apéndice Normativo A. Límites máximos para aditivos alimentarios.

Apéndice Normativo B. Métodos de Prueba

Apéndice Informativo A. Lista de sustancias desinfectantes recomendadas

Apéndice Informativo B. Procedimiento de limpieza y descontaminación del material de vidrio y área de trabajo para la determinación de aflatoxinas.

1. Objetivo y Campo de Aplicación

- 1.1 Esta Norma Oficial Mexicana establece las especificaciones sanitarias y nutrimentales que debe cumplir la leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y los derivados lácteos.
- 1.2 Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el territorio nacional para las personas físicas o morales que se dedican al proceso e importación de la leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos.

2. Referencias

Esta norma se complementa con las siguientes o las que las sustituyan:

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

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

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

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

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

3. Definiciones

Los términos en los que se definen y clasifican los productos específicos no son denominaciones comerciales y su aplicación se relaciona exclusivamente con el control sanitario.

Para efectos de esta Norma Oficial Mexicana se entiende por.

3.1 Aditivo o Aditivo para alimentos, cualquier sustancia permitida que, sin tener propiedades nutritivas, se incluya en la formulación de los productos y que actúe como estabilizante, conservador o modificador de sus características organolépticas, para favorecer ya sea su estabilidad, conservación, apariencia o aceptabilidad.

3.2 Alimento y bebida no alcohólicas con modificaciones en su composición, al que ha sufrido cambios en su composición por adición, disminución o eliminación de uno o más de sus nutrimentos, tales como hidratos de carbono, proteínas, lípidos, vitaminas, minerales o fibra; y que forman parte de la dieta habitual.

3.3 Azúcares, a todos los mono y disacáridos presentes en un alimento o bebida no alcohólica.

3.4 Bases o mezclas para helados, es la emulsión cuya composición se ajusta al helado, según sea el caso, pudiendo presentarse en forma líquida, concentrada o en polvo.

3.5 Bitácora o registro, al documento controlado que provee evidencia objetiva y auditable de las actividades ejecutadas o resultados obtenidos durante el proceso del producto y su análisis.

3.6 Buenas prácticas de fabricación, en particular para el caso de los aditivos se refiere a la cantidad mínima indispensable para lograr el efecto deseado.

3.7 Congelación, método de conservación físico que se efectúa por medio de equipo especial para lograr una reducción de la temperatura de los productos objeto de esta norma en su centro térmico a máximo -18°C (255°K).

3.8 Consumidor, persona física o moral que adquiere o disfruta como destinatario final productos alimenticios y bebidas no alcohólicas preenvasados.

3.9 Contaminantes, entidades físicas, químicas o biológicas indeseables, que se encuentran en el producto, por arriba de los límites permisibles.

3.10 Crema, al producto terminado en el que se ha reunido una fracción determinada de grasa y sólidos no grasos de la leche, ya sea por reposo, por centrifugación o reconstitución sometida a pasteurización y cualquier otro tratamiento térmico que asegure su inocuidad.

3.11 Derivados o productos lácteos, productos obtenidos a partir de la leche o sus componentes y otros ingredientes funcionalmente necesarios para su elaboración, incluidos los productos con grasa vegetal.

3.12 Deshidratación, al tratamiento que consiste en la eliminación de agua de un producto.

3.13 Dulces a base de leche, a los productos elaborados por tratamiento térmico de la leche y edulcorantes, pudiendo ser adicionados de aditivos e ingredientes opcionales.

3.14 Edulcorante, sustancia que produce la sensación de dulzura, de orígenes naturales o sintéticos.

3.15 Envasado aséptico, al proceso que reúne las condiciones de esterilidad comercial para evitar la presencia de microorganismos en el producto durante el envasado.

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

3.17 Esterilización comercial, al tratamiento térmico aplicado al producto para la destrucción de todos los microorganismos viables de importancia en la salud pública y aquellos capaces de reproducirse en el alimento bajo condiciones normales de almacenamiento y distribución, sin la condición de refrigeración.

3.18 Etiqueta, marbete rótulo, inscripción, marca, imagen gráfica u otra forma descriptiva, que se haya escrito, impreso, estarcido, marcado, en relieve o en hueco, grabado, adherido, precintado o anexado al empaque o envase del producto.

3.19 Fecha de caducidad, a la fecha límite en que se considera que un producto preenvasado almacenado en las condiciones establecidas por el fabricante, mantiene las características sanitarias que debe reunir para su consumo. Después de esta fecha no debe comercializarse ni consumirse.

3.20 Fecha de consumo preferente, fecha en que, bajo determinadas condiciones de almacenamiento, expira el periodo durante el cual el producto preenvasado es comercializable y mantiene las cualidades específicas se le atribuyen tácita o explícitamente, pero después de la cual el producto preenvasado puede ser consumido.

3.21 Fórmula láctea, es el producto elaborado a partir de ingredientes propios de la leche, tales como caseína, grasa, lactosueros y agua para consumo humano. En cantidades de conformidad con lo que establece la norma de denominación comercial correspondiente.

3.22 Función tecnológica, efecto que produce el uso de aditivos en los alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados, que proporciona o intensifica su aroma, color o sabor, y/o mejora su estabilidad y conservación, entre otros. Véase aditivo.

3.23 Helado, alimento producido mediante la congelación con o sin agitación de una mezcla pasteurizada compuesta por una combinación de ingredientes lácteos pudiendo contener grasas vegetales, frutas, huevo y sus derivados, saborizantes, edulcorantes y otros aditivos; cuando está empalillado se nombrará paleta.

3.24 Información nutrimental, toda descripción destinada a informar al consumidor sobre las propiedades nutrimentales de un alimento o bebida no alcohólica preenvasado. Comprende dos aspectos:

- a) La declaración nutrimental obligatoria.
- b) La declaración nutrimental complementaria.

3.25 Ingrediente, cualquier sustancia o producto, incluidos los aditivos, que se emplee, en la fabricación o preparación de un alimento o bebida no alcohólica y esté presente en el producto final, transformado o no.

3.26 Ingredientes opcionales, a los que se pueden adicionar a los productos tales como: chiles, condimentos, especias, frutas, verduras, entre otros.

3.27 Leche, a la secreción natural de las glándulas mamarias de las vacas sanas o de cualquier otra especie animal, excluido el calostro.

3.28 Leche acidificada, a la obtenida por la acidificación de la leche entera, parcialmente descremada o descremada, pasteurizada, con agentes acidulantes.

3.29 Leche condensada azucarada, la que ha sido obtenida mediante la evaporación del agua de la leche a través de presión reducida, a la que se le ha agregado sacarosa y/o dextrosa u otro edulcorante natural, hasta alcanzar una determinada concentración de grasa butírica y sólidos totales.

3.30 Leche evaporada, producto obtenido mediante eliminación parcial del agua de la leche por el calor o por cualquier otro procedimiento que permita obtener un producto con la misma composición y características de la leche sin modificación en la proporción entre la caseína y la proteína de la leche.

3.31 Leche fermentada, a la obtenida por la acidificación de la leche estandarizada entera o deshidratada, pasteurizada, parcialmente descremada, semidescremada o descremada, debido a la acción de bacterias lácticas vivas con la consiguiente reducción del pH, adicionada o no por aditivos, por alimentos e ingredientes opcionales.

3.32 Límite máximo, cantidad establecida de aditivos, microorganismos, parásitos, materia extraña, plaguicidas, metales pesados y metaloides, entre otros, que no se debe exceder en un alimento, bebida o materia prima.

3.33 Limpieza, conjunto de procedimientos que tiene por objeto eliminar tierra, residuos, suciedad, polvo, grasa u otras sustancias objetables.

3.34 Lote, a la cantidad de un producto, elaborado en un mismo ciclo, integrado por unidades homogéneas.

3.35 Mantequilla, al producto obtenido a partir de la grasa de la leche o grasa de la crema, la cual ha sido pasteurizada, sometida a maduración, fermentación o acidificación,

batido o amasado, pudiendo ser o no adicionada de sal. El contenido de grasa butírica debe ser mínimo de 80%.

3.36 Materia extraña, a cualquier sustancia, resto, desecho o material que se presenta en el producto pero que no forma parte de la composición normal de éste.

3.37 Metal pesado, a los elementos químicos que causan efectos indeseables en el metabolismo aun en concentraciones bajas. Su toxicidad depende de la dosis en que se ingieran, así como su acumulación en el organismo.

3.38 Método de prueba, al procedimiento analítico utilizado para comprobar que un producto satisface las especificaciones que establece la norma.

3.39 Muestra, al total de unidades de producto provenientes de un lote y que representan las características y condiciones del mismo.

3.40 Pasteurización, al tratamiento térmico al que se someten los productos, consistente en una relación de temperatura y tiempo que garantice la destrucción de organismos patógenos y la inactivación de algunas enzimas de los alimentos.

3.41 Planta procesadora, al establecimiento dedicado al proceso de pasteurización, ultrapasteurización, esterilización, deshidratación, rehidratación, entre otros procesos de la leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado.

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

3.43 Producto a granel, al producto que debe pesarse, medirse, o contarse en presencia del consumidor por no encontrarse preenvasado al momento de su venta.

3.44 Producto lácteo combinado, el producto elaborado a partir de sólidos lácteos u otros ingredientes que no proceden de la leche. En cantidades de conformidad con lo que establece la norma de denominación comercial correspondiente.

3.45 Prueba de esterilidad comercial, a la retención temporal de las muestras representativas de los productos bajo condiciones de tiempo y temperatura establecidas para verificar la esterilidad comercial del producto.

3.46 Quesos, productos elaborados de la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida de 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.

3.47 Quesos frescos, aquellos que además de cumplir con la descripción general de queso se caracterizan por su alto contenido de humedad, y por no tener corteza o tener corteza muy fina, pudiendo o no adicionarles aditivos e ingredientes opcionales.

3.48 Quesos madurados, aquellos que además de cumplir con la descripción general de queso, se caracterizan por ser de pasta dura, semidura o blanda y pueden tener o no corteza; sometidos a un proceso de maduración mediante adición de microorganismos, bajo condiciones controladas de tiempo, temperatura y humedad, para provocar en ellos cambios bioquímicos y físicos característicos del producto del que se trate, lo que le permite prolongar su vida de anaquel, los cuales pueden o no requerir condiciones de refrigeración.

3.49 Quesos procesados, aquellos que además de cumplir con la descripción general de queso se caracterizan por ser elaborados con mezclas de quesos, fusión y emulsión con sales fundentes, aditivos para alimentos permitidos e ingredientes opcionales, sometidos a proceso térmico de 70°C durante 30 segundos o someterse a cualquier otra combinación equivalente o mayor de tiempo y temperatura, lo que le permite prolongar su vida de anaquel.

3.50 Quesos de suero, productos obtenidos a partir del suero de leche entera, semidescremada, o descremada pasteurizada de vaca, cabra u oveja, el cual es coagulado por calentamiento en medio ácido para favorecer la obtención de la cuajada, la que es salada, drenada, moldeada, empacada y etiquetada y posteriormente refrigerada para su conservación.

3.51 Refrigeración, al método de conservación físico con el cual se mantienen los productos a una temperatura máxima de 7°C (280°K) que se emplea para inhibir el desarrollo de la mayoría de los microorganismos, reducir las reacciones bioquímicas y el deterioro propio de los alimentos.

3.52 Rehidratación, al procedimiento mediante el cual se restituye el agua a los productos deshidratados objeto de esta norma.

3.53 Sorbete, producto que cumple con la definición de helado, excepto en que su contenido de grasa, sólidos no grasos y sólidos totales, son inferiores a los del helado.

3.54 Suero de leche, líquido obtenido de la coagulación de la caseína de la leche, mediante la acción de enzimas coagulantes de origen animal, vegetal o microbiano, por la adición de ácidos orgánicos o minerales de grado alimentario; acidificación por intercambio iónico hasta alcanzar el punto isoeléctrico de la caseína.

3.55 Tratamiento térmico, al método físico que consiste en someter a una fuente de calor suficiente por un tiempo apropiado al producto, antes o después de ser envasado con el fin de lograr una estabilidad biológica y que garantice la eliminación de microorganismos patógenos.

3.56 Ultrapasteurización, al proceso al cual es sometido el producto a una adecuada relación de temperatura y tiempo, envasado asépticamente para garantizar la esterilidad comercial.

4. Clasificación

Los productos objeto de esta norma por su proceso se clasifican de la siguiente manera, la cual no corresponde a una denominación:

4.1 Leche

4.1.1 Pasteurizada

4.1.2 Ultrapasteurizada

4.1.3 Esterilizada

4.1.4 Deshidratada

4.2 Fórmula láctea

4.2.1 Pasteurizada

4.2.2 Ultrapasteurizada

4.2.3 Esterilizada

4.2.4 Deshidratada

4.3 Producto lácteo combinado

4.3.1 Pasteurizado

4.3.2 Ultrapasteurizado

4.3.3 Esterilizado

4.3.4 Deshidratado

4.4 Quesos

4.4.1 Frescos

4.4.1.1 Frescales: Panela, Canasto, Sierra, Ranchero, Fresco, Blanco, Enchilado, Adobado.

4.4.1.2 De pasta cocida: Oaxaca, Asadero, Mozzarella, Del Morral, Adobera.

4.4.1.3 Acidificados: Cottage, Crema, Doble crema, Petit Suisse, Nuefchatel.

4.4.1.4 Quesos de suero: Broccio, Broccotle, Cerrase, Geitmysost, Gyetost, Mejetle, Mysost, Recuit, Requesón, Ricotta, Picotón, Schottenezinger, Zinder.

4.4.2 Madurados

4.4.2.1 Madurados prensados de pasta dura: Añejo, Parmesano, Cotija, Reggianito.

4.4.2.2 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, Maribo, Norvergia, Provolone, Port Salut, Romadur, Saint Paulin, Samsoe, Svecia, Tilsiter, Bola, Jack.

4.4.2.3 De maduración con mohos: Azul, Cabrales, Camembert, Roquefort, Danablu, Limburgo, Brie.

4.4.3 Procesados

4.4.3.1 Fundidos

4.4.3.2 Fundidos para untar

4.4.4 Otros quesos: frescos, madurados y procesados no considerados en los numerales 4.4.1, 4.4.2 y 4.4.3, deberán observar lo dispuesto en este ordenamiento.

4.5 Mantequilla

4.6 Cremas

4.6.1 Pasteurizadas

4.6.2 Ultrapasteurizadas

4.6.3 Esterilizadas

4.6.4 Deshidratadas

4.6.5 Acidificadas

4.6.6 Fermentadas

4.6.7 Batidas y para batir

4.7 Leche condensada azucarada

4.8 Leche fermentada o acidificada

4.9 Dulces a base de leche

4.9.1 Dulces de baja humedad (menos del 12%) o endurecidos: caramelos, chiclosos, jamoncillos, etc.

4.9.2 Dulces de humedad intermedia (12-20%) que se procesan mediante evaporación: glorias, cajeta y obleas con cajeta, etc.

4.9.3 Dulces de alta humedad (más de 20%), procesados por coagulación, aireación y procesos enzimáticos: flanes, gelatinas, chongos, mousse, arroz con leche, etc.

4.10 Helados y Sorbetes

4.10.1 Helados de crema

4.10.2 Helados de leche

4.10.3 Helados de grasa vegetal

4.10.4 Sorbetes

4.10.5 Bases para helados y sorbetes

4.11 Otros productos lácteos no considerados, deberán observar lo dispuesto en este ordenamiento.

5. Símbolos y Abreviaturas

AFM1	aflatoxina M1
BPF	buenas prácticas de fabricación
cm	Centímetro
cm ²	centímetro cuadrado
CI	color index
conc.	concentración
HACCP	análisis de peligros y de puntos críticos de control (por su siglas en inglés).

HPLC	cromatografía de líquidos de alta eficacia
°C	grados Celsius
g	gramo
x g	gravedad (en centrifugado)
h	hora
=	igual
1/d	inversa de la dilución
kg	kilogramo
lb	libra
L	litro
+	más
m	masa
±	más-menos
Máx.	máximo
>	mayor que
<	menor que
≤	igual o menor que
m	micra
μg	microgramo
μL	microlitro
mg	miligramo
μm	micrómetro
mL	mililitro
min	minutos
mm	milímetro
mM	milimolar
M	molar
m/v	masa a volumen
ng	nanogramo

nm	Nanómetro
N	Normal
No.	Número
/	Por
%	por ciento
pH	potencial de hidrógeno
Pulg	Pulgada
rpm	revoluciones por minuto
seg	Segundos
x	signo de multiplicación
UF	unidades de fenol
UFC	unidades formadoras de colonias
UI	unidades internacionales
UV	Ultravioleta
v	Volumen
v/v	volumen a volumen

Cuando en la presente norma se mencione:

- Acuerdo, debe entenderse que se trata del Acuerdo por el que se determinan las sustancias permitidas como aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, y sus modificaciones.
- Reglamento, debe entenderse que se trata del Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios.

6. Especificaciones sanitarias

6.1 Generales

Los productos objeto de esta norma, además de cumplir con lo establecido en el Reglamento, deben ajustarse a las siguientes disposiciones:

6.1.1 Los establecimientos que se dediquen al proceso e importación de los productos comercializados en el Territorio Nacional objeto de esta norma, deben cumplir con lo establecido en la NOM-251-SSA1-2009, señalada en el apartado de referencias.

6.1.2 Todos los ingredientes que se utilicen para la elaboración de los productos objeto de esta norma, deben cumplir con las especificaciones sanitarias establecidas en el Reglamento y las normas oficiales mexicanas correspondientes.

6.1.3 Los productos que se modifiquen en su composición, deben cumplir con lo establecido en la NOM-086-SSA1-1994, señalada en el apartado de referencias.

6.1.4 Los productos sujetos a tratamiento térmico y envasados en recipientes de cierre hermético, además de cumplir con lo establecido en este ordenamiento, deben cumplir con la NOM-130-SSA1-1995, señalada en el apartado de referencias.

6.1.5 La leche, que se comercialice para su consumo humano o que se emplee como materia prima para la elaboración de productos lácteos debe cumplir con lo siguiente:

6.1.5.1 No presentar materias extrañas, conservadores ni sustancias neutralizantes.

6.1.5.2 No coagular por ebullición.

6.1.5.3 Presentar prueba de alcohol al 68% negativa (sólo para leche de bovino).

6.1.5.4 Presentar prueba de inhibidores bacterianos, negativa; detectados por métodos fisicoquímicos y microbiológicos, de conformidad con la tabla 1 del presente ordenamiento.

Tabla 1. Inhibidores bacterianos en leche.

PRODUCTO	Derivados Clorados	Sales cuaternarias de amonio	Oxidantes	Formaldehído	Antibióticos
Pasteurizados	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Ultrapasteurizados	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
0Esterilizados	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

6.1.5.5 Debe someterse a un tratamiento térmico con un tiempo y temperatura determinados que garantice su inocuidad, independientemente del uso que se le dé posteriormente. A excepción de la leche que se utilice para la elaboración de quesos que por las características de éstos no pueda ser sometida a tratamiento térmico, la cual debe cumplir con lo siguiente:

6.1.5.5.1 Tener implementado un sistema HACCP para su proceso, conforme a lo establecido en el Apéndice A de la NOM-251-SSA1-2009, citada en el apartado de referencias.

6.1.5.6 Los tratamientos térmicos a los que se someta la leche, fórmula láctea o producto lácteo combinado para su comercialización, o antes de su uso como materia prima para el caso de la leche, pueden ser: ebullición, pasteurización, ultrapasteurización, esterilización o deshidratación.

Tabla 2. Temperaturas y tiempos para tratamiento térmico de la leche, fórmula láctea o producto combinado.

Tratamiento	Temperatura y tiempo*
Pasteurización	Lenta 63°C / 30 min. Rápida 72°C / 15 seg.
Ultrapasteurización o esterilización	135°C a 149°C / 2 a 8 seg.

* Puede emplearse alguna otra relación de tiempo-temperatura que sea equivalente para la destrucción de los microorganismos patógenos.

6.1.5.7 El equipo para la pasteurización lenta debe contar, por lo menos, con un sistema para registro gráfico o numérico y control de la temperatura y tiempo del proceso, tina con tapa y sistema de agitación del producto, termómetro de mercurio con vástago de acero inoxidable funcionando y calibrado, o su equivalente.

6.1.5.8 El equipo empleado para la pasteurización rápida debe contar, por lo menos, con un sistema de control y registro automático de la temperatura y tiempo del proceso, que no permita el paso del producto cuando no se haya alcanzado la temperatura mínima establecida, así mismo, un sistema en que el flujo del producto cumpla con el tiempo mínimo determinado. Termómetro de mercurio o su equivalente funcionando y calibrado, colocado al final de la "zona de sostenimiento" del equipo, en el que la terminal tenga contacto con el producto.

6.1.5.8.1 La temperatura registrada en el sistema de control y registro del proceso debe ser ≤ 1 °C de la temperatura que indique dicho termómetro.

6.1.5.9 El equipo empleado para la ultrapasteurización o esterilización, debe contar con dispositivos de control y registro de temperatura de operación durante el tiempo de producción, que permita comprobar que los productos han sido sometidos al tratamiento térmico establecido.

6.1.5.10 Una vez alcanzada la temperatura, la leche, fórmula láctea o producto combinado debe enfriarse rápidamente a una temperatura de 6°C, y manejarse a esta temperatura hasta el momento del envasado a excepción de productos ultrapasteurizados o esterilizados.

6.1.5.11 Los productos sometidos a deshidratación deben cumplir con lo siguiente:

- a) Los que se utilicen como materia prima, deben ser pasteurizados previamente a la deshidratación.
- b) No se podrán vender a granel al consumidor.

6.1.5.12 Los productos sometidos a rehidratación deben ser pasteurizados, ultrapasteurizados o esterilizados, conforme a este ordenamiento.

6.1.6 Especificaciones físicas y químicas

6.1.6.1 Prueba de fosfatasa residual.

Tabla No. 3. Límite máximo de fosfatasa residual.

Producto	Límite máximo de fosfatasa residual (UF/g)
Leche, fórmula láctea o producto lácteo combinado pasteurizado*	4
Quesos frescos, madurados y procesados	12
Quesos de suero	4
Helados de crema, de leche o grasa vegetal, sorbetes y bases o mezclas para helados	4
Mantequilla y cremas pasteurizada**	4

Nota: Se debe considerar que podrán presentar falsos positivos, por lo que esta prueba no puede ser concluyente.

* No aplica para este tipo de productos ultrapasteurizados, esterilizados y deshidratados.

**** No aplica para leche condensada azucarada, leche fermentada o acidificada y dulces a base de leche**

6.1.6.2 No deben contener materia extraña.

6.1.7 Especificaciones de contaminantes

6.1.7.1 La presencia de contaminantes en los productos objeto de esta norma no debe rebasar el límite máximo señalado en la siguiente tabla.

Tabla No. 4. Límites máximos de contaminantes⁽¹⁾

Contaminante	Límite máximo mg/kg
Arsénico ⁽²⁾	0,2
Plomo	0,1 ⁽³⁾ 0,5 ⁽⁴⁾
Mercurio	0,05 ⁽³⁾
Estaño	250 ⁽⁵⁾
Aflatoxina M1	0,5mg/L ⁽³⁾

⁽¹⁾ No aplica ningún contaminante a los helados, sorbetes y bases o mezclas para helados; ⁽²⁾ No aplica a mantequillas, cremas, leche fermentada y acidificada, leche condensada azucarada, dulces a base de leche; ⁽³⁾ Límite sólo para leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado, ⁽⁴⁾ Límite para quesos ⁽⁵⁾ Aplica sólo para aquellos productos envasados en hoja de lata sin barniz.

6.1.7.2 El productor o fabricante de los productos objeto de esta norma, debe establecer mecanismos de control que permitan determinar la presencia y cantidad de metales pesados y metaloides en las materias primas o en el producto en proceso de elaboración o en el producto terminado. Es recomendable establecer una periodicidad de verificación de mecanismos de control de al menos 1 vez por año, considerando las condiciones del proceso e instalaciones. La información generada debe estar a disposición de la Secretaría de Salud, cuando ésta así lo requiera.

6.1.8 Especificaciones Microbiológicas

6.1.8.1 Los productos objeto de esta norma no deben exceder los límites de microorganismos señalados a continuación:

Tabla 5. Límites máximos de contenido microbiano para leche y derivados lácteos.

Microorganismo	Límite máximo	Productos
Organismos Coliformes totales	≤ 100 UFC/g o mL	Helados y sorbetes. Quesos de suero
	≤ 50 UFC/g o mL	Bases o mezclas para helados.
	≤ 20 UFC/g o mL	En punto de venta: Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado; pasteurizados.
	≤ 10 UFC/g o mL	En planta: Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado; pasteurizados o deshidratados. Mantequilla, cremas, leche condensada azucarada, leche fermentada o acidificada, dulces a base de leche.
<i>Staphylococcus aureus</i>	≤ 10 UFC/ mL por siembra directa	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado pasteurizado.
	≤ 100 UFC/g o mL	Mantequilla, cremas, leche condensada azucarada, leche fermentada o acidificada, dulces a base de leche. Quesos madurados y quesos procesados
	1000 UFC/g	Quesos frescos y quesos de suero
<i>Salmonella spp</i>	Ausente en 25g o mL	Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado: pasteurizados y deshidratados. Quesos frescos, madurados y procesados. Quesos desuero.

		Cremas, leche fermentada o acidificada, dulces a base de leche*, helados, sorbetes y bases para helados. Mantequillas.
<i>Escherichia coli</i>	100 UFC/g o mL	Quesos frescos.
	≤ 3 NMP/g o mL	Leche utilizada como materia prima para la elaboración de quesos. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado;deshidratados.
	≤ 10 NMP/g	Quesos madurados y procesados.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausente en 25g o mL	Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado;pasteurizados ** Quesos. Quesos de suero. Helados, bases para helados y sorbetes.**.
<i>Vibrio cholerae</i> ***	Ausente en 25g	Quesos frescos. Helados, sorbetes y bases para helados.
	Ausente en 50g	Quesos de suero.
Enterotoxina estafilococcica	Negativa	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado;deshidratados y la que se emplee como materia prima para elaboración de quesos. Quesos frescos, madurados y procesados. Helados, sorbetes y bases para helados.
Toxina botulínica**	Negativa	Quesos frescos, madurados y procesados, envasados al alto vacío.
Mohos y levaduras	500 UFC/g o mL	Quesos frescos, madurados*** y quesos de suero.
	100 UFC/g o mL	Quesos procesados.

	50 UFC/g o mL	Bases o mezclas para helados.
Mesofílicos aerobios	200,000 UFC/g o mL	Helados y sorbetes.
	100,000 UFC/g o mL	Bases para helado.

* Para aquellos que contienen chocolate, cocoa, coco, huevo y semillas.

** Se determinará únicamente en situaciones de emergencia sanitaria, cuando la SSA de acuerdo a los resultados microbiológicos detecte su presencia, y ordenará la realización de un plan de trabajo por parte del fabricante o importador para controlar la presencia.

*** Aquellos productos que para su maduración requieren de hongos, pudieran estar fuera de este límite.

6.1.9 Aditivos

6.1.9.1 Únicamente se permiten los aditivos en los límites y productos que se señalan en el apéndice

normativo A de este ordenamiento.

6.1.10 Control documental del proceso:

6.1.10.1 Los registros de tratamiento térmico deben ser continuos y contar con la siguiente información:

Tabla 6. Información mínima de los procedimientos, bitácoras o registros de las diferentes etapas del proceso.

DOCUMENTO	INFORMACION
Bitácora o registro de Proceso	Control de tratamiento térmico. Gráficas de temperatura y tiempo de tratamiento térmico (pasteurización, ultrapasteurización o esterilización, deshidratación), por equipo. Temperatura y tiempo de enfriamiento. Cantidad e identificación del producto Registro de los hechos no comunes.

Procedimiento de operaciones de limpieza y desinfección de equipos para tratamiento térmico.	Personal encargado de la operación. Frecuencia Vigencia.
Bitácora o Registro de operaciones de limpieza y desinfección de equipo para tratamiento térmico.	Registro de los hechos no comunes.
Diagrama de proceso	Etapas de proceso con tiempos y temperaturas de cada operación.

6.2 Específicas

Además de las especificaciones sanitarias generales señaladas en el numeral 6.1 de este ordenamiento; se debe cumplir con lo siguiente:

6.2.1 Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado.

6.2.1.1 Deben contener de 310 a 670 mg equivalentes de retinol/L (1033 a 2233 UI/L), de forma natural o por restauración. Y entre 5 a 7,5 mg/L de Vitamina D3 (200-300 UI/L).

6.2.1.2 Los productos adicionados con Vitamina A o D3 no deben contener cantidades superiores a las establecidas en este ordenamiento.

6.2.1.3 Los productos deshidratados deben contener una humedad no mayor al 4%.

6.2.1.4 Los productos sometidos a ultrapasteurización o esterilización deben cumplir con lo siguiente:

6.2.1.4.1 Ser envasados asépticamente en envases que cuenten con barreras para proteger el producto del oxígeno y la luz, y llenarse en ausencia de aire.

6.2.1.4.2 El cierre de los envases debe ser hermético y llevar a cabo las pruebas para su control y los registros correspondientes.

6.2.1.4.3 El envase que se emplee, debe someterse a un tratamiento de desinfección.

6.2.1.4.4 Los agentes desinfectantes deben tener actividad esporicida, no degradar el material del envase, se deben evaporar fácilmente de la superficie del envase y no deben reaccionar con el producto.

6.2.1.4.5 Sólo se permite el uso de peróxido de hidrógeno para efectos de desinfección de los envases, éste debe emplearse en una concentración de 30 al 50%.

6.2.1.4.6 Los establecimientos deben destinar un área de incubación para la prueba de esterilidad comercial para efectos del control interno de una muestra representativa de la producción, de la cual se debe tomar una submuestra para someterse a análisis microbiológicos.

6.2.2 Cremas

6.2.2.1 Las cremas acidificadas y fermentadas deben tener una acidez titulable de no menos de 0,5% expresada como ácido láctico.

6.2.2.2 Las cremas deshidratadas deben contener una humedad no mayor al 4%.

6.2.3 Leche fermentada o acidificada.

6.2.3.1 Las leches fermentadas o acidificadas deben tener una acidez titulable de no menos de 0,5% expresada como ácido láctico y su pH debe ser máximo de 4,5.

6.2.4 Helados, bases para helados y sorbetes

6.2.4.1 Para la elaboración de helados y sorbetes se permite la incorporación de aire limpio como coadyuvante en su elaboración.

6.2.4.2 No se permite volver a congelar los productos después de haber sido descongelados.

6.2.4.3 La mezcla para elaborar los helados, bases para helados y sorbetes debe pasteurizarse de la siguiente forma:

6.2.4.3.1 Deben someterse a una temperatura de 68,5°C durante un tiempo de 30 minutos, o.

6.2.4.3.2 Serán sometidas a una temperatura de 79,4°C durante un tiempo mínimo de 25 segundos, o

6.2.4.3.3 Someterlas a otra relación de tiempos y temperaturas cuyo efecto sea el mismo.

6.2.4.3.4 En cualquiera de los casos, una vez alcanzados, respectivamente, las temperaturas y tiempos señalados se enfriará bruscamente a 4°C.

6.2.4.3.5 Una vez pasteurizadas las mezclas, deben mantenerse a una temperatura máxima de 6°C antes de someterse a congelación.

7. Muestreo

7.1 El procedimiento de muestreo para los productos objeto de esta norma, debe sujetarse a lo que establece la Ley General de Salud, debiendo mantener la muestra en condiciones que eviten su contaminación o descomposición.

8. Métodos de Prueba

Para la verificación oficial de las especificaciones que se establecen en esta norma, se deben aplicar los métodos de prueba señalados en el apéndice normativo B de este ordenamiento.

9. Etiquetado

La etiqueta de los productos objeto de esta norma, además de cumplir con lo establecido en el Reglamento y la NOM-051-SCFI/SSA1-2010 señalada en el apartado de referencias, debe sujetarse a lo siguiente, sin interferir con las atribuciones de otras dependencias:

9.1 En la superficie principal de exhibición de los envases de leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado, debe declararse el tratamiento térmico al que fue sometido, así como otros tratamientos aplicados para asegurar la inocuidad del producto, establecidos en otros ordenamientos legales correspondientes.

9.2 En los productos objeto de esta norma que contienen sal yodada, debe declararse como tal en la lista de ingredientes.

9.3 Cuando en la elaboración de los productos objeto de esta norma, se emplee leche que no procede de vaca, se debe indicar su origen.

9.4 Los quesos deben indicar el contenido de grasa butírica.

9.5 Los productos objeto de esta norma a excepción de los helados, bases para helados y sorbetes deben indicar "fecha de caducidad".

9.6 Si la identificación del lote corresponde a la fecha de caducidad, se deben indicar las leyendas: "Lote" y "Fecha de caducidad" o sus abreviaturas o sus equivalentes.

9.7 En la etiqueta de productos pasteurizados y de aquellos que requieren refrigeración para su conservación, se debe incluir la siguiente leyenda: "Manténgase en refrigeración" o "Consérvese en refrigeración" o cualquier otra equivalente.

9.8 En el caso de los helados, sorbetes y otros productos que requieren congelación debe figurar la leyenda "Manténgase en congelación" o "Consérvese en congelación" o cualquier otra equivalente.

9.9 Para productos deshidratados: "Consérvese en un lugar fresco y seco", "Una vez preparado el producto, manténgase o consérvese en refrigeración" o cualquier otra equivalente.

9.10 Para dulces a base de leche de humedad baja e intermedia, debe indicarse "Manténgase en lugar fresco y seco", o cualquier otra equivalente.

9.11 Los productos ultrapasteurizados o esterilizados deben de incluir las leyendas "Manténgase o consérvese en lugar fresco y seco". "No requiere refrigeración en tanto no se abra el envase". "Refrigérese después de abrirse" o leyendas equivalentes.

9.12 Los productos objeto de esta norma que hayan sido modificados en su composición nutrimental, deben ostentar junto a la denominación, con el mismo tipo y tamaño de letra, la modificación que lo caracterice.

9.13 La leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado, adicionados con vitamina D o con vitaminas A y D, según corresponda, deben hacer figurar su contenido con las siguientes leyendas:

9.13.1 "Contiene _____ mg de Vitamina D por L", o

9.13.2 "Contiene _____ mg de Vitamina D y _____ mg equivalentes de retinol (Vitamina A)/L".

9.13.3 En el espacio en blanco debe figurar el contenido de dichos nutrimentos, o sus equivalentes por 100 g, por porción o por envase, si éste contiene sólo una porción. El término entre paréntesis es opcional.

9.13.4 El texto, "Adicionada con Vitamina D" para los productos adicionados con Vitamina D3.

9.13.5 Cuando voluntariamente se señalen dentro de la declaración nutrimental, deben figurar como se señala a continuación:

Tabla 8

Nutrimento	Cantidad por 100 g o por porción o por envase
Vitamina A	mg equivalentes de retinol

Vitamina D	mg
------------	----

9.14 Los productos con modificación en su composición deben cumplir con lo señalado en la NOM-086-SSA1-1994, citada en el apartado de referencias, a excepción de los indicados en el numeral 9.8.2.1, los cuales deben cumplir con lo señalado en este ordenamiento.

9.15 Cálculo de vitaminas

9.15.1 Vitamina A

1 UI de vitamina A es equivalente a 0,3 mg equivalentes de retinol (todos los Retinols "trans").

9.15.2 Vitamina D3

1 UI de vitamina D3 es equivalente a 0,025 mg de colecalciferol.

9.16 Leyendas precautorias

9.16.1 Los productos que contengan alcohol etílico o bebidas alcohólicas en cantidades superiores al 0,5%, deben incluir en la superficie principal de exhibición de la etiqueta, la siguiente leyenda: "Este producto contiene _____% de alcohol. No recomendable para niños". (En el espacio en blanco citar el contenido de alcohol en %).

9.17 La cantidad de proteínas que ha de indicarse, debe calcularse utilizando la siguiente fórmula:

Leche, derivados o productos lácteos y quesos

Proteína = contenido total de nitrógeno Kjeldahl X 6.38

Dulces a base de leche, Helados, Sorbetes:

Proteína = contenido total de nitrógeno Kjeldahl X 6.25

9.18 En el caso de que los productos objeto de esta norma contengan o incluyan productos preenvasados como parte de promociones u obsequios, tales como productos de panificación, cereales, chocolate u otros alimentos, deben incluir en el envase del producto de promoción u obsequio, cuando menos la siguiente información: lista de ingredientes, identificación del responsable del producto, fecha de caducidad y lote.

9.19 Cuando en las etiquetas se declaren u ostenten en forma escrita, gráfica o descriptiva que los productos, su uso, aplicación, ingredientes o cualquier otra característica están recomendados, respaldados o aceptados por centros de investigación, asociaciones, organizaciones, entre otros, los cuales deberán contar con reconocimiento nacional o

internacional de su experiencia y estar calificados para dar opinión sobre la información declarada. Se deberá contar con el sustento técnico respectivo, el que estará a disposición de la Secretaría de Salud en el momento que lo solicite. Dichas declaraciones deben sujetarse a lo siguiente: la leyenda debe describir claramente la característica referida, estar precedida por el símbolo o nombre del organismo y figurar en caracteres claros y fácilmente legibles.

9.20 Los productos destinados a ser reconstituidos o los contenidos en envases que requieran instrucciones de uso o consumo especiales, deben incluir una descripción escrita o gráfica de las instrucciones de uso, empleo o preparación.

9.21 Los productos envasados en punto de venta, deben ostentar la siguiente información:

9.21.1 Nombre o denominación del producto.

9.21.2 Fecha de envasado y, en su caso, fecha de caducidad, señalando el día y el mes y anteponiendo la leyenda que corresponda "fecha de envasado _____", "fecha de caducidad _____", o leyenda equivalente.

10. Concordancia con normas internacionales

Esta norma es parcialmente equivalente a las siguientes normas:

10.1 Codex Alimentarius. CODEX STAN 232-2001. Norma Nivel Máximo para la Aflatoxina M1 en la Leche.

10.2 Codex Alimentarius. CODEX STAN A-9-1976, Rev. 1-2003. Norma del Codex Para Las Natas (Cremas) Y Las Natas (Cremas) Preparadas.

10.3 Codex Alimentarius. CODEX STAN A-6-1978, Rev. 1-1999, enmendado en 2006. Norma del General del Codex para el Queso.

10.4 Codex Alimentarius. CODEX STAN 221-2001. Norma colectiva para el Queso No Madurado, Incluido el Queso Fresco.

11. Bibliografía

11.1 Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

11.2 Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

11.3 Ley General de Salud.

11.4 Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios.

11.5 Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI-1994. Sistema general de unidades de medida. México, D.F.

11.6 Guía para la redacción, estructuración y presentación de las normas oficiales mexicanas. NORMA-Z-13/02.

11.7 Food and Drug Administration. Grade "A" Pasteurized Milk Ordinance. (2003 Revision). Department of Health and Human Services. U.S.A.

11.8 Fernández Escartín, E. 2000. "Microbiología e inocuidad de los Alimentos". Universidad Autónoma de Querétaro.

11.9 Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1994. "Summary of evaluations performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)". ILSI Press, Washington.

11.10 U.S. Food & Drug Administration. 2001. Center for Food Safety & Applied Nutrition. Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook. "Bad bug book".

11.11 Secretaría de Salud. Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios. Aplicación de Análisis de Riesgos, Identificación y Control de Puntos Críticos en la Industria de la Leche Pasteurizada. México 1994.

11.12 Secretaría de Salud. Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios. Pasteurización de la Leche Controles y Exámenes Curso 302. Traducción de documentos de la FDA. México, 1994.

11.13 Norma Mexicana NMX-F-703-COFOCALEC-2004, Sistema de producto leche alimentos- lácteos leche y producto lácteo (o alimento lácteo)- fermentado o acidificado denominaciones, especificaciones y métodos de prueba.

11.14 Norma Mexicana NMX-F-709-COFOCALEC-2004, Sistema producto leche alimento- alimento lácteo regional- chongos zamoranos y producto lácteo tipo chongos zamoranos denominaciones, especificaciones y métodos de prueba.

12. Observancia de la norma

12.1 La vigilancia del cumplimiento de la presente norma corresponde a la Secretaría de Salud, a los gobiernos de las entidades federativas, en el ámbito de sus respectivas competencias.

13. Vigencia

13.1 La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor a los 60 días naturales posteriores a la fecha de su publicación en el Diario Oficial de la Federación, a excepción de los numerales 6.1.5.5 y 6.1.5.5.1 los cuales entrarán en vigor a los 365 días naturales posteriores a la misma fecha.

Transitorio

Unico: Con la entrada en vigor de la presente Norma Oficial Mexicana se cancelan las siguientes normas oficiales mexicanas:

- NOM-035-SSA1-1993, Bienes y servicios. Quesos de suero. Especificaciones sanitarias, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 30 de enero de 1995.
- NOM-036-SSA1-1993, Bienes y servicios. Helados de crema, de leche o grasa vegetal, sorbetes y bases o mezclas para helados. Especificaciones sanitarias, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 10 de marzo de 1995.
- NOM-121-SSA1-1994, Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 23 de febrero de 1996.
- NOM-184-SSA1-2002, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado. Especificaciones sanitarias, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 23 de octubre de 2002
- 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, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 16 de octubre de 2002.

Sufragio Efectivo. No Reección.

México, Distrito Federal, a 25 de junio de 2010.- El Comisionado Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios y Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, **Miguel Angel Toscano Velasco**.-
Rúbrica.

A2.- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-110-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.

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

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

PREFACIO

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

SECRETARIA DE SALUD

Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios

Laboratorio Nacional de Salud Pública

SECRETARIA DE MEDIO AMBIENTE, RECURSOS NATURALES Y PESCA

Instituto Nacional de la Pesca

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

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

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

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

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

SOCIEDAD MEXICANA DE NORMALIZACION Y CERTIFICACION, S.C.

NORMEX

INDICE

0. INTRODUCCION
1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION
2. FUNDAMENTO
3. REFERENCIAS
4. DEFINICIONES
5. SIMBOLOS Y ABREVIATURAS
6. REACTIVOS Y MATERIALES
7. APARATOS E INSTRUMENTOS
8. PROCEDIMIENTO
9. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES
10. BIBLIOGRAFIA
11. OBSERVANCIA DE LA NORMA

12. VIGENCIA

0. Introducción

Esta norma está orientada a proporcionar las guías generales para la preparación de diluciones para el examen microbiológico de alimentos. En vista de la gran cantidad de productos en este campo de aplicación, estas guías pueden ser inapropiadas para todos ellos en forma detallada y para otros requerirse otros métodos diferentes. Sin embargo, en todos los casos donde sea posible se recomienda apegarse a estas guías y modificarse únicamente cuando sea necesario.

La dilución primaria tiene por objeto obtener una distribución lo más uniforme posible de los microorganismos contenidos en la muestra destinada para el análisis.

La preparación de diluciones decimales adicionales, si son necesarias, tiene como objetivo reducir el número de microorganismos por unidad de volumen, para permitir, después de la incubación, la observación de la prueba en el caso de tubos o matraces y la cuenta de colonias en el caso de placas.

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta Norma Oficial Mexicana establece el procedimiento para la preparación de diluciones para el análisis microbiológico de productos alimenticios.

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

2. Fundamento

Se basa en la preparación de diluciones primarias, para obtener una distribución lo más uniforme posible de los microorganismos presentes en la porción de muestra.

3. Referencias

Esta norma se complementa con lo siguiente:

NOM-109-SSA1-1994 Procedimientos para la toma, Manejo y Transporte de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.*

4. Definiciones

Para fines de esta norma se entiende por:

4.1 Dilución primaria, es la solución, suspensión o emulsión obtenida después de pesar o medir una cantidad del producto bajo examen y mezclarla con una cantidad de nueve veces en proporción de diluyente.

4.2 Diluciones decimales adicionales, las suspensiones o soluciones obtenidas al mezclar un determinado volumen de la dilución primaria con un volumen de nueve veces un diluyente y que por repetición de esta operación con cada dilución así preparada, se obtiene la serie de diluciones decimales adecuadas para la inoculación de medios de cultivo.

5. Símbolos y abreviaturas

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

cm centímetro

mm milímetro

g gramos

ml mililitro

l litro

pH potencial de hidrógeno

N normal

°C grado Celsius

% por ciento

h hora

6. Reactivos y materiales

6.1 Reactivos

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

6.1.1 Preparación de reactivos

6.1.1.1 Solución de hidróxido de sodio 1,0 N

FORMULA

INGREDIENTES CANTIDADES

Hidróxido de sodio 4,0 g

Agua 100,0 ml

Preparación:

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

6.1.1.2 Soluciones diluyentes

6.1.1.2.1 Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada).

FORMULA

INGREDIENTES CANTIDADES

Fosfato de sodio monobásico 34,0 g

Agua 1,0 l

Preparación:

Disolver el fosfato en 500 ml de agua y ajustar el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio 1,0 N.

Llevar a un litro con agua.

Esterilizar durante 15 minutos a $121^{\circ} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$.

Conservar en refrigeración (solución concentrada).

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

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

Esterilizar a $121^{\circ} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos.

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

6.1.1.2.2 Agua peptonada

FORMULA

INGREDIENTES CANTIDADES

Peptona 1,0 g

Cloruro de sodio 8,5 g

Agua 1,0 l

Preparación:

Disolver los componentes en un litro de agua.

Ajustar el pH a $7 \pm 0,1$ con hidróxido de sodio 1,0 N.

Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml o en cualquier volumen múltiplo de nueve según se requiera.

Esterilizar a $121 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos.

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

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

6.2 Materiales

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

Frascos de vidrio de 250 ml con tapón de rosca.

Tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca.

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

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

Horno, durante 2 h a 170 a 175°C o 1 h a 180°C o

Autoclave, durante 15 minutos como mínimo a $121 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$.

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

7. Aparatos e instrumentos

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

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

Baño de agua con control de temperatura y circulación mecánica, provista con termómetro calibrado con divisiones de $0,1^{\circ}\text{C}$ y que mantenga la temperatura a $45 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

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

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

Balanza granataria con sensibilidad de 0,1 g.

8. Procedimiento

8.1 Preparación de la dilución primaria.

8.1.1 A partir de muestras líquidas:

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

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

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

8.1.1.1 Agitar la muestra manualmente con 25 movimientos de arriba a abajo en un arco de 30 cm efectuados en un tiempo de 7 segundos. Tomar 1 ml de la muestra y diluir con 9 ml del diluyente el cual debe encontrarse a una temperatura similar a ésta, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente.

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

8.1.2 A partir de muestras sólidas o semisólidas.

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

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

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

8.1.2.3 Operar la licuadora o el homogeneizador peristáltico de 1 a 2 minutos hasta obtener una suspensión completa y homogénea según se indique en la técnica correspondiente para cada alimento. Aún en los equipos más lentos, este tiempo no debe exceder de 2,5 minutos.

8.1.2.4 Permitir que las partículas grandes se sedimenten, y transferir la cantidad deseada tomando de las capas superiores de la suspensión.

Cuando la dilución primaria es muy viscosa o pegajosa, adicionar más diluyente, lo cual debe tomarse en cuenta para las operaciones subsecuentes o expresión de resultados.

El homogeneizador peristáltico (Stomacher) puede no ser adecuado para algunos productos (por ejemplo, aquellos con partículas agudas o constituyentes que no se dispersen fácilmente). Debe ser utilizado sólo cuando exista evidencia (publicada o por ensayos comparativos) de que los resultados obtenidos no difieren significativamente con aquellos obtenidos con licuadora.

8.2 Preparación de las diluciones decimales adicionales.

8.2.1 Transferir 1 ml o un múltiplo, por ejemplo, 10 u 11 ml de la dilución primaria 1 + 9 (10-1), en otro recipiente conteniendo nueve veces el volumen del diluyente estéril a la temperatura apropiada, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente.

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

8.2.3 La selección de las diluciones que se vayan a preparar y de aquellas que se van a inocular, dependen del número esperado de microorganismos en la muestra, con base a los resultados de análisis previos y de la información que se obtenga del personal de inspección

que la haya colectado. En ausencia total de información, trabajar con las diluciones de la primera a la sexta.

8.2.4 Utilizar pipetas diferentes para cada dilución inoculando simultáneamente las cajas que se hayan seleccionado. El volumen que se transfiera nunca debe ser menor al 10% de la capacidad total de la pipeta.

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

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

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

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

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

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

8.3 Duración del procedimiento.

En general, las diluciones de la muestra deben ser preparadas inmediatamente antes del análisis y éstas deben ser usadas para inocular el medio de cultivo dentro de los 20 minutos posteriores a su preparación.

9. Concordancia con normas internacionales

Esta norma es técnicamente equivalente a la Norma ISO 6887-1983 (E) Microbiology General guidance for the preparation of dilutions for microbiological examination. International Organization for Standardization.

10. Bibliografía

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

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

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

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

10.5 Norma ISO 6887-1983 (E). Microbiology General guidance for the preparation of dilutions for microbiological examination. International Organization for Standardization.

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

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

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

11. Observancia de la norma

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

12. Vigencia

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

Sufragio Efectivo. No Reección.

México, D.F., a 10 de mayo de 1995.- El Director General de Control Sanitario de Bienes y Servicios, José Meljem Moctezuma.- Rúbrica.

A3.- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-092-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA.

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

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

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

SECRETARIA DE SALUD

Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios

Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica. INDRE

Laboratorio Nacional de Salud Pública

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

Instituto Nacional de la Pesca

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

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

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

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

SOCIEDAD MEXICANA DE NORMALIZACION Y CERTIFICACION, S.C.

NORMEX

INDICE

0 INTRODUCCION

1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION

2 FUNDAMENTO

3 REFERENCIAS

4 DEFINICIONES

5 SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

6 REACTIVOS Y MATERIALES

7 APARATOS E INSTRUMENTOS

8 PREPARACION DE LA MUESTRA

9 PROCEDIMIENTO

10 EXPRESION DE RESULTADOS

11 INFORME DE LA PRUEBA

12 CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

13 BIBLIOGRAFIA

14 OBSERVANCIA DE LA NORMA

15 VIGENCIA

0. Introducción

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

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

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

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

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

1. Objetivo y campo de aplicación

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

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

2. Fundamento

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

3. Referencias

Esta Norma se complementa con lo siguiente:

NOM-109-SSA1-1994 Procedimiento para la Toma, Manejo y Transporte de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.*

NOM-110-SSA1-1994 Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

4. Definición

Para fines de esta norma se entiende por:

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

5. Símbolos y abreviaturas

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

g gramo

l litro

ml mililitro

°C grado Celsius

pH potencial de hidrógeno

% por ciento

UFC unidades formadoras de colonias

h hora

6. Reactivos y materiales

6.1 Reactivos

Los reactivos que a continuación se mencionan, deben ser grado analítico.

Cuando se indique agua, debe entenderse agua destilada, con pH cercano a la neutralidad.

Medio de Cultivo.

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

FORMULA

INGREDIENTES CANTIDADES

Extracto de levadura 2,5 g

Triptona 5,0 g

Dextrosa 1,0 g

Agar 15,0 g

Agua 1,0 l

Preparación del medio de cultivo.

Suspender los componentes del medio deshidratado en un litro de agua. Hervir hasta total disolución.

Distribuir en recipientes de vidrio esterilizables de capacidad no mayor de 500 ml, cantidades de aproximadamente la mitad del volumen del mismo. Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1,0$ °C, durante 15 minutos. El pH final del medio debe ser $7,0 \pm 0,2$ a 25°C.

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

En caso de medios deshidratados seguir las instrucciones del fabricante.

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

6.2 Materiales

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

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

7. Aparatos e instrumentos

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

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

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

Registrador mecánico o electrónico.

Microscopio óptico.

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

8. Preparación de la muestra

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

9. Procedimiento

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

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

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

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

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

CUADRO 1

Grupo Bacteriano Temperatura Tiempo de Incubación

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

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

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

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

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

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

10. Expresión de resultados

10.1 Cálculo del método.

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

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

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

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

10.1.3.2 Placas con más de 250 colonias.- Cuando el número de colonias por placa exceda de 250, contar las colonias en aquellas porciones de la placa que sean representativas de la distribución de colonias. Contar por ejemplo, una cuarta parte o una mitad del área de la caja y multiplicar el valor obtenido por 4 ó 2, respectivamente. Si solamente pueden contarse algunos cuadros, considerar que el fondo de una caja Petri de 100 mm de diámetro contiene 65 cuadros de la cuadrícula del contador. Aclarar en el informe esta situación agregando la leyenda "valor estimado", véase el cuadro 2, ejemplo 4.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10.1.7 Placas corridas por duplicado, ambas placas de una dilución dentro del intervalo de 25 a 250 y sólo una de la otra dilución dentro del mismo. Contar las cuatro cajas incluyendo aquélla con menos de 25 o más de 250 colonias, para calcular la cuenta en placa, véase el cuadro 2, ejemplo 9.

10.1.8 Después de contabilizar las colonias en las placas seleccionadas, multiplicar por la inversa de la dilución para obtener el número de UFC por mililitro o gramo de la muestra.

Redondear la cifra obtenida en la cuenta de manera que sólo aparezcan dos dígitos significativos al inicio de esta cifra. Para redondear, elevar el segundo dígito al número inmediato superior cuando el tercer dígito de la derecha sea cinco o mayor (por ejemplo: 128 redondear a 130). Si el tercer dígito es cuatro o menos, reemplazar el tercer dígito con cero y el segundo dígito mantenerlo igual (Por ejemplo: 2417 a 2400):

11. Informe de la prueba

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

CUADRO 2

Cálculo de los valores de la cuenta en placa

(Ensayos por duplicado)

Ejemplo Colonias contadas UFC/g o ml

número 1: 100 1: 1000 1: 10000

1 > 250a 178 16 180000

> 250 190 17

2 > 250 220 25 250000

238 28

3 18 2 0 1600b

14 0 0

4 > 250 > 250 512 5000000b

> 250 > 250 495

5 > 250 240 34 290000

> 250 235 crecimiento

extendido

6 0 0 0 < 100c

7 > 250 240 24 250000

> 250 268 19

8 > 250 216 23 280000

> 250 262 42

9 > 250 215 20 230000

> 250 235 26

> 250 275 32 270000

> 250 225 26

12. Concordancia con normas internacionales

Esta Norma no tiene concordancia con normas internacionales.

13. Bibliografía

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

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

- 13.3 Secretaría de Salud. 1988. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. México, D.F.
- 13.4 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. NOM-008-SCFI-1993. Norma Oficial Mexicana. Sistema General de Unidades de Medida.
- 13.5 Bacteriological Analytical Manual. 1984. Food and Drugs Administration FDA. Bureau of Foods. Division of Microbiology. 6a Ed. Washington D.C.
- 13.6 NORMA-Z-013/02. 1981. Guía para la Redacción, Estructuración y Presentación de las Normas Oficiales Mexicanas. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial.
- 13.7 Tomasiewicz, D. M., et al. 1980. The most suitable number of colonies on plate for counting. Journal of Food Protection. 43: 4.
- 13.8 Vanderzant F., Carland S., y Don F. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association. Washington, D.C. 1992.

14. Observancia de la norma

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

15. Vigencia

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

Sufragio Efectivo. No Reelección.

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

A4.- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-115-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN ALIMENTOS.

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

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

PREFACIO

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

SECRETARIA DE SALUD

Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios

Laboratorio Nacional de Salud Pública

SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA Y DESARROLLO RURAL

Comisión Nacional del Agua

SECRETARIA DE MEDIO AMBIENTE, RECURSOS NATURALES Y PESCA

Instituto Nacional de la Pesca

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

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

LABORATORIO FERMI, S.A.

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

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

SOCIEDAD MEXICANA DE NORMALIZACION Y CERTIFICACION, S.C.

NORMEX

INDICE

0. INTRODUCCION
1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION
2. FUNDAMENTO
3. REFERENCIAS
4. DEFINICIONES
5. SIMBOLOS Y ABREVIATURAS
6. REACTIVOS Y MATERIALES
7. APARATOS

8. PREPARACION DE LA MUESTRA
9. PROCEDIMIENTO
10. CALCULO Y EXPRESION DE RESULTADOS
11. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES
12. BIBLIOGRAFIA
13. OBSERVANCIA DE LA NORMA
14. VIGENCIA

0. Introducción

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

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

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

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

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

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

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

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

1. Objetivo y campo de aplicación

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

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

2. Fundamento

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

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

3. Referencias

Esta norma se complementa con lo siguiente:

NOM-109-SSA1-1994 Procedimiento para la Toma, Manejo y Transporte de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.*

NOM-110-SSA1-1994 Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.*

4. Definiciones

Para fines de esta norma se entiende por:

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

5. Símbolos y abreviaturas

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

kg kilogramo

cm² centímetro cuadrado

g gramo

l litro

ml mililitro

cm centímetro

mm milímetro

h hora

min	minuto
seg	segundo
°C	grados Celsius
N	normal
M	molar
PM	peso molecular
pH	potencial de hidrógeno
±	más o menos
%	por ciento
/	por
µm	micrómetro
UFC	unidades formadoras de colonias

6. Reactivos y materiales

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

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

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

6.1 Reactivos

6.1.1 Soluciones diluyentes

6.1.1.1 Solución reguladora de fosfatos (Solución concentrada)

FORMULA

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

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

Agua 1,0 l

Preparación

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

Esterilizar durante 15 min a $121^{\circ}\text{C} \pm 1$, conservar en refrigeración (solución concentrada).

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

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

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

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

6.1.1.2 Agua peptonada

FORMULA

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

Preparación

Disolver los componentes en un litro de agua.

Ajustar el pH a 7,0 con solución de hidróxido de sodio 1N.

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

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

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

6.1.2 Medios de cultivo

6.1.2.1 Medio de Baird-Parker

FORMULA

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

Preparación

Cuando el medio base esté a 45°C, agregar los demás ingredientes y mezclar.

Colocar de 15 a 20 ml del medio completo, enfriar y dejar solidificar.

Las placas pueden almacenarse por 48 h a temperatura de 0 a 5°C.

6.1.2.1.1 Medio base de Baird-Parker

FORMULA

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

Preparación

Disolver los ingredientes o el agar base en agua y calentar con agitación constante y hervir durante 1 min. Esterilizar a 121°C ±1 durante 15 min.

Enfriar y mantener el medio a 45°C.

6.1.2.1.2 Solución de telurito

FORMULA

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

Telurito de potasio	1,0 g
---------------------	-------

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

Preparación

Disolver el telurito de potasio en agua y esterilizar.

La solución puede ser almacenada por varios meses a temperatura de 0 a 5°C.

6.1.2.1.3 Emulsión de yema de huevo

Preparación

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

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

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

Filtrar a través de gasa.

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

6.1.2.1.4 Solución salina isotónica

FORMULA

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

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

Agua 100,0 ml

Preparación

Disolver el ingrediente en agua y esterilizar a $121^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante 15 min.

6.1.2.2 Caldo de infusión cerebro-corazón (BHI)

FORMULA

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

Infusión de cerebro de ternera	200,0 ml
--------------------------------	----------

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

Peptona de gelatina	10,0 g
---------------------	--------

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

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

Glucosa	2,0 g
---------	-------

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

Preparación

Disolver los ingredientes en agua y calentar ligeramente si es necesario.

Distribuir y esterilizar durante 15 min a $121^{\circ}\text{C} \pm 1$.

6.1.2.3 Acido desoxirribonucleico helicoidal de timo de ternera.

FORMULA

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

Acido desoxirribonucleico helicoidal de timo de ternera o equivalente	0,03 g
---	--------

Agar	1,00 g
------	--------

Cloruro de calcio anhidro (Solución	
-------------------------------------	--

0,01 M) (6.1.2.3.1) 0,10 ml

Cloruro de sodio 1,00 g

Azul de toluidina (Solución 0,1 M)

(6.1.2.3.2) 0,30 ml

Tris-(hidroximetil-aminometano)

(Tris solución 0,05 M, pH 9)

(6.1.2.3.3) 100,00 ml

Preparación

Disolver los ingredientes, excepto el azul de toluidina agitando hasta completar la disolución del ácido desoxirribonucleico y calentar a ebullición.

Agregar el azul de toluidina. Distribuir en frascos pequeños con tapón de hule. No es necesario esterilizar.

Este medio es estable a temperatura ambiente hasta 4 meses y funciona perfectamente aun después de fundirlo varias veces.

Tomar un porta objetos limpio y agregar 3 ml del medio fundido esparciéndolo por la superficie.

Cuando el agar solidifique, hacer orificios con la punta de una pipeta Pasteur.

Conservar en refrigeración para evitar la deshidratación.

6.1.2.3.1 Solución de cloruro de calcio anhidro 0,01 M

Cloruro de calcio PM = 110,99

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

6.1.2.3.2 Solución de azul de toluidina 0,1 M

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

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

(Tris pH 9) PM = 121,1

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

6.1.3 Reactivo biológico:

Plasma de conejo

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

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

6.2 Materiales

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

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

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

Tubos de cultivo de 10 mm x 75 mm.

Cajas Petri de 90 a 100 mm de diámetro.

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

Pipetas Pasteur.

Probetas.

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

Matraz Erlenmeyer con perlas de vidrio

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

7. Aparatos

Horno para esterilizar que alcance 180°C.

Autoclave con termómetro.

Baño de agua con regulador de temperatura de $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Baño de agua con regulador de temperatura de $45 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

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

Incubadora a $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

8. Preparación de la muestra

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

9. Procedimiento

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

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

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

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

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

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

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

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

CUADRO

NUMERO DE COLONIAS	NUMERO DE COLONIAS
SOSPECHOSAS EN PLACA	POR PROBAR

Menos de 50 3

51 a 100 5

101 a 150 o más 7

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

9.10 Incubar a 35°C durante 24 h.

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

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

9.13 Prueba de coagulasa

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

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

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

9.14 Prueba de termonucleasa

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

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

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

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

10. Cálculo y expresión de resultados

10.1 Cálculo

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

Ejemplo 1:

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

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

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

5

Ejemplo 2:

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

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

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

3

10.2 Expresión de los resultados:

Según ejemplo 1:

Informar como *Staphylococcus aureus* 640 000 UFC/g

Según ejemplo 2:

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

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

0 UFC/g en muestras directas

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

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

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

11. Concordancia con normas internacionales

Esta norma no tiene concordancia con normas internacionales.

12. Bibliografía

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

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

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

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

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

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

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

12.8 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1981

NORMA-Z-013/02. Guía para la Redacción, Estructuración y Presentación de las Normas Oficiales Mexicanas. México, D.F.

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

13. Observancia de la Norma

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

14. Vigencia

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

Sufragio Efectivo. No Reelección.

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

A5.- E. Protocolo de purificación de ADN genómico de bacterias grampositivas

- Antes de empezar

Prepare el tampón de lisis de bacterias grampositivas: Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, EDTA 2 mM, 1.2% de Triton X-100, agregue lisozima a 20 mg / ml inmediatamente antes de usar.

- Procedimiento escalonado

1.- Recolecte hasta 2×10^9 células bacterianas en un tubo de microcentrífuga de 1.5 o 2 ml. Centrifugación durante 10 min a 5000 x g. Deseche el sobrenadante.

2.- Resuspender el sedimento en 180 µl de tampón de lisis de bacterias grampositivas. Incubar durante 30 min a 37 ° C.

3.- Agregue 200 µL de solución de lisis y 20 µL de proteinasa K. Mezcle bien con vórtex o pipeteado para obtener una suspensión uniforme.

4.- Incube la muestra a 56 ° C mientras vortex ocasionalmente o use un baño de agua con agitación, plataforma oscilante o termomezclador hasta que las células estén completamente lisadas (~30 min).

5.- Agregue 20 µL de solución de RNasa A, mezcle por agitación e incube la mezcla durante 10 min a temperatura ambiente.

6.- Agregue 400 µL de etanol 50% y mezcle mediante pipeteo o agitación con vórtex.

7.- Transfiera el lisado preparado a una columna de purificación de ADN genómico GeneJET insertado en un tubo de colección. Centrifugar la columna durante 1 minuto a 6000 g. Descarte el tubo de colección que contiene la solución de desecho. Coloque la columna de purificación de ADN genómico GeneJET en un nuevo tubo de colección de 2 ml (incluido).

Nota. Cierre la bolsa de columnas de purificación de ADN genómico GeneJET firmemente después de cada uso!

8.- Agregue 500 µL de *Wash Buffer I* (con etanol agregado). Centrifugar durante 1 minuto a 8000 g. Tire el desecho y coloque la columna de purificación de nuevo en el tubo de colección.

9.- Agregue 500 µL de *Wash Buffer II* (con etanol agregado) a la columna de purificación ADN genómico GeneJET. Centrifugar durante 3 minutos a la velocidad máxima (≥ 12000 x g).

Opcional. Si se ve una solución residual en la columna de purificación, vacíe el tubo de colección y vuelva a centrifugar la columna durante 1 min. a velocidad máxima.

Deseche el tubo de colección que contiene el desecho y transfiera la columna de purificación de ADN genético GeneJET en un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 ml (no incluido).

10.- Agregue 200 μ L de *Elution Buffer* al centro de la membrana de purificación de la columna para eluir el ADN genómico. Incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente y centrifugar durante 1 minuto a 8000 g.

Nota

- Para obtener el máximo rendimiento de ADN, repita el paso de elución con 200 μ L adicionales de *Elution Buffer*.
- Si se requiere ADN más concentrado o se aísla el ADN inicialmente de una pequeña cantidad de material, el volumen de *Elution Buffer* agregado a la columna se puede reducir a 50-100 μ L.

Tenga en cuenta que volúmenes más pequeños de *Elution Buffer* resultarán en una cantidad final más pequeña de ADN eluido.

11.- Deseche la columna de purificación. Utilice el ADN purificado inmediatamente para su aplicación o almacene a -20 ° C.

A6. Thermo Scientific GeneRuler 100 bp & 1 Kb DNA Ladder

