



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

TESIS:

***“CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE JUGOS DE NARANJA DE
VENTA CALLEJERA EN LA CIUDAD DE MORELIA MICHOACÁN”***

Que para obtener el título de Químico-Farmacobiólogo

Presenta:

SALVADOR AGUILAR CHÁIREZ

Director de tesis:

MAESTRA EN SALUD PÚBLICA KARLA G. DOMÍNGUEZ GONZÁLEZ

DOCTOR EN BIOMEDICINA MOLECULAR JORGE FRANCISCO CERNA CORTÉS

**MORELIA MICHOACÁN
JUNIO 2014.**





UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

TITULO DE TESIS:

**“CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE JUGOS DE NARANJA DE
VENTA CALLEJERA EN LA CIUDAD DE MORELIA MICHOACÁN”**

Que para obtener el título de Químico-Farmacobiólogo

Presenta:

SALVADOR AGUILAR CHÁIREZ

Director de tesis:

M.S.P. KARLA G. DOMÍNGUEZ GONZÁLEZ

D.C. JORGE FRANCISCO CERNA CORTÉS

MORELIA MICH.



PROLOGO

El presente trabajo de tesis, es el resultado de una colaboración entre el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Químico-Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (Q.F.B – U.M.S.N.H) y el laboratorio de Microbiología Molecular y Microbiología Sanitaria del departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (E.N.C.B-IPN). Bajo la dirección de la M.S.P. KARLA G. DOMÍNGUEZ GONZÁLEZ y el D.C JORGE F. CERNA CORTES adscritos a la facultad de Q.F.B-U.M.S.N.H y la E.N.C.B-IPN respectivamente.

Que para obtener el título de licenciatura en Químico-Farmacobiología presenta el p.Q.F.B SALVADOR AGUILAR CHÁIREZ, destacando además la colaboración del Q.F.B Ricardo Giovanni Soria Herrera y Q.F.B Yazmín Cuevas Muñoz, formando parte del equipo de trabajo, ambos adscritos a la facultad de Q.F.B.

Ésta tesis fue apoyada por el Consejo Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación (CECTI) a través del programa “BECA-TESIS 2013” del estado de Michoacán.

“POR QUE JEHOVÁ DA LA SABIDURIA Y DE SU BOCA VIENE EL
CONOCIMIENTO Y LA INTELIGENCIA” *proverbios 2:6*

AGRADECIMIENTOS

Siempre al concluir un trabajo de mucho agrado y lleno de aprendizaje, es común que te aborde un muy humano sentimiento de egocentrismo que te lleva a dar merito a la mayor parte del aporte que has hecho. Sin embargo, tal aporte hubiese sido imposible sin la participación de personas e instituciones que han facilitado las vías para que este trabajo llegue a término. Por ello, me complace utilizar este apartado para ser justo y humilde con ellas, expresándoles mis agradecimientos.

Agradezco a dios por el camino designado, contemplando a las personas que en él aparecieron, consiguiendo así aprender de su experiencia y sabiduría para lograr ésta empresa. A mis padres y familiares por su apoyo incondicional, guías en momentos de incertidumbre, afecto y cariño en momentos de necesidad. Al Profr. NEPTALI FLORES, a la Q.F.B TERESA ZAVALA PANTOJA por ser mi gran mentor e impulsor de mi vocación.

A la universidad y la facultad por el apoyo con material, equipo e instalaciones para llevar a fin este proyecto, al Q.F.B RICARDO VEGA TAVERA secretario administrativo y jefe del área de microbiología de la facultad Q.F.B y al equipo de trabajo del laboratorio de microbiología de esta dependencia.

Debo agradecer de manera especial a la M.S.P KARLA GABRIELA DOMÍNGUEZ GONZÁLEZ y al D.C JORGE FRANCISCO CERNA CORTES por aceptarme para realizar esta tesis de licenciatura bajo su dirección, su apoyo, confianza en mi trabajo y su capacidad para guiarme ha sido un aporte invaluable, en el desarrollo de esta tesis y también en mi formación como estudiante. Les agradezco de antemano el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento a los Q.F.B's RICARDO SORIA HERRERA, KARINA HERNANDEZ RAMÓN, ANDRES MARTINEZ RAMIREZ y YAZMIN CUEVAS MUÑOZ por su paciencia y gran voluntad de apoyo prestado a lo largo del trabajo realizado.

A las chicas y chicos de cepario e instructores; Ale Anguiano, Katy Orozco, Alejandra Espinoza, Fabiola, Gabriela Rodríguez, Gloria, Efraín, por su gran apoyo y calidez humana.

INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS	II
INDICE DE TABLAS	II
INDICE DE GRÁFICOS	II
INDICE DE ESQUEMAS	II
1. RESUMEN	1
1.1. Abstract	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. Generalidades	3
2.2. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs)	4
2.2.1. Factores de riesgo de ETAs	7
2.2.2. Epidemiología de las ETAs	8
2.2.3. Alimentos involucrados en ETAs	10
2.2.4. Microorganismos indicadores	12
2.2.5. <i>E. coli</i>	13
2.2.6. Grupos de <i>E. coli</i> diarreogénicos	13
2.2.7. <i>Salmonella</i>	15
3. ANTECEDENTES	16
4. JUSTIFICACIÓN	17
5. HIPÓTESIS	18
6. OBJETIVOS	19
6.1. Objetivo general	19
6.2. Objetivos específicos	19
7. MATERIAL Y MÉTODOS	20
7.1. Colecta de las muestras	21
7.2. Sitos seleccionados para la colecta de las muestras	21
7.2.1. Características sanitarias del establecimiento	22
7.3. Determinación del pH	22
7.4. Determinación de mesofílicos aerobios	22
7.4.1. Determinación de coliformes totales por conteo en placa	23
7.4.2. Determinación de coliformes fecales por el número más probable (NMP).	24
7.4.3. Pre-enriquecimiento para el aislamiento de patógenos	25
7.4.4. Aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i> y otros patógenos.	26
7.4.5. Aislamiento e identificación de <i>E. coli</i> .	26
7.5. PCR múltiple para la identificación de EPEC, STEC, EIEC y ETEC	26
7.6. Análisis estadístico de los resultados	29
8. RESULTADOS	29
8.1. Resultados de Criterios de limpieza	29

8.2.	Determinación del pH	29
8.3.	Evaluación de la calidad microbiológica: mesofílicos aerobios, coliformes totales y fecales	30
8.4.	Identificación de enterobacterias	31
8.5.	Identificación de grupos de <i>E. coli</i> diarreogénicos	31
9.	DISCUSIÓN	32
10.	CONCLUSIONES	36
10.1.	Conclusiones parciales	36
11.	REFERENCIAS	37
12.	Anexos	48
12.1.	Anexo 1 Tablas de resultados	48
12.2.	Anexo 2 (medios y materiales)	52
12.3.	Anexo 3 (Normas Oficiales Mexicanas)	54

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	MECANISMOS DE PATOGENICIDAD DE LOS GED (NATARO & KAPER, 1998)	14
FIGURA 2.	MECANISMO DE PATOGENESIS DE <i>SALMONELLA</i> . TOMADO DE (REVOLLEDO, 2010)	16
FIGURA 3.	MAPA DE MORELIA DONDE SE MUESTRA LOS SITIOS DE COLECTA DE LOS JUGOS	21
FIGURA 4.	PRODUCTOS ESPERADOS EN LA PCR MÚLTIPLEX. TOMADO DE (LÓPEZ SAUCEDO C. , Y OTROS, 2003)	28
FIGURA 5.	ELECTROFEROGRAMA DE LOS RESULTADOS DE PCR-MÚLTIPLEX	31

INDICE DE TABLAS

TABLA 1.	BROTOS DE ETAs EN AMÉRICA LATINA, PERIODO 1997-2002	9
TABLA 2.	CARACTERÍSTICAS DE LOS GRUPOS DE <i>E. COLI</i> DIARREOGÉNICOS	14
TABLA 3.	INICIADORES UTILIZADOS EN LA PCR	28
TABLA 4.	RESULTADOS DEL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LOS JUGOS DE NARANJA	30
TABLA 5.	RELACIÓN DE SITIOS MUESTREADOS, UBICACIÓN Y PUNTAJE	48
TABLA 6.	TABLA DE RESULTADOS, CUENTA DE MICROORGANISMOS EN PLACA Y NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP)	50

INDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1.	EVALUACIÓN DE CRITERIOS DE LIMPIEZA	29
GRÁFICO 2.	GÉNEROS BACTERIANOS AISLADOS EN JUGOS DE NARANJA	31

INDICE DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1.	DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO	20
ESQUEMA 2.	MÉTODO PARA LA CUENTA DE MESOFÍlicos AEROBios	23
ESQUEMA 3.	DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES DE ACUERDO A LA NOM-113-SSA1-1994	24
ESQUEMA 4.	TÉCNICA DEL NMP PARA LA DETERMINACIÓN DE COLIFORMES FECALES	25
ESQUEMA 5.	PROCEDIMIENTO PARA PCR-MULTIPLEX	27

1. RESUMEN

Introducción. En México, la población consume jugo de naranja de venta callejera, debido a que es un alimento de bajo costo y fácil adquisición. Se ha reportado que el jugo de naranja no pasteurizado es un vehículo de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs). Entre las bacterias causantes de ETAs identificadas en los jugos se encuentran *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* O157:H7. Los organismos patógenos pueden entrar a las naranjas a través de su superficie dañada provocada por cortes o fracturas que se producen durante el cultivo o la cosecha. Las malas prácticas higiénicas contribuyen considerablemente al ingreso de patógenos bacterianos a los jugos preparados. Por lo cual, los objetivos de este estudio fueron (1) evaluar las prácticas de higiene de los vendedores ambulantes, (2) determinar la calidad microbiológica de los jugos de naranja recién exprimidos y (3) evaluar la presencia de patógenos bacterianos en dichas muestras.

Metodología. Se colectaron 100 muestras de jugo de naranja de venta callejera en Morelia Michoacán. Se determinaron las condiciones sanitarias del manipulador y del establecimiento. Se determinó el pH de los jugos y se realizó el recuento de mesofílicos aerobios (MA) y coliformes totales (CT) por técnica de vaciado en placa, mientras que los coliformes fecales (CF) por la técnica del Número Más Probable (NMP). Finalmente se realizó la búsqueda intencionada de patógenos como grupos de *E. coli* diarreogénicos, *Salmonella* y otros de importancia sanitaria por su asociación con brotes de ETAs.

Resultados y conclusión. Los jugos de naranja presentaron un pH de 3 a 4.7. El 100% de las muestras de jugo de naranja contenía MA en concentraciones de hasta 22,530,000 UFC/mL, 26 muestras superaron el límite permitido por la norma. Los CT fueron detectados en el 100% de las muestras en un intervalo de 60 a 11,844,000 UFC/mL y el 99% estuvo fuera del límite permisible. Los CF fueron detectados en 35 muestras. *E. coli* fue identificada en 14% de las muestras y ninguna de estas cepas perteneció a algún grupo de *E. coli* diarreogénico. Otras bacterias asociadas a ETAs identificadas en los jugos fueron *Shigella* sp, *Enterobacter* sp y *Klebsiella*. No se identificó *Salmonella* en las muestras. Los resultados mostraron que los jugos de naranja tienen una mala calidad microbiológica y contienen bacterias patógenas causantes de ETAs. La alta carga de microorganismos indicadores muestra una mala calidad de la materia prima además de las inadecuadas prácticas sanitarias, por lo tanto, se sugiere que se tomar medidas, con el fin de prevenir la contaminación de los jugos. Además recomendamos la desinfección de la materia prima para reducir a los patógenos en las naranjas.

Palabras clave: jugos de naranja de venta callejera, calidad microbiológica, enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs).

1.1. Abstract

Introduction. In Mexico, fresh-squeezed orange juice is preferred by the consumers because of the “fresh flavor” and additionally provides a source of readily available and affordable source of nutrients to many sectors of the population, including the urban poor. Unpasteurized orange juice has been the vehicle of several outbreaks of illness caused by *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* O157:H7 and hepatitis A virus. Street-vended fresh-squeezed orange juice also has shown to harbor human pathogens in Mexico. Pathogenic organisms can enter fruits and vegetables through damaged surfaces, such as punctures, wounds, cuts and splits that occur during growing or harvesting or contamination from raw materials and equipment, additional processing conditions, improper handling, prevalence of unhygienic conditions, as in street-vended food, contribute substantially to the entry of bacterial pathogens in juices prepared from these fruits. Therefore, the objectives of this study were to (i) assess hygiene practices of street vendors, (ii) to determine the microbiological quality of fresh-squeezed orange juice, and (iii) to evaluate the presence of bacterial human pathogens in such samples.

Methods. One hundred samples of fresh-squeezed orange juice were collected from different areas of Morelia Michoacán and sanitary conditions of the manipulator and the establishment were evaluated. The presence of aerobic mesophilic count (AMC), total coliforms (TC) and fecal coliforms (FC) and the pH were determined. Pathogenic bacteria associated with foodborne illness were identified by conventional methods and biochemical and molecular tests

Results and conclusion. The orange juice samples have a pH range between 3 and 4.7. AMC were present in all juices with limits up to 22,530,000 CFU/mL and 26 samples exceeded the permissible limit by the ICMSF. TC were detected in all samples, with limits ranging from 60 to 11,844,000 CFU/mL; 99% of them were outside the permissible limits. CF were detected in 35 samples and 14% of samples of them harbor *E. coli*. Others pathogenic bacteria identified were *Shigella* sp, *Klebsiella* spp, and *Enterobacter* sp. *Salmonella* and diarrheagenic *E. coli* pathotypes were not identified in the samples.

Based on our findings, it was concluded that the microbiological quality of street-vended orange juice was unacceptable, and such samples harbor bacteria the cause foodborne illness. Consequently, this study highlighted the fact that orange juice that had high bacterial counts was due to poor personal hygiene and lack of sanitary facilities. Therefore, strict hygiene is paramount to prevent juice contamination, while orange disinfection is recommended to reduce pathogens in raw materials.

Key words: street-vended fresh-squeezed orange juice, microbiological quality, foodborne illness.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Generalidades

Los estudios realizados en alimentos de venta callejera en América Latina revelaron peligros para la Salud Pública debido: 1) a que los alimentos se preparan sin disponer de acceso a agua limpia; 2) no se respetan las prácticas mínimas de higiene; 3) los alimentos crudos no se seleccionan con cuidado; 4) no se tiene en cuenta la contaminación ambiental (FAO, 1996).

La inquietud respecto a la inocuidad de los alimentos son temas críticos cuando los alimentos ofrecidos en las calles son importantes para los consumidores urbanos. Hay que entender que en algunas circunstancias, los riesgos de contaminación química y bacteriana durante la elaboración, así como la comercialización de los alimentos son difíciles de controlar y con frecuencia no disponen de infraestructuras adecuadas, por ejemplo, para la eliminación de desechos y no cuentan con el suministro de agua. El almacenamiento de los alimentos también es un problema debido que los vendedores ambulantes no tienen acceso a electricidad ni a medios de refrigeración. Además, las mejoras en la infraestructura de los mercados no bastan para eliminar estos riesgos (FAO, 1997).

Un estudio en siete ciudades Africanas y Asiáticas reportó que, en general, los alimentos cocinados y vendidos en la vía pública o en mercados son inofensivos si se consumen poco tiempo después de su preparación (Tinker, 2003). Sin embargo, esto prácticamente no sucede.

En México, la venta callejera de alimentos es un problema aun sin enfrentar integralmente; tiene en sí mismo altos costos políticos debidos a los diferentes argumentos que lo sostienen, ya que es una actividad que permite el autoempleo generando ingresos que el sector formal no absorbe.

El impacto sobre la Salud Pública es evidente y creíble, ya que se ha reportado que la alimentos de venta callejera en países en vías de desarrollo, como México, son una fuente de infecciones y es muy difícil abordar esta problemática, por lo que ninguna institución puede solucionar por si solo el

problema. Esta situación debe de ser resuelta de manera integral por las diferentes instituciones implicadas (SSA, 2000).

En 2001 Castillo reportó que no existen cifras económicas precisas acerca del tamaño del sector alimentario en México, debido a que muchas transacciones se llevan a cabo dentro del “sector informal” de la economía nacional. El mercado de los alimentos procesados se estima en unos 12,878 millones de dólares. Aun así, la cifra no incluye a los productos frescos (frutas, hortalizas). En 2006, Schneider efectuó una investigación en 145 países para analizar la magnitud del comercio informal como porcentaje del PIB (FAO/OMS, 2005) y México se sitúa en un sector intermedio dentro de los países estudiados, con una economía informal equivalente al 33.2% de su PIB. Se estima que el valor de las actividades informales alcanza los 380,000 millones de dólares anuales, una cifra que supera las aportaciones de las actividades industriales del país; y el sector informal sigue creciendo (Esquivel, 2008).

En 2010, las cifras en México revelaron que el 27.9% de la población ocupada esta industria se encontraba en provincia mientras que para el DF el porcentaje de la población que trabajó en la misma industria fue del 26.8% (Gómez Méndez, 2012). Se reportó que en el año 2012, el número de mexicanos que trabajó en la venta callejera de alimentos fueron 14.2 millones, lo que equivale al 29.35% de la población, lo cual representa un aumento de 830,000 personas respecto al año 2011 (CNN Expansión, 2012). La tasa de desempleo en nuestro país descendió un 0.67%, es decir paso del 5.68% en 2011 a 5.01% en 2012, debido a la industria de alimentos de venta callejera (CNN Expansión, 2012).

2.2. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs)

Algunas personas se enferman al ingerir determinados alimentos, lo cual sucede frecuentemente y cuando esto acontece, no se tiene certeza de que el alimento fue el causante de la enfermedad y generalmente nos inclinamos en pensar que comimos demasiado, sin embargo, esta reportado que los alimentos vendidos en puestos de venta callejera y en establecimientos formales son el vehículo de agentes bacterianos, virales o parasitarios causantes de infecciones.

DEFINICIONES:

“Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) son aquellas enfermedades que se originan por la ingestión de alimentos infectados con contaminantes en cantidades suficientes para afectar la salud del consumidor” (Butzby y otros, 1996).

Rosas & Acosta en el 2001 ampliaron la definición y el alcance de las mismas, *“las ETAs se producen por la ingestión de alimentos y/o bebidas contaminados con microorganismos patógenos que afectan la salud del consumidor en forma individual o colectiva. Sus síntomas más comunes son la diarrea y el vómito, pero también se pueden presentar otros como choque séptico, hepatitis, cefaleas, fiebre, visión doble, etc”.*

“Las ETAs, constituyen un importante problema de salud pública debido al incremento en su incidencia, al surgimiento de nuevas formas de transmisión, a la aparición de grupos poblacionales vulnerables, al aumento de la resistencia de los patógenos a los compuestos antimicrobianos y al impacto socioeconómico que ocasionan” (Autio, 1999).

En 2001, la Secretaría de Salud (SSA) de México señaló que la frecuencia de ETAs continúa siendo un alto riesgo en la salud de la población, involucrando en ellas al comensal y a todas las personas que intervienen en el proceso de elaboración de los alimentos. De esta forma las ETAs pueden provocar:

- a) **INFECCIONES.-** Se producen al consumir alimentos contaminados con bacterias patógenas, virus y huevecillos de parásitos vivos.
- b) **INTOXICACIONES.-** Las intoxicaciones alimentarias son enfermedades causadas por la presencia de agentes químicos de origen sintético o natural en los alimentos ingeridos.

Estos pueden ser residuos de químicos que se han empleado en algún tipo de tratamiento sobre el alimento, previo a su ingestión, que no han sido removidos adecuadamente; por ejemplo, plaguicidas, pesticidas, jabones, ceras y nitritos (en embutidos). Algunos de los microorganismos contenidos en el alimento producen toxinas, las cuales son consumidas por el hombre al mismo tiempo que ingiere el alimento, por ejemplo: la toxina producida por *Staphylococcus aureus*, la toxina de *Clostridium botulinum*; micotoxinas como la aflatoxina que es producida por el hongo *Aspergillus*.

Las ETAs con causadas por bacterias, virus y parásitos como ya se mencionó. Entre las bacterias comúnmente reconocidas como causantes de ETAs se encuentran especies de los géneros *Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia*, *Clostridium*, *Campylobacter*, etc. Algunos de los virus causantes de ETAS son: *Norovirus*, *Hepatitis A* y *Rotavirus*, etc. Para el caso de parásitos tenemos: *Taenia*, *Platelmintos*, *Nematodos*, etc. Las ETAs pueden evolucionar a cuadros clínicos graves; por ejemplo, es posible que una infección con *E. coli* O157:H7 provoque el síndrome urémico hemolítico (SUH), el cual consiste en insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica y trombocitopenia (Nataro & Kaper, 1998).

El Centro de Control de Enfermedades y Prevención (“CDC”, por sus siglas en inglés) en 2009, reportó que para las personas sanas, la mayoría de las ETAs son enfermedades pasajeras, que sólo duran un par de días y sin ningún tipo de complicación, pero para las personas susceptibles, como son los niños menores de cinco años, los ancianos, las mujeres embarazadas o los que presentan algún tipo de inmunosupresión estas ETAs provocan cuadros clínicos graves que pueden dejar secuelas o incluso hasta provocar la muerte.

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (“FAO”, por sus siglas en inglés) en 2009 en su conferencia anual realizada en Roma, afirmó que las ETAs han pasado a ser un problema que debe ser considerado en un ámbito de carácter social, tecnológico, económico, cultural

y político. A su vez enfatizó la importancia de la calidad de un alimento y de las buenas prácticas higiénicas.

“La salud y la vida de las personas dependen en gran parte de la calidad nutricional de los alimentos que consumen diariamente, la cual a su vez depende de la calidad higiénica y sanitaria a que estos son sometidos en toda la cadena productiva, desde el campo hasta la mesa del consumidor. Si bien la falta de higiene y de sanidad en el procesamiento y preparación de los alimentos es un problema que puede ocurrir en cualquier lugar del mundo, la incidencia de enfermedades causadas por los alimentos mal procesados o pobremente preparados es un problema crítico, severo y que se encuentra con más frecuencia en los países en vías de desarrollo”

(FAO, 2009).

La incidencia de estas enfermedades es un indicador directo de la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos y se ha demostrado que la contaminación de éstos puede ocurrir durante su procesamiento (Millemann, Gaubert, Remy, & Colmin, 2000) o por el empleo de materia prima contaminada (Hielm, Björkroth, Hyytiä, & Korkeala, 1998), (Fach, y otros, 2002) debido a que algunas bacterias patógenas para el hombre forman parte de la flora normal de aves, cerdos y ganado.

2.2.1. Factores de riesgo de ETAs

Los siguientes factores de riesgos son la mayor causa de ETAs (FDA, 2004):

a) Mala higiene personal

- Inapropiado lavado de manos, o no lavarse las manos cuando es necesario.
- Contacto de las manos descubiertas con la comida lista para comer.

- Empleados de servicios de alimentos trabajando cuando están enfermos con síntomas de vómito, diarrea, dolor de garganta con fiebre, ictericia o con heridas o quemaduras infestadas en las manos o muñecas.

b) Alimentos de fuentes Inseguras

- Alimentos recibidos de establecimientos no aprobados o preparados en lugares no permitidos.
- Recibir alimentos adulterados.

c) Cocinar a temperaturas impropias/métodos

- Cocinar
- Recalentar
- Congelar (es un paso para matar parásitos en el pescado)

d) Mantenimiento, tiempo y temperatura incorrectas

- Impropio mantenimiento de los alimentos potencialmente peligrosos (“PHF”, por sus siglas en inglés) en estados fríos o calientes.
- No marcar la fecha y hora en comidas listas para comer que son alimentos potencialmente peligrosos. Impropio uso del tiempo como control.
- Impropio enfriamiento de alimentos potencialmente peligrosos.

e) Contaminación de los Alimentos

- Uso de equipos contaminados o contruidos inapropiadamente.
- Malas prácticas usadas por empleados
- Inapropiado almacenamiento de alimentos/ preparación
- Expuesto a químicos

2.2.2. Epidemiología de las ETAs

En las últimas décadas se han documentado importantes brotes de ETAs en todos los continentes, causados principalmente por el consumo de agua y alimentos contaminados con agentes patógenos. De acuerdo al Comité para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) cada año, 1 de cada 6 estadounidenses (o 48 millones de personas) se enferman, 128 mil son

hospitalizados y 3000 mueren a causa de las ETAs, de las cuales más del 90% de los casos son ocasionados por agentes patógenos conocidos y microorganismos no identificados (CDC, 2011).

Actualmente existen reportes en los cuales se ha demostrado que los países en desarrollo son los más afectados. En el año 2004, las enfermedades diarreicas fueron la tercera causa de muerte en países en vías de desarrollo, siendo el 6.9% de la mortalidad en general (OMS, 2009).

En América Latina las ETAs figuran entre las primeras causas de muerte en niños menores de 5 años y, en general, el número de brotes fue considerable para el período 1997-2002 (Tabla 1). En México la situación de la inocuidad no escapa a esa realidad; en el período 1997-2002 se registraron 461 casos con 41 fallecimientos (Arispe & Tapia, 2007). Sin embargo, el Dr. Eduardo Fernández-Escartín, profesor de la Universidad Autónoma de Querétaro y experto nacional en microbiología en alimentos, en el XIV Congreso Internacional de Inocuidad de Alimentos realizado en Puerto Vallarta en 2012, mencionó que en México se producen 250 millones de ETAs cada año.

Tabla 1. Brotes de ETAs en América Latina, periodo 1997-2002.

País	Total de brotes	Nº de afectados	Total de fallecidos
Argentina	147	3149	5
Bolivia	5	1248	2
Brasil	432	10701	4
Chile	3	48	0
Colombia	1	19	0
Costa Rica	1	4	0
Ecuador	28	1871	12
El Salvador	13	249	0
México	461	9889	41
Nicaragua	105	1059	0
Panamá	14	101	1
Paraguay	65	1055	0
Perú	83	3849	31
R. Dominicana	62	1681	0
Uruguay	94	2312	1
Venezuela	193	5322	9

Tomado de (Arispe & Tapia, 2007)

De acuerdo con estimaciones de la Organización Panamericana de la Salud (OPS)/OMS, se considera que la incidencia real de ETAs es 300 a 350 veces mayor con respecto a las que se registran epidemiológicamente (Arispe & Tapia, 2007).

Según los registros del Boletín Epidemiológico del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) en el año 2013 se reportaron 5, 902,354 casos de diarrea en México, mientras que para el año 2012 se presentaron 6,780,008 casos (Boletín de Epidemiología, 2014).

2.2.3. Alimentos involucrados en ETAs

Los alimentos son un medio ideal para el crecimiento y desarrollo microbiológico. Algunos de éstos, debido a su composición y sistemas de producción, procesamiento, manipulación y forma de consumo son más susceptibles a ser contaminados con microorganismos patógenos y por tanto, representan un alto riesgo para la salud de los consumidores (*Kopper, Calderón, Schneider, Domínguez, & Gutierrez, 2009*). Entre los alimentos de mayor riesgo se encuentran la leche y los productos lácteos, las carnes (pollo, pescado, cerdo), las hortalizas y las frutas, los jugos, entre otros (*Jay, 2000*).

Sin embargo, en todo el mundo se ha incrementado la frecuencia de brotes de enfermedades gastrointestinales asociadas al consumo de frutas y hortalizas contaminadas. Por su naturaleza, estos productos están expuestos a microorganismos patógenos presentes en el campo y en el agua de riego. Dependiendo de las condiciones de producción y cosecha, estos productos pueden contener cargas importantes de especies formadoras de esporas como *Clostridium* spp., *Listeria* spp., y *enterobacterias* presentes en el agua de riego como grupos de *E. coli* diarreogénicos y *Salmonella* spp. Históricamente un agente causal de brotes de ETAs ha sido *Salmonella*. En los Estados Unidos esta bacteria fue la causante de enfermedades gastrointestinales por consumo de germinados contaminados (*Mahon, y otros, 1997*), tomate (*Cummings, y otros, 2001*), rebanadas de tomate (*Wood, Hedberg, & White, 1991*), rebanadas de melón (*Ries, Zasa, Langkop, Tauxe, & Blake, 1990*), y rebanadas de sandía

(Blostein, 1993). *Escherichia coli* O157:H7 y *Shigella* spp, también se han asociado a brotes de enfermedades por consumo de diversas variedades de lechuga (Kapperud, y otros, 1995). Por otra parte, enfermedades causadas por el virus de la Hepatitis A se han relacionado con el consumo de tomates y fresas azucaradas (De Roever, 1998).

En 1992 (Utzinger, Arias, Monge, & Antillón, 1992), estudiaron la calidad microbiológica de las frutas que se expenden con mayor frecuencia en los puestos callejeros de San José Costa Rica; analizaron frutas que se venden peladas y en rebanadas como la piña (*Ananas comosus*), papaya (*Carica papaya*), mango (*Mangifera indica*) y sandía (*Citrullus vulgaris*), así como otras frutas que se consumen con cáscara como los nanches (*Byrsonima crassifolia*) y los jocotes (*Spondias purpurea*). Los autores demostraron que más del 38% de las muestras de frutas presentaron contaminación con coliformes totales y más del 30% con coliformes termotolerantes. Asimismo, en más del 10% de las muestras aislaron *Escherichia coli*.

Por otra parte, los brotes de enfermedades asociados con el consumo de jugo de fruta han sido un problema creciente de salud pública desde la década de 1990. De acuerdo a un estudio realizado por el CDC en el período de 1995-2005, se reportaron 21 brotes asociados con el consumo de jugo, de los cuales 10 estuvieron implicados al consumo de zumo de manzana o sidra, 8 estuvieron relacionados con el jugo de naranja y 3 con jugos de otro tipo de frutas. De estos brotes 13 fueron de etiología conocida, 5 fueron causados por *Salmonella*, 5 por *Escherichia coli* O157:H7, 2 por *Cryptosporidium* y uno por *E. coli* O111 productor de la toxina Shiga (Vojdani, Beuchat, & Tauxe, 2008). También en 1999 se reportaron en Australia 427 casos de salmonelosis después de beber jugo de naranja sin pasteurizar (Durgesh, Ranjana, & Varsh, 2008).

En el 2006 Castillo y colaboradores, reportaron la presencia de *Salmonella* (14%) y *Shigella* (6%) en muestras de jugo de naranja obtenidas de expendios ambulantes en la Ciudad de Guadalajara, México.

Los patógenos que se pueden desarrollar en jugos ácidos (pH 4.6 o menos) como el de naranja, son principalmente agentes bacterianos entéricos tales

como *E. coli* O157:H7, diferentes tipos de *Salmonella*, y el parásito protozoario *Cryptosporidium parvum*, también se ha identificado como posible contaminante en jugos a *Listeria monocytogenes* (FDA, 2004).

2.2.4. Microorganismos indicadores

Los organismos indicadores suelen emplearse para evidenciar la calidad microbiológica de los alimentos en proporción a la vida útil del producto y verificar la presencia o ausencia de agentes patógenos transmitidos por los alimentos. Con frecuencia, los indicadores son utilizados para valorar higiene de los alimentos. (Jay, 2000).

Los microorganismos indicadores incluyen a los mesofílicos aerobios, coliformes totales y coliformes fecales. Los mesofílicos aerobios son organismos que necesitan oxígeno y desarrollan a una temperatura de 25-40 °C y son indicativos de una mala calidad de la materia prima.

Los coliformes totales son el grupo indicador con mayor tradición en la microbiología sanitaria definidos como bacilos Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa con producción de gas dentro de 48 h de incubación a 35°C (Jay, 2000). El grupo de coliformes totales está formado por los siguientes géneros: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*. Los coliformes totales son indicativos de una mala calidad sanitaria. Dentro del grupo de los coliformes totales tenemos a los coliformes termotolerantes también llamado coliformes fecales, este grupo se ha venido utilizado en la microbiología para manifestar organismos coliformes que crecen a 44 o 44.5 °C y fermentan la lactosa produciendo ácido y gas. La presencia de coliformes termotolerantes casi siempre indica contaminación de origen fecal reciente, este grupo está representado por *E. coli*. (UNEP/WHO, 1996).

2.2.5. *E. coli*

E. coli pertenece a la familia Enterobacteriaceae y se caracteriza por ser un bacilo corto, Gram negativo, anaerobio facultativo, no esporulado, generalmente con flagelos peritricos y fimbrias, oxidasa negativo, ureasa negativa, Indol positivo, rojo de metilo positivo, la mayoría son fermentadoras de la lactosa y producen gas a partir de la glucosa. *E. coli* puede crecer a temperaturas desde 2.5 hasta 45 grados centígrados y a un pH de 4.4 a 9.0, aunque ha sido aislada en algunos productos con un pH de 3.7.

2.2.6. Grupos de *E. coli* diarreogénicos

E. coli es el principal anaerobio facultativo de la microbiota que reside en el colon humano, el cual es colonizado desde su nacimiento con una o dos cepas que residen de manera permanente estableciendo una relación simbiótica toda su vida. Sin embargo, se han descrito seis grupos de *E. coli* diarreogénicos (GED), que se clasifican en base a su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico que producen: *E. coli* enteropatógena (EPEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC) y enterodifusa (DAEC) (Nataro & Kaper, 1998)(Ver tabla 2).

Los grupos de *E. coli* diarreogénicos causan daño mediante los siguientes tres mecanismos de patogenicidad: 1) adherencia, 2) producción de toxinas e 3) invasión. La adherencia permite que la bacteria pueda unirse y colonizar el epitelio de ciertas áreas del intestino, seguido por la producción de toxinas que son liberadas una vez que la bacteria ha colonizado el intestino y que, dependiendo de sus características, puede tener un efecto en la estimulación de secreción de agua y electrolitos (enterotoxinas) o la destrucción celular (citotoxinas); o en la invasión en donde la bacteria se introduce dentro del citoplasma de las células vecinas, evadiendo así los mecanismos de protección del huésped (figura 1) (Nataro & Kaper, 1998) (Rodríguez Angeles, 2002).

Tabla 2. Características de los grupos de *E. coli* diarreogénicos.

Grupo	Síntomas clínicos	Epidemiología	Serogrupos y serotipos más comunes	Factores de patogenicidad
ETEC	Diarrea aguda acuosa	Niños menores de 2 años y diarrea del viajero	O8:H9, O15:H11, O25:H, O20:H, O27:H7, O78:H12, O148:H28	ST y LT CFA
EHEC	SUH, CH, diarrea sin sangre, fiebre, dolor abdominal, vomito	Niños y adultos que comen carne cruda o mal cocida	O157:H7, O26:H11, O103:H2, O113:H21, O119, O128, O145	STX, A/E Intimina pO157
EIEC	Diarrea con moco o cuadro disentérico.	Niños menores de 6 meses	O28:H, O112ac:H, O144:H, O152:H, O119, O128, O145	Invasividad Plásmido de 140MDa
EPEC	Diarrea aguda, dolor abdominal, vomito, fiebre	Niños menores de 6 meses hasta dos años	O55, O86, O142, O111:H, O127	A/E, BFP Plásmido EAF de 50-70 MDa
EAEC	Diarrea líquida, verde con moco, sin sangre	Recién nacidos y menores de 2 años	O44:H18	Fimbria AAF I y II, Proteínas Pet y Pic, OMP, EAST I y Citotoxina
DAEC	Diarrea acuosa sin sangre	Niños de 1 a 5 años	O126:H27	Fimbria F1845 OMP

LT= toxina termolábil, ST= toxina termoestable, CFA= Factor de colonización antigénica, BFP= Pili en forma de fimbria, EAF= factor de adherencia de EPEC, OMP= proteína de membrana externa, STX= toxina Shiga, EAST= toxina ST de cepas enteroagregativas, A/E=Adherencia y esfecelamiento, EAF=Factor de adherencia de EPEC, Proteínas Pet y Pic

Tomado de (Rodríguez Angeles, 2002).

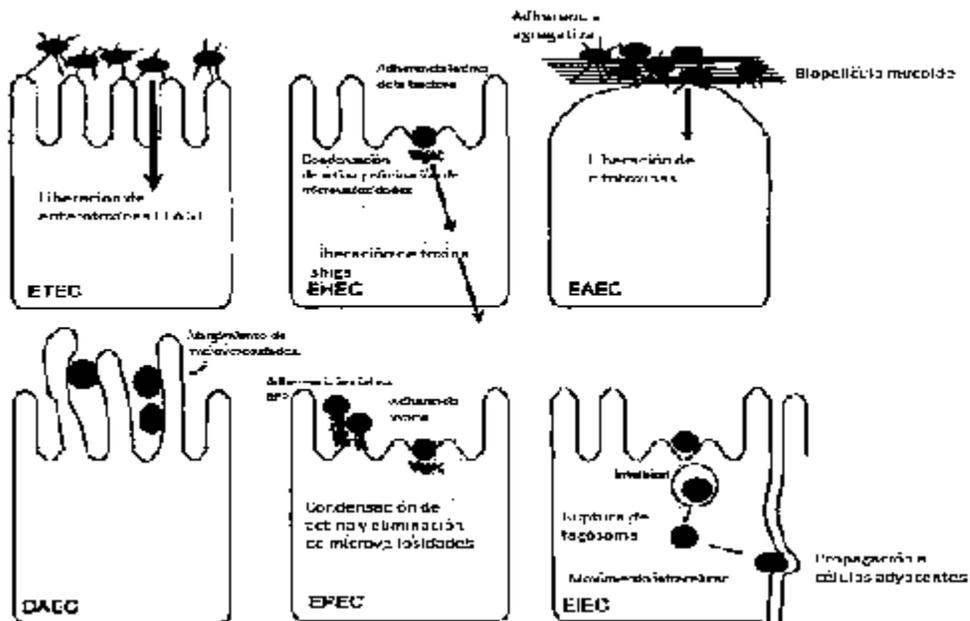


Figura 1. Mecanismos de patogenicidad de los GED (Nataro & Kaper, 1998).

2.2.7. *Salmonella*

Es un género constituido por diferentes especies que son patógenas para el hombre y muchos animales. Son bacilos Gram negativos, no esporulados, oxidasa negativa, no fermentan la lactosa, son móviles, aerobios o anaerobios facultativos, termolábiles, contienen endotoxinas, resistentes a algunos agentes químicos y a la congelación, su rica y característica composición antigénica se utiliza para la identificación de sus serotipos. Actualmente existen más de 2500 serotipos de *Salmonella* y todos son potencialmente patógenos para el hombre. Los factores de virulencia incluyen la habilidad de invadir células, poseer una cubierta completa de lipopolisacárido (LPS), capacidad de replicación intracelular y producción de toxinas (Caballero Torres, 2008).

La adherencia de *Salmonella*, así como de otros patógenos intestinales, a la superficie intestinal es el factor clave en la patogenicidad y en la colonización intestinal. A pesar de que estas bacterias pueden colonizar un huésped sano, el riesgo de infección se relaciona con períodos de estrés. El daño epitelial que se produce durante el estrés puede causar secreciones de proteínas de matriz extracelular, tales como fibronectina que funciona como un receptor para algunas proteínas de adhesión de *Salmonella*.

En los mamíferos, la infección por *Salmonella* se caracteriza por la interacción inicial de bacterias en el tracto digestivo, principalmente a través de las células M y células epiteliales (figura 2). *Salmonella* produce efectos citotóxicos que resultan en la destrucción de las células M y en la invasión de los enterocitos (Revolledo, 2010). *S. typhi*, así como *S. typhimurium*, son capaces de entrar en el epitelio intestinal, sin embargo, *S. typhimurium* no destruye el epitelio (Pascopella, y otros, 1995).

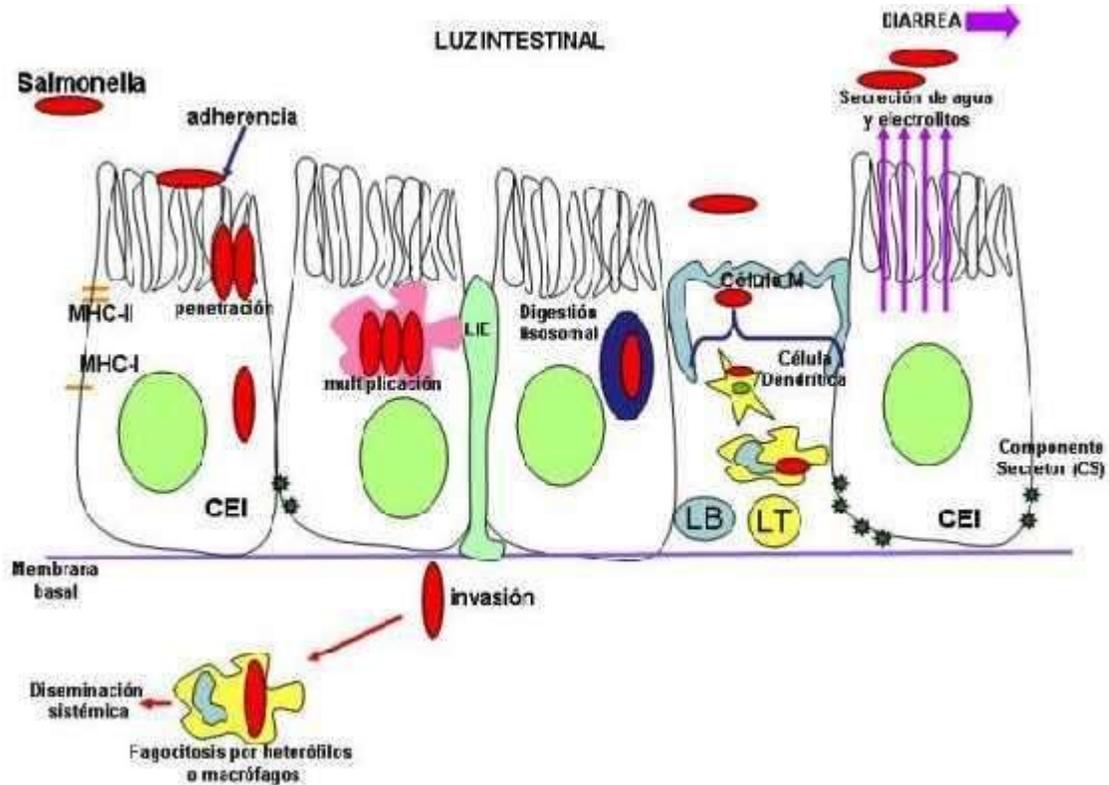


Figura 2. Mecanismo de patogénesis de *Salmonella*. Tomado de (Revolledo, 2010).

3. ANTECEDENTES

Las modificaciones en los hábitos alimenticios de la sociedad, ya sea el consumo de alimentos envasados, comidas fuera de casa, establecimientos de comidas preparadas y comidas rápidas, son factores que contribuyen al incremento de las ETAs. Estos cambios en los estilos de vida solapan riesgos, principalmente en las sociedades desarrolladas. En las entidades con menor nivel socio-económico siguen siendo prevalentes las enfermedades entéricas como la diarrea, el cólera, la fiebre tifoidea y la parasitosis (Käferstein & Abdussalam, 1999).

La posible relación entre factores socio-demográficos como el envejecimiento de la población también podría estar influyendo en el aumento de estas enfermedades. (Kass & Rieman, 2006) (Majowicz, Horrocks, & Bocking, 2007). Los zumos de frutas y vegetales crudos se posicionan como fuentes emergentes de ETAs (Parish M. E., 1997).

Los elaboradores de jugos de frutas dan por hecho que la acidez de sus productos garantiza la seguridad microbiológica. Sin embargo, la capacidad de los patógenos para sobrevivir en jugos ácidos está documentada (Ryu & Beuchat, 1998) (Uljas & Ingham, 1998) (Linton, McClements, & Patterson, 1999).

Aunque los patógenos transmitidos por los alimentos pueden ser destruidos por la pasteurización, el consumo de jugo sin pasteurizar se produce con frecuencia debido a las preferencias de los consumidores. En estos jugos sin pasteurizar, como los jugos de naranja, bacterias patógenas, como *Salmonella*, *Shigella* y *Staphylococcus aureus* han sido aisladas (Castillo, Villarruel Lopez, Navarro Hidalgo, Martinez Gonzalez, & Torres Vitela, 2006) (Sospedra, Rubert, Soriano, & Manes, 2012). Los jugos de fruta no pasteurizados evidentemente constituyen un riesgo significativo para la salud de los consumidores.

4. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades gastrointestinales han ido en aumento, éstas son transmitidas al hombre a través de alimentos y agua contaminada. En estudios de diferentes partes del mundo se ha reportado que los alimentos de venta callejera pueden contener patógenos en cantidad suficiente para producir enfermedades. En México, el jugo de naranja recién exprimido es uno de los alimentos de venta callejera que se consume con más frecuencia durante las primeras horas del día. En estudios realizados en otros países se ha reportado que este tipo de jugo puede contener *Salmonella* y grupos de *E. coli* diarreogénicos, sin embargo, en Morelia Michoacán no hay estudios de búsqueda intencional de estos patógenos por lo cual, proponemos determinar la calidad microbiológica de los jugos de naranja de venta callejera así como evaluar la presencia de diferentes patógenos. Este trabajo permitirá establecer si los jugos de naranja recién exprimidos de venta callejera de la Cd. de Morelia presentan una buena calidad microbiológica y si contienen agentes patógenos productores de ETAs.

5. HIPÓTESIS

Los jugos de naranja recién exprimidos de venta callejera en la Morelia Michoacán son de mala calidad microbiológica y pueden contener agentes patógenos productores de ETAs.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

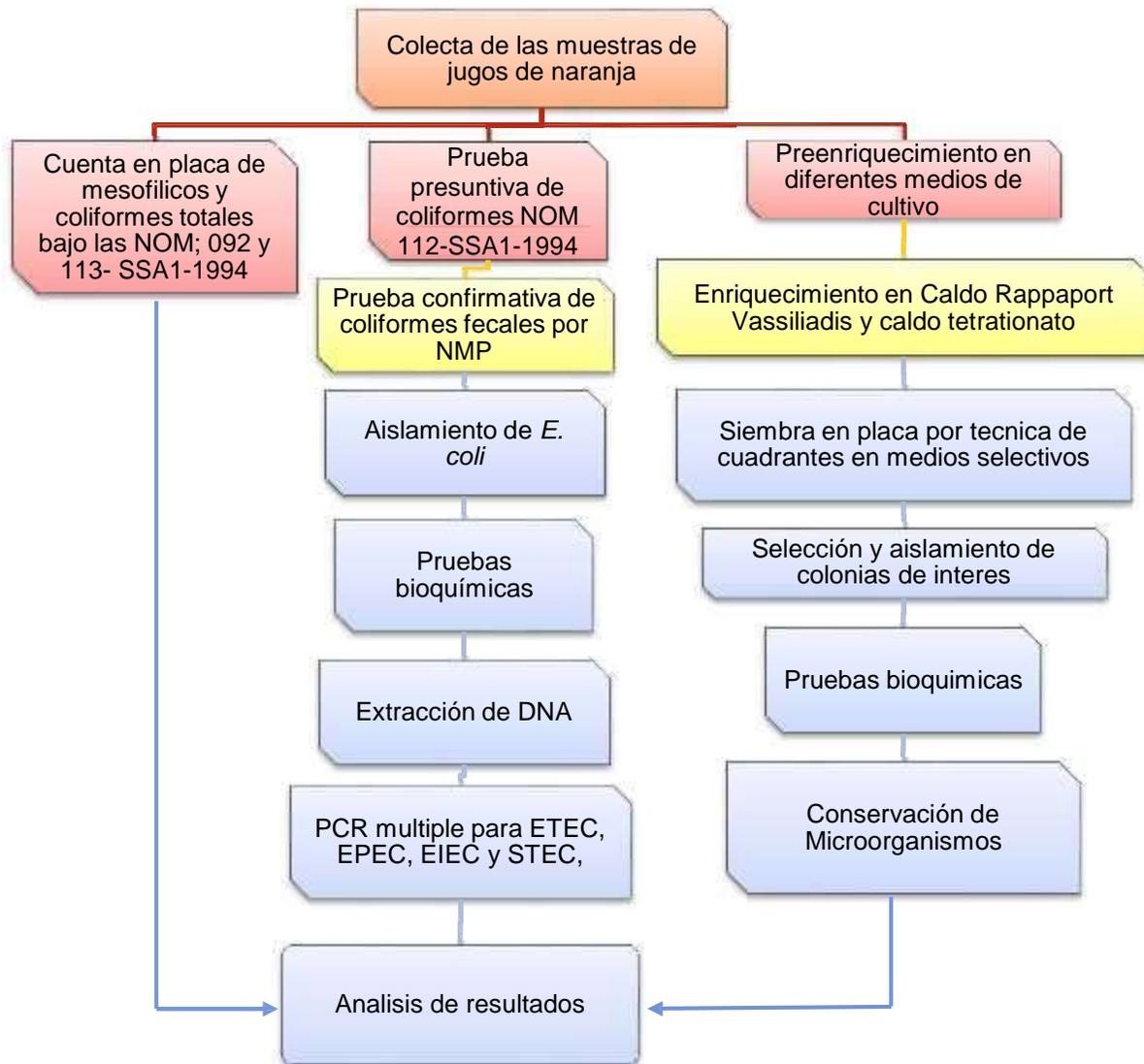
Evaluar la calidad microbiológica de 100 muestras de jugos de naranja recién exprimidos de venta callejera en la Ciudad de Morelia Michoacán, así como determinar si contienen agentes patógenos productores de ETAs.

6.2. Objetivos específicos

- Colectar 100 muestras de jugos de naranja recién exprimido de venta callejera en la ciudad de Morelia Michoacán y evaluación de las características sanitarias del establecimiento.
- Determinación de microorganismos mesofílicos aerobios utilizando la NOM-092-SSA1.
- Establecer el número de microorganismos coliformes totales con base a la norma NOM-113-SSA1
- Establecer el número de microorganismos coliformes fecales con base a la norma NOM-112-SSA1
- Hacer la búsqueda de microorganismos patógenos que puedan causar problemas de ETAs, particularmente *Salmonella* y *E. coli* con ayuda de medios selectivos y pruebas bioquímicas.
- Identificar a los grupos de *E. coli* diarreogénicos (EPEC, ETEC, EHEC y EIEC) utilizando una PCR multiplex.
- Análisis de los resultados.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

A continuación se muestra el esquema general de trabajo empleado en este estudio.



Esquema 1. Diagrama general de trabajo.

7.1. Colecta de las muestras

Se colectaron 100 muestras de jugos de naranja utilizando los criterios establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994 (ver anexo 3). Las muestras fueron seleccionadas con base en la geografía de la ciudad y fueron sitios que presentan una gran concurrencia de la población.

7.2. Sitos seleccionados para la colecta de las muestras

A continuación se presenta un mapa donde se localizan con un asterisco rojo cada uno de los puntos de venta donde se colectaron las muestras de jugos de naranja en la ciudad de Morelia Michoacán.



Figura 3. Mapa de Morelia donde se muestra los sitios de colecta de los jugos

7.2.1. Características sanitarias del establecimiento

Para determinar las características sanitarias del establecimiento se tomaron en cuenta cinco criterios de limpieza: 1) limpieza del puesto/establecimiento, 2) limpieza del manipulador, 3) limpieza de la materia prima, 4) disposición de la basura (separación de basura), y 5) limpieza de utensilios de trabajo.

Así se evaluó a cada lugar de venta de jugos, dando una puntuación a cada uno de los parámetros de la siguiente manera:

- **Bueno:** 3 puntos
- **Aceptable:** 2 puntos
- **Deficiente:** 1 punto
- **Malo:** 0 puntos

7.3. Determinación del pH

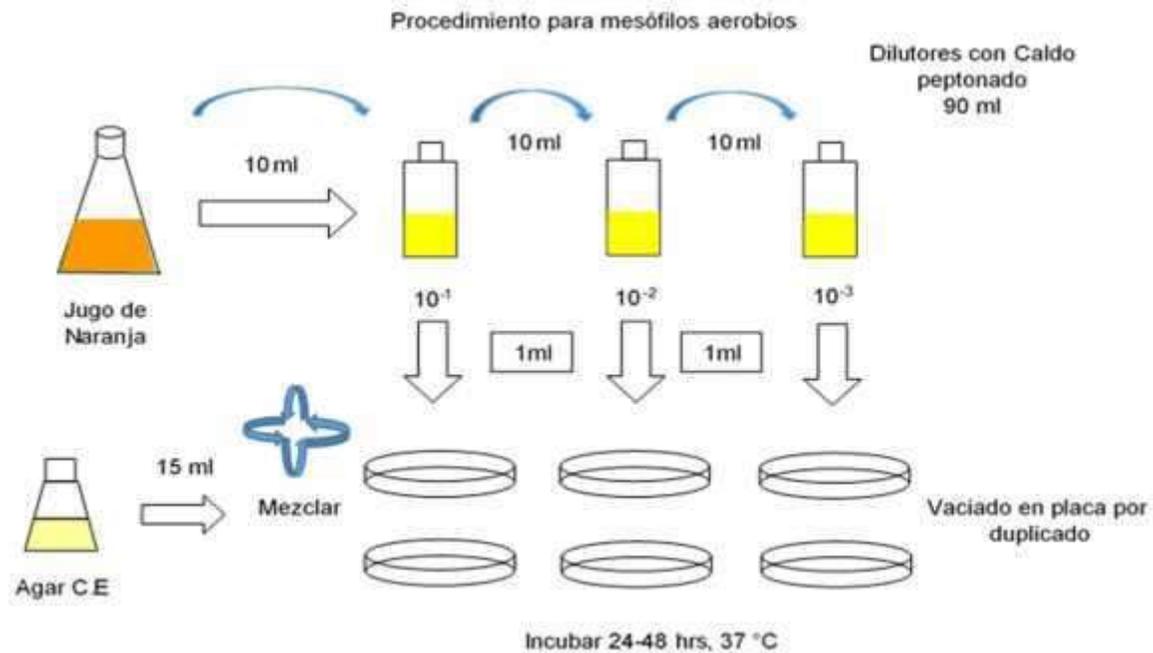
El pH de las muestras fue determinado utilizando un potenciómetro HI98129 marca HANNA.

7.4. Determinación de mesofílicos aerobios

Utilizando el procedimiento establecido por la NOM-110-SSA1-1994 “Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico” y la técnica establecida por la NOM-092-SSA1-1994, “Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa” (ver Anexo 3) se realizó el siguiente procedimiento:

En condiciones de esterilidad, se midieron 10 mL de jugo de naranja utilizando una pipeta de cristal estéril, vertiéndolo en un dilutor el cual contenía 90 mL caldo peptonado, el cual se agitó y se consideró como la primera dilución (10^{-1}) y a partir de esta dilución se realizaron las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} utilizando los mismos volúmenes. Un mL de cada una de estas diluciones fueron depositados en una caja de Petri estéril y a estas se le adicionó 15 mL de agar cuenta estándar a temperatura de 45°C. Este procedimiento se realizó por duplicado. Las placas fueron homogenizadas como lo establece la norma y una vez que la mezcla solidificó, las placas se incubaron a 37°C por 24-48 h (ver esquema 2).

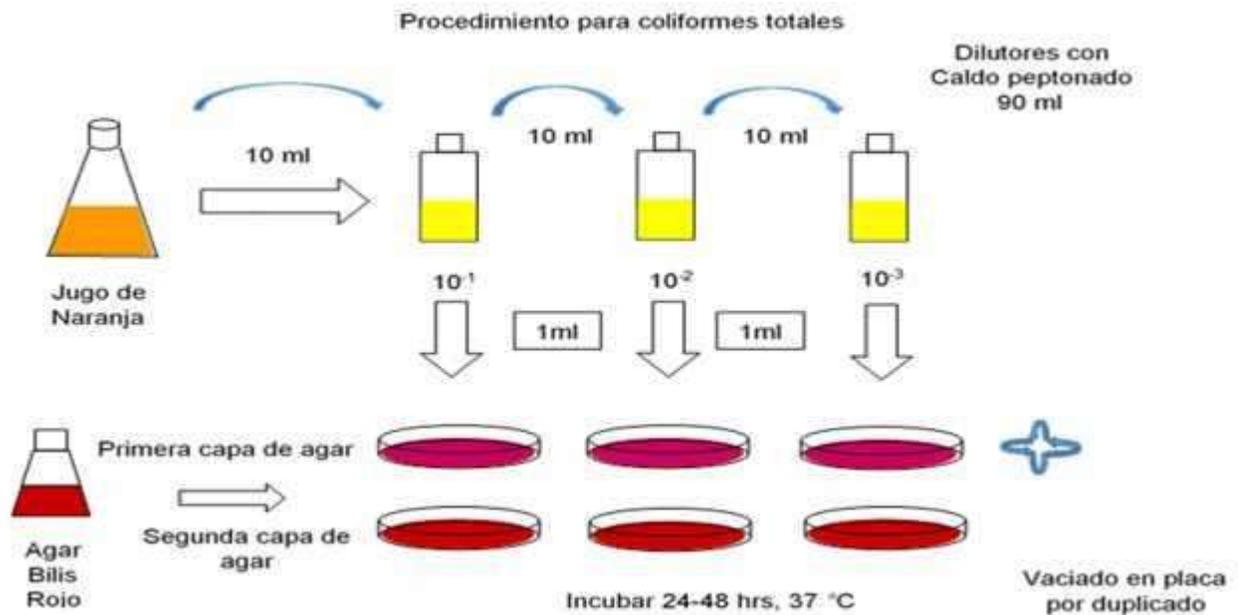
Finalmente, los mesofílicos aerobios se reportaron en unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL).



Esquema 2. Método para la cuenta de mesofílicos aerobios

7.4.1. Determinación de coliformes totales por conteo en placa

Para la determinación de coliformes totales en placa se siguió el procedimiento establecido en la NOM 113-SSA1-1994. Brevemente, de las diluciones anteriores (10^{-1} a 10^{-3}), 1 mL de cada dilución se vertió en una placa de Petri estéril y se adicionaron 10 mL de Agar Bilis Rojo-Violeta a temperatura de 45°C , se mezcló cuidadosamente hasta obtener una mezcla homogénea y se dejó solidificar. Posteriormente se adicionó otra capa de 5 mL del mismo agar y se dejó solidificar. Este procedimiento se realizó por duplicado (Esquema 3). Las placas se incubaron a 37°C por 24-48 h. La cuenta de coliformes totales se reportó en UFC/mL.



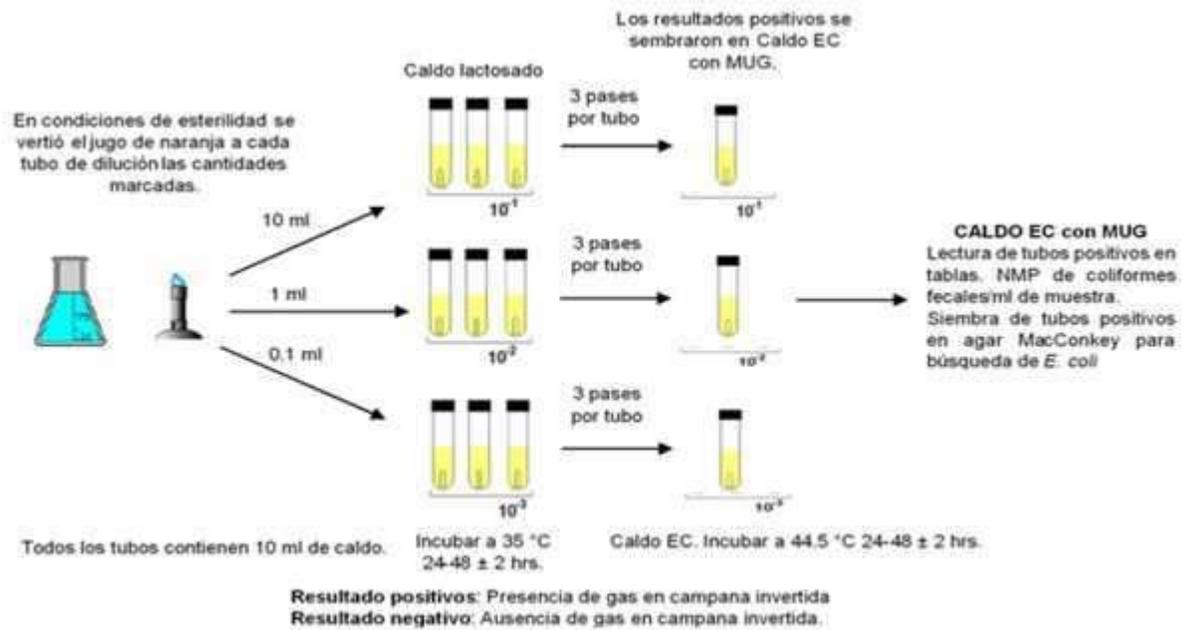
Esquema 3. Determinación de coliformes totales de acuerdo a la NOM-113-SSA1-1994.

7.4.2. Determinación de coliformes fecales por el número más probable (NMP).

Para la determinación de coliformes fecales por el método del número más probable, se realizó primero una prueba presuntiva y posteriormente una confirmatoria.

Prueba Presuntiva. Para la determinación de NMP para coliformes fecales se efectuó el procedimiento basado en la NOM-112-SSA1-1993 como se muestra en esquema 4. A partir de la muestra se inocularon tubos que contenían 10 mL de caldo lactosado con 10, 1 y 0.1 mL de la muestra. Este procedimiento se realizó por triplicado. Estos tubos se incubaron a 35°C por 24-48h. La presencia de gas en la campana de Durham hace la prueba positiva.

Prueba confirmativa. De cada tubo que presento formación de gas en la prueba presuntiva se tomó una asada y se inoculó en igual número de tubos con caldo *E. coli*. Los tubos se incubaron en baño de agua a temperatura constante de $45.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ por 24-48 h. La presencia de gas hace la prueba positiva. Los resultados obtenidos se reportaron como NMP/mL.



Esquema 4. Técnica del NMP para la determinación de coliformes fecales.

7.4.3. Pre-enriquecimiento para el aislamiento de patógenos

Para este procedimiento se inocularon 25 mL de jugo de naranja a un matraz que contenía 250 mL de caldo lactosado ajustado a un pH de 7. La mezcla se incubó a 35°C por 24 h.

Enriquecimiento (selectivo) para el aislamiento de *Salmonella* y otros patógenos. Transcurrido el tiempo de incubación del pre-enriquecimiento, se tomó 1 mL y se vertió en un tubo que contenía 10 mL de caldo Tetrionato (T.t) y se activó con 6 gotas de verde brillante al 1% y 3 gotas de lugol. Posteriormente de este caldo se tomó 1 mL y se vertió en tubo que contenía 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (R.V). El tubo se homogenizó y se incubó a 35°C por 48 h. El resultado es positivo para el T.t cuando se observa la decoloración del color característico dado por el reactivo de verde brillante, mientras que para el R.V es positivo cuando se observa turbidez en el tubo.

7.4.4. Aislamiento e identificación de *Salmonella* y otros patógenos.

A partir de los caldos positivos para T.t y R. V, se tomó una asada utilizando un asa bacteriológica calibrada y se sembró por estría en cuadrantes en Agar Sulfito de Bismuto (S.B), Agar Xilosa Desoxicolato (XLD), Agar Verde Brillante y Agar MacConkey (MCK). Las placas se incubaron a 37°C por 24-48 h, posteriormente se examinaron las placas y se seleccionaron colonias típicas de *Salmonella* en S.B. De medios restantes se seleccionaron 2 colonias con morfología variadas. Todas las cepas aisladas de estos medios fueron identificadas por pruebas bioquímicas.

7.4.5. Aislamiento e identificación de *E. coli*.

El aislamiento de las cepas de *E. coli* se realizó a partir de los tubos positivos de coliformes fecales (Caldo EC con MUG). De dichos tubos, una asada fue sembrada por estría en cuadrantes en eosina azul de metileno (EMB) y en agar MacConkey (MCK). Las placas fueron incubadas a 37°C por 24 h. De cada muestra, 1 colonia con morfología compatible con *E. coli* fue seleccionada de cada uno de los medios. Para la confirmación de las cepas de *E. coli* se realizaron pruebas bioquímicas.

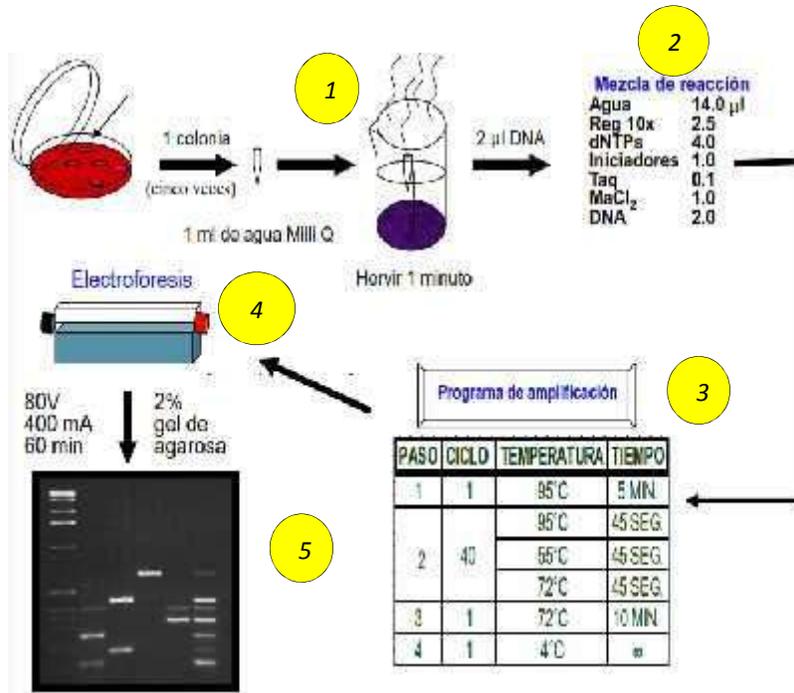
7.5. PCR múltiplex para la identificación de EPEC, STEC, EIEC y ETEC

Para la identificación de los grupos de *E. coli* diarreogénicos se realizó una PCR multiplex donde se amplifican 7 genes en una sola reacción. Para lo cual se realizó la obtención de un lisado bacteriano. Brevemente, cada cepa de *E. coli* aislada se sembró en agar MCK, estas placas fueron incubadas de 18 a 24 h a 37°C; posteriormente se seleccionó una colonia y se re suspendió en 1 mL de agua MilliQ (agua desionizada) estéril contenida en un microtubo. Se homogenizó perfectamente usando un vórtex, el tubo se colocó en ebullición por un minuto, pasando ese tiempo se colocó inmediatamente en hielo durante 5 min.

La PCR que se utilizó fue desarrollada por López-Saucedo y colaboradores (López Saucedo C. , y otros, 2003), donde se seleccionaron los genes de patogenia característicos de cada grupo: para ETEC los que codifican las toxinas

LT (*lt*) y ST (*st*), para EPEC los que codifican para la proteína intimina: (*eaeA*) y para la fimbria BFP (*bfpA*), para STEC los que codifican para las toxinas Stx1 (*stx1*), Stx2 (*stx2*) y el de la intimina (*eaeA*) y para EIEC se seleccionó un fragmento del plásmido de invasividad denominado *ial*.

Para realizar la PCR múltiplex (Esquema 5), cada microtubo de PCR contenía 23 μ L de la mezcla de reacción compuesta de tris-HCl (10 mM, pH 8.3), KCl (50mM), MgCl₂ (2 mM), gelatina (100 μ g/mL), glicerol (5% v/v), dATP,dCTP,dGTP y dTTP (200 μ M cada uno), polimerasa Ampli Taq (GIBCO-BRL) (0.5 U/23 μ L), una mezcla de 14 iniciadores (Tabla 3), y 2 μ L del lisado de la bacteria (DNA). La concentración final de cada iniciador se describe en el cuadro 4. La amplificación se realizó en un termociclador (MyCycler, BioRAD) utilizando el siguiente programa: 50°C (2 min, 1 ciclo), 95°C (5 min, 1 ciclo), 95°C, 50°C y 72°C (45 s cada temperatura, 40 ciclos) y un paso de extensión final de 10 min a 72°C. Se visualizaron 4 μ L del producto mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% utilizando bromuro de etidio (Figura 5).



Esquema 5. Procedimiento para PCR-Multiplex.

Tabla 3. Iniciadores utilizados en la PCR

<i>E. coli</i> category tested strains and serotypes	Locus	Primers	Amplification size (bp)	Primer (pMol) or mM
ETEC H11C407 O78:H11 ^b (7) E9031A O8:H9 (8) B+C O9:H13 (8) E8775A O25:H42 ^c (9)	<i>stx</i>	F:5'GGC DAC AGA TTA TAC COT CC3' (4) R:5' CCG TCT CTA TAT TCC CTG TT3' (4)	490	5.0
ETEC H11C407 O78:H11 ^b (7) E9031A O8:H9 (8) B+C O9:H13 (8) E8775A O25:H42 ^c (9)	<i>stx</i>	F:5'ATT TTT CTT TCT GTA TTT TCT T3' (4) R:5' CAC CCG GTA CAA GCA GGA TT3' (4)	190	6.47
EPEC E2348-D9 O127:H9 ^b (10) B171 8 D111:N34 (10) 639-79 O119:H6 (10) E85171 O142:H6 (10)	<i>hlyEA</i>	F:5' AAT GGT GCT TGG GCT TGC TCC3' (5) R:5' GCG GCT TTA TLL AAC CTG GAA3' (5)	324	2.5
EPEC E2348-D9 O127:H9 ^b (10) B171 8 D111:N34 (10) 639-79 O119:H6 (10) E85171 O142:H6 (10)	<i>eaeA</i>	F:5' GAC CCG GCA CAA GCA TAA CC3' (6) R:5' GAA CTT GCA GCA ACA AGA CG3' (6)	384	1.88
STEC EDL933 O157:H7 ^b (11) TB234C O85:NM (12) TB285A O126:H2 (12) TB226A O111:H1 (12)	<i>stx1</i>	F:5' CTG GAT TTA ATG TCG CAT ACT GT ^{1d} (GenBank accession no. M17558) R:5' AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC3' (6)	150	1.88
STEC EDL933 O157:H7 ^b (11) TB234C O85:NM (12) TB285A O126:H2 (12) TB226A O111:H1 (12)	<i>stx2</i>	F:5' GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC3' (6) R:5' TCG CCA GTC ATC GACAT TCT GG3' (6)	255	2.5
EIEC F11 O133:NM ^b (13) O134:TCO (14) O136:NM (14) O143:NM (14)	<i>eae1</i>	F:5' GGT ATG ATG ATG ATG AGT CCA 3' ^d (GenBank accession no. D11463) R:5' GCA GGC CAA CAA TTA TTT CC3' ^d	650	10,25

Tomado de (López Saucedo C. , y otros, 2003).

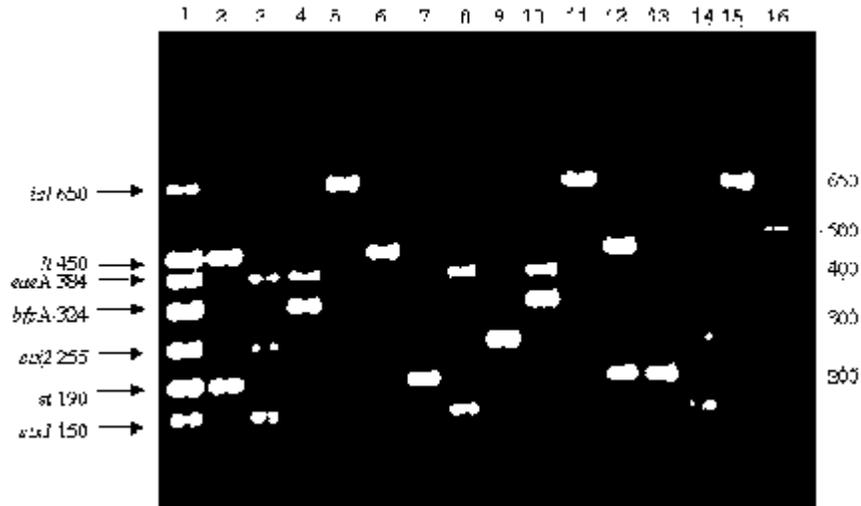


Figura 4. Productos esperados en la PCR múltiple. Tomado de (López Saucedo C. , y otros, 2003)

7.6. Análisis estadístico de los resultados

Los datos se analizaron utilizando la prueba de chi cuadrada para la comparación de grupos, mientras que para las variables continuas se realizó la prueba de *t-student*, con el programa EPI-INFO versión 7.0

8. RESULTADOS

8.1. Resultados de Criterios de limpieza

En general los establecimientos presentaron una mala limpieza ($p < 0.05$), ya la mayoría de los puestos tenían un puntaje menor a 2. Los porcentajes obtenidos de los 5 criterios son mostrados en el gráfico 1.

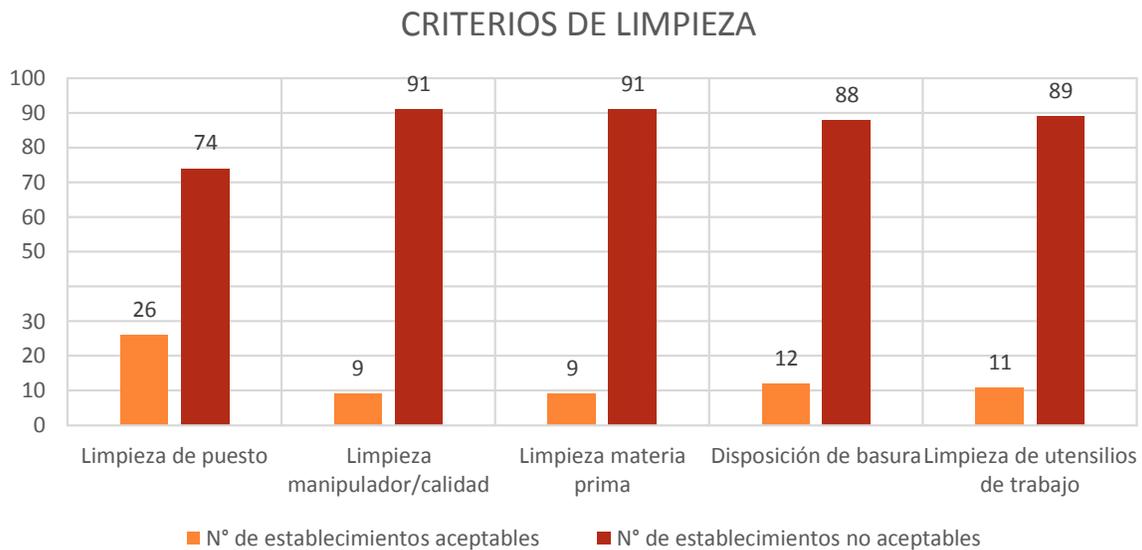


Gráfico 1. Evaluación de criterios de limpieza.

8.2. Determinación del pH

Los valores de la determinación de pH osciló entre un mínimo de 3, con una media de 4 y un máximo de 4.73 (ver anexo 1).

8.3. Evaluación de la calidad microbiológica: mesofílicos aerobios, coliformes totales y fecales

El análisis microbiológico realizado a las muestras de jugo de naranja para determinar mesofílicos aerobios (Tabla 4), mostraron cantidades muy altas de estos, que oscilaron en un intervalo de 260 hasta 22,530,000 UFC/mL, donde el 100% de las muestras contenían organismos mesofílicos y 26 muestras sobrepasaron el límite permitido por la norma de la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos (ICMSF, por sus siglas en un inglés), la cual nos indica un valor máximo de mesofílicos aerobios de 100,000 UFC/mL.

Los coliformes totales mostraron un valor alto, donde el 100% de las muestras contenían estos organismos en un intervalo de 60 a 11, 844,000 UFC/mL y el 99% de las muestras se encontró fuera de norma (Tabla 4). Para coliformes fecales el 35% de las muestras contenían este grupo indicador con un intervalo de <0.03 a >11.0 NMP/mL y 35 muestras estuvieron fuera de norma ICMSF, la cual establece la ausencia de este grupo indicador en las muestras (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados del análisis microbiológico de los jugos de naranja.

Organismos	Mínimo	Media	Máximo	Límite permitido*	Muestras Positivas (%)	Muestras fuera de norma (%)
<i>Mesofílicos aerobios UFC/mL</i>	260	209,914	22,530,000	100,000 UFC/mL	100 (100)	26 (26)
<i>Coliformes totales UFC/mL</i>	60	173,734	11,844,000	100 UFC/mL	100 (100)	99 (99)
<i>Coliformes fecales NMP/mL</i>	<0.03	0.13	>11.0	<0.03 NMP (negativo)	35(35)	35(35)

*Límites establecidos por la Comisión Internacional de especificaciones Microbiológicas para los alimentos (ICMSF, por sus siglas en inglés).

8.4. Identificación de enterobacterias

A partir de las muestras de jugo de naranja se logró aislar 326 cepas bacterianas de las cuales se identificaron 31 especies incluidas en 6 géneros bacterianos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* (Figura 2). En ninguna de las muestras se aisló *Salmonella*

Especies bacterianas identificadas en los jugos de naranja

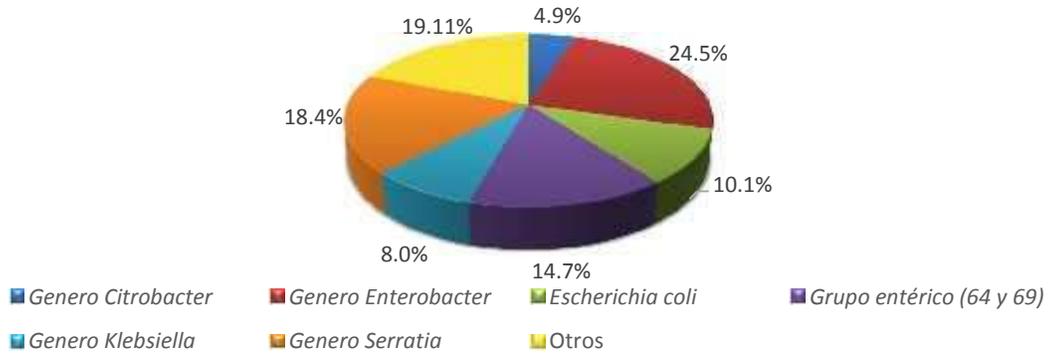


Gráfico 2. Géneros bacterianos aislados en jugos de naranja.

8.5. Identificación de grupos de *E. coli* diarreogénicos

Se realizó la amplificación del DNA de 33 cepas de *E. coli* aisladas de los jugos de naranja con los iniciadores específicos para 4 grupos de *E. coli* diarreogénicos. Ninguna de las cepas de *E. coli* perteneció a algún grupo diarreogénico (Figura 5).

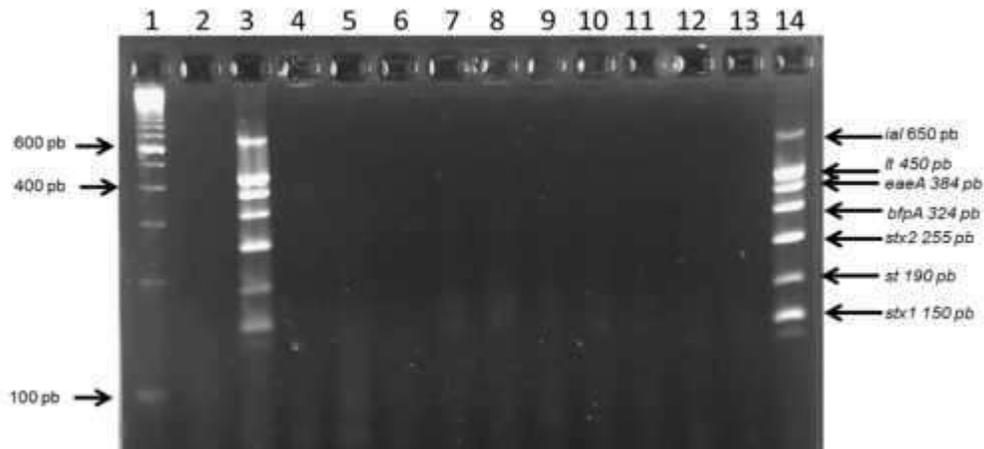


Figura 5. Electroferograma de los resultados de PCR-múltiplex.

En el carril 1: Marcador de 100 pb, carril 2: control negativo, carriles 3 y 14: controles positivo, carriles del 4 al 13: muestras de DNA de cepas de *E. coli* aisladas de jugos de naranja.

9. DISCUSIÓN

El sector informal domina ya de forma importante la economía en México donde un 30% de la población se dedica a la venta de alimentos de venta callejera y el número de vendedores en este sector sigue en aumento (*CNN Expansión, 2012*). La industria de los alimentos de venta callejera tiene un papel importante en países en vías de desarrollo como México, en donde del 20 al 25% de los ingresos son gastados en alimentos de venta callejera y algunos segmentos de la población depende enteramente de este tipo de alimentos (*FAO/WHO, 2003*).

El valor nutricional y delicioso sabor de los jugos de frutas cítricas recién exprimido es muy apreciado, por lo que el consumo de estos jugos se ha incrementado los últimos años en todo el mundo, particularmente del jugo de naranja (*Perez Cacho & Rouseff, 2008*), este tipo de jugo se caracteriza por contener un potente arreglo de antioxidantes como los flavonoides (hesperetina y naringenina predominantemente como glicosidos), carotenoides (xantofilos, cryptoxantinas y carotenos), vitamina C y fitoquímicos como folato (*Franke, Conney, Henning, & Custer, 2005*). Estos compuestos contribuyen de manera significativa para prevenir el cáncer y enfermedades cardiacas (*Franke, Conney, Henning, & Custer, 2005*) (*Asplund, 2002*).

Los jugos de fruta recién preparados tienen como característica que no se han sometido a ningún proceso de pasteurización, por eso, es de esperarse que el jugo de naranja sea catalogado como un vehículo de transmisión de patógenos (*Castillo, Villarruel Lopez, Navarro Hidalgo, Martinez Gonzalez, & Torres Vitela, 2006*). Ya que se ha reportado que los jugos de naranja han estado involucrados en brotes asociados a *E. coli* 0157:H7, *Salmonella*, *Cryptosporidium* etc. (*Vojdani, Beuchat, & Tauxe, 2008*).

La calidad de los alimentos está directamente relacionada con las buenas prácticas de higiene de los preparadores, de las técnicas de desinfección utilizadas en su materia prima, de la manipulación y del almacenaje tanto de la

materia prima como del producto terminado (refrigeración), esto último interviene en el tiempo de vida útil del producto, el cual disminuye si todo lo anterior no se lleva a cabo de la forma correcta.

En México existe poca investigación enfocada a la búsqueda de patógenos y calidad microbiológica en los alimentos de venta callejera, que nos permita conocer riesgos que representa el consumo de estos alimentos para la población, principalmente para la inmunosuprimida. Por ello, se planteó la evaluación de la calidad microbiológica y búsqueda de bacterias patógenas causante de ETAs en los jugos de naranja vendidos en la calle en la ciudad de Morelia Michoacán.

En nuestro estudio, los jugos de naranja presentaron un pH que osciló en un intervalo de 3 a 4.7, estos datos coinciden con lo reportado por *(Uljas & Ingham, 1998)*, *(Linton, McClements, & Patterson, 1999)* *(Castillo, Villarruel Lopez, Navarro Hidalgo, Martinez Gonzalez, & Torres Vitela, 2006)*.

El análisis microbiológico mostró que el 100% de las muestras de jugo de naranja contenía mesofílicos aerobios en un intervalo de 260 hasta 22, 530,000 UFC/mL y de los cuales 26 superaron el límite permitido por la ICMSF. Los valores de mesofílicos aerobios encontrados en este estudio son similares a lo reportado en un estudio realizado en jugos de naranja en Guadalajara; México, por Castillo y colaboradores en 2006 *(Castillo, Villarruel Lopez, Navarro Hidalgo, Martinez Gonzalez, & Torres Vitela, 2006)*, quienes encontraron que el 100% de sus muestras contenían mesofílicos aerobios en un intervalo de >100 a >1,000,000 UFC/mL de mesofílicos aerobios, donde el 33% de las muestras contenía más de 100,000 UFC/mL. Nuestro estudio también coincide con lo reportado por *(Lewis, Thompson, Rajanna, Rao, & Kalavati, 2006)* y *(Bagci & Temiz, 2011)* quienes encontraron que el 100% de los jugos de naranja de venta callejera en la India y en Turquía contienen mesofílicos aerobios en concentraciones de 80,000 a 336,000 UFC/100mL y de 1000 a 100,000 UFC/mL, respectivamente.

Estos resultados indican la mala calidad de la materia prima que utilizaron para la preparación de los jugos de naranja y observamos que este problema se presenta en diferentes países.

Los organismos coliformes totales en este trabajo fueron detectados en el 100% de las muestras en un intervalo de 60 a 11, 844,000 UFC/mL de las cuales 99/100 (99%) muestras estuvieron fuera del límite permisible de normatividad.

Esta información indica que los jugos de naranja son preparados utilizando malas prácticas de Higiene. Este resultado coincide con el reportado para la India por Lewis y colaboradores quienes encontraron que el 100% de los jugos de naranja contenían coliformes totales, sin embargo, ellos reportaron una concentración de coliformes totales menor a la nuestra, 88000 a 104,000 UFC/100 mL (Lewis, Thompson, Rajanna, Rao, & Kalavati, 2006). Nuestro resultado coincide con lo reportado por Torres-Vitela y colaboradores (Torres-Vitela, y otros, 2012), quienes encuentran que las 280 muestras de jugo de zanahoria compradas en Pachuca Hidalgo, contienen coliformes totales en una concentración similares a las nuestras.

El análisis de los jugos para evaluar la presencia de coliformes fecales reveló que 35 muestras contenían este grupo indicador. Debido a que la ICMSF establece la ausencia de coliformes fecales, las 35 muestras están fuera de norma. Este resultado es preocupante debido a que los coliformes fecales nos indican una contaminación fecal reciente, lo que demuestra la falta de higiene de los vendedores ambulantes. Nuestro resultado es inferior al reportado realizado por Parish, quien evaluó la presencia de coliformes fecales en muestras de jugos de naranja de 8 diferentes plantas de procesamiento, con el fin de identificar la fuente de los jugos causantes de un brote de Salmonelosis en la Florida, Estados Unidos, en dicho estudio todas las muestras contenían coliformes fecales (Parish M. E., 1998). En este trabajo se encontró que nuestros resultados son inferiores a lo reportado por Torres-vitela para jugos de zanahoria, quien encontraron que el 96.8% de los 280 jugos analizados contenían coliformes fecales (Torres-Vitela, y otros, 2012).

En el 14% de nuestros jugos se aisló *E. coli*, este resultado coincide con un estudio reportado en Ankara, Turquía. Donde el 17% de los jugos de naranja contenían *E. coli* (Bagci & Temiz, 2011). Mientras que Lewis y colegas (Lewis, Thompson, Rajanna, Rao, & Kalavati, 2006) reportaron que el 27% de los jugos de naranja de la India contenían *E. coli*. Nuestro resultado es inferior al reportado por Castillo y colaboradores (Castillo, Villarruel Lopez, Navarro Hidalgo, Martinez Gonzalez, & Torres Vitela, 2006) quien encuentran que el 100% de los jugos de naranja contienen *E. coli*. Torres-Vitela y colaboradores (Torres-Vitela, y otros, 2012) reportó que el 54.3% de las muestras de jugo de zanahoria contenían *E. coli*.

En este estudio si identificó que los jugos contenían bacterias patógenas como *Shigella* sp, *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp, *Enterobacter* sp, *Serratia* spp. Varias de estas especies han sido asociadas a enfermedad, por ejemplo, en un artículo reciente se reportó que *Shigella* provocó 2309 casos de ETAs (CDC, 2013). Castillo y colegas en 2006 (Castillo, Villarruel Lopez, Navarro Hidalgo, Martinez Gonzalez, & Torres Vitela, 2006), revelaron la presencia *Shigella* en un 6% de muestras de jugo de naranja de Guadalajara, Jalisco. Recientemente se ha reportado que *Klebsiella* y *Shigella* fueron responsables de brotes de diarrea debido al consumo de alimentos (Alexander & Blackburn, 2013), mientras que *Enterobacter* es un patógeno importante transmitido por alimentos en todo el mundo (Ortega, 2008).

Este trabajo permitió identificar que los jugos de naranja de venta callejera presentan una mala calidad microbiológica y contienen bacterias patógenas causantes de ETAs, por lo cual, el consumo de este alimento es un riesgo para la población que los consume.

10. CONCLUSIONES

10.1. Conclusiones parciales

1. Los establecimientos de venta callejera no cumplen con los criterios básicos de limpieza.
2. Los jugos de naranja de venta callejera de la ciudad de Morelia Michoacán revelaron tener una inadecuada calidad microbiológica para los consumidores.
3. Se identificaron cepas de *E. coli* en el 14% de las muestras.
4. Ninguna de las cepas de *E. coli* perteneció a los grupos de *E. coli* diarreogénicos.
5. Los jugos de naranja contenían *Shigella* sp, *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp, *Enterobacter* sp, *Serratia* spp., algunas de las cuales han sido asociadas a brotes de ETAs.

11. REFERENCIAS

- Alexander, K. A., & Blackburn, J. K. (2013). Overcoming barriers in evaluation outbreaks of diarrheal disease in resource poor settings: assessment of recurrent outbreaks in Chobe District, Botswana. *Public Health*, 13(775), 1471-2458. Retrieved from <http://www.biomedcentral.com/1471-2458/13/775>
- Arispe, I., & Tapia, M. S. (2007). Inocuidad y calidad; requisitos indispensables para la protección de la salud de los consumidores. *Agroalimentaria*, 13(24), 105-117.
- Asplund, K. (2002). Antioxidant vitamins in the prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *Journal of Internal Medicine*, 251, 372-392.
- Autio, T. (1999). Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Environ Microbiol.*
- Avendaño Ruiz, B. D. (2006). La inocuidad alimentaria en México. Las hortalizas frescas de exportación. (M. A. Poma, Ed.) México D.F.
- Bagci, U., & Temiz, A. (2011). Bag Microbiological Quality of Fresh-Squeezed Orange Juice and Efficacy of Fruit Surface Decontamination Methods in Microbiological Quality. *J. Food Prot.*, 74, 1238-1244.
- Barrera Saldaña, H. A. (1992). Información Genética: estructura, función y manipulación. In Conacyt, Colección Ciencia Basica. México.
- Barrera Saldaña, H. A., Ortiz López, R., Rojas Martínez, A., & Reséndez Pérez, D. (1993). Reacción en Cadena de la Polimerasa: Una nueva época dorada en la Biología Molecular. *Ciencia y Desarrollo*, Conacyt, 18(108), 50-60.
- Baumforth, K. R., Nelson, P. N., Digby, J. E., O'Neil, J. D., & Murray, P. G. (1999). Demystified ... the polymerase chain reaction. *Mol Pathol*, 52(1), 1-10.
- Beey, J. T., Doyle, M. P., & Higley, N. A. (1986). Infection of gnotobiotic pigs with and *Escherichia coli* O157:H7 strain associated with an outbreak of hemorrhagic colitis. *Infect. Immun.*(51), 953-956.
- Bilge, S. S., Clausen, C. R., Lau, W., & Moseley, S. L. (1989). Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to Hep-2 cell. *J Bacteriol*, 171, 4281-4289.
- Blostein, J. (1993). An outbreak of *Salmonella javiana* associated with consumption of watermelon. *Journal of Environmental Health*, 56(1), 29-31.
- British Columbia. (2008, Septiembre). Food to Avoid for people at Risk of Food-borne Illness. *British Columbia*(76).
- Caballero Torres, A. E. (2008). TEMAS DE HIGIENE DE LOS ALIMENTOS. (N. Cheping Sánchez, Ed.) *El Vedado, La Habana, CUBA: CIENCIAS MEDICAS.*
- Campos, L. C., Franzolin, M. R., & Trabulsi, L. R. (2004, Oct). Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99(6), 545-52.

- Cariello, N. F., Swenberg, J. A., & Skopek, T. R. (1991). Fidelity of *Thermococcus litoralis* DNA polymerase (Vent) in PCR determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.*, 19(15), 4193-8.
- Cassels, F. J., & Wolf, M. K. (1995). Colonization factors of diarrheagenic *E. coli* and their intestinal receptors. *J Ind Microbiol*, 15, 214-226.
- Castillo, A. (2001, Julio). *Las 500 empresas mas grandes de México*. Expansion.
- Castillo, A., Villarruel Lopez, A., Navarro Hidalgo, V., Martinez Gonzalez, N. E., & Torres Vitela, M. R. (2006). *Salmonella and Shigella in freshly squeezed orange juice, fresh oranges and wiping cloths collected from public markets and street booths in Guadalajara, México: incidence and comparison of analytical routes*. *J Food Prot*(69), 2595-2599. Retrieved Octubre 10, 2013
- CDC. (2007). *Surveillance for foodborne disease outbreaks-United States*. Center for Disease Control and Prevention (CDC). Retrieved Octubre 10, 2013, from *Surveillance for Foodborne disease outbreaks-United States*.
- CDC. (2009, Noviembre 25). Centers for Disease Control and Prevention. Retrieved Agosto 15, 2013, from *Centro Nacional de zoonóticas, transmitidas por vectores, y Enfermedades entéricas*: http://www.cdc.gov/nczved/es/enfermedades/infecciones_alimentos/
- CDC. (2009). *Datos preliminares sobre la incidencia de la infección por patógenos transmitidos por alimentos comunmente- 10 estados,2008*. *MMWR*, 58, 333-7. Retrieved from <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5813a2.htm>
- CDC. (2011). *Las estimaciones de enfermedades transmitidas por alimentos en los estados unidos. Estados unidos*. Retrieved 02 19, 12, from <http://www.cdc.gov/Features/dsFoodborneEstimates/>
- CDC. (2013). *Foodsafety.gov. (U.S. Department of Health & Human Services)* Retrieved Agosto 16, 2013, from <http://www.foodsafety.gov/keep/types/index.html>
- CDC. (2013, April 19). *Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food*. Center for Disease Control and Prevention, U.S. Department of Health and Human Services. *MMWR*.
- Cerna-Cortés, J. F., Estrada-García, T., & González y Merchand, J. A. (2009). *Isolation of Mycobacterium mucogenicum from Street-Vended Chili Sauces: A Potential Source of Human Infection*. *Journal of Food Protection*, 72(1), 182-184.
- CNN Expansión. (2012, Agosto 10). *México, con 14.2 millones de informales*, CNN Expansión. Retrieved from [www.cnnexpansion.com](http://www.cnnexpansion.com/economia/2012/08/10/mexico-tiene-142-millones-de-informales): <http://www.cnnexpansion.com/economia/2012/08/10/mexico-tiene-142-millones-de-informales>
- CNN Expansión. (2012, Octubre 19). *www.cnnexpansion.com*. Retrieved from *México: menos desempleo, más informales*: <http://www.cnnexpansion.com/economia/2012/10/19/mexico-menos-desempleo-mas-informales>

- Cobeljic, M., Miljkovic Selimovic, B., Paunovic Todosijevec, D., Velickovic, Z., Lepsanovic, Z., & Savic, D. (1996). *Enteroggregative Escherichia coli associated with an outbreak of diarrhoea in a neonatal nursery ward*. *Epidemiol Infect*, 117, 11-16.
- CODEx ALIMENTARIUS. (1994). NOM-112-SSA1-1994. NOM-112-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE MICROORGANISMOS TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE. MÉXICO D.F., D.F, ESTADOS UNIDOS MEXICANOS.
- Cravioto, A., Tello, A., Navarro, A., Ruiz, J., Villafan, H., & Uribe, F. (1991). *Association of Escherichia coli Hep-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea*. *Lancet*, 337, 262-264.
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013, October). *Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. American Society for Microbiology., 26(4), 822-880. doi:10.1128/CMR.00022-13
- Cummings, K., Barret, E., Mohle-Boetani, J. C., Brooks, J. T., Farrar, J., Hunt, T., . . . Slutsker, L. (2001). *A multistate outbreak of Salmonella enterica serotype Baildon associated with domestic raw tomatoes*. *Emerging Infectious Diseases*, 7(6), 1046-1048.
- Cunningham, M. W., & Fujinami, R. S. (2000). *Effects of microbes on the immune system*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Czczulin, J. R., Balepur, S., Hicks, S., Philips, A., Hall, R., & Kothary, M. H. (1997). *Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroggregative Escherichia coli*. *Infect Immun*, 65, 4135-4145.
- Chordash, R. A., & Insalata, N. F. (1978). *Incidence of pathological significance of Escherichia coli and other sanitary indicator organism in food and water*. *Food Technol.*, 32(10), 54-63. Retrieved Octubre 23, 2013
- De Roever, C. (1998). *Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce*. *Food Control*, 9(6), 321-347.
- DIREPRIS. (2014, Enero 23). Retrieved from www.direpris.michoacan.gob.mx: <http://www.direpris.michoacan.gob.mx/index.php/historia>
- Donnenberg, M. S. (2010). *Las infecciones causadas por Escherichia coli y otros bacilos entéricos*. *Medicina ACP*, 1-10. Retrieved Febrero 15, 2014, from http://www.medicinanet.com.br/conteudos/acp-medicine/4663/infeccoes_causadas_por_escherichia_coli_e_outros_bacilos_entericos_gram_negativos_%E2%80%93_michael_s_donne.htm
- Donnenberg, M. S., Girón, J. A., & Kasper, J. B. (1992). *A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic Escherichia coli associated with localized adherence*. *Mol Microbiol*, 6, 3427-3437.
- Doyle, M. P., & Erickson, M. C. (2006). *Closing the door on the fecal coliform assay*. *Microbe*, 1, 162-163.

- Durgesh, P. M., Ranjana, G. K., & Varsh, K. V. (2008). *Microbiological analysis of street vended fruit juices from Mumbai City*. Food Safety Information Publishing, 10, 31-34.
- Esquivel, E. (2008). *La república informal: el ambulante en la Ciudad de México*. Tecnológico de Monterrey, 107-110.
- Ewing, W. H. (1985). *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae (4th ed.)*. Elsevier.
- Fach, P., Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J., Dargaignaratz, C., Botella, L., . . . Broussolle, V. (2002). Detection by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay of *Clostridium botulinum* in fish and environmental samples from a coastal area in northern France. *Francia: Appl Environ Microbiol*.
- FAO. (1995). FAO corporate document repository. Retrieved Octubre 2, 2013, from FAO; Food, Nutrition and Agriculture: <http://www.fao.org/docrep/V9723T/V9723T00.htm>
- FAO. (1995). FAO CORPORATE DOCUMENT REPOSITORY. (A. Whitehead, & C. FIELD, Eds.) Retrieved SEPTIEMBRE 2, 2013, from FAO; Food, Nutrition and Agriculture: <http://www.fao.org/docrep/V9723T/V9723T00.htm>
- FAO. (1996). Estrategias para el mejoramiento de la calidad de los alimentos callejeros en América Latina y el Caribe. Alimentos de Ventas Callejeras. ROMA. Retrieved from www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/DOCREP/W3699T/w3699t00.htm
- FAO. (1997). Report of an FAO technical meeting on street foods. ROMA. Retrieved from www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/DOCREP/W4128T/w4128t14.htm
- FAO. (1998). Requisitos generales (higiene de los alimentos). *Suplemento al Volumen 1B. Programa Conjunto*.
- FAO. (2002). Deposito de Documentos de la FAO. Retrieved Septiembre 2, 2013, from Deposito de Documentos de la FAO: <http://www.fao.org/docrep/007/j0776s/j0776s02.htm#TopOfPage>
- FAO. (2005). Segundo foro Mundial FAO/OMS de Autoridades de Reglamentación sobre Inocuidad de los Alimentos. In D. d. Agricultura (Ed.), *Vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmitidas por los alimentos y sistemas de alerta en materia de inocuidad de los alimentos*, (p. 2). Retrieved Septiembre 18, 2013, from <http://www.fao.org/docrep/meeting/008/y5871s/y5871s00.htm>
- FAO. (2009). *Enfermedades Transmitidas por Alimentos y su Impacto Socioeconómico, Estudios de caso en Costa Rica, el Salvador, Guatemala y Honduras*. In C. ROSELL (Ed.), INFORME TÉCNICO SOBRE INGENIERÍA AGRÍCOLA Y ALIMENTARIA. VI. Roma: FAO. Retrieved Septiembre 2, 2013
- FAO. (2010). *Estrategia de la FAO para la prestación de asesoramiento científico relativo a la inocuidad de los alimentos 2010-2013*. In O. d. (FAO) (Ed.), *La ciencia a favor de los alimentos inocuos*. Roma, Italia.
- FAO/OMS. (2003). *Garantía de la inocuidad y calidad de los alimentos. Directrices para el fortalecimiento de los sistemas nacionales de control de los alimentos*. Estudio FAO Alimentación y Nutrición 76, Roma. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/006/y8705s/y8705s00.htm>

- FAO/OMS. (2005). *Inocuidad de Alimentos para las Américas y el Caribe*. Conferencia regional FAO/OMS sobre la Inocuidad de los Alimentos para las Américas y el Caribe. San Jose, Costa Rica.
- FAO/SAGARPA. (2006). *Análisis Prospectivo de Política de Sanidad e Inocuidad Agroalimentaria*. In A. González Cambero, Proyecto Evaluación Alianza para el campo 2005. México, México.
- FAO/WHO. (2003). Assuring food safety and quality: guidelines for strengthening national food control systems. Retrieved from <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/006/y8705e/y8705e00.pdf>
- FAO/WHO. (2008). Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs. Microbiological Risk Assessment Series No. 14. *meeting report.*, Roma. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/>
- FDA. (2004). *HACCP en Jugos. Descripción del Análisis de Riesgo*. Retrieved 04 03, 2014, from <http://www.alfa-editores.com/bebidas/Ago-Sep%2004/HACCP%20en%20Jugos.pdf>
- FDA. (2004). Report in the Occurrence of Food borne Illness Risk Factor in Selected Institutional Food Service, Restaurant and Retail Food Store Facility types. Retrieved Agosto 15, 2013, from <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/RetailFoodProtection/FoodbornIllnessRiskFactorReduction/ucm106205.htm>
- Fernandez Cantón, S. B., Herrera Torres, M. E., & Montoya Núñez, Y. A. (2012). Perfil Epidemiológico de las Enfermedades Infecciosas Intestinales. *Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología. México, D.F.: IEPSA*. Retrieved Septiembre 20, 2013, from <http://www.dgepi.salud.gob.mx>
- Fernández Escartín, E. (2000). MICROBIOLOGÍA e INOCUIDAD de los ALIMENTOS (PRIMERA ed., Vol. I). (FERNÁNDEZ-ESCARTIN, Ed.) MÉXICO, ESTADO DE MÉXICO, REPUBLICA MEXICANA: UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERÉTARO. Retrieved OCTUBRE 8, 2013
- Flores Abuxapuí, J. J., Suárez Itoil, G. J., Heredia-Navarrete, M. R., Puc-Franco, M. A., & Franco Monsreal, J. (1994). Frequency of enterotoxigenic *Escherichia coli* in infants during the first three months of life. *Arch Med Res*, 25, 303-307.
- Franke, A. A., Conney, R. V., Henning, S. M., & Custer, L. J. (2005, June 29). Bioavailability and antioxidant effects of orange juice components in humans. *J Agric Food Chem*, 53(13), 5170-5178. doi:10.1021/jf050054y
- García del Portillo, F. (2000). *Molecular and cellular biology of Salmonella pathogenesis*. (J. W. Cary, J. E. Linz, & D. Bhatnagar, Eds.) *Microbial Foodborne Disease*, 3-49.
- García, H. M., & Martínez, C. F. (2006). *Temario Especifico*.
- Geldreich, E. E., & Bordner, R. H. (1971). Fecal contamination of fruits and vegetables during cultivation and processing for market. A review. *J. Milk Food Technol.*(34), 184-195.
- Giono, S., Escobar, A., Valdespino, J. L., Eslava, C., Mateo, J., & Cravioto, A. (1994). Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea. En: diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. México: Secretaría de Salud.

- Girón, J. A., Ho, A., & Schoolnik, G. K. (1991). An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science*(254), 710-713.
- Gómez Méndez, N. A. (2012). Liderazgos y organizaciones en el comercio en vía pública de la Ciudad de México. El caso de la delegación Iztapalapa, 1998-2008. México: COLMEX.
- Hjelm, S., Björkroth, J., Hyytiä, E., & Korkeala, H. (1998). Prevalence of clostridium botulinum in finish trout farms: Pulsed-field gel electrophoresis typing reveals extensive genetic diversity among type E isolates. *Appl Environ Microbiol*.
- Holt. (1994). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (9th Edition ed.)*. (G. John, Ed.) Baltimore: Williams & Wilkins.
- Jay, J. M. (2000). *Modern Food Microbiology (Segunda ed., Vol. I)*. Gaithersburg, Maryland, EE.UU: Aspen Publisher, Inc.
- Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Blak, D., & Gittleman, J. L. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 3.
- Käferstein, F., & Abdussalam, M. (1999). Food safety in the 21st century. *Bull World Health Org*(4), 47-51.
- Kapperud, G., Rorvik, L. M., Hasseltvedt, V., Hoiby, E. A., Iversen, V. G., Staveland, K., . . . Lassen, J. (1995). Outbreaks of *Shigella sonnei* infection traced to imported iceberg lettuce. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(3), 609-614.
- Kasper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Natural Reviews Microbiology*, 2(2), 123-140.
- Kass, P. H., & Rieman, H. P. (2006). *Epidemiology of foodborne diseases*. In P. H. Kass, H. P. Rieman, H. P. Rieman, & D. O. Cliver (Eds.), *Foodborne infections and intoxications*. (pp. 3-26). San Diego, California, U.S.A: Academic Press. Retrieved Octubre 10, 2013
- Kimata, K., Shima, T., Shimizu, M., Tanaka, D., Isobe, J., & Gyobu, Y. (2005). Rapid categorization of pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. *Microbiol Immunol.*, 49(6), 485-92.
- Knutton, S., Lloyd, D. R., & Mc Neish, A. S. (1987). Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infect Immun*(55), 69-77.
- Kopper, G., Calderón, G., Schneider, S., Domínguez, W., & Gutierrez, G. (2009). *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. estudios de casos en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua*. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Sexto informe Técnico sobre ingeniería agrícola y alimentaria. Roma.
- Lewis, J. E., Thompson, P., Rajanna, B., Rao, B., & Kalavati, C. (2006). *Human Bacteria in Street Vended Fruit Juices: A Case Study of Visakhapatnam City, India*. *Internet Journal of Food Safety*, Vol. 8, 35-38.
- Linton, M., McClements, J. J., & Patterson, M. F. (1999). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during storage in pressure treated orange juice. *J Food Prot*(62), 1038-1040.

- López Saucedo, C., Cerna, J. F., Villegas Sepulveda, N., Thompson, R., Velazquez, F. R., & Torres, J. (2003, Jan). *Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis.*, 9(1), 127-31.
- López Saucedo, C., Cerna, J. F., Villegas Sepulveda, N., Thompson, R., Velazquez, F. R., Torres, J., . . . Estrada García, T. (2003, Enero). *Single Multiplex Polymerase Chain Reaction To Detect Diverse Loci Associated with Diarrheagenic Escherichia coli*. *Emerging Infectious Disease*, 9(1), 127-131.
- Mahon, B. E., Pönkä, A., Hall, W. N., Komatsu, K., Dietrich, S. E., Siitonen, A., . . . Slutsker, L. (1997). *An international outbreak of Salmonella infections caused by alfalfa sprouts grown from contaminated seeds*. *Journal of Infection Diseases*, 175(4), 876-882.
- Majowicz, S. E., Horrocks, J., & Bocking, K. (2007). *Demographic determinants of acute gastrointestinal illness in Canada: A population study*. *BMC Public Health*, 7-162. Retrieved Octubre 10, 2013
- Mandell, G. L. (2006). *Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica. (Sexta ed.)*. Madrid, España: Elsevier Churchill Livingtone.
- Mattar, S., & Vásquez, E. (1996). *Importancia de la vigilancia de un brote de Escherichia coli*. *Bol Oficina Sanitaria Panamericana*, 120, 523.
- Mc Veigh, A., Fassano, A., Scott, D. A., Jelacic, S., Moseley, S. L., & Robertson, D. C. (2000). *IS1414 an Escherichia coli insertion sequence with a heat-stable enterotoxin gene embed in a transposase-like gene*. *Infect Immun*, 68, 5710-5715.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., & Shapiro, C. (1999). *Food related illness and death in the United States*. *Emerging Infect Disease*, 5. Retrieved Octubre 10, 2013
- Millemann, Y., Gaubert, S., Remy, D., & Colmin, C. (2000). *Evaluation of IS200-PCR and comparison with other molecular markers to trace Salmonella enterica subsp. enterica serotype typhimurium bovine isolates from farm meat*. *J Clin Microbiol*.
- Miller, L. G., & Kaspar, C. W. (1994). *Escherichia coli O157:H7 acid tolerance and survival in place cider*. *Journal of Food Protection*, 57, 460-464.
- Montville, J. T., & Matthews, R. K. (2005). *Food Microbiology an introduction*. ASM. American Society for Microbiology, 11-28 y 111-127.
- Mossel, D., & Moreno Garcia, B. (n.d.). *Microbiología de los alimentos (Primera ed.)*. Acribia.
- Müller, D., Hagedorn, P., Brast, S., Heusipp, G., Bielaszewska, M., & Friedrich, A. W. (2006, Jul). *Rapid identification and differentiation of clinical isolates of enteropathogenic Escherichia coli (EPEC), atypical EPEC, and Shiga toxin-producing Escherichia coli by a one-step multiplex PCR method*. *J Clin Microbiol.*, 44(7), 2626-9.
- Mullis, K. B. (1990). *The unusual origin of the polymerase chain reaction*. *Sci Am*, 262(4), 56-61, 64-5.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Hom, G., & Erlich, H. (1986). *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, 51(1), 263-73.

- Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). *Clin Microbiol Rev*(11), 142-201.
- Nataro, J. P., Deng, Y., Maneval, D. R., German, A. L., Martin, W. C., & Leviene, M. M. (1992). *Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative Escherichia coli mediate adherence to Hep-2 cells and hemagglutination of human enterocytes*. *Infect Immun*, 2297-2304.
- Navarro García, F., Sonnested, M., & Teter, K. (2010, May 14). *Host-Toxin Interaction Involving EspC and Pet, Two Serine Protease Autotransporters of the Enterobacteriaceae*. *Toxins*, 2(5), 1134-1147. doi:10.3390/toxins2051134
- O'Brien, A. D., & Holmes, R. K. (1987). *Shiga and Shiga-like toxins*. *Microbiol Revs*, 51, 206-220.
- O'Brien, A., LaVeck, G. D., Thompson, M. R., & Formal, S. B. (1982). *Production of Shigella dysenteriae type 1-like cytotoxin by Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1977, 146, 763-769.
- OECD. (1999). *Food Safety and Quality, Trade Considerations*. Paris, Francia.
- Olea, A., Díaz, J., Fuentes, R., Vaquero, A., & García, M. (2012, Junio 2). *Vigilancia de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en Chile*. *Rev Chilena infectol*(29), 504-510. Retrieved Octubre 10, 2013, from <http://www.sochinf.cl>
- OMS. (2009). *Enfermedades diarreicas*. Retrieved 04 10, 14, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/index.html>
- OPS/OMS. (1999). Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis. Retrieved Septiembre 18, 2013, from Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis: <http://www.phao.org/spanish/HCP/HCV/doc471.pdf>
- Ortega, Y. R. (2008). *Foodborne Diseases*. (S. Simjee, Ed.) *Emerging Infectious Diseases*, 14(7), 540. doi:10.3201/eid1407.080346
- Parish, M. E. (1997). *Public health and non-pasteurized fruit juices*. *Crit Rev Microbiol*(23), 109-119.
- Parish, M. E. (1998). *Coliforms, Escherichia coli and Salmonella Serovars Associated with a Citrus-Processing Facility Implicated in a Salmonellosis Outbreak*. *Journal of Food Protection*, 61(3), 280-284.
- Pascopella, L., Raunpach, B., Ghorji, N., Monack, D., Falkow, S., & Small, P. I. (1995). *Host restriction phenotypes of Salmonella typhi and Salmonella Gallinarium*. *Infect Immun*, 63, 4329-4335.
- Perez Cacho, P. R., & Rouseff, R. (2008). *Processing and storage effects on orange juice aroma*. *J. Agric. Food Chem*, 56, 9785-9796.
- Phantouamath, B., Sithivong, N., Insisiengmay, S., Higa, N., Toma, C., & Nakasone, N. (2003, Jun). *The Incidence of Escherichia coli having pathogenic genes for diarrhea: a study in the People's Democratic Republic of Lao*. *Jpn. J Infect Dis*, 56(3), 103-6.
- Pomp, D., & Medrano, J. F. (1991). *Organic solvents as facilitator of polymerase chain reaction*. *Biotechniques*, 10(1), 58-9.

- Revolledo, L. (2010, Mayo 24). Veterinaria Digital. Retrieved from Veterinaria Digital; Salmonella, Colonization of gastrointestinal tract.: <http://www.veterinariadigital.com/uk/noticia.php?id=14>
- Rico Martínez, M. G. (1995). *Biología molecular en la patogenia de Shigella sp y Escherichia coli enteroinvasiva*. Rev Latinoam Microbiol, 37, 368-385.
- Ries, A. A., Zasa, A., Langkop, C., Tauxe, R. V., & Blake, P. A. (1990). A multistate outbreak of Salmonella chester linked to imported cantaloupe. Thirtieth Interscience conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society of Microbiology, 38.
- Roberts, J. A., & Sockett, P. N. (1994). The socio-economic impact of human salmonella enteritidis infection. (I. J. Ed.) Food Microbiol. Retrieved Octubre 10, 2013
- Rodríguez Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. Salud Publica de México, 44(5), 464-475. Retrieved from <http://bvs.insp.mx/rsp/articulos/articulo.php?id=000363#autores>
- Rodriguez Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. Salud Publica de México, 44(5), 464-475. Retrieved from <http://bvs.insp.mx/rsp/articulos/articulo.php?id=000363#autores>
- Rosa, A. C., Mariano, A. T., Pereira, A. M., Tibana, A., Gómez, T. A., & Andrade, J. R. (1998). Enteropathogenicity markers in Escherichia coli isolated from infants with acute diarrhoea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. J Med Microbiol(47), 781-790.
- Rosas, G. A., & Acosta, V. M. (2001). Manual de manejo higiénico de los alimentos. Mexico, D.F: Secretaria de Salud.
- Ryu, J. H., & Beuchat, L. R. (1998). Influence of acid tolerance responses on survival, growth, and thermal crossprotection of Escherichia coli O157:H7 in acidified media and fruit juices. Int J Food Microbiol(45), 185-193.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., . . . Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 239(4839), 487-91.
- Savarino, S. J., Fasano, A., Robertson, D. C., & Levine, M. M. (1991). Enteraggregative Escherichia coli elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro intestinal model. J Clin Invest, 87, 1450-1455.
- Savarino, S. J., McVeigh, A., Watson, J., Molina, J., Cravioto, A., & Echeverria, P. (1996). Enteraggregative Escherichia coli heat-stable enterotoxins not restricted to enteraggregative E. coli. J Infect Dis, 173, 1019-1022.
- Scallan, E., Griffin, P. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., & Hoekstra, R. M. (2011). Enfermedades transmitidas por alimentos adquiridos en los agentes de Estados Unidos-no especificados. Emerg Infect Dis, 17, 16-22.

- Sears, C. L., & Kapper, J. B. (1996). *Enteric bacterial toxins: Mechanisms of action and linkage to intestinal secretion*. *Microbiol Revs*, 60, 167-215.
- SINAIS. (2012). Dirección General de Información en Salud (DGIS). Retrieved Septiembre 18, 2013, from *Estimaciones de Población 1990-2012 COLMEX*: <http://www.sinais.salud.gob.mx>
- Slayers, A. A., & Whitt, D. D. (1994). *Bacterial pathogenesis : a molecular approach*. Washington, D.C: ASM Press.
- Snyder, J. D., Wells, J. G., Yashuk, J., Puhr, N., & Blake, P. A. (1984). *Outbreak of invasive Escherichia coli gastroenteritis on a cruise ship*. *A J Trop Med Hyg*, 33, 281-284.
- Sospedra, I., Rubert, J., Soriano, J. M., & Manes, J. (2012). *Incidence of microorganisms from fresh orange juice processed by squeezing machines*. *Food Cont*(23), 282-285.
- SSA. (2000). *Seminario sobre Venta de Alimentos en la Vía Pública (Primera ed.)*. (J. L. Hernández Sánchez, Ed.) México, México, Estados Unidos Mexicanos: Secretaria de Salud. Retrieved Septiembre 10, 2013
- SSA. (2001). *MANUAL DE MANEJO HIGIENICO DE LOS ALIMENTOS (Primera Edición ed.)*. MÉXICO, D.F.
- Tarr, P. I. (1995). *Escherichia coli O157:H7 clinical, diagnostic and epidemiological aspect of human infection*. *Clin Infect Dis*, 20, 1-10.
- Tinker, I. (2003). *Street foods: traditional microenterprise in*. *International Journal of Politics, Culture and Society*, 16(3), 331-349.
- Torres Vitela, M. R. (2002). *Agentes patógenos transmitidos por los alimentos. (Vol. I)*. México: Universidad de Guadalajara.
- Torres-Vitela, M., Gómez Aldapa, C. A., Cerna-Cortés, J. F., Villarruel-López, A., Rangel-Vargas, E., & Castro-Rosas, J. (2012). *Presence of indicator bacteria, diarrhoeagenic Escherichia coli pathotypes and Salmonella in fresh carrot juice from Mexican restaurants*. *The Society for Applied Microbiology*, 1-7.
- Uljas, H. E., & Ingham, S. C. (1998). *Survival of Escherichia coli O157:H7 in synthetic gastric fluid after cold and acid habituation in apple juice or trypticase soy broth acidified with hydrochloric acid or organic acid*. *J Food Prot*(61), 939-947.
- UNEP/WHO. (1996). *Water Quality Monitoring - A Practical Guide to the Design and Implementation of Freshwater*. In UNEP/WHO, J. Bartram, & R. Ballance (Eds.), *Water Quality Monitoring - A Practical Guide to the Design and Implementation of Freshwater* (pp. 1-27).
- Utzinger, D., Arias, M. L., Monge, R., & Antillón, F. (1992). *Calidad microbiológica y valor nutricional de frutas frescas que se venden en puestos callejeros*. *Revista costarricense de ciencias médicas*, 13(1-2), 17-26.
- Vásquez Arroyo, J., & Cabral Martell, A. (2001). *La inocuidad alimentaria, realidad y reto mundial*. *FAO*(28), 9.

- Vidal Graniel, J. E. (2003). *Escherichia coli enteropatogena (EPEC): Una causa frecuente de diarrea infantil*. Salud en Tabasco, 9(1), 188-193. Retrieved Octubre 22, 2013, from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48709108>
- Vojdani, D. J., Beuchat, L. R., & Tauxe, R. V. (2008). *Juice-associated outbreaks of human illness in the United States, 1995 through 2005*. Journal of Food Protection, 71(2), 356-364.
- WHO. (1998). *Zoonotic non-O157 Shiga toxin producing Escherichia coli (STEC). Report of a WHO scientific working group meeting*.
- Wood, R. C., Hedberg, C., & White, K. (1991). *A multistate outbreak of Salmonella javiana infections associated with raw tomatoes*. 40 Annual conference CDC Epidemic Intelligence Service, Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, (p. 69). Atlanta.
- Yang, J. R., Wu, F. T., Tsai, J. L., Mu, J. J., Lin, L. F., & Chen, K. L. (2007). *Comparison between O serotyping method and multiplex real-time PCR to identify diarrheagenic Escherichia coli in Taiwan*. J Clin Microbiol, 45(11), 3620-5.

12. Anexos

12.1. Anexo 1 Tablas de resultados

A continuación se muestra la relación de establecimientos analizados, donde se incluyen los criterios utilizados y el puntaje obtenido a partir de su limpieza y sanidad.

Tabla 5. Relación de sitios muestreados, ubicación y puntaje.

Nº DE MUESTRA	LIMPIEZA DEL PUESTO	LIMPIEZA DE MANIPULADOR Y CALIDAD	LIMPIEZA DE LA MATERIA PRIMA	DISPOSICIÓN DE BASURA	UTENSILIOS DE TRABAJO	DOMICILIO
1	3	2	2	2	2	Av. A cueducto #1308 esquina con Alcázar de Chapultepec. Col. Chapultepec Norte.
2	1	1	1	2	1	Tzintzuntzan s/n esq. con Av. A cueducto (Fac. M.V.Z – UMSNH)
3	0	1	1	1	0	Av. del estudiante Col. Vasco de Quiroga. Cocina Económica "Las ranas"
4	2	1	0	2	2	Tzintzuntzan s/n esq. con Av. A cueducto Antes ISSSTE-TIENDA
5	1	1	1	1	1	Av. del estudiante esq. calle del empleado s/n Col. Matamoros.
6	1	2	0	1	1	Av. Bucareli S/N.Col. Vasco de quiroga
7	1	0	0	0	0	Av. Bucareli S/N.Col. Vasco de quiroga
8	1	0	0	0	0	Av. Bucareli S/N.Col. Vasco de quiroga
9	1	0	0	0	1	Av. Bucareli S/N.Col. Vasco de quiroga
10	0	1	0	0	0	Av. Bucareli S/N.Col. Vasco de quiroga
11	0	0	0	0	0	Antonio de saavedra s/n esq. Av Francisco I. Madero Oriente. Col. Vasco de Quiroga
12	0	0	1	0	0	Olivares de Tzintzuntzan #1209. Col. Vasco de Quiroga.
13	0	0	0	0	0	Tejedores de Aranza S/N. Col. Vasco de Quiroga.
14	0	0	1	0	0	Curtidores de Teremendo esq. Obrajeros de Nurio S/N. Col. Vasco de quiroga.
15	0	0	0	0	0	Curtidores de teremendo S/N. Col. Vasco de Quiroga
16	3	3	3	3	3	Curtidores de Teremendo # 487. Col. Vasco de Quiroga.
17	0	0	0	0	0	Curtidores de Teremendo esq. Obrajeros de Nurio. Col. Vasco de quiroga.
18	3	1	1	1	0	Curtidores de Teremendo s/n esq. Obreros de santa clara.
19	0	1	1	1	1	Calle Platanares de Ziracuaretiro s/n.
20	3	1	1	1	2	Tejedores de Aranza esq. Bucareli s/n.
21	1	1	1	0	1	Calle revolución s/n, primer puesto frente a la plaza San Juan, Gazpachos y jugos
22	0	0	0	1	0	Dentro del mercado San Juan atrás del puesto 1 de gazpachos y jugos.
23	2	1	1	1	1	Calle Plan de Ayala # 633
24	1	1	0	1	1	Calle Plan de Ayala S/N Frente a farmacia santa cruz
25	0	0	0	1	1	Dentro del mercado San Juan, entrada por plan de ayala.
26	1	1	1	1	1	Calle Vicente Santa María # desconocido Col. Centro.
27	1	0	1	1	0	Calle miguel de cervantes Saavedra # 296. Col. Independencia
28	0	1	2	1	1	Calle Vicente santa maria esq. Ana María Gallaga S/N
29	2	1	1	2	1	Calle Río Mayo # 458 Col. Independencia
30	2	1	1	1	1	Jesús Urbina # 13 Col. Chapultepec sur
31	1	1	1	1	0	Batallon de Matamoros # 77. Col. Chapultepec Sur.
32	1	0	1	1	0	Batalla de casamata #666A. Col. Chapultepec sur.
33	1	1	0	0	0	Calle Casa mata esq. Pedro Ana maya #617. Col. Chapultepec sur.
34	1	1	0	0	1	Calle Juan Escutia esq. Gral. Mariano monterde s/n. Col. Chapultepec sur
35	1	0	0	1	1	Calle Niños Héroes # 200. Col. Chapultepec sur
36	0	0	0	1	0	Calle Rafael de la vega # 102. Poblado Ocolusen
37	1	0	0	1	0	Calle Rafael de la Vega # 180-B. Col. Poblado Ocolusen
38	2	1	1	1	0	Calle Dr. Luis Pasteur # 130. Col. Poblado Ocolusen
39	0	0	0	1	0	Calle Dr. Luis Pasteur # 115. Col. Poblado Ocolusen
40	2	0	1	1	0	Calle Dr. Luis Pasteur s/n. Col. Poblado Ocolusen.
41	1	0	0	0	1	Calle Alejandro Volta # 233. Col. Ventura Fuente.
42	2	1	2	2	2	Calle Manuel Pérez Coronado # 13-B Col. Frente al IMSS camelinas.
43	2	1	0	1	0	Calle Manuel Pérez Coronado #181. Col. Frente al IMSS camelinas
44	2	1	0	1	0	Bld. Jesús Sansón Flores. Col. Sin asignación de nombre.
45	0	1	1	1	0	Calle Blvd. Jesús Sansón Flores. Col. Camelinas
46	2	1	1	1	0	Padre Lloreda # 594. Col. Centro
47	0	0	0	1	0	Calle Diego José Abad # 301. Col. Centro
48	1	1	1	1	1	Calle Diego José Abad # 166. Col. Centro
49	0	0	0	0	0	Calle Samuel Ramos s/n. Frente al hospital Cvil.
50	0	0	0	0	0	Andador Samuel Ramos s/n. Dentro del bosque Cuauhtémoc.

51	1	0	0	1	0	Calle Zamora # 11. Col. Juárez
52	0	0	0	0	0	Calle Zamora s/n. Col. Juárez
53	0	0	1	0	0	Calle Zamora # 683. Col. Juárez.
54	1	1	1	2	2	Calle Nicolás Bravo # 757. Col. Juárez.
55	2	1	1	2	0	Calle Cuautla s/n. Col. Juárez.
56	2	1	1	1	1	Calle Cuautla #1158 Col. Felicitas del Rio
57	0	1	1	1	0	Dr. José Pilar Ruiz #153 Col. Felicitas del Rio
58	1	0	1	1	1	Dr. José Pilar Ruiz #284 Col. Felicitas del Rio.
59	2	2	1	1	2	Calle Martin Castrejon #560
60	1	1	1	1	0	Martin Castrejon #622ª Col. Felicitas del Rio
61	1	1	1	0	1	Cayetano Andrade #315 Col. Felicitas del Rio.
62	2	1	1	1	1	Constituyentes s/n Col. Felicitas del Rio.
63	1	0	1	1	1	F.J. Mujica # 385. Col. Felicitas del Rio.
64	2	2	1	1	0	F.J. Mujica S/N. Col. Felicitas del Rio.
65	0	0	0	0	0	Interior de CU, Local s/n
66	1	0	0	1	0	Interior de CU, Local 2
67	0	0	0	1	1	Tlalpujahua # 394-b. Col. Felicitas del Rio.
68	1	0	0	1	1	Interior de CU. Local 1.
69	0	1	1	1	0	F. J, Mujica S/N. Frente a estacionamiento de CU Noreste. Col. Felicitas del rio.
70	0	1	0	1	0	Viena # 7603. Col. Villa Universidad.
71	0	1	0	0	1	Av. Universidad # s/n. Col. Villa Universidad.
72	0	1	0	0	0	Av. Universidad # 1290-A. Col. Villa Universidad.
73	1	1	0	1	0	Av. Universidad # 1217. Col. Villa Universidad.
74	1	1	0	1	0	Constitución # 347. Col. Felicitas del Rio
75	1	0	1	1	0	Calle Lic. Alberto Alvarado #584. Col. Villas de Morelia.
76	0	0	1	1	0	Lic. Alberto Alvarado #629. Col. Villas de Morelia
77	0	0	0	1	1	Eduardo Ruiz s/n Col. Centro
78	1	2	2	1	2	Calle Eduardo Ruiz #136 Col. Centro
79	0	0	0	0	0	Eduardo Ruiz #586 Col. Centro
80	2	1	1	1	1	Eduardo Ruiz #631ª Col: Centro
81	1	0	0	1	1	Calle Guadalupe Victoria #242 Col. Centro
82	0	0	0	2	1	Calle Guadalupe Victoria S/N Col. Industrial
83	2	1	1	1	1	Calle Guadalupe Victoria esq. Zinc #808 Col Industrial
84	1	1	0	1	0	Calle Zinc #711 Col. Industrial
85	0	1	1	1	0	Calle Santos Degollado #310 Col. Industrial
86	0	2	1	1	1	Calle Benito Juárez #626ª Col. Industrial
87	2	1	1	2	1	Pico de Tzirate S/N Col. Lomas del Tecnológico
88	2	2	1	1	1	Cerro de Villachuato #540 Col. Lomas del Tecnológico.
89	0	0	0	0	0	Cerro de Villachuato #443 Col. Lomas del Tecnológico
90	0	0	1	0	1	Calle Cerro de Villachuato #574. Col. Santiaguito
91	0	0	1	0	1	Calle Curucupaseo esq. Cerro de Villachuato #s/n Col. Santiaguito
92	2	2	2	2	2	Calle Pichátaro #490 Col. Santiaguito
93	1	1	0	1	1	Sierra de Pchataro esq. Cerro de Villachuato S/N Col. Santiaguito
94	1	1	1	1	1	Calle Jacarandas S/N Col. Prados Verdes
95	2	1	1	2	1	Calle Jacarandas S/N Col. Prados Verdes
96	0	0	0	0	1	Av. Poliducto esq. Av. Michoacán S/N Col. Primo Tapia
97	1	0	2	1	2	Av. Pedregal #804 Col. La colina
98	2	1	2	1	1	Calle Manuel Fernando Soto S/N. Col. Tierra y libertad
99	1	1	2	1	2	Calle Manuel Fernando Soto #56 Col. Tierra y Libertad
100	0	0	0	0	0	Calle Capitán Carlos Roviroso S/N Col. Tierra y Libertad

Puntaje:

3	2	1	0
Bueno	Aceptable	Deficiente	Malo

Tabla 6. Tabla de resultados, cuenta de microorganismos en placa y número más probable (NMP).

N° de MUESTRA	pH	CONTEO EN PLACA UFC/ml		Número más probable (NMP)
		<u>CONTEO DE MESÓFILOS AEROBIOS</u>	<u>COLIFORMES TOTALES</u>	<u>COLIFORMES FECALES</u>
M001	3.5	185,000	250	0.03
M002	3	55,000	740	<0.03
M003	4	65,000	7,700	<0.03
M004	3	93,000	410	<0.03
M005	3	51,000	5,100	<0.03
M006	4	82,000	4,500	<0.03
M007	4	15,500	510	<0.03
M008	3	19,100	330	<0.03
M009	3.5	450,000	1,550	<0.03
M010	3.5	58,000	440	<0.03
M011	3.5	10,000	142,000	0.04
M012	4	19,000	550	0.04
M013	3.5	80,000	6,900	<0.03
M014	3.5	420,000	20,000	<0.03
M015	3.5	116,000	15,100	0.04
M016	4	150,000	400	<0.03
M017	3	30,000	5,500	0.2
M018	4	118,000	45,000	<0.03
M019	3.5	206,000	40,000	<0.03
M020	4	15,000	220	<0.03
M021	3.5	32,000	2,000	<0.03
M022	3.5	3,246,000	41,000	<0.03
M023	4	5,000	150	<0.03
M024	4	3,800	440	0.04
M025	4	8,000	2,500	0.04
M026	3.5	161,000	173,000	0.09
M027	4	56,000	39,000	0.04
M028	3.5	41,000	119,000	0.09
M029	3.5	163,000	10,100	<0.03
M030	4	13,700	270	<0.03
M031	3.5	45,000	12,600	0.09
M032	4	17,000	11,000	0.04
M033	3.5	2,900	3,500	<0.03
M034	4	6,800	320	<0.03
M035	3.5	260	160	0.04
M036	4	28,000	1,300	<0.03
M037	3	13,500	3,600	<0.03
M038	4.5	12,100	3,400	<0.03
M039	4	2,000	120	0.04
M040	3.5	23,000	3,400	<0.03
M041	3.5	23,400	2,860	<0.03
M042	4.5	18,600	8,500	<0.03
M043	4	2,420	60	<0.03
M044	4	9,700	5,000	<0.03
M045	4	1,160	460	<0.03
M046	3.5	340	130	<0.03

M047	4	20,600	7,500	<0.03
M048	3.5	3,800	1,740	<0.03
M049	3.5	7,900	5,600	<0.03
M050	4	350,000	140	<0.03
M051	4	47000	5,000	0.09
M052	4	12,700	280	<0.03
M053	4	3,700	150	<0.03
M054	4	27,000	1,640	0.04
M055	4.5	21,800	6,700	<0.03
M056	3.5	32,000	61,000	<0.03
M057	3.7	34,000	1,060	0.03
M058	3.8	200,000	75,000	0.03
M059	3.8	6,000	270	<0.03
M060	3.7	15,500	170	<0.03
M061	4	4,600	1,030	<0.03
M062	3.8	1,120	200	<0.03
M063	3.9	25,000	6,400	<0.03
M064	3.9	6,600	5,700	0.21
M065	3.7	1,662,000	1,084,000	0.03
M066	3.9	236,000	108,000	>11.0
M067	3.7	77,000	9,200	<0.03
M068	3.7	44,000	22,000	<0.03
M069	3.8	6,400	1,160	0.13
M070	3.7	418,000	21,000	0.03
M071	4.05	5,600	540	0.13
M072	4	44,000	8,200	<0.03
M073	3.7	88,000	4,200	<0.03
M074	3.8	4,400	410	0.04
M075	4	1,344,000	232,000	0.03
M076	3.7	40,000	2,600	<0.03
M077	4	110,000	68,000	<0.03
M078	4	162,000	12,000	<0.03
M079	4	7,815,000	2,044,000	0.03
M080	4	29,000	5,400	0.11
M081	4	86,000	20,000	<0.03
M082	4	10,584,000	11,844,000	0.11
M083	4	50,000	320	0.23
M084	4	68,000	3,400	<0.03
M085	4.5	22,530,000	310	<0.03
M086	4.7	89,000	43,000	<0.03
M087	4.5	21,000	7,700	<0.03
M088	4.5	15,372,000	46,000	0.09
M089	4.5	33,000	2,900	<0.03
M090	4	41,000	18,000	0.09
M091	4.5	4,284,000	210,000	<0.03
M092	4.2	11,200	1,300	<0.03
M093	4.6	INN	293,000	<0.03
M094	4.2	1,014,000	31,000	0.11
M095	4.5	18,200	21,200	<0.03
M096	4.5	4,300	6,800	<0.03
M097	4.5	40,000	15,000	0.03
M098	4	38,000	8,100	<0.03
M099	4.5	22,900	1,100	0.03
M100	4.7	332,000	257,000	<0.03

12.2. Anexo 2 (medios y materiales)

MATERIAL

Tubos sin rosca 20 x 180 mm con campana Durham en su interior. (Marca KIMAX)

Tubos con roca 16 x 150 mm campana Durham en su interior. (Marca KIMAX)

Tubos de rosca 13 x 100 mm. (Marca KIMAX y PYREX)

Tubos sin rosca 13 x 100 mm. (PYREX)

Pipetas de 10 ml graduada en décimas, estériles. (Marca KIMAX)

Pipetas de 5 ml graduadas en décimas, estériles. (Marca KIMAX)

Pipetas de 1 ml graduadas en décimas, estériles. (Marca KIMAX)

Agitador de vidrio. (Sin Marca)

Matraces Erlenmeyer 125 ml, 250 ml, 500 ml, 2000 ml. (Marca KIMAX y PYREX)

Dilutores de 100 ml con rosca. (Marca KIMAX)

Vasos de precipitados de 250 ml, 500 ml, 1000 ml. (Marca KIMAX)

Fascos ámbar de 125 ml y 250 ml. (Sin marca)

Probeta de 100 ml, 250 ml, 500 ml, 800 ml. (KIMAX)

Mechero Bunsen. (Marca AESA)

Mechero Fisher. (Sin Marca)

Aplicadores de madera estériles.

Asas bacteriológicas. (Sin marca)

Cubre-objetos.

Porta-objetos.

Tapones de goma. (Marca Becton Dickinson)

Gradillas para tubos de 18 x 150 y de 20 x 200.

Cerillos o encendedor. (Marca BIC)

1200 Placas Petri enteras desechables. (Marca

Placas Petri divididas desechables.

Papel Aluminio. (ALUPACK)

Micro-pipetas calibradas de 10 μ L, 100 μ L y 200 μ L.

Puntas para micro-pipetas estériles, 10 μ L, 100 μ L y 200 μ L.

Micro-viales.

Embudo de cristal.

Tiras de pH. (ROCHE)

Pro-pipeta.

Gasa.

Algodón.

Cinta testigo.

Cinta adhesiva.

Marcador permanente.

Tijeras

EQUIPO

Potenciómetro.

Incubadora a 35 °C.

Baño incubadora para *C. Fecales* a temperatura constante de 44 °C (± 0.5 °C).

Agitador de tubos Vortex.

Lámpara de luz UV.

Termociclador.

Transiluminador.

Microscopio óptico. (Marca LEICA)

Horno de microondas.

Estufa de gas.

Autoclave. (Marca PRESSTO)

Cuenta colonias.

Cámara de Electroforesis. (Marca BIOXON)

MEDIOS Y REACTIVOS

Agua destilada y des-ionizada.

Agarosa.

Agar Soya Trypticaseina. (Marca BIOXON)

Agar Gelosa Especial.

Agar Cuenta Estándar. (Marca BIOXON)

Agar Bilis Rojo Violeta (ABRV). (Marca BIOXON)

Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD). (Marca BIOXON)

Agar Sulfito de Bismuto. (Marca BIOXON)

Agar MacConkey. (Marca BIOXON)

Agar Verde Brillante. (Marca BIOXON)

Agar Eosina Azul de Metileno (EMB). (Marca BIOXON)

Agar Triple Azúcar Hierro (TSI).

Agar Lisina Hierro (LIA).

Agar Citrato de Simmons (CIT). (Marca BIOXON)

Caldo lactosado. (Marca BIOXON)

Caldo peptonado. (Marca BIOXON)

Caldo Lactosa bilis verde brillante (LBVB). (Marca BIOXON)

Caldo E.C. con MUG (*Escherichia coli*). (Marca BIOXON)

Caldo Rapaport Vasilidians. (*Salmonella*).

Caldo Urea (UREA). (Marca BIOXON)

Medio (MIO). (Marca BIOXON)

Caldo Malonato Modificado (MAL). (Marca BIOXON)

Caldo Rojo de Metilo (RM).

Hidróxido de Sodio 1N (NaOH: 1N).

Colorante Verde de Malaquita.

Yodo-Lugol.

Verde Brillante 0.1%

Rojo de Metilo (marca HYCEL).

Cloruro Férrico (FeCl₃).

Reactivo de Kovac.

Colorante Naranja de Acridina.

Colorante Azul de Bromocresol.

Colorante Azul de Bromotimol.

Cloruro de Benzalconio.

Hipoclorito de Sodio 6%.

Azul de Metileno. (Marca HYCEL)

Azul de algodón.

12.3. Anexo 3 (Normas Oficiales Mexicanas)

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 DOMEQ, 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 $45 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

- Licuadora 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 un 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 Reelección.

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

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

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

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

PREFACIO

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

SECRETARIA DE SALUD

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

SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA Y DESARROLLO RURAL

Comisión Nacional del Agua

SECRETARIA DE MEDIO AMBIENTE, RECURSOS NATURALES Y PESCA

Instituto Nacional de la Pesca

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

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

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

LABORATORIO FERMI, S.A.

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

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

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

SOCIEDAD MEXICANA DE NORMALIZACION Y CERTIFICACION, S.C.

NORMEX

INDICE

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

0. Introducción

Las bacterias coliformes son un grupo heterogéneo compuesto por varios. Existe poca evidencia que indique que estas bacterias coliformes pertenezcan a un solo género taxonómico. La falta de certeza en cuanto a su filiación taxonómica y la imprecisa correlación entre los métodos recomendados para la detección de coliformes han presentado problemas. El primero, es que *Escherichia coli* es aceptada como bacteria coliforme, la especie contiene variantes que no producen gas de la lactosa o lo hacen después de 48 horas, por lo que no se les identifica por medio de esta técnica. Segundo, la capacidad de fermentar la lactosa está frecuentemente asociada a genes localizados en plásmidos. Estos determinantes extracromosomales son fácilmente transferidos entre otras bacterias Gram negativas no relacionadas a las coliformes, que pueden, en consecuencia, ser recuperadas en la etapa inicial del análisis. No obstante en la práctica, la técnica ha demostrado su efectividad. El número de organismos se establece mediante la cuenta de unidades formadoras de colonias (NOM-113-SSA1-1994. Método para la Cuenta de Microorganismos Coliformes Totales en Placa) o el uso de la técnica del número más probable. Esta última, también llamada técnica de dilución en tubo, proporciona una estimación estadística de la densidad microbiana presente con base a que la probabilidad de obtener tubos con crecimiento positivo disminuye conforme es menor el volumen de muestra inoculado.

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta Norma Oficial Mexicana establece el método microbiológico para estimar el número de coliformes presentes en productos alimenticios, por medio del cálculo del número más probable (NMP) después de la incubación a 35 °C de la muestra diluida en un medio líquido. Este procedimiento puede aplicarse a agua potable, agua purificada, hielo y alimentos procesados térmicamente, así como a muestras destinadas a evaluar la eficiencia de prácticas sanitarias en la industria alimentaria. Este procedimiento debe seleccionarse cuando la densidad esperada es como mínimo de una bacteria en 10 ml de producto líquido o una bacteria por gramo de alimento sólido.

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

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

2. Fundamento

El método se basa en que las bacterias coliformes, fermentan la lactosa incubadas a 35 ± 1°C durante 24 a 48 horas, resultando una producción de ácidos y gas el cual se manifiesta en las campanas de fermentación.

3. Referencias

Esta norma se complementa con lo siguiente:

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

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

4. Definiciones

Para fines de esta norma se entiende por:

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

5. Símbolos y abreviaturas

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

| g – gramo | ml – mililitro | l – litro | mm – milímetro | °C - grado Celsius | % - por ciento | pH - potencial de hidrógeno |

| N – normal | NMP - número más probable |

6. Reactivos y materiales

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

6.1 Reactivos

6.1.1 Soluciones diluyentes

6.1.1.1 Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada)

FORMULA

INGREDIENTES CANTIDADES

Fosfato monopotásico 34,0 g

Agua 1,0 l

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

6.1.1.2. Agua peptonada

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Peptona	1,0 g
Cloruro de sodio	8,5 g
Agua	1,0 l

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

Si este diluyente no es usado inmediatamente, almacenar en lugar 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.

6.1.2 Medios de cultivo.

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

Caldo lauril sulfato triptosa (medio de enriquecimiento selectivo).

Caldo lactosa bilis verde brillante (medio de confirmación).

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

6.1.2.1 Caldo lactosado

CUADRO 1

INGREDIENTE	MEDIO DE CONCENTRACIÓN 1,5.	MEDIO DE CONCENTRACIÓN SENCILLA.
Extracto de carne	4,5 g	3,0 g
Peptona de gelatina	7,5 g	5,0 g
Lactosa	7,5 g	5,0 g
Agua destilada	1000,0 ml	1000,0 ml

Disolver los ingredientes en 1 l de agua, calentando si es necesario o el medio completo deshidratado, siguiendo las instrucciones del fabricante. → Ajustar el pH final de tal manera que después de la esterilización éste sea de $6,9 \pm 0,2$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. → Distribuir en volúmenes de 10 ml en tubos con dimensiones de 16 x 160 mm el medio de concentración sencilla y de 20 ml en tubos de 20 x 200 mm el medio de concentración 1,5, cada tubo debe tener campana de fermentación. → Esterilizar en autoclave por 15 minutos a $121 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$. → Enfriar rápidamente para evitar una exposición excesiva al calor. El aspecto del caldo es claro y de color beige. → Se puede utilizar una concentración doble del medio de cultivo, en cuyo caso se emplearán 10 ml del caldo preparado, cuando se agreguen 10 ml de la muestra.

6.1.2.2 Caldo lauril sulfato triptosa.

CUADRO 2

INGREDIENTE	MEDIO DE CONCENTRACIÓN 1,5.	MEDIO DE CONCENTRACIÓN SENCILLA.
Triptosa	30,0 g	20,0 g
Lactosa	7,5 g	5,0 g
Fosfato dipotásico	4,125 g	2,75 g
Fosfato monopotásico	4,125 g	2,75 g
Cloruro de sodio	7,50 g	5,0 g
Lauril sulfato de sodio	0,15 g	0,1 g
Agua destilada	1000,0 ml	1000,0 ml

Disolver los componentes en 1 l de agua, calentando si es necesario o el medio de cultivo completo deshidratado, siguiendo las instrucciones del fabricante. → Ajustar el pH de tal manera que después de la esterilización éste sea de $6,8 \pm 0,2$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. → Distribuir en volúmenes de 10 ml en tubos con dimensiones de 16 x 160 mm el medio de concentración sencilla y de 20 ml en tubos de 20 x 200 mm el medio de concentración 1,5, cada tubo debe tener campana de fermentación. → Esterilizar en autoclave por 15 minutos a $121 \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$. → Se recomienda almacenar el medio una vez preparado. → Las campanas de fermentación no deben de contener burbujas de aire después de la esterilización. → Se puede utilizar una concentración doble del medio de cultivo, en cuyo caso se emplearán 10 ml de caldo preparado, cuando se agreguen 10 ml de muestra.

6.1.2.3 Caldo lactosa bilis verde brillante

FORMULA

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

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

6.2 Materiales

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

Frascos de vidrio de 250 ml con tapón de rosca.

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

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

Campanas de fermentación (tubos de Durham).

Pipetas bacteriológicas graduadas de 10 y 1 ml.

Gradillas.

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

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

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

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

7. Aparatos e instrumentos

Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de $170\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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

Termómetro de máximas y mínimas.

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

Potenciómetro con una escala mínima de 0,1 unidades de pH a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

8. Preparación de la muestra

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

9. Procedimiento

9.1 Para agua potable y hielo

9.1.1 Prueba presuntiva

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

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

9.1.2 Prueba confirmativa

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

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

9.2 Para alimentos.

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

9.2.1 Prueba presuntiva

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

9.2.1.1.1 Tomar tres tubos de concentración sencilla del medio selectivo de enriquecimiento. Usar una pipeta estéril para transferir a cada uno de estos tubos 1 ml de la muestra si es líquida o 1 ml de la dilución primaria en el caso de otros productos.

9.2.1.1.2 Para las diluciones subsecuentes, continuar como se indica en el párrafo anterior, usando una pipeta diferente para cada dilución. Mezclar suavemente el inóculo con el medio.

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

9.2.2 Prueba confirmativa

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

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

10. Expresión de los resultados

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

El cuadro 3 muestra algunos ejemplos que se pueden presentar.

Ejemplos: Ejemplo 1. Cuando sólo una dilución muestra tres tubos positivos, elegir ésta y las diluciones mayores posteriores. Ejemplo 2. Cuando más de una dilución muestra tres tubos positivos y la última da menos de tres, elegir esta última y las dos diluciones anteriores más bajas. Ejemplo 3. Cuando en ninguna dilución hay tres tubos positivos y éstos se encuentran en más de tres diluciones, seleccionar las dos diluciones mayores positivas y la siguiente. Ejemplos 4 y 5. Cuando los tubos positivos sólo se encuentran en la muestra sin diluir (10 ml o 1 g) y en la primera dilución (1 ml o 10-1 g), seleccionar las tres primeras diluciones para el cálculo del número más probable.

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

La técnica de NMP puede admitir gran cantidad de variaciones. Los resultados obtenidos con esta técnica deben ser utilizados con precaución. Los límites de confianza están representados en los cuadros 4 al 7. Por ejemplo, para una muestra sólida con un NMP de 70 coliformes por gramo, los límites de confianza en el 95% de los casos variarán de 10 a 230 coliformes por gramo (ejemplo 3 del cuadro 3) y en un producto con 24 de NMP de coliformes por gramo, los límites de confianza son de 3,6 a 130 coliformes por gramo (ejemplo 2 cuadro 3).

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

Número de tubos positivos obtenidos de tres NMP tubos incubados, para las siguientes cantidades de muestra inoculada por tubo

E J E M P L O	Producto Líquido (ml)	10	1	10-1	10-2	10-3	NMP	
	Otros Productos (g)	1	10-1	10-2	10-3	10-4	Productos Líquidos	Otros Productos
Mayor dilución= menor concentración								
							ml-1	g-1
1		3	3	2	1	0	15 (5)	150 (6)
2		3	3	3		0	24 (5)	240 (6)
3		2	2	1	1	0	7 (6)	70 (7)
4		3	3	0	0	0	2,4 (4)	24 (5)
5		2	2	0	1	0	0,21 (4)	2,1 (5)

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

combinación de positivos	3 tubos por dilución			5 tubos por dilución		
	índice del NMP por g	95% Límites de confianza		índice del NMP por g	95% Límites de confianza	
		bajo	alto		bajo	alto
0-0-0	<0,03	<0,005	<0,00	<0,02	<0,005	<0,07
0-0-1	0,03	<0,005	<0,00	0,02	<0,005	0,07
0-1-0	0,03	<0,005	0,13	0,02	<0,005	0,07
0-2-0	—	—	—	0,04	<0,005	0,11
1-0-0	0,04	<0,005	0,20	0,02	<0,005	0,07
1-0-1	0,07	0,01	0,21	0,04	<0,005	0,11
1-1-0	0,07	0,01	0,23	0,04	<0,005	0,11
1-1-1	0,11	0,03	0,36	0,06	<0,005	0,15
1-2-0	0,11	0,03	0,36	0,06	<0,005	0,15
2-0-0	0,09	0,01	0,39	0,05	<0,005	0,13
2-0-1	0,14	0,03	0,37	0,07	0,01	0,17
2-1-0	0,16	0,03	0,44	0,07	0,01	0,17
2-1-1	0,20	0,07	0,60	0,09	0,02	0,21
2-2-0	0,21	0,04	0,47	0,09	0,02	0,21
2-2-1	0,28	0,10	1,50	—	—	—
2-3-0	—	—	—	0,12	0,03	0,28
3-0-0	0,23	0,04	1,20	0,08	0,01	0,19
3-0-1	0,39	0,07	1,3	0,11	0,02	0,25
3-0-2	0,64	0,15	3,00	—	—	—
3-1-0	0,43	0,07	2,1	0,11	0,02	0,25
3-1-1	0,75	0,14	2,3	0,14	0,04	0,34
3-1-2	1,20	0,30	3,0	—	—	—
3-2-0	0,63	0,15	3,80	0,14	0,04	0,34
3-2-1	1,50	0,30	4,40	0,17	0,05	0,40
3-2-2	2,10	0,35	4,70	—	—	—
3-3-0	2,40	0,36	13,0	—	—	—
3-3-1	4,60	0,71	24,0	—	—	—
3-3-2	11,0	1,50	49,0	—	—	—
3-3-3	>11,0	>1,50	>49,0	—	—	—
4-0-0	—	—	—	0,13	0,03	0,31
4-0-1	—	—	—	0,17	0,05	0,40
4-1-0	—	—	—	0,17	0,05	0,40
4-1-1	—	—	—	0,21	0,07	0,53
4-1-2	—	—	—	0,26	0,09	0,78
4-2-0	—	—	—	0,22	0,07	0,57
4-2-1	—	—	—	0,26	0,08	0,78
4-3-0	—	—	—	0,27	0,09	0,80
4-3-1	—	—	—	0,33	0,11	0,93
4-4-0	—	—	—	0,34	0,12	0,93
5-0-0	—	—	—	0,23	0,07	0,70
5-0-1	—	—	—	0,31	0,11	0,89
5-0-2	—	—	—	0,43	0,15	1,14
5-1-0	—	—	—	0,33	0,11	0,93
5-1-1	—	—	—	0,46	0,16	1,2
5-1-2	—	—	—	0,63	0,21	1,5
5-2-0	—	—	—	0,49	0,17	1,3
5-2-1	—	—	—	0,70	0,23	1,70
5-2-2	—	—	—	0,94	0,28	2,2
5-3-0	—	—	—	0,79	0,25	1,9
5-3-1	—	—	—	1,10	0,31	2,5
5-3-2	—	—	—	1,4	0,37	3,4
5-3-3	—	—	—	1,80	0,44	5,0
5-4-0	—	—	—	1,30	0,36	3,0
5-4-1	—	—	—	1,70	0,43	4,9
5-4-2	—	—	—	2,20	0,57	7,0
5-4-3	—	—	—	2,80	0,90	8,5
5-4-4	—	—	—	3,50	1,20	10,0
5-5-0	—	—	—	2,40	0,68	7,5
5-5-1	—	—	—	3,50	1,80	10,0
5-5-2	—	—	—	5,40	1,80	14,0
5-5-3	—	—	—	9,20	3,0	32,0
5-5-4	—	—	—	16,09	6,40	68,0
5-5-5	—	—	—	—	—	—

CUADRO 5. Índice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos. (Diluciones 1.0, 0,1 y 0.01 g)

combinación de positivos	3 TUBOS POR DIUCIÓN			5 TUBOS POR DILUCIÓN		
	Índice del NMP por g	95% Límites de confianza		Índice del NMP por g	95% Límites de confianza	
		bajo	alto		bajo	alto
0-0-0	<0,3	<0,05	<0,9	<0,2	<0,05	<0,7
0-0-1	0,3	<0,05	<0,9	0,7	<0,05	0,7
0-1-0	0,3	<0,05	1,3	0,2	<0,05	0,7
0-2-0	—	—	—	0,4	<0,05	0,11
1-0-0	0,4	<0,05	2,0	0,2	<0,05	0,7
1-0-1	0,7	0,1	2,0	0,4	<0,05	1,1
1-1-0	0,7	0,1	2,3	0,4	<0,05	1,1
1-1-1	1,1	0,3	3,0	0,6	<0,05	1,6
1-2-0	1,1	0,3	3,6	0,6	<0,05	1,5
2-0-0	0,9	0,1	3,0	0,5	<0,05	1,3
2-0-1	1,4	0,3	3,7	0,7	0,1	1,7
2-1-0	1,5	0,3	4,4	0,7	0,1	1,7
2-1-1	2,0	0,7	6,0	0,9	0,2	2,1
2-2-0	2,1	0,4	4,7	0,9	0,2	2,1
2-2-1	2,8	1,0	15,0	—	—	—
2-3-0	—	—	—	1,2	0,3	2,9
3-0-0	2,3	0,4	12,0	0,8	0,1	1,9
3-0-1	3,0	0,7	13,0	1,1	0,2	2,5
3-0-2	0,4	1,5	30,0	—	—	—
3-1-0	4,3	0,7	21,0	1,1	0,2	2,5
3-1-1	7,5	1,4	23,0	1,4	0,4	3,4
3-1-2	12,0	3,0	30,0	—	—	—
3-2-0	9,3	1,5	30,0	1,4	0,4	3,4
3-2-1	15,0	3,0	44,0	1,7	0,5	4,6
3-2-2	21,0	3,5	47,0	—	—	—
3-3-0	24,0	3,6	130,0	—	—	—
3-3-1	40,0	7,1	240,0	—	—	—
3-3-2	110,0	15,0	490,0	—	—	—
3-3-3	>110,0	>15,0	>490,0	—	—	—
4-0-0	—	—	—	1,3	0,3	3,1
4-0-1	—	—	—	1,7	0,5	4,0
4-1-0	—	—	—	1,7	0,5	4,0
4-1-1	—	—	—	2,1	0,7	6,3
4-1-2	—	—	—	2,5	0,9	7,8
4-2-0	—	—	—	2,2	0,7	6,7
4-2-1	—	—	—	2,6	0,9	7,8
4-3-0	—	—	—	2,7	0,9	8,0
4-3-1	—	—	—	3,3	1,1	9,3
4-4-0	—	—	—	3,4	1,2	9,3
5-0-0	—	—	—	2,3	0,7	7,0
5-0-1	—	—	—	3,1	1,1	8,9
5-0-2	—	—	—	4,3	1,5	11,4
5-1-0	—	—	—	3,3	1,1	9,3
5-1-1	—	—	—	4,5	1,6	12,0
5-1-2	—	—	—	6,3	2,1	16,0
5-2-0	—	—	—	4,9	1,7	13,0
5-2-1	—	—	—	7,0	2,3	17,0
5-2-2	—	—	—	9,4	2,8	22,0
5-3-0	—	—	—	7,9	2,6	19,0
5-3-1	—	—	—	11,0	3,1	25,0
5-3-2	—	—	—	14,0	3,7	34,0
5-3-3	—	—	—	18,0	4,4	50,0
5-4-0	—	—	—	13,0	3,6	30,0
5-4-1	—	—	—	17,0	4,3	40,0
5-4-2	—	—	—	22,0	5,7	70,0
5-4-3	—	—	—	28,0	8,0	85,0
5-4-4	—	—	—	35,0	12,0	100,0
5-5-0	—	—	—	24,0	6,8	75,0
5-5-1	—	—	—	35,0	12,0	100,0
5-5-2	—	—	—	54,0	18,0	140,0
5-5-3	—	—	—	92,0	30,0	220,0
5-5-4	—	—	—	131,0	64,0	680,0
5-5-5	—	—	—	>131,0	>64,0	>680,0

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

combinación de positivos	3 tubos por dilución		5 tubos por dilución			
	Índice del NMP por g	95% Límites de confianza		Índice del NMP por g	95% Límites de confianza	
		bajo	alto		bajo	alto
0-0-0	<3	<0,5	<3	<2	<0,5	<7
0-0-1	3	<0,5	3	2	<0,5	7
0-1-0	3	<0,5	13	2	<0,5	7
0-2-0	4	<0,5	-	4	<0,5	11
1-0-0	4	<0,5	20	2	<0,5	7
1-0-1	7	1	21	4	<0,5	11
1-1-0	7	1	23	4	<0,6	11
1-1-1	11	3	30	6	<0,5	15
1-2-0	11	3	36	8	<0,5	15
2-0-0	14	1	36	5	<0,5	13
2-0-1	14	3	37	2	1,0	17
2-1-0	15	3	44	7	1,0	17
2-1-1	20	7	69	9	2,0	21
2-2-0	21	4	47	9	2,0	21
2-2-1	26	10	150	-	-	-
2-3-0	-	-	-	12	3,0	20
3-0-0	23	4	120	9	1,0	19
3-0-1	39	7	13	11	2,0	25
3-0-2	94	15	380	-	-	-
3-1-0	43	7	210	11	2,0	25
3-1-1	75	14	230	14	4,0	34
3-1-2	120	30	380	-	-	-
3-2-0	53	15	380	14	4,0	34
3-2-1	150	30	440	17	5,0	46
3-2-2	210	35	470	-	-	-
3-3-0	240	30	130	-	-	-
3-3-1	400	71	240	-	-	-
3-3-2	1100	150	480	-	-	-
3-3-3	>1100	>150	>480	-	-	-
4-0-0	-	-	-	13	3,0	31
4-0-1	-	-	-	17	5,0	45
4-1-0	-	-	-	17	5,0	45
4-1-1	-	-	-	21	7,0	63
4-1-2	-	-	-	26	9,0	78
4-2-0	-	-	-	22	7,0	67
4-2-1	-	-	-	28	9,0	78
4-3-0	-	-	-	27	9,0	80
4-3-1	-	-	-	33	11,0	93
4-4-0	-	-	-	34	12,0	93
5-0-0	-	-	-	23	7,0	70
5-0-1	-	-	-	31	11,0	89
5-0-2	-	-	-	43	15,0	114
5-1-0	-	-	-	33	11,0	93
5-1-1	-	-	-	46	16,0	120
5-1-2	-	-	-	63	21,0	160
5-2-0	-	-	-	49	17,0	130
5-2-1	-	-	-	70	23,0	170
5-2-2	-	-	-	94	28,0	220
5-3-0	-	-	-	79	25,0	190
5-3-1	-	-	-	110	31,0	260
5-3-2	-	-	-	140	37,0	340
5-3-3	-	-	-	180	44,0	500
5-4-0	-	-	-	130	35,0	300
5-4-1	-	-	-	170	43,0	490
5-4-2	-	-	-	220	57,0	700
5-4-3	-	-	-	280	90,0	850
5-4-4	-	-	-	350	120,0	1000
5-5-0	-	-	-	240	68,0	750
5-5-1	-	-	-	350	120,0	1000
5-5-2	-	-	-	540	180,0	1400
5-5-3	-	-	-	970	300,0	3200
5-5-4	-	-	-	1500	640,0	5800
5-5-5	-	-	-	>1500	>640,0	>5800

11. Informe de la prueba

Informar "Número más probable (NMP) de coliformes por gramo o mililitro de muestra".

En caso de muestras de agua informar NMP/100 ml.

12. Concordancia con normas internacionales

Esta norma no tiene concordancia con normas internacionales.

13. Bibliografía

- 13.1 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1992. Ley Federal sobre Metrología y Normalización. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.
- 13.2 Secretaría de Salud. 1984. Ley General de Salud. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.
- 13.3 Secretaría de Salud. 1988. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.
- 13.4 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. NOM-008-SCFI-1993. Norma Oficial Mexicana. Sistema General de Unidades de Medida.
- 13.5 Bacteriological Analytical Manual. 1984. Food and Drugs Administration FDA. Bureau of Foods. Division of Microbiology. 6a Ed. Washington, D.C.
- 13.6 Norma ISO 4831 2a. 1991. Microbiology - General guidance for the enumeration of coliforms - Most probable number technique. International Organization for Standardization.
- 13.7 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. NORMA-Z-013/02. 1981. Guía para la Redacción, Estructuración y Presentación de las Normas Oficiales Mexicanas.
- 13.8 Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 1989. American Public Health Association. APHA-WWA-WPCF. 17o. Ed. Washington D.C.
- 13.9 Vanderzant F., Carland S. y Don F. 1992. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association. Washington, D.C.

14. Observancia de la norma

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

15. Vigencia

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

Sufragio Efectivo. No Reelección.

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

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-113-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE MICROORGANISMOS COLIFORMES TOTALES 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.

PREFACIO

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

SECRETARÍA DE SALUD

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

SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y DESARROLLO RURAL

Comisión Nacional del Agua

SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE, RECURSOS NATURALES Y PESCA

Instituto Nacional de la Pesca

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

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

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

LABORATORIO FERMI, S.A.

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

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

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

SOCIEDAD MEXICANA DE NORMALIZACIÓN Y CERTIFICACIÓN, S.C. NORMEX

INDICE

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

0. Introducción

El grupo de los microorganismos coliformes es el más ampliamente utilizado en la microbiología de los alimentos como indicador de prácticas higiénicas inadecuadas.

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

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

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta Norma Oficial Mexicana establece el método microbiológico para determinar el número de microorganismos coliformes totales presentes en productos alimenticios por medio de la técnica de cuenta en placa.

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

2. Fundamento

El método permite determinar el número de microorganismos coliformes presentes en una muestra, utilizando un medio selectivo (agar rojo violeta bilis) en el que se desarrollan bacterias a 35°C en aproximadamente 24 h, dando como resultado la producción de gas y ácidos orgánicos, los cuales viran el indicador de pH y precipitan las sales biliares.

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.*

NOM-092-SSA1-1994 Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa.*

NOM-112-SSA1-1994 Determinación de Bacterias Coliformes. Técnica del Número más Probable.*

4. Definiciones

Para fines de esta Norma se entiende por: Coliformes, bacilos Gram negativos, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos que a 35 °C fermentan la lactosa con formación de ácido, ocasionando en las colonias desarrolladas el vire del indicador rojo neutro presente en el medio y la precipitación de las sales biliares.

5. Símbolos y abreviaturas

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

| H – hora | g – gramo | ml – mililitro | l – litro | mm – milímetro | °C – grados Celsius | % – por ciento | pH – potencial de hidrógeno | N – normal | RVBA agar-rojo-violeta-bilis-lactosa | 1/d – inversa de la dilución | UFC – unidades formadoras de colonias | / – por |

6. Reactivos y materiales

6.1 Reactivos

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

6.1.1 Soluciones diluyentes

6.1.1.1 Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada)

FORMULA

INGREDIENTES CANTIDADES

Fosfato monopotásico 34,0 g

Agua 1,0 l

Preparación: Disolver el fosfato en 500 ml de agua y ajustar el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio 1,0 N. → Llevar con agua a un litro. → Esterilizar a $121 \pm 1,0^\circ\text{C}$ durante 15 minutos. 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 durante 15 minutos a $121 \pm 1,0^\circ\text{C}$. → Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

6.1.1.2 Agua peptonada

FORMULA

INGREDIENTES CANTIDADES

Peptona 1,0 g

NaCl 8,5 g

Agua 1,0 l

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

Si este diluyente no es usado inmediatamente, almacenar en lugar 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.

6.1.2 Medio de cultivo

Agar-rojo- violeta-bilis-lactosa (RVBA)

FORMULA

INGREDIENTES CANTIDADES

Peptona 7,0 g

Extracto de levadura 3,0 g

Lactosa 10,0 g Sales

biliares 1,5 g Cloruro

de sodio 5,0 g Rojo

neutro 0,03 g Cristal

violeta 0,002 g Agar

15,0 g

Agua 1,0 l

Preparación: Mezclar los componentes en el agua y dejar reposar durante algunos minutos. → Mezclar perfectamente y ajustar el pH a 7,4 con ácido clorhídrico 0,1N o con hidróxido de sodio 0,1N a 25°C , de forma que después del calentamiento se mantenga en este valor. → Calentar con agitación constante y hervir durante 2 minutos. → Enfriar inmediatamente el medio en un baño de agua hasta que llegue a 45°C . → Evitar el sobrecalentamiento del medio. → No debe esterilizarse en autoclave.

Usar el medio dentro de las tres primeras horas después de su preparación. → En el caso de utilizar medio de cultivo deshidratado, seguir las instrucciones del fabricante.

6.2 Materiales

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

- Frascos de vidrio de 250 ml con tapón de rosca.

- Tubos de 16 X 150 mm con tapón de rosca.

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

- Cajas Petri.

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

Horno, durante 2 h a $170 - 175^\circ\text{C}$, o 1 h a 180°C ; o en 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 las esterilizaciones repetidas 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 $45 \pm 1,0^\circ\text{C}$.

- Licuadora 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.
- Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de $\pm 1,0^{\circ}\text{C}$, provista con termómetro calibrado.
- Contador de colonias de campo oscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadrículada y lente amplificador.
- Registrador mecánico o electrónico.
- Microscopio óptico.
- Potenciómetro con una escala mínima de 0,1 unidades de pH a 25°C .

8. Preparación de la muestra

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

9. Procedimiento

- 9.1 Colocar en cajas Petri por duplicado 1 ml de la muestra líquida directa o de la dilución primaria, utilizando para tal propósito una pipeta estéril.
- 9.2 Repetir el procedimiento tantas veces como diluciones decimales se requiera sembrar, utilizando una pipeta estéril diferente para cada dilución.
- 9.3 Verter de 15 a 20 ml del medio RVBA fundido y mantenido a $45 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ en baño de agua. En el caso de utilizar cajas de Petri de plástico se vierte de 10 a 15 ml del medio. El tiempo transcurrido entre la preparación de la dilución primaria y el momento en que se vierte el medio de cultivo, no debe exceder de 20 minutos.
- 9.4 Mezclar cuidadosamente el inóculo con el medio con seis movimientos de derecha a izquierda, seis movimientos en el sentido de las manecillas del reloj, seis movimientos en el sentido contrario al de las manecillas del reloj y seis de atrás para adelante, sobre una superficie lisa y nivelada. Permitir que la mezcla solidifique dejando las cajas Petri reposar sobre una superficie horizontal fría.
- 9.5 Preparar una caja control con 15 ml de medio para verificar la esterilidad.
- 9.6 Después de que está el medio completamente solidificado en la caja, verter aproximadamente 4 ml del medio RVBA a $45 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ en la superficie del medio inoculado. Dejar que solidifique.
- 9.7 Invertir las placas y colocarlas en la incubadora a 35°C , durante 24 ± 2 horas.
- 9.8 Después del periodo especificado para la incubación, contar las colonias con el contador de colonias.
- 9.9 Seleccionar las placas que contengan entre 15 y 150 colonias. Las colonias típicas son de color rojo oscuro, generalmente se encuentran rodeadas de un halo de precipitación debido a las sales biliares, el cual es de color rojo claro o rosa, la morfología colonial es semejante a lentes biconvexos con un diámetro de 0,5 a 2,0 mm.

10. Expresión de los resultados

10.1 Cálculo del método

10.1.1 Placas que contienen entre 15 y 150 colonias características.

Separar las placas que contienen el número antes mencionado de colonias características en dos diluciones consecutivas. Contar las colonias presentes. Calcular el número de coliformes por mililitro o por gramo de producto, multiplicando el número de colonias por el inverso de la dilución correspondiente, tomando los criterios de la NOM-092-SSA1-1994. Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa.

10.1.2 Placas que contienen menos de 15 colonias características.

Si cada una de las placas tiene menos de 15 colonias características, reportar el número obtenido seguido de la dilución correspondiente.

10.1.3 Placas con colonias no características.

Si en las placas no hay colonias características, reportar el resultado como: menos de un coliforme por 1/d por gramo, en donde d es el factor de dilución.

11. Informe de la prueba

Informar: UFC/g o ml en placa de agar rojo violeta bilis, incubados a 35°C durante 24 ± 2 h.

En caso de emplear diluciones y no observar crecimiento, informar utilizando como referencia la dilución más baja utilizada, por ejemplo dilución 10-1.

En caso de no observar crecimiento en la muestra sin diluir se informa: "no desarrollo de coliformes por ml".

12. Concordancia con normas internacionales

Esta Norma no tiene concordancia con normas internacionales.

13. Bibliografía

- 13.1 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1992. Ley Federal sobre Metrología y Normalización. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.
- 13.2 Secretaría de Salud. 1984. Ley General de Salud. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.
- 13.3 Secretaría de Salud. 1988. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.
- 13.4 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. NOM-008-SCFI-1993. Norma Oficial Mexicana. Sistema General de Unidades de Medida. México, D.F.
- 13.5 International Organization for Standardization. 1991: "Norma ISO 4832-1991. Microbiology-General Guidance for the Enumeration of Coliforms-Colony Count Technique".
- 13.6 Food and Drugs Administration. 1984: "Bacteriological Analytical Manual". Bureau of Foods. Division of Microbiology. 6a Ed. Washington D.C.
- 13.7 Secretaría de Salud. Laboratorio Nacional de Salud Pública: "Manuales para la determinación de organismos coliformes totales". México, D.F.
- 13.8 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.

14. Observancia de la Norma

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

15. Vigencia

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

Sufragio Efectivo. No Reelección.

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

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-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

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

En realidad esta técnica no pretende poner en evidencia todos los microorganismos presentes. La variedad de especies y tipos diferenciables por sus necesidades nutricionales, temperatura requerida para su crecimiento, oxígeno disponible, etc., hacen que el número de colonias contadas constituyan una estimación de la cifra realmente presente y la misma refleja si el manejo sanitario del producto ha sido el adecuado. Por otra parte el recuento de termófilos, psicófilos 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 Tripton-Extracto de Levadura (agar para cuenta estándar).

FORMULA

INGREDIENTES CANTIDADES

Extracto de levadura 2,5 g

Triptona 5,0 g

Dextrosa 1,0 g

Agar 15,0 g

Agua 1,0 l

Preparación del medio de cultivo: Suspender los componentes del medio deshidratado en un litro de agua. Hervir hasta total disolución. → Distribuir en recipientes de vidrio esterilizables de capacidad no mayor de 500 ml, cantidades de aproximadamente la mitad del volumen del mismo. Esterilizar en autoclave a $121 \pm 1,0$ °C, durante 15 minutos. El pH final del medio debe ser $7,0 \pm 0,2$ a 25°C. → Si el medio de cultivo es utilizado inmediatamente, enfriar a $45^\circ\text{C} \pm 1,0$ °C en baño de agua y mantenerlo a esta temperatura hasta antes de su uso. El medio no debe fundirse más de una vez. → En caso de medios deshidratados seguir las instrucciones del fabricante. → El medio de cultivo anterior es el de uso más generalizado. Para algunos alimentos en particular se requerirá de un medio de cultivo especial que se debe indicar al describir la técnica para ese alimento.

6.2 Materiales

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

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

7. Aparatos e instrumentos

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

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

Contador de colonias de campo obscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadriculada 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 °C y que mantenga la temperatura a $45 \pm 1,0$ °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
Termófilicos aerobios	55 ± 2°C	48 ± 2 h
Mesófilicos aerobios*	35 ± 2°C	48 ± 2 h
Psicrótróficos	20 ± 2°C	3 - 5 días
Psicrófilicos	5 ± 2°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 o 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 o 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 cómo 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 tripton extracto de levadura o agar para cuenta estándar, incubadas _____ horas a _____ °C.

CUADRO 2

Ejemplo número	Cálculo de los valores de la cuenta en placa (Ensayos por duplicado)			UFC/g o ml
	Colonias contadas			
	1: 100	1: 1000	1: 10000	
1	> 250 ^a	178	16	180000
2	> 250	190	17	250000
3	> 250	220	25	1600 ^b
4	18	238	28	5000000 ^b
5	14	2	0	290000
6	> 250	> 250	512	crecimiento extendido
7	> 250	> 250	495	< 100 ^c
8	> 250	240	24	250000
9	> 250	268	19	280000
	> 250	216	23	230000
	> 250	262	42	270000
	> 250	215	20	
	> 250	235	26	
	> 250	275	32	
	> 250	225	26	

a Cuenta por arriba de 250 colonias.

b Debe aclararse "valor estimado" por encontrarse los valores fuera del intervalo de 25 a 250.

c Debe informarse de acuerdo a la menor dilución ensayada y contada, en este caso 1:100.

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.