



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

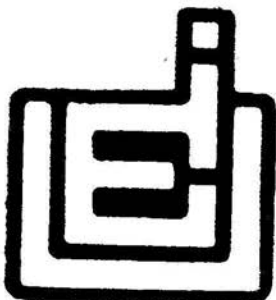
Escuela Nacional de Estudios
Profesionales Iztacala ENEP - I

BO 1260

Ej. 2

ESTUDIO DE LA CALIDAD BACTERICLOGICA DE
PALETAS HELADAS ELABORADAS EN EL AREA
METROPOLITANA DE LA CIUDAD DE MEXICO

T E S I S
Que para obtener el Título de:
B I O L O G O
P r e s e n t a:
CATALINA MAYA RENDON



DIRECTOR DE TESIS
Q.F.B. Patricia del Carmen Memije Néri

San Juan Iztacala, México

1996



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**ESTUDIO DE LA CALIDAD BACTERIOLÓGICA DE
PALETAS HELADAS ELABORADAS EN EL AREA
METROPOLITANA DE LA CIUDAD DE MÉXICO**

JURADO:

Dra. Ma. del Rosario Sánchez Rodríguez
M. en C. Saul Flores Maya
Q.F.B. Patricia del Carmen Memije Neri
BIOL. Graciela Molina González
M. en C. Agustín Ruiz Cabrera.

ASESOR DE TESIS

M. en C. Angel Durán Díaz
Dr. Víctor Olvera Viascán

El presente trabajo de tesis se inició en el laboratorio de microbiología del Centro de Investigación y Entrenamiento para el Control de la Calidad del Agua (CIECCA), agradeciendo de antemano el apoyo recibido por:

M. en C. Claudia Sotomayor Garza, Jefe de Proyecto de la Red Nacional de Laboratorios.

La conclusión se efectuó en el laboratorio de microbiología del Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA), agradeciendo las facilidades otorgadas por parte de :

M. en C. Juana Cortés Muñoz y un reconocimiento, Responsable del Area

Y un reconocimiento especial a:

Q.F.B. Victoria Navarrete López, Jefe del laboratorio de Calidad del Agua y Responsable del Aseguramiento de Calidad, por el apoyo desinteresado y su amistosa insistencia en la conclusión del presente trabajo.

El análisis estadístico se efectuó en la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala (ENEP-I) UNAM, agradeciendo de antemano la asesoría recibida por parte de:

M. en C. Angel Durán Díaz

De igual forma se reconoce el apoyo y sobre todo las aportaciones profesionales recibidas en la elaboración del presente trabajo a:

I. A. Armida Arevila. Ramirez y I.Q. Judith G. Ramos Hernández del Instituto de Ingeniería de la UNAM.

En toda obra existe una trama compleja y sostenida de agradecimientos para aquellos que de forma desinteresada participaron directa o indirectamente en su realización.

Gracias a todos.

Con respeto a:

Rosa María, Carolina, Jorge y Miguel Maya.

Por su apoyo sobre todo en las desavenencias.

De forma especial a:

Angélica, David Antonio y José Antonio Roman.

Por la ayuda y motivación desinteresada que me brindaron cuando más la necesite.

Mis amigos

Juana Parada

Gracias por la riqueza de tu amistad y compañerismo.

Maribel Pulido

**Gracias por tu amistad y apoyo en la
elaboración del presente trabajo**

Teodora Rosas

Gracias por tu amistad, respeto y sinceridad en todos los momentos vividos a lo largo de la carrera, y en especial por el tiempo brindado para la conclusión de éste trabajo.

Neige Gentier

Pour qui j' éprouverai toujours une secrète admiration, pour son amitié, son optimisme, sa confiance et simplement pour le plaisir de sa compagnie.

Dedicatoria especial :

Que sin ser el momento más propicio en tu estado de ánimo, me auxiliaste en todas y cada una de las etapas que el presente trabajo requirió. Sacrificando tiempo y esfuerzo, sin el menor reclamo y soportando en ocasiones mi mal carácter.

Patricia del Carmen Memije

Recibe el presente agradecimiento con amor, respeto y admiración.

Reconocimiento Especial :

Por su apoyo y ayuda a través de mi formación. Por que les debo todo lo bueno, y en parte un poco, lo malo que soy. Fueron los cimientos académicos y el trampolín en mi deseo de superación. El presente trabajo es parte integral de ellas y mío.

María de los Angeles y Baetríz Maya

Mil gracias por el apoyo incondicional y el respeto mis ideas y decisiones.

INDICE

PAG.

	RESUMEN	a
I	INTRODUCCION	1
II	ANTECEDENTES	2
1	Generalidades	4
	1.1 Enfermedades diarreicas	4
	1.2 Enterobacterias	5
	1.3 Indicadores bacteriológicos de contaminación	7
	1.3.1 Coliformes totales	8
	1.3.2 Coliformes fecales	9
	1.4 <i>Vibrio cholerae</i>	9
III	OBJETIVOS	11
	1.1 Objetivos particulares	11
IV	METODOLOGIA	12
	1.1 Sitios de muestreo	12
	1.2 Procedimientos de muestreo	12
	1.3 Muestras compuestas	13
2	Procedimiento	15
	2.1 Determinación de coliformes totales y coliformes fecales por la técnica del número más probable (NMP)	15
	2.2 Aislamiento e identificación de enterobacterias por tres técnicas	17
	2.2.1 Identificación por cuatro medios diferenciales	18
	2.2.2 Técnica del IMViC	18
	2.2.3.. Técnica API 20 E	19
3	Aislamiento de <i>Vibrio cholerae</i>	23
	3.1 Técnica tradicional doble enriquecimiento	23
	3.2 Técnica API 20 E	23
4	Análisis estadístico	25
V	RESULTADOS	26
1	Resultados de coliformes totales y coliformes fecales por la técnica del número más probable (NMP)	26
2	Resultados de la identificación de enterobacterias	38
3	Resultados de la comparación de la calidad bacteriológica de paletas heladas de agua de marca registrada	44
4	Resultados del aislamiento de <i>Vibrio cholerae</i> O1 en paletas heladas de agua	46

	INDICE	PAG.
VI	DISCUSION	48
VII	CONCLUSIONES	55
VIII	RECOMENDACIONES	59
1	La higiene personal	61
2	En el área de trabajo	62
3	Los equipos y utensilios	63
IX	BIBLIOGRAFIA	64
ANEXO 1	Descripción de las técnicas utilizadas en la determinación de la calidad bacteriológica	71
ANEXO 2	Preparación de medios de cultivos y soluciones	97
ANEXO 3	Tablas de resultados de coliformes totales y coliformes fecales (NMP/ 100 mL) de los seis sabores de paletas heladas de agua	117
ANEXO 4	Solicitud de certificación y resultados de 64 cepas de enterobacterias aisladas e identificadas en los seis diferentes sabores de paletas heladas de agua, por parte del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencias Epidemiológicos “ Dr. Manuel Martínez Báez” (INDRE) de la Secretaría de Salud.	121

INDICE DE TABLAS		PAG.
TABLA 1	Géneros integrantes de la familia Enterobacteriaceae	7
TABLA 2	Estudio bacteriológico de paletas heladas de agua en el área Metropolitana de la ciudad de México	13
TABLA 3	Resultados del logaritmo de NMP/ 100 mL de coliformes totales y coliformes fecales para la zona Centro	27
TABLA 4	Resultados del logaritmo de NMP/ 100 mL de coliformes totales y coliformes fecales para la zona Sur	28
TABLA 5	Resultados del logaritmo de NMP/ 100 mL de coliformes totales y coliformes fecales para la zona Oeste	29
TABLA 6	Resultados de la distribución de la frecuencia de NMP de coliformes totales y coliformes fecales, de la población de los seis sabores de muestras compuestas de paletas analizadas	36
TABLA 7	Resultados de enterobacterias identificadas por las tres técnicas utilizadas	38
TABLA 8	Resultados de presencia-ausencia de <i>Enterobacter cloacae</i> identificada a partir de la población de muestras compuestas de paletas en los seis diferentes sabores analizados	40
TABLA 9	Resultados de presencia-ausencia de <i>Escherichia coli</i> identificada a partir de la población de muestras compuestas de paletas en los seis diferentes sabores analizados	40
TABLA 10	Resultados de presencia-ausencia de <i>Proteus mirabilis</i> identificada a partir de la población de muestras compuestas de paletas en los seis diferentes sabores analizados	41
TABLA 11	Resultados de presencia-ausencia de <i>Klebsiella pneumoniae</i> identificada a partir de la población de muestras compuestas de paletas en los seis diferentes sabores analizados	41
TABLA 12	Resultados de presencia-ausencia de <i>Klebsiella oxytoca</i> identificada a partir de la población de muestras compuestas de paletas en los seis diferentes sabores analizados	42
TABLA 13	Resultados de presencia-ausencia de <i>Enterobacter aerogenes</i> identificada a partir de la población de muestras compuestas de paletas en los seis diferentes sabores analizados	42
TABLA 14	Resultados de los valores de NMP de coliformes totales y coliformes fecales en muestras compuestas de paletas de agua de dos marcas registradas	44
TABLA 15	Resultados de la comparación de costos y requerimientos de las tres técnicas para identificación de enterobacterias a partir de 10 muestras	45
TABLA 16	Resultados del aislamiento de <i>Vibrio cholerae</i> O1 en paletas heladas	46
TABLA 17	Resultados del aislamiento de <i>Vibrio cholerae</i> O1, posterior a la inoculación de las paletas heladas con la cepa de <i>Vibrio cholerae</i> el TOR ATCC 14033.	47

INDICE DE FIGURAS		PAG.
FIGURA 1	Esquema de las zonas de muestreo	14
FIGURA 2	Esquema de la técnica del número más probable (NMP)	16
FIGURA 3	Esquema de la técnica de cuatro medios diferenciales	20
FIGURA 4	Esquema de la técnica IMViC	21
FIGURA 5	Esquema de la técnica API 20 E	22
FIGURA 6	Esquema de la técnica tradicional (doble enriquecimiento) para el aislamiento de <i>Vibrio cholerae</i>	24
FIGURA 7	Relación entre sabor y medias (en expresión logarítmica) de NMP de coliformes totales y coliformes fecales de paletas heladas analizadas en la zona Centro	30
FIGURA 8	Relación entre sabor y medias (en expresión logarítmica) de NMP de coliformes totales y coliformes fecales de paletas heladas analizadas en la zona Sur	31
FIGURA 9	Relación entre sabor y medias (en expresión logarítmica) de NMP de coliformes totales y coliformes fecales de paletas heladas analizadas en la zona Oeste	32
FIGURA 10	Relación entre los valores (en expresión logarítmica) de NMP coliformes fecales en los seis sabores de paletas heladas analizadas y los meses de muestreo correspondiente a la zona Centro	33
FIGURA 11	Relación entre los valores (en expresión logarítmica) de NMP coliformes fecales en los seis sabores de paletas heladas analizadas y los meses de muestreo correspondiente a la zona Sur	34
FIGURA 12	Relación entre los valores (en expresión logarítmica) de NMP coliformes fecales en los seis sabores de paletas heladas analizadas y los meses de muestreo correspondiente a la zona Oeste	35
FIGURA 13	Distribución de frecuencias de NMP de coliformes totales y coliformes fecales a partir de la población de paletas heladas analizadas	37
FIGURA 16	Porcentaje de enterobacterias identificadas a partir de la población de paletas heladas analizadas	43

RESUMEN

Limitados estudios indican la existencia de una contaminación de origen fecal en aguas frescas, frutas rebanadas, nieves y paletas de hielo. Lo anterior sugiere condiciones deplorables de higiene en el expendio y manipulación de frutas, problemas en la producción, transportación, almacenamiento y expendio de tales productos, así como la nula inspección sanitaria.

El presente estudio evaluó la calidad microbiológica de las paletas heladas de agua, producto de gran consumo sobre todo en la población infantil, agrupándolos en paletas sin marca y de marca registrada. Se seleccionaron tres zonas representativas del área Metropolitana de la ciudad de México. Se muestrearon seis diferentes sabores: Arroz, Coco, Fresa, Guayaba, Mango y Zarzamora. Dicho muestreo se realizó en meses fríos y calurosos.

Se efectuó el análisis de un total de 124 muestras compuestas de paletas sin marca registrada, obteniendo resultados desde 10^2 hasta 10^9 NMP/100 mL de coliformes totales y de coliformes fecales, sobre todo en aquellos sabores cuyo pH fue mayor de 5. Se aislaron e identificaron por tres técnicas diferentes las enterobacterias: *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca* y *Enterobacter aerogenes*.

En el caso de las marcas registradas los coliformes fecales presentaron valores de >2 , lo que indica un control de calidad de los productos.

La ausencia presuntiva de bacterias patógenas como *Salmonella*, *Shigella* ó *Vibrio cholerae*, debe considerarse para técnicas más específicas, como las de fluorescencia. La alta tasa de contaminación de tipo fecal, indica la posibilidad de competencia entre los organismos o bien de condiciones especiales en que las bacterias puedan ser viables pero no cultivables.

Las paletas heladas de agua consumidas en el área Metropolitana de la ciudad de México no cuentan con las mínimas medidas de control de calidad al sobrepasar los límites permisibles, sobre todo en época de calor y en los sabores de coco, mango, arroz y guayaba, donde se obtienen los mayores niveles de contaminación fecal.

Es importante llevar un control de calidad en cada uno de los pasos del proceso incluyendo desde la selección de la materia prima, elaboración, almacenamiento, expendio y consumo. Las autoridades encargadas deben efectuar monitoreos continuos para evitar las pésimas condiciones de las instalaciones y asegurar que el producto sea de calidad aceptable.

I INTRODUCCION

Las principales causas de enfermedades entéricas en el hombre son los microorganismos patógenos y el mecanismo más común de transmisión es a través del agua potable contaminada, ya sea por excrementos humanos o de animales, no sólo en forma directa, sino también por la elaboración de alimentos, cuyo consumo origina las infecciones intestinales (Biagi, 1992; CEPIS, 1990; 1981; INDRE, 1993). La alta probabilidad con la que el agua potable se puede contaminar, crea un amplio margen de distribución de enfermedades, que ponen en riesgo la salud y bienestar de la población, la cual depende en forma primordial tanto de la cantidad como de la calidad del agua utilizada (Feachem y colaboradores, 1983).

Dentro de los microorganismos patógenos, las bacterias entéricas transmitidas por agua contaminada son la mayor fuente de morbimortalidad. Durante el período comprendido entre 1986 a 1990, ocasionaron el 53.2 % en brotes de enfermedad a nivel mundial, por alimentos contaminados. Los alimentos involucrados fueron: agua (productos derivados), leche, pollo, jamón, queso, entre otros. Se estima que la mitad de la población mundial ha sufrido alguna infección y que alrededor de 10 millones mueren anualmente por dicha causa (McFeters y Singh, 1991).

En la República Mexicana y de acuerdo a estudios de la Escuela Nacional de Salud (ENS 1988), se estima que ocurren en promedio 115 millones de eventos diarreicos al año, presentando una incidencia anual en menores de cinco años de 4 episodios diarreicos al año (Giono y colaboradores, 1993)

Las enfermedades gastrointestinales provocadas por la ingestión de agua y alimentos contaminados constituyen una de las principales causas de mortandad. El número de muertes por diarrea para 1990 fue de 22,196, la tasa por 100,000 habitantes fue de 26.2 %

representando al 5.2 % del total de defunciones registradas en el país (Giono y colaboradores, 1993)

Todo ello y con un mayor riesgo por la escasa disponibilidad de agua, disposición inadecuada de excretas y otras variables de la vivienda, así como también el número de cultivos no restringidos regados con aguas negras no tratadas, que es una práctica común, explica la gravedad de la situación (Biagi, 1992).

II ANTECEDENTES

El hábito en el hombre de consumir bebidas frías y aún heladas, se observa desde Ateneo (filósofo griego), quien pide nieve del monte Olimpo para refrescar el vino. Tanto los romanos como los griegos tenían subterráneos donde guardaban el hielo para el verano y enviaban a sus corredores a las montañas a recogerla. Séneca, criticaba a las damas romanas que masticaban hielo o nieve. Fue hasta el siglo XV cuando Bernardo Buentalenti logró producir artificialmente el primer sorbete, extendiéndose su consumo de Italia al resto de Europa y más tarde a todo el mundo (Arroyo, 1984).

Este tipo de productos constituyen un alimento nutritivo por sus componentes, sin embargo se encuentran contaminados con gérmenes causantes de diversas enfermedades según resultados reportados en el estudio efectuado en 1945 por Gómez G. L., en nieves de la zona metropolitana de la ciudad de México (Arroyo, 1984).

El Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional del Consumidor (INCO), realizó un estudio sobre la calidad sanitaria de frutas, nieves, raspados, paletas de agua y aguas frescas, que se distribuyen en el área metropolitana y en los cuales se observó una marcada contaminación de origen fecal. Los resultados indicaron que el 60 % de las muestras

contenían coliformes, el 37 % contenían coliformes fecales. Así mismo el 47 % de los alimentos contaminados correspondieron a aguas frescas, el 36 % a frutas rebanadas, el 18 % a nieves y un porcentaje menor a paletas de agua (Kuramura, 1985).

Además de la presencia de coliformes de origen fecal se aisló *Salmonella* en el caso de la fruta rebanada, lo cual representa un grave peligro para la población que ingiera este tipo de productos, ya sea por una grave infección intestinal (salmonelosis), o diarreas agudas y colitis (Kuramura, 1985).

Por otra parte, las frutas utilizadas en la preparación de estos productos son expeditas en condiciones higiénicas deplorables, encontrándose en el suelo o en carretillas y que constantemente son “humedecidas” con agua de dudosa procedencia, lo que incrementa su contaminación. Artega y colaboradores (1980), realizaron un estudio sobre la contaminación fecal de frutas y verduras de mercados de la ciudad de México, encontrando altos porcentajes de coliformes, así como la presencia de *Proteus* y *Salmonella*.

Tales productos contribuyen con su alta carga bacteriana, en caso de no recibir ningún tratamiento de desinfección, a la contaminación final, ocurriendo alteraciones importantes antes y durante la mezcla, cuando el producto se encuentra listo para su almacenamiento en congelación (SSA, 1989).

Además, el incremento de la temperatura facilita la contaminación de los alimentos y dificulta la práctica de ciertas medidas higiénicas al escasear el agua. Durante la época de calor (abril, mayo y junio), en el Instituto Nacional de Pediatría, se atienden alrededor de 60 niños por diarreas infecciosas, mientras que normalmente se atienden de 25 a 30 casos (Arroyo, 1983).

Diversos estudios del Laboratorio de Fundación de Chile, han demostrado las condiciones higiénicas deplorables en la preparación y distribución de nieves, helados y paletas heladas, comparando entre helados artesanales y helados industriales, los primeros son más concentrados y nutritivos que los segundos, pero también son más caros y menos higiénicos. Los problemas de higiene son como resultado de la manipulación y el deplorable lavado de máquinas. La nula inspección sanitaria, explica las condiciones lamentables en las que se encuentran los establecimientos (Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción, 1991).

Abbar y Kaddar en 1991, efectuaron un estudio de productos derivados de la leche (queso y mantequilla), cuya preparación incluía hervir el lácteo durante 10 - 15 minutos a 100 °C, y donde el expendio se realizaba el mismo día o a más tardar un día después su elaboración. Se efectuó la cuantificación de coliformes fecales encontrando niveles de entre $10^2/g$ y $> 10^6/g$ en el 72.5 % del total de muestras analizadas, además se aisló *Escherichia coli* Enteropatógena.

La alta carga observada de coliformes fecales en las muestras procesadas puede deberse al manejo subsecuente, o fallas en la limpieza y en la esterilidad del equipo y material. Todo ello reafirma la necesidad de adoptar estrictas o rigurosas medidas de higiene en la producción, transportación, almacenamiento y expendio de tales productos

1 Generalidades

1.1 Enfermedades diarreicas

Se entiende por fecalismo la ingestión de alimentos infectados con materia fecal, así como la práctica de la deposición de heces humanas y de animales, al ras del suelo, que proveen de un alto contenido de contaminantes al ser arrastradas por el agua de lluvia. Además y en relación

a los alimentos preparados por medio de manipulación directa, son los que más fácilmente adquieren un sin fin de agentes biológicos o bióticos que provienen directamente del suelo y del agua durante su cultivo y riego respectivamente. (Arteaga y colaboradores, 1980).

Una enfermedad diarreica se caracteriza por evacuaciones frecuentes de heces anormales, blancas o líquidas, que contienen más agua de lo normal, la diarrea agrava la desnutrición por cuatro mecanismos (Giono y colaboradores, 1993):

- 1) Disminución de la ingesta de alimentos por vómito, fiebre, deshidratación, dispepsia.
- 2) Mal absorción de azúcares, grasas, proteínas, vitaminas y minerales.
- 3) Alteraciones metabólicas y
- 4) Pérdidas directas, lo que a su vez ocasiona otras alteraciones.

Los alimentos son buen sustrato para las Enterobacterias, así como para *Vibrio cholerae*, lo que se origina principalmente por (CEPIS, 1990 y Feachem y colaboradores, 1983):

- ☞ Irrigación de cultivos con aguas residuales crudas o parcialmente tratadas.
- ☞ Frutas o verduras que han sido lavadas con agua sucia o que durante su manejo fueron contaminadas.
- ☞ Toda clase de alimentos y bebidas cuya preparación implique el uso de agua de consumo contaminada desde la fuente o durante el manejo y almacenamiento.

1.2 Enterobacterias

Entre las bacterias de mayor frecuencia y causantes de gastroenteritis se encuentra la familia Enterobacteriaceae, que se definen como conjunto de bacilos gram negativos, heterogéneos en cuanto a su habitat y su capacidad patógena, móviles con flagelos peritricos o inmóviles, no

esporulados, aerobios y anaerobios facultativos y oxidasa negativa. Tienen la capacidad de reducir nitratos a nitritos (Burrows,1984; Jawetz y colaboradores, 1992; Joklik y colaboradores, 1992).

Son organismos que se encuentran habitando suelo, agua, lodos, materia en descomposición, diversos productos alimenticios, así como el tracto digestivo y urinario del hombre, su tamaño oscila entre 0.3 a 2 μm . Si bien algunos forman parte de la flora normal del intestino, otros son patógenos ampliamente reconocidos como *Escherichia* enteropatógena, *Klebsiella*, *Shigella*, *Salmonella* y *Yersinia* (TABLA 1), causando infecciones en los aparatos gastrointestinal y urinario (Burrows, 1984; Perea, 1992).

Las bacterias coliformes constituyen una gran parte de la flora normal aerobia del intestino y pueden incluso contribuir al funcionamiento normal y a la nutrición, sin embargo se transforman en patógenos cuando alcanzan tejidos u órgano susceptible fuera del intestino, en especial las vías urinarias, las vías biliares, los pulmones, el peritoneo o las meninges provocando inflamaciones (Burrows, 1984).

Cuando las defensas son inadecuadas (particularmente en lactantes y ancianos), las bacterias coliformes pueden alcanzar la corriente sanguínea y provocar septicemias (Jawetz y colaboradores, 1992).

TABLA 1: GENEROS INTEGRANTES DE LA FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE

GENEROS	PATOGENICIDAD
<i>Escherichia</i>	Habitantes intestinales: gastroenteritis
<i>Edwardsiella</i>	Diarreas humanas ocasionales
<i>Citrobacter</i>	Habitante normal del intestino
<i>Salmonella</i>	Fiebre tifoidea: gastroenteritis por <i>Salmonella</i>
<i>Shigella</i>	Bacilos de la disentería
<i>Klebsiella</i>	Neumonía en el hombre
<i>Enterobacter</i>	Habitante normal del intestino
<i>Hafnia</i>	Habitante normal del intestino
<i>Serratia</i>	Formas de vida libre
<i>Proteus</i>	Habitante intestinal, ocasionalmente patógeno para el hombre
<i>Yersinia</i>	Bacilo de la peste

Tomado de: Burrows, 1984

1.3 Indicadores bacteriológicos de contaminación

Un buen indicador bacteriológico de contaminación se caracteriza por (Feachem y colaboradores, 1983):

- ☞ Indicar que ha ocurrido un tipo de contaminación y en ocasiones sugerir su origen.
- ☞ Estar presente cuando existan bacterias patógenas de origen fecal.
- ☞ Estar directamente relacionada con el grado de contaminación fecal.
- ☞ Presentar un tiempo de sobrevivencia mayor que la de los patógenos entéricos.

- ☞ Desaparecer junto con los patógenos una vez realizado el tratamiento de desinfección.
- ☞ Ser determinados cuantitativamente en forma rutinaria sin interferencia de otras bacterias

Los indicadores de contaminación fecal de agua más ampliamente utilizados son los coliformes totales y fecales. Sin embargo, la técnica de cuantificación de coliformes totales incluye equivocadamente a los miembros no coliformes de la familia Enterobacteriaceae (Feachem y colaboradores, 1983).

Se sugiere utilizar la técnica de coliformes fecales en lugar de la de los coliformes totales, para evaluar una contaminación de tipo fecal, siendo mucho más específica en la detección de *Escherichia coli* (Lavoie, 1983).

1.3.1 *Coliformes totales*

Los coliformes totales tienen poco significado sanitario debido a que algunos miembros se encuentran distribuidos en la naturaleza en comparación a su presencia en el intestino humano y de animales de sangre caliente. Son muy útiles para la evaluación de procesos de tratamiento, potabilización y desinfección del agua (Lavoie, 1983).

Los coliformes totales son bacilos cortos gram negativos, aerobios y anaerobios facultativos, capaces de fermentar lactosa con producción de ácido y gas en 24 horas a 35 ± 0.5 °C. El grupo incluye los géneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella* (Giono y colaboradores, 1993).

1.3.2.- *Coliformes fecales*

Los coliformes fecales son bacilos cortos gram negativos, aerobios y anaerobios facultativos capaces de fermentar lactosa con producción de ácido y gas en 24 horas a 44.5 ± 0.2 °C. El principal representante es *Escherichia* y algunas cepas de *Klebsiella* (Lavoie, 1983; SECOFI, 1987)

1.4 *Vibrio cholerae*

Otro microorganismo de importancia médica es la bacteria *Vibrio cholerae* O1 que ocasiona la enfermedad del cólera, infección intestinal aguda, grave e invasiva. *V. cholerae* pertenece a la familia Vibrionaceae (CETESB, 1991; INDRE, 1993).

El género *Vibrio* comprende bacilos gram negativos que miden de 0.5 mm a 0.8 mm de diámetro por 1.4 - 2.6 mm de largo, son móviles por flagelos polares, anaerobios facultativos, poseen ambos metabolismos, respiratorio y fermentativo, no fijan ni desnitrifican el nitrógeno, son quimiorganótrofos, muchos son capaces de crecer en un medio mineral conteniendo D-glucosa (cuya fermentación produce ácido pero no gas) y NH_4Cl , además utilizan D-fructosa, maltosa y glicerol. (Giono y colaboradores, 1993).

Vibrio cholerae presenta resistencia a diversos factores ambientales (Dhiman y Greenough 1992):

- Soporta temperaturas menores de -32 °C
- Se mantiene viable completamente congelado durante 20 días
- Puede estar sujeto a repetidos congelamientos y descongelamientos
- Resiste en aguas superficiales, de 1 a 13 días
- En heces hasta 17 horas
- En aguas residuales a 37 °C, cuando más 24 horas
- En el suelo hasta 2 meses
- En especies acuáticas, de 1 a 40 días
- En alimentos, de 1 a 10 días
- En el intestino de moscas, de 4 a 5 días
- Sobrevive en un rango de 5.6 a 9.6 de pH, con niveles óptimos de 7.6 a 8.6.
- A un pH de 6.0 los vibriones mueren en períodos cortos de tiempo.

La transmisión de las infecciones gastrointestinales está asociado al nivel de saneamiento y al desarrollo socioeconómico. Es relevante planear acciones de control, formular nuevas estrategias de intervención. Mientras exista fecalismo y basureros al aire libre, y no haya un manejo higiénico de los alimentos, las enfermedades gastrointestinales seguirán apareciendo entre los 10 padecimientos que están propiciando el mayor número de mortalidad (Tay y colaboradores, 1991).

III OBJETIVO

Evaluar la calidad bacteriológica de paletas heladas de agua elaboradas en el área metropolitana de la ciudad de México.

1.1 Objetivos particulares

- ☞ Determinar bacterias del grupo coliforme total y del grupo coliforme fecal en paletas heladas de agua, cuantificándolas por la técnica del Número Más Probable (NMP).
- ☞ Aislar algunos géneros de la familia Enterobacteriaceae, comparando tres diferentes técnicas para su identificación.
- ☞ Comparar la calidad bacteriológica de paletas heladas de agua de marcas populares contra paletas heladas de agua de marca registrada.
- ☞ Aislar *Vibrio cholerae* O1 en paletas heladas de agua, por el método de doble enriquecimiento en agua peptonada alcalina (APA) e identificarlo por la técnica de API- 20E.
- ☞ Confirmar que las técnicas son repetitivas y válidas para los productos en cuya elaboración interviene agua.

IV METODOLOGIA

1.1 Sitios de muestreo

Se seleccionaron aleatoriamente tres zonas representativas del área metropolitana de la ciudad de México (FIG. 1), que distribuyeran paletas heladas de agua a comercios menores y/o a vendedores ambulantes, correspondiendo a:

- I. Zona Centro: incluyó a los municipios de Gustavo A. Madero y Naucalpan. Se efectuaron 8 muestreos de paletas para cada uno de los seis sabores. Los meses de muestreo fueron de mayo a septiembre de 1993.
- II. Zona Sur: constituida por la delegación de Xochimilco. Se realizaron 8 muestreos para cada uno de los seis sabores. Los meses de muestreo fueron de noviembre de 1994 a junio de 1995.
- III. Zona Oeste: constituida por la delegación de Cuajimalpa. Se efectuaron 6 muestreos de cada uno de los seis sabores. Los meses de muestreo fueron de junio a diciembre de 1995.

1.2 Procedimiento de muestreo

Se muestrearon paletas de agua de cinco frutas naturales que se consumen o se procesan crudas y de un cereal, que requiere cocción durante la elaboración del producto. Los seis sabores seleccionados fueron:

- Arroz (A)
- Coco (C)

- Fresa (F)
- Guayaba (G)
- Mango (M)
- Zarzamora (Z)

El número de muestreos por zonas, y el total se observan en la TABLA 2.

TABLA 2: ESTUDIO BACTERIOLOGICO DE PALETAS HELADAS DE AGUA EN EL AREA METROPOLITANA DE LA CIUDAD DE MEXICO

ZONAS SELECCIONADAS PARA LOS MUESTREOS	NUMERO DE MUESTREOS REALIZADOS POR SABOR						TOTAL DE MUESTRAS COMPUESTAS ANALIZADAS
	ARROZ	COCO	FRESA	GUAYABA	MANGO	ZARZAMORA	
ZONA CENTRO	8	8	6	8	7	8	45
ZONA SUR	8	8	8	8	8	7	47
ZONA OESTE	6	6	5	6	4	5	32
TOTAL	22	22	19	22	19	20	124

Se efectuaron cuatro muestreos de paletas de agua de dos diferentes sabores: Mango (M) y Fresa (F), de las marcas registradas que denominaremos "B" y "H". De los seis seleccionados inicialmente, se analizaron solo 2 sabores, por ser los únicos que se elaboran regularmente en dichas marcas.

1.3 Muestras compuestas

Para conformar una muestra compuesta se recolectaron por separado en bolsas de polietileno esterilizadas con luz ultravioleta (UV), cinco paletas de cada uno de los seis diferentes sabores. Los muestreos se efectuaron el mismo día o un día antes de iniciar el análisis manteniéndolas congeladas hasta su procesamiento.

FIGURA 1: ESQUEMA DE LAS ZONAS DE MUESTREO

AREA METROPOLITANA DE LA CIUDAD DE MEXICO

(INEGI 1990)

Delegaciones Políticas del Distrito Federal

Clave	Nombre
002	Azcapotzalco
003	Coyoacan
004	Cuajimalpa (ZONA III)
005	Gustavo A. Madero (ZONA D)
006	Iztacalco
007	Iztapalapa
008	Magdalena Contreras, La
009	Milpa alta
010	Alvaro Obregón
011	Tlahuac
012	Tlalpan
013	Xochimilco (ZONA II)
014	Benito Juárez
015	Cuauhtémoc
016	Miguel Hidalgo
017	Venustiano Carranza

Municipios Conurbados del Estado de México

002	Acolman	059	Nextlalpan
011	Atenco	060	Nicolas Romero
013	Atizapan de Zaragoza	070	Paz, La
020	Coacalco	081	Tecamac
024	Cuautitlan	091	Teoloyucan
025	Chalco	095	Tepotzotlan
029	Chicoloapan	099	Texcoco
031	Chimalhuacan	104	Tlalnepantla
033	Ecatepec	108	Tultepec
037	Huixquilucan	109	Tultitlan
039	Ixtapaluca	120	Zumpango
044	Jaltenco	121	Cuautitlan Izcalli
057	Naucalpan (ZONA I)		
058	Nezahualcoyotl		

ESTADO DE HIDALGO



Las muestras compuestas se dejaron descongelar, homogeneizaron y filtraron a través de gasa estéril para eliminar la pulpa de la fruta, y recolectar el filtrado en vasos de precipitado de 1 litro estériles, todo bajo condiciones de asepsia. El mismo procedimiento se efectuó para el muestreo de paletas de agua de marcas reconocidas.

2 Procedimiento

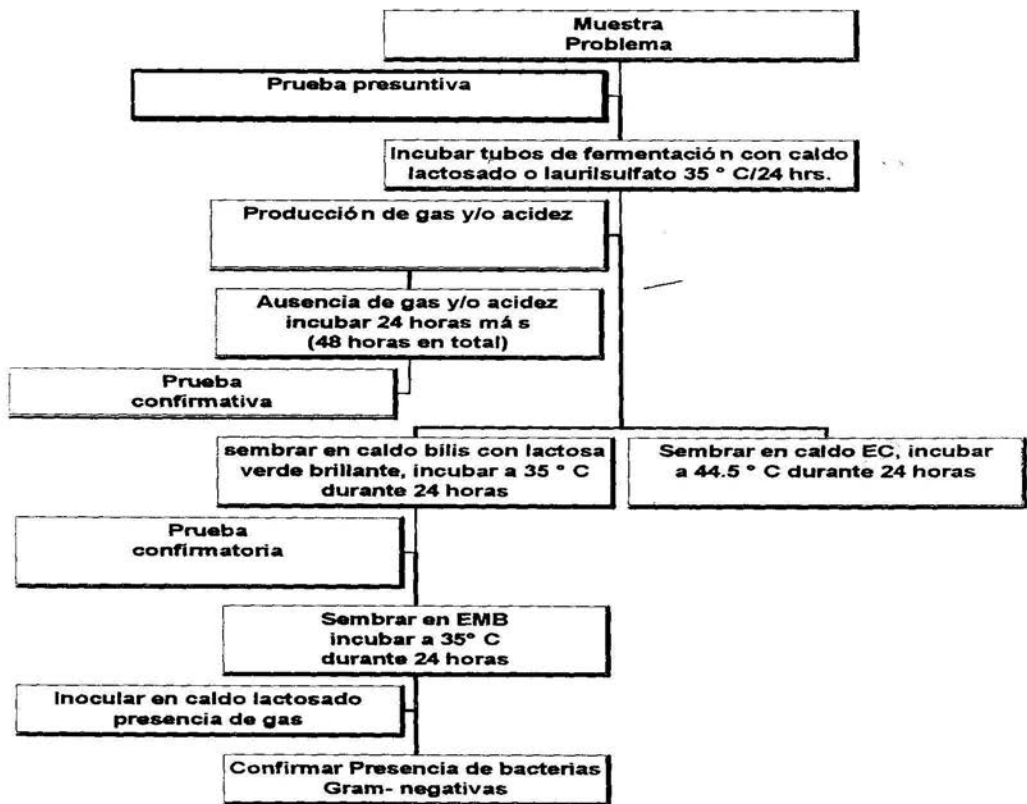
2.1 Determinación de coliformes totales y coliformes fecales por la técnica del número más probable (NMP). (APHA, 1992; CETESB, 1990; SECOFI, 1987).

Se empleó la técnica de NMP, que se basa en la inoculación de volúmenes decrecientes de la muestra en medio de cultivo adecuado en una serie de tubos. En donde a través de diluciones sucesivas de la muestra, los inóculos al sembrarse dan resultados negativos en por lo menos un tubo de la serie y la combinación de resultados negativos y positivos permite obtener una estimación de la densidad de bacterias obtenidas, mediante la aplicación de cálculos de probabilidad.

El desarrollo de la técnica completa presenta tres pruebas (ver ANEXO 1):

- a) La prueba presuntiva, inicialmente permite detectar la presencia de bacterias del grupo coliforme.
- b) La prueba confirmativa positiva disminuye la probabilidad de resultados falsos positivos, debido a la actividad de bacterias esporuladas y de bacterias gram positivas fermentadoras de la lactosa, indicando la presencia de bacterias del grupo coliforme total y fecal.
- c) La prueba confirmatoria, afirma la presencia de coliformes (FIG.2).

FIGURA 2: ESQUEMA DE LA TECNICA DEL NUMERO MAS PROBABLE (NMP)



2.2 Aislamiento e identificación de enterobacterias por tres técnicas

Para la identificación de género y especie de enterobacterias se aplicaron y compararon las siguientes tres técnicas:

- Técnica de identificación por cuatro medios diferenciales (INDRE, 1993 modificada).
- Técnica IMViC (APHA, 1992)
- Técnica API-20 E (Bio-Mérieux, 1993).

El aislamiento y selección de colonias se inició a partir de tubos positivos a las pruebas confirmativas de coliformes totales y fecales por la técnica del Número Más Probable (NMP), que tenían como máximo 24 horas después del proceso de incubación o 48 horas con refrigeración.

Para el caso de *Salmonella* se inoculó el caldo de tetrionato de Mueller o de Kauffman, utilizando un inóculo considerable de la muestra, y se incubó a 35 ± 0.5 °C de 12 a 18 horas (APHA, 1992).

Del caldo de tetrionato de Mueller o de Kauffmann, se sembraron dos placas de los medios inhibitorios correspondientes, verde brillante y sulfito de bismuto, por estría cruzada, y se incubaron durante 18 - 24 horas a 35 ± 0.5 °C (APHA, 1992).

Para la descripción completa de las técnicas ver ANEXO 1.

2.2.1.- Identificación por cuatro medios diferenciales (INDRE, 1993, modificada)

La identificación de las bacterias aisladas se realizó por las diferentes pruebas bioquímicas las cuales se manifiestan en los medios de cultivo que contienen substratos necesarios para su crecimiento, la presencia de ciertos compuestos generados por el metabolismo bacteriano y el cambio de pH en el medio de cultivo, que se evidencia por indicadores.

Para la identificación de las bacterias aisladas, en ésta técnica originalmente se utilizaban tres medios diferenciales, siendo necesario incluir un cuarto medio logrando con ello resultados más confiables y precisos, sobre todo en el caso de algunos géneros. Los cuatro medios recomendados para detectar la presencia de tales compuestos o propiedades son:

- Medio MIO: Movilidad, Indol, Ornitina
- Medio LIA: Lisina, Fierro (Lisyne Iron Agar)
- Medio TSI: Glucosa, Lactosa, Sacarosa, Fierro (Triple sugar Iron)
- Citrato de Simmons: Utilización del citrato como única fuente de carbono (FIG. 3).

2.2.2. Técnica del IMViC (APHA, 1992; Giono y colaboradores, 1993).

La técnica indica las pruebas señaladas por las siglas IMViC:

- Indol: producto del metabolismo bacteriano del triptofano
- Rojo de metilo: fermentación de la glucosa y producción del ácido láctico, acidificación del medio de cultivo que se manifiesta en el cambio de pH por el indicador del rojo de metilo.

- Voges Proskauer: detecta la presencia de acetoina, producto metabólico de determinadas bacterias coliformes en un medio de peptona glucosa y
- Citrato: detecta la capacidad de utilizar el citrato como única fuente de carbono.
(FIG. 4).

2.2.3.- Técnica API- 20 E (Bio-Mérieux, 1993).

El API-20E, es un sistema estandarizado de rápida identificación. Fue originalmente desarrollado para la identificación de bacterias Gram-negativas (bacterias entéricas), en laboratorios clínicos (Grisez y colaboradores, 1991).

El sistema miniaturizado API-20 E (Analytical Profile Index, 20 pruebas bioquímicas para Enterobacterias), se compone por tiras reactivas que permiten la identificación de las bacterias aisladas mediante 20 pruebas bioquímicas, más 6 pruebas complementarias, mediante la aplicación de una suspensión bacteriana a pequeñas galerías o depósitos que contienen los sustratos o indicadores deshidratados correspondientes a cada una de las pruebas bioquímicas.

Cada prueba bioquímica positiva o negativa compone un código, que se consulta en el catálogo o index del sistema, y permite la identificación de la bacteria aislada, género y especie (FIG. 5).

FIGURA 3: ESQUEMA DE LA TECNICA DE CUATRO MEDIOS DIFERENCIALES

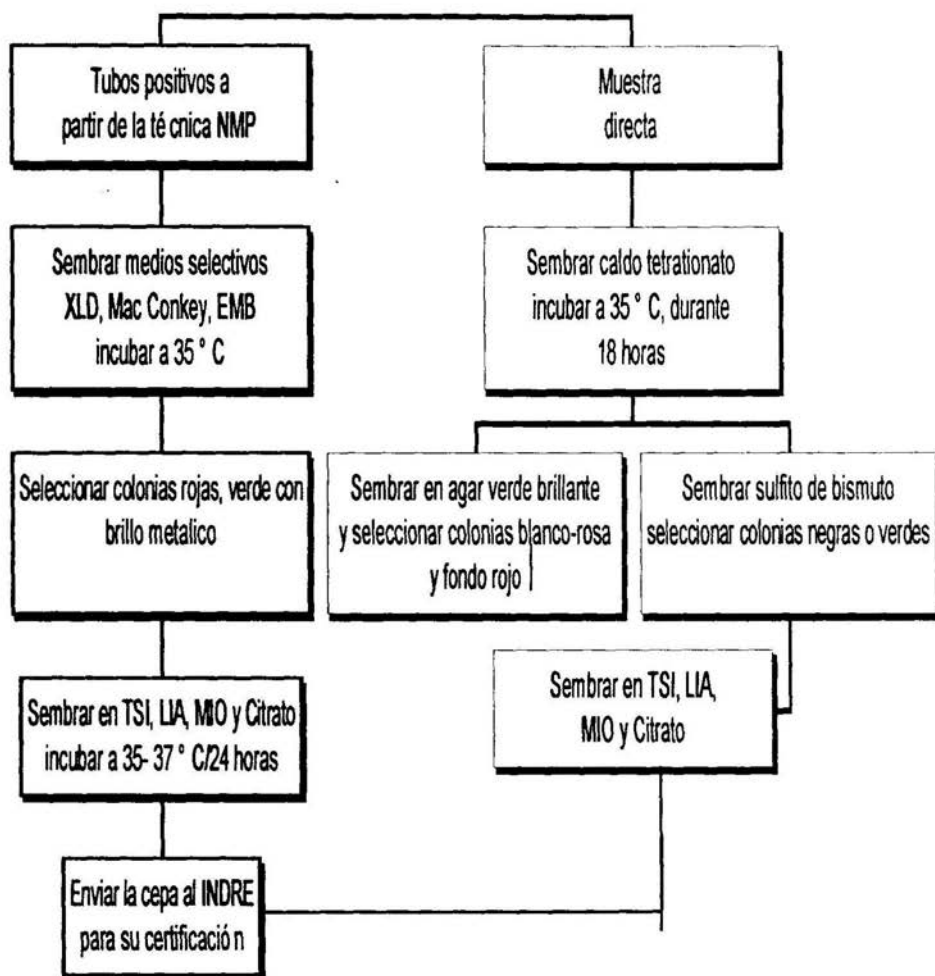


FIGURA 4: ESQUEMA DE LA TECNICA IMVIC

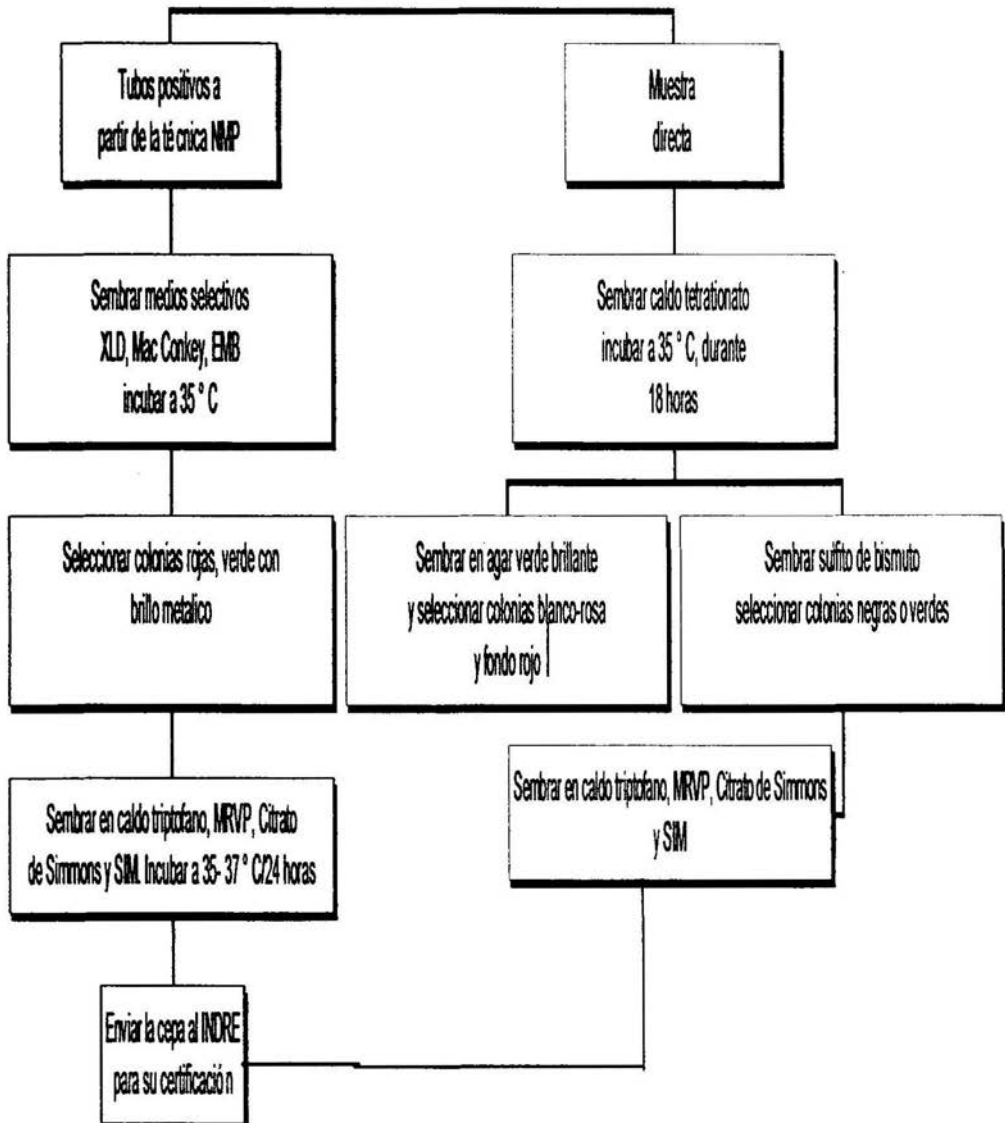
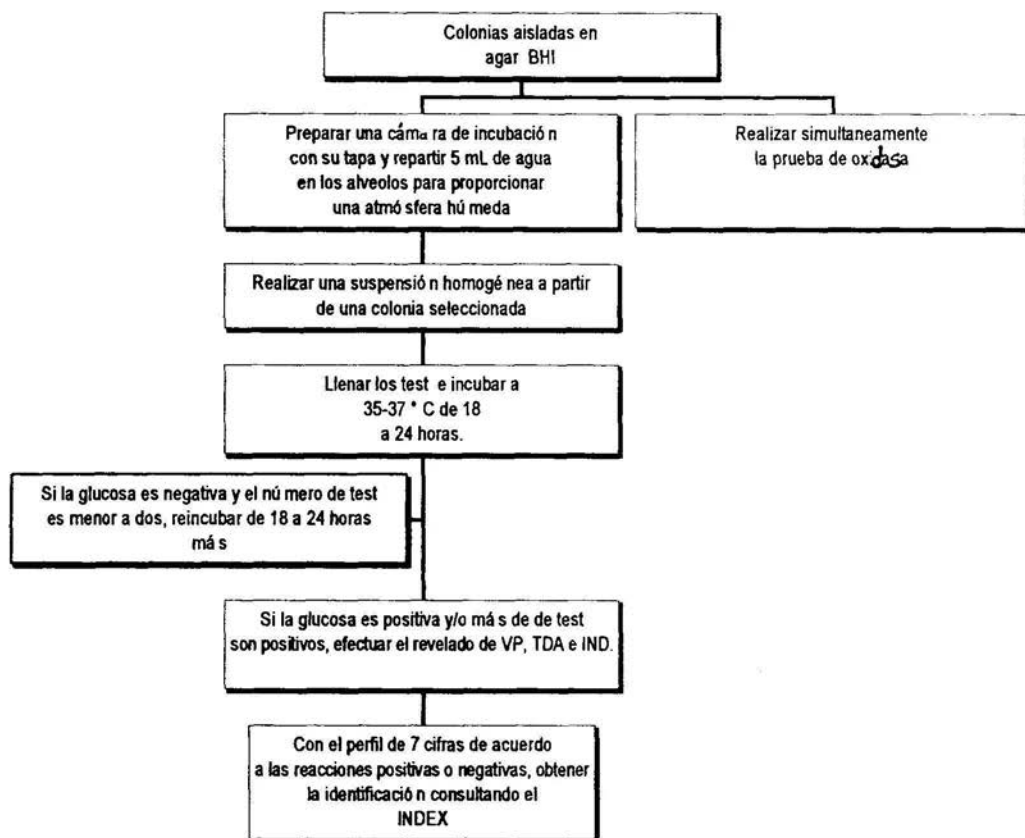


FIGURA 6 : ESQUEMA DE LA TECNICA API 20 E



3 Aislamiento de *Vibrio cholerae*

3.1 Técnica tradicional doble enriquecimiento (CETESB, 1991; Giono et al, 1991; IMTA, 1992; INDRE, 1991)

Para el caso de *Vibrio cholerae*, la técnica del doble enriquecimiento en agua peptonada, es uno de los métodos más efectivos para el aislamiento de la bacteria. El agua peptonada constituye un medio de enriquecimiento con las características adecuadas para el crecimiento de la bacteria, como la alcalinidad (FIG. 6).

Como control positivo, se realizaron paralelamente los procedimientos analíticos de las muestras, con una cepa certificada de *Vibrio cholerae* O1 El Tor ATCC 14033 .

3.2 Técnica API- 20 E (Bio-Mérieux, 1993).

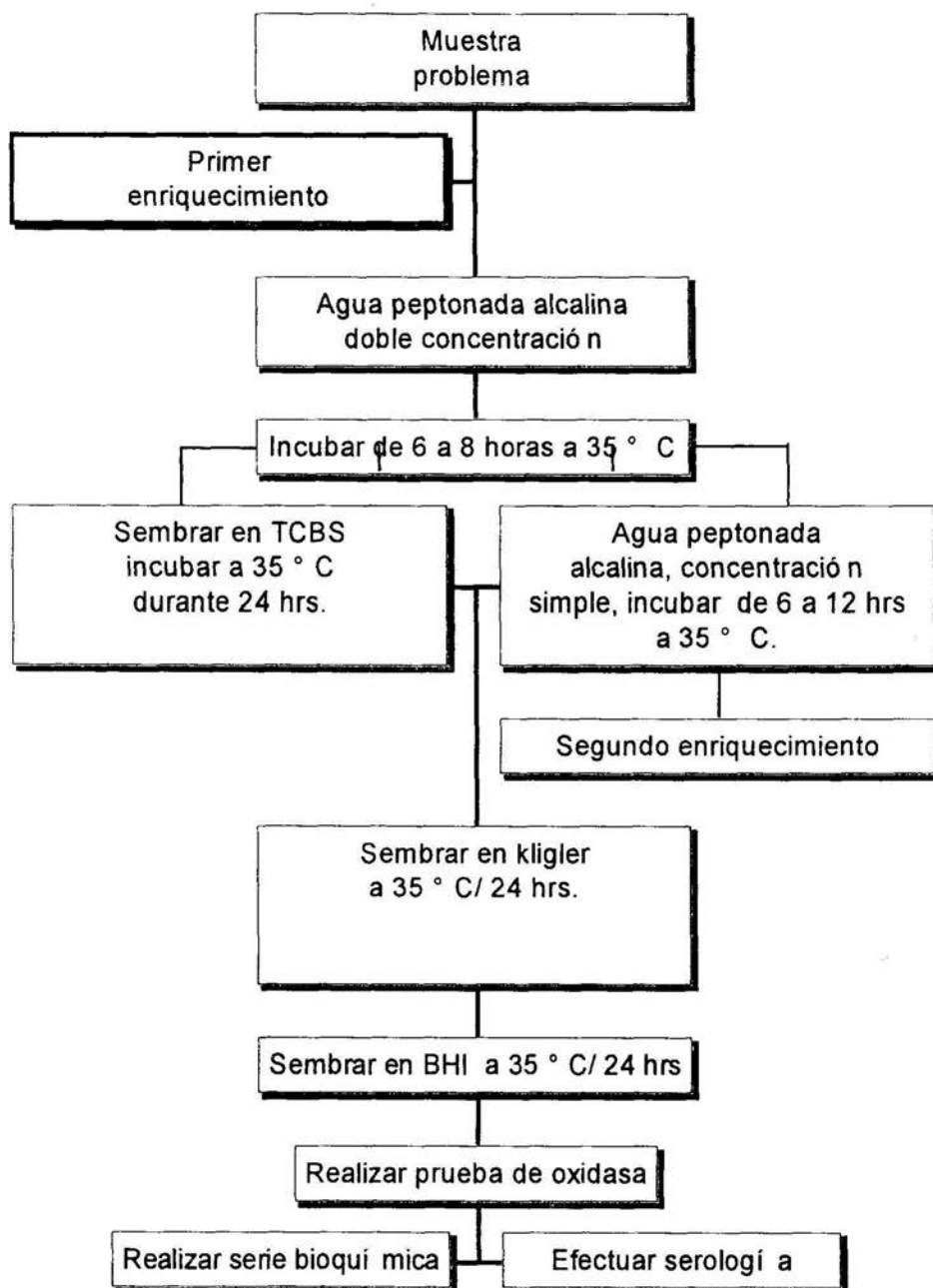
Para la identificación de *Vibrio cholerae* por la técnica de API- 20E, se utilizó una suspensión homogénea exclusivamente de las colonias positivas a la prueba de oxidasa, que crecieron por 24 horas en placas de BHI a partir de los tubos positivos del medio Kligler .

A partir de este paso se sigue el mismo procedimiento para la identificación de enterobacterias (FIG. 5).

4 Análisis estadístico

Para la interpretación adecuada de los datos obtenidos se aplicaron diferentes pruebas estadísticas, a continuación se describe cada una de ellas.

FIGURA 6: ESQUEMA DE LA TECNICA TRADICIONAL (DOBLE ENRIQUECIMIENTO) PARA EL AISLAMIENTO DE *Vibrio cholerae*



4 Análisis estadístico

Para determinar si existían diferencias entre cada uno de los sabores en cuanto a coliformes totales y coliformes fecales, se aplicó un análisis de varianza. Para los casos en que éste análisis resultó significativo, se utilizó la prueba de comparación múltiple de medias de Fisher o prueba de LSD.

Para estos análisis, los valores de NMP de coliformes totales y coliformes fecales se aplicaron en expresión logarítmica.

Para el análisis de presencia-ausencia de las diferentes enterobacterias con relación a los seis sabores de paletas analizados se aplicó la prueba de ji-cuadrada.

Estos análisis se procesaron con el paquete de computo estadístico STATISTICA versión 4.1 para Windows

V RESULTADOS

1 Resultados de coliformes totales y coliformes fecales por la técnica del número más probable (NMP).

Los valores obtenidos de NMP/ 100 mL de coliformes totales y coliformes fecales de los seis sabores de paletas analizadas para cada una de las tres zonas, fueron expresados logarítmicamente (para consultar los datos originales ver ANEXO 3).

A continuación se presentan las tablas de resultados para cada una de las zonas, donde se indica:

- ☞ Fechas de muestreo
- ☞ pH promedio de cada sabor
- ☞ NMP/ 100 mL de coliformes totales y coliformes fecales (logaritmos)
- ☞ Mínimo
- ☞ Máximo
- ☞ Media
- ☞ Desviación estándar (s)
- ☞ Resultados de análisis de varianza para coliformes totales y coliformes fecales
- ☞ Resultados de la prueba F para coliformes totales y coliformes fecales.

TABLA 3: RESULTADOS DEL LOGARITMO DE NMP/ 100mL DE COLIFORMES TOTALES Y COLIFORMES FECALES PARA LA ZONA CENTRO

FECHA DE MUESTREO	S A B O R E S											
	A= ARROZ pH= 7		C= COCO pH= 6 - 7		F= FRESA pH= 3 - 3.5		G=GUAYABA pH= 4		M= MANGO pH= 5		Z= ZARZAMORA pH= 2	
	CT	CF	CT	CF	CT	CF	CT	CF	CT	CF	CT	CF
MAY I	2.48	2.48	4.70	4.40	3.70	3.70	3.23	2.70	***	***	1.36	1.36
JUN II	5.34	5.04	4.48	3.84	***	***	6.20	5.48	6.20	6.20	0.30	0.30
JUN III	5.36	5.36	5.34	5.15	4.90	4.36	6.20	5.95	6.23	6.23	1.36	1.36
JUL IV	4.84	4.36	6.36	6.36	4.36	4.36	7.11	7.11	7.90	7.48	3.36	3.36
JUL V	4.95	4.95	9.20	9.20	4.04	4.04	7.23	7.23	6.23	6.23	3.23	2.90
AGO VI	5.11	4.34	7.69	7.15	4.11	4.11	7.04	7.04	6.70	6.15	2.90	2.70
AGO VII	5.90	4.90	7.26	6.53	***	***	6.84	6.30	6.30	6.30	2.04	2.04
SEP VIII	4.36	4.36	7.04	6.70	4.52	3.70	5.36	5.36	5.60	5.30	2.36	2.36
Mínimo	2.48	2.48	4.48	3.84	3.70	3.70	3.23	2.70	5.60	5.30	0.30	0.30
Máximo	5.90	5.36	9.20	9.20	4.90	4.36	7.23	7.23	7.90	7.48	3.36	3.36
Media	4.79	4.47 b	6.51	6.16 c	4.27	4.04 b	6.15	5.90 c	6.45	6.27 c	2.11	2.05 a
s	1.0358	0.8891	1.6151	1.6984	0.4176	0.2970	1.3368	1.4834	0.7148	0.6362	1.0630	0.9980
<p>Para CT, F= 1.35 (p= 0.2613) No existe diferencias significativas entre ninguno de los sabores analizados.</p> <p>Para CF, F= 17.25 (p= 0.000) Si existe diferencias significativas entre los sabores analizados</p> <p>Las medias con idéntica letra no son estadísticamente diferentes. Las medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes</p> <p>La letra a corresponde al sabor menos contaminado, y así sucesivamente hasta la c, que corresponde a los sabores más contaminados</p> <p>CT: Coliformes totales, CF: Coliformes fecales, s: Desviación estándar, ***: No se consiguió muestra</p>												

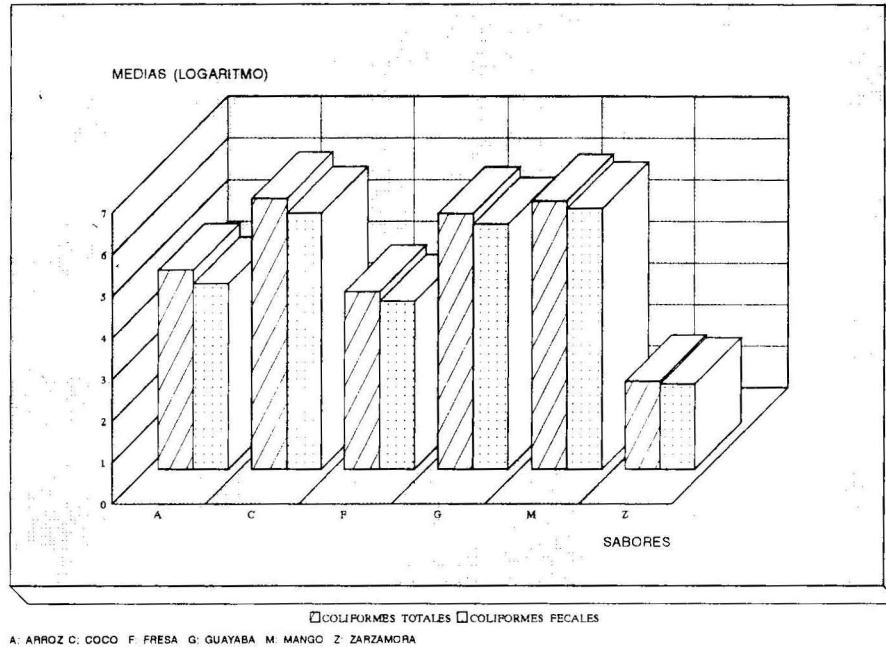
TABLA 4: RESULTADOS DEL LOGARITMO DE NMP/ 100 mL DE COLIFORMES TOTALES Y COLIFORMES FECALES PARA LA ZONA SUR

FECHA DE MUESTREO		S A B O R E S											
		A = ARROZ pH= 7 - 7.5		C = COCO pH= 6 - 7.5		F = FRESA pH= 3 - 3.5		G = GUAYABA pH= 4 - 4.2		M = MANGO pH= 4.5 - 5		Z = ZARZAMORA pH= 2	
		CT	CF	CT	CF	CT	CF	CT	CF	CT	CF	CT	CF
NOV	I	2.90	2.36	4.95	4.30	2.04	0.90	0.30	0.30	4.36	3.30	2.60	1.70
NOV	II	2.36	2.34	2.14	2.04	0.30	0.30	0.30	0.30	4.95	4.60	0.30	0.30
DIC	III	2.90	2.30	3.08	2.53	0.30	0.30	0.30	0.30	3.36	3.36	0.30	0.30
ENE	IV	2.54	2.25	2.52	2.04	1.08	0.30	0.30	0.30	2.23	2.23	***	***
FEB	V	3.11	2.53	4.34	3.41	2.04	2.04	1.30	0.30	4.43	4.11	1.36	1.36
MAR	VI	5.41	4.11	6.41	6.41	4.15	3.41	3.11	3.11	4.43	4.30	0.30	0.30
ABR	VII	7.43	7.23	9.43	8.04	4.04	3.90	6.78	6.78	4.84	4.41	2.41	2.41
JUN	VIII	6.41	6.11	7.36	6.08	4.15	4.11	6.70	6.04	8.54	7.95	2.30	2.30
Mínimo		2.36	2.34	2.52	2.04	0.30	0.30	0.30	0.30	2.23	2.23	0.30	0.30
Máximo		7.43	7.23	9.43	8.04	4.15	4.11	6.78	6.78	8.54	7.95	2.60	2.30
Media		4.13 c	3.65 c	5.03 c	4.36 c	2.26 b	1.91 b	2.39 b	2.18 b	4.64 c	4.28 c	1.37 a	1.24 a
s		1.9804	1.9819	2.5530	2.2590	1.6684	1.6845	2.8542	2.7927	1.8110	1.6745	1.0720	0.9461
<p>Para CT, F= 4.17 (p= 0.0036) Existen diferencias significativas entre los sabores analizados.</p> <p>Para CF, F= 3.66 (p= 0.0077) Existen diferencias significativas entre los sabores analizados</p> <p>Las medias con idéntica letra no son estadísticamente diferentes, . Las medias con letra diferentes son estadísticamente diferentes</p> <p>La letra a corresponde a la menor contaminación, sucesivamente hasta la letra c que corresponde a la mayor contaminación</p> <p>CT: Coliformes totales, CF: Coliformes fecales, s: Desviación estándar, ***: No se conigió muestra.</p>													

TABLA 5: RESULTADOS DEL LOGARITMO DE NMP/ 100 mL DE COLIFORMES TOTALES Y COLIFORMES FECALES PARA LA ZONA OESTE.

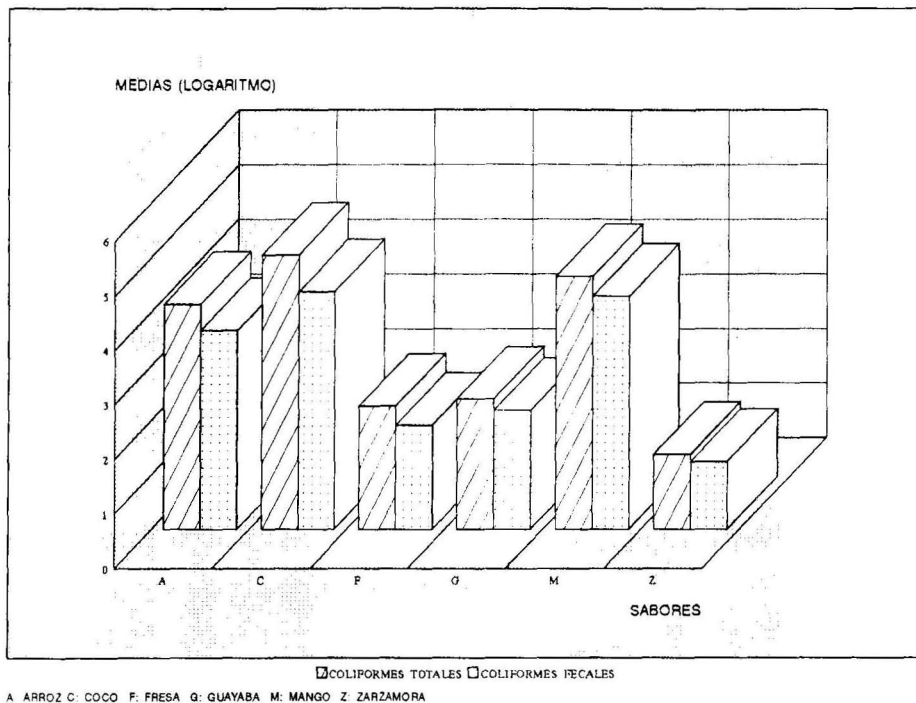
FECHA DE MUESTREO	S A B O R E S											
	A= ARROZ pH= 6.5 - 7		C= COCO pH= 6.5 - 7		F= FRESA pH= 3 - 3.5		G= GUAYABA pH= 4 - 4.2		M= MANGO pH= 4.5 - 5		Z= ZARZAMORA pH= 2	
	CT	CF	CT	CF	CT	CF	CT	CF	CT	CF	CT	CF
JUN I	5.34	5.25	6.23	5.70	5.90	5.90	3.25	3.25	6.15	5.90	***	***
OCT II	5.41	5.41	6.23	6.04	***	***	4.11	3.70	6.38	6.11	2.78	2.30
NOV III	3.36	2.90	4.69	2.63	2.04	1.30	2.70	2.30	3.15	2.23	0.30	0.30
NOV IV	3.49	2.95	3.41	3.23	1.78	0.30	0.30	0.30	2.90	2.70	0.30	0.30
DIC V	2.60	2.60	3.25	2.90	0.30	0.30	1.30	0.30	***	***	0.30	0.30
DIC VI	3.60	3.15	6.70	5.15	0.30	0.30	0.30	0.30	***	***	0.30	0.30
Mínimo	2.60	2.60	3.25	2.90	0.30	0.30	0.30	0.30	2.90	2.23	0.30	0.30
Máximo	5.41	5.41	6.70	6.04	5.90	5.90	4.11	3.70	6.38	6.11	2.78	2.30
Media	4.0 b	3.71 b	5.08 b	4.27 b	2.06 a	1.62 a	1.99 a	1.69 a	4.64 b	4.23 b	0.80 a	0.70 a
s	1.1466	1.2682	1.5204	1.5232	2.2921	2.431	1.5984	1.5901	1.8758	2.0546	0.9920	0.800
<p>Para CT, F= 7.84 (p= 0.00) Existen diferencias significativas entre los sabores analizados</p> <p>Para CF, F= 6.04 (p= 0.000557) Existen diferencias significativas entre los sabores analizados</p> <p>Las medias con letra idéntica no presentan diferencias significativas. Las medias con letra diferente presentan diferencias significativas</p> <p>La letra a representa la menor contaminación, sucesivamente hasta la letra c que presenta la mayor contaminación,</p> <p>CT: Coliformes totales, CF: Coliformes fecales, s: Desviación estándar, ***: No se consiguió muestra.</p>												

FIGURA 7: RELACION ENTRE SABOR Y MEDIAS (EN EXPRESION LOGARITMICA) DE NMP DE COLIFORMES TOTALES Y COLIFORMES FECALES DE PALETAS HELADAS ANALIZADAS EN LA ZONA CENTRO.



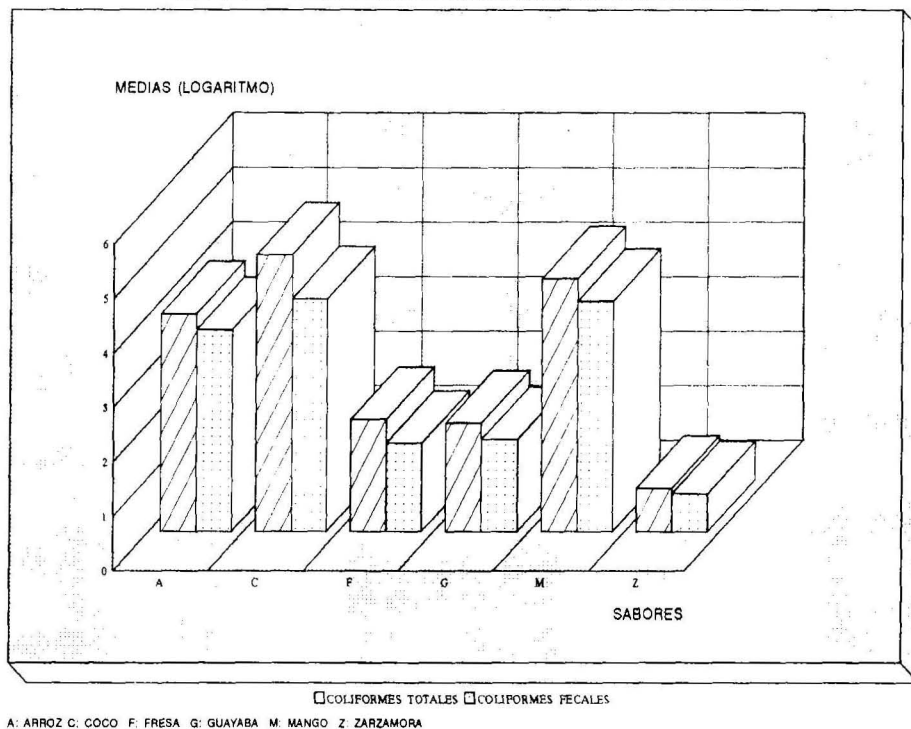
Para el caso de los coliformes totales no se presentaron diferencias significativas entre ninguno de los sabores analizados, mientras que para los coliformes fecales los sabores con las mayores medias logarítmicas fueron coco, mango y guayaba. Seguidos de fresa y arroz, sabores sin diferencias significativas entre sí. Y por último zarzamora el cual presentó la menor contaminación de tipo fecal. Algunos valores obtenidos son: coco con 6.51 ± 1.615 (s) para CT, 6.16 ± 1.698 (s) para CF, mango con 6.45 ± 0.715 (s) para CT, 6.27 ± 0.636 (s) para CF y zarzamora con 2.11 ± 1.063 (s) para CT y 2.05 ± 0.998 para CF.

FIGURA 8. RELACION ENTRE SABOR Y MEDIAS (EN EXPRESION LOGARITMICA) DE NMP DE COLIFORMES TOTALES Y COLIFORMES FECALIS DE PALETAS HELADAS ANALIZADAS EN LA ZONA SUR.



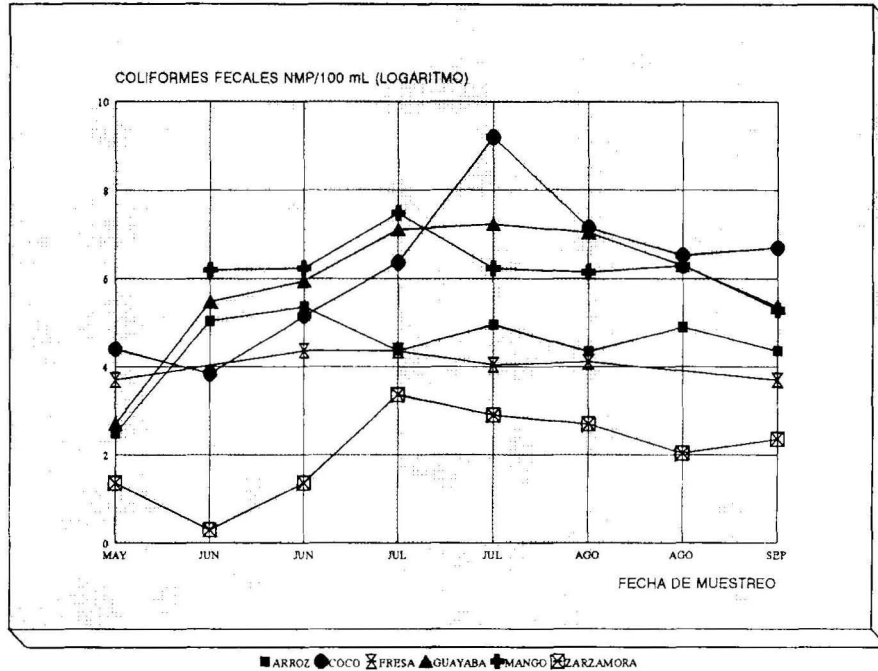
En la zona Sur, existieron diferencias significativas entre los sabores tanto para coliformes totales, como para coliformes fecales. Se observa una disminución con respecto a las medias logarítmicas en comparación a la zona Centro (FIG. 7). Los valores de mayor contaminación correspondieron a los sabores coco, mango y arroz (significativamente iguales entre si) , seguidos de guayaba y fresa. Por último nuevamente el sabor con la menor contaminación significativa fue zarzamora. Algunos de los valores obtenidos son: coco con 5.03 ± 2.553 (s) para CT, 4.36 ± 2.259 (s) para CF, mango con 4.64 ± 1.811 (s) para CT, 4.28 ± 1.674 (s) para CF y en el caso de zarzamora 1.37 ± 1.072 (s) para CT, 1.24 ± 0.946 (s) para CF.

FIGURA 9. RELACION ENTRE SABOR Y MEDIAS (EN EXPRESION LOGARITMICA) DE NMP DE COLIFORMES TOTALES Y COLIFORMES FECALES DE PALETAS HELADAS ANALIZADAS EN LA ZONA OESTE



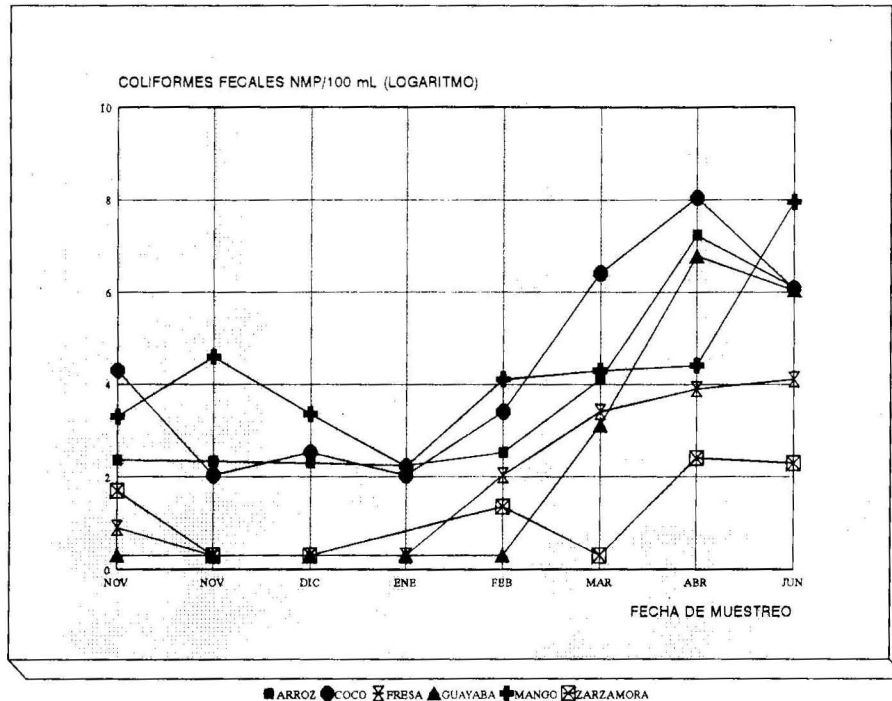
De forma semejante a la zona anterior, la zona Oeste presentó diferencias significativas entre las medias logarítmicas para coliformes totales y coliformes fecales, agrupándose en éste caso los sabores en: los de mayor contaminación (y sin diferencias significativas entre sí): coco, mango y arroz. Mientras que con el menor nivel significativo de contaminación se encuentran guayaba, fresa y zarzamora. En forma general existen niveles menores de contaminación con respecto a la zona I, pero se mantienen en proporción a los observados en la zona II. Algunos de los valores obtenidos son : coco con 5.08 ± 1.520 (s) para CT, 4.27 ± 1.523 (s) para CF, mango con 4.64 ± 1.876 (s) para CT, 4.23 ± 2.055 (s) para CF y zarzamora con 0.80 ± 0.992 (s) y 0.70 ± 0.800 (s) para CF.

FIGURA 10: RELACION ENTRE LOS VALORES (EN EXPRESION LOGARITMICA) DE NMP DE COLIFORMES FECALES EN LOS SEIS SABORES DE PALETAS HELADAS ANALIZADAS Y LOS MESES DE MUESTREO CORRESPONDIENTE A LA ZONA CENTRO.



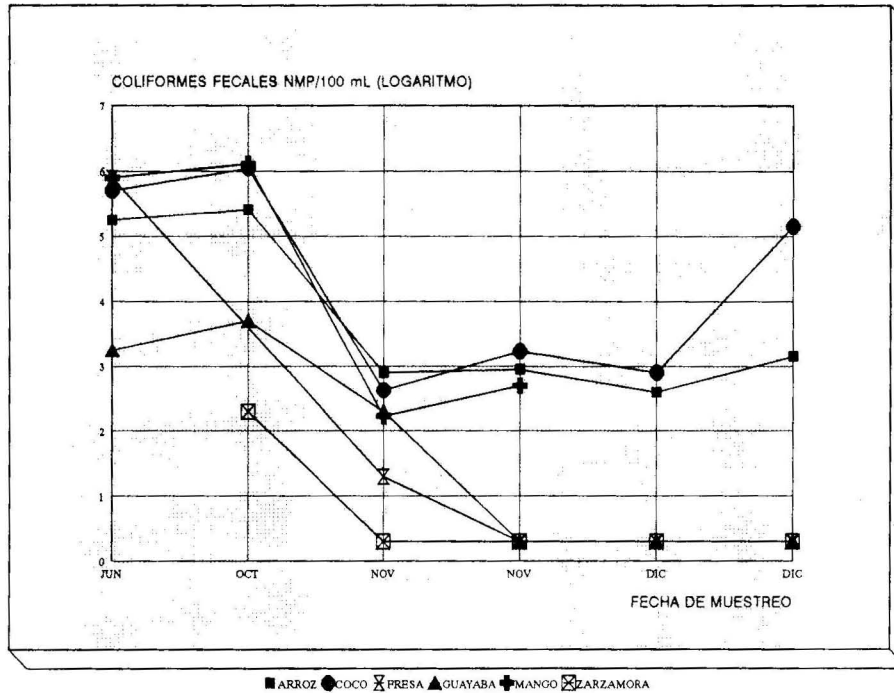
En la zona Centro, los meses de muestreo fueron de mayo a septiembre (todos calurosos), observándose que los sabores coco, mango y guayaba presentaron las mayores medias logarítmicas sin diferencias significativas entre sí para coliformes fecales, mientras que para zarzamora fueron significativamente menores en todos los muestreos.

FIGURA 11: RELACION ENTRE LOS VALORES (EN EXPRESION LOGARITMICA) DE NMP DE COLIFORMES FECALES EN LOS SEIS SABORES DE PALETAS HELADAS Y LOS MESES DE MUESTREO CORRESPONDIENTES A LA ZONA SUR.



En la zona Sur, los meses de muestreo fueron de noviembre a junio (no se efectuó muestreo en mayo). Se observa que en los meses de marzo, abril y junio (meses calurosos), existió un incremento para los valores de coliformes fecales en todos los sabores, mientras que en enero y diciembre (meses fríos), ocurrió lo opuesto. Es importante resaltar que los sabores de coco, mango y arroz (significativamente iguales), presentaron el mayor nivel de contaminación fecal, mientras que zarzamora el menor.

FIGURA 12: RELACION ENTRE LOS VALORES (EN EXPRESION LOGARITMICA) DE NMP DE COLIFORMES FECALES EN LOS SEIS SABORES DE PALETAS HELADAS Y LOS MESES DE MUESTREO CORRESPONDIENTES A LA ZONA OESTE.

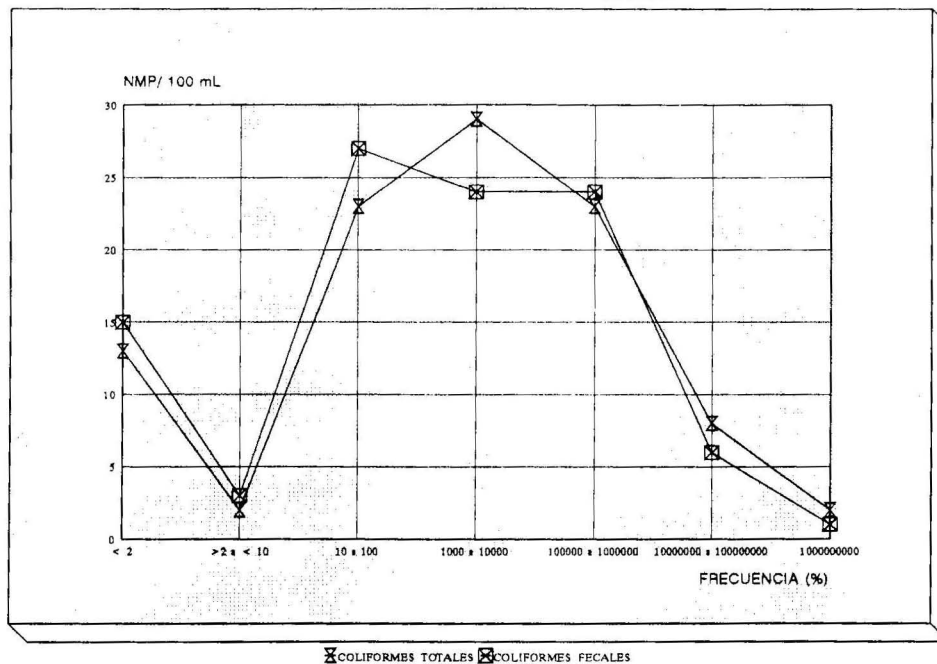


Para el caso de la zona Oeste, los meses de muestreo fueron de junio a diciembre (los meses de julio, agosto y septiembre no se muestrearon), se observa una disminución en las medias logarítmicas de coliformes fecales en los meses de noviembre y diciembre (meses fríos), con respecto al resto de los meses muestreados. En ésta zona para los sabores de coco, mango y arroz no existieron diferencias significativas y presentaron el mayor nivel de contaminación fecal. Los sabores guayaba, fresa y zarzamora conformaron por su parte el grupo de menor contaminación fecal.

**TABLA 6: RESULTADOS DE LA DISTRIBUCION DE LA FRECUENCIA DE NMP DE COLIFORMES TOTALES Y COLIFORMES
FECALES DE LA POBLACION LOS SEIS SABORES DE MUESTRAS COMPUESTAS DE PALETAS ANALIZADAS**

SABORES	GRUPO COLIFORME	FRECUENCIA (VALORES ENCONTRADOS)							TOTAL DE MUESTRAS
		< 2	>2-<10	10-10 ²	10 ³ -10 ⁴	10 ⁵ -10 ⁶	10 ⁷ -10 ⁸	10 ⁹	
ARROZ	CT	0	0	6	7	8	1	0	22
	CF	0	0	9	7	5	1	0	22
COCO	CT	0	0	2	8	6	4	2	22
	CF	0	0	5	5	10	1	1	22
FRESA	CT	4	0	5	9	1	0	0	19
	CF	5	2	2	9	1	0	0	19
GUAYABA	CT	5	1	3	4	6	3	0	22
	CF	7	1	2	3	6	3	0	22
MANGO	CT	0	0	2	7	8	2	0	19
	CF	0	0	3	6	8	2	0	19
ZARZAMORA	CT	7	1	11	1	0	0	0	20
	CF	7	1	12	0	0	0	0	20
TOTAL	CT	16	2	29	36	29	10	2	124
	CF	19	4	33	30	30	7	1	124
% TOTAL	CT	13	2.0	23	29	23	8	2.0	100 %
	CF	15	3.0	27	24	24	6.0	1.0	100 %

FIGURA 13: DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS DE NMP DE COLIFORMES TOTALES Y COLIFORMES FECALES A PARTIR DE LA POBLACION DE PALETAS HELADAS ANALIZADAS.



En la presente figura se observa la distribución de la frecuencia de NMP de coliformes totales y coliformes fecales a partir de la población de paletas heladas analizadas, encontrando que el 65 y 55 % del total de las muestras se agruparon entre $> 10^2$ y 10^9 NMP/ 100 mL, respectivamente. La mayor frecuencia se localiza entre 10^3 y 10^6 NMP/ 100 mL tanto para CT como para CF.

2 Resultados de la identificación de enterobacterias

En la tabla 7 se muestran los resultados en la identificación de enterobacterias a partir de los aislamientos para cada una de las técnicas utilizadas en cada una de las tres zonas de muestreo.

TABLA 7: RESULTADOS DE ENTEROBACTERIAS IDENTIFICADAS POR LAS TRES TECNICAS UTILIZADAS.

ZONAS DE MUESTREO	TECNICAS UTILIZADAS		
	CUATRO MEDIOS DIFERENCIALES	IMViC	API-20E
ZONA CENTRO	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter</i> * <i>Proteus mirabilis</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Proteus mirabilis</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Proteus mirabilis</i>
ZONA SUR	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter</i> * <i>Proteus mirabilis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> ** <i>Proteus mirabilis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>
ZONA OESTE	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter</i> * <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>

* PARA EL GENERO ENTEROBACTER NO SE DETERMINA LA ESPECIE EN NINGUNA DE SUS POSIBILIDADES.
 ** ESTE GENERO FUE IDENTIFICADO SOLAMENTE POR LA TECNICA DE API- 20E
 LOS SABORES MUESTREADOS FUERON: ARROZ, COCO, GUAYABA, MANGO, FRESA y ZARZAMORA.

Como se observa en la mayoría de los casos, se identificaron las mismas especies por las tres técnicas aplicadas a diferencia de *Enterobacter aerogenes*, la cual fue aislada únicamente por la técnica API- 20E.

Sólo se determinó el género *Enterobacter* por la técnica de los cuatro medios diferenciales, mientras que las otras dos técnicas llegan hasta la especie.

A continuación se presenta la relación de presencia y ausencia, así como los porcentajes (%) para cada una de las especies de enterobacterias identificadas en cada uno de los seis sabores de paletas en el total de la población analizada de muestras compuestas. Como se observa los mayores porcentajes, correspondieron a *Enterobacter cloacae* y *Escherichia coli*, mientras que el menor correspondió a *Enterobacter aerogenes*.

De igual manera se indica el valor calculado en la determinación de ji-cuadrada (χ^2) y la relación de significancia entre cada una de las enterobacterias aisladas e identificadas y los seis sabores de paletas analizadas a partir de la población de muestras compuestas.

TABLA:8 RESULTADOS DE PRESENCIA - AUSENCIA DE *Enterobacter cloacae* IDENTIFICADA A PARTIR DE LA POBLACION DE MUESTRAS COMPUESTAS DE PALETAS EN LOS SEIS DIFERENTES SABORES ANALIZADOS.

	SABORES ANALIZADOS						TOTAL (%)
	A	C	F	G	M	Z	
PRESENCIA (+)	22	22	14	14	19	9	100/ 124 (81 %)
AUSENCIA (-)	0	0	5	8	0	11	24/ 124 (19 %)

$\chi^2 = 36.068$ ($p = 4.72 \times 10^{-7}$) Existe relación significativa entre *Enterobacter cloacae* y cada uno de los seis sabores analizados
A: ARROZ C: COCO F: FRESA G: GUAYABA M: MANGO Z: ZARZAMORA

TABLA 9: RESULTADOS DE PRESENCIA - AUSENCIA DE *Escherichia coli* IDENTIFICADA A PARTIR DE LA POBLACION DE MUESTRAS COMPUESTAS DE PALETAS EN LOS SEIS DIFERENTES SABORES ANALIZADOS.

	SABORES ANALIZADOS						TOTAL (%)
	A	C	F	G	M	Z	
PRESENCIA (+)	14	21	9	14	14	7	79/ 124 (64 %)
AUSENCIA (-)	5	1	10	5	5	13	45/ 124 (36 %)

$\chi^2 = 21.766$ ($p = 5797 \times 10^{-4}$) Existe relación significativa entre *Escherichia coli* y cada uno de los seis sabores analizados
A: ARROZ C: COCO F: FRESA G: GUAYABA M: MANGO Z: ZARZAMORA

TABLA:10 RESULTADOS DE PRESENCIA - AUSENCIA DE *Proteus mirabilis* IDENTIFICADA A PARTIR DE LA POBLACION DE MUESTRAS COMPUESTAS DE PALETAS EN LOS SEIS DIFERENTES SABORES ANALIZADOS.

	SABORES ANALIZADOS						TOTAL (%)
	A	C	F	G	M	Z	
PRESENCIA (+)	7	11	4	7	9	5	43/ 124 (35 %)
AUSENCIA (-)	15	11	15	15	10	15	81/ 124 (65 %)

$\chi^2 = 6.174$ ($p = 0.2897$) No existe relación significativa entre *Proteus mirabilis* y los sabores de paletas analizados
A: ARROZ C: COCO F: FRESA G: GUAYABA M: MANGO Z: ZARZAMORA

TABLA 11: RESULTADOS DE PRESENCIA - AUSENCIA DE *Klebsiella pneumoniae* IDENTIFICADA A PARTIR DE LA POBLACION DE MUESTRAS COMPUESTAS DE PALETAS EN LOS SEIS DIFERENTES SABORES ANALIZADOS.

	SABORES ANALIZADOS						TOTAL (%)
	A	C	F	G	M	Z	
PRESENCIA (+)	5	9	0	5	6	0	25/ 124 (20 %)
AUSENCIA (-)	17	13	19	17	13	20	99/ 124 (80 %)

$\chi^2 = 17.451$ ($p = 3.719 \times 10^{-3}$) Existe relación significativa entre *Klebsiella pneumoniae* y cada uno de los seis sabores analizados
A: ARROZ C: COCO F: FRESA G: GUAYABA M: MANGO Z: ZARZAMORA

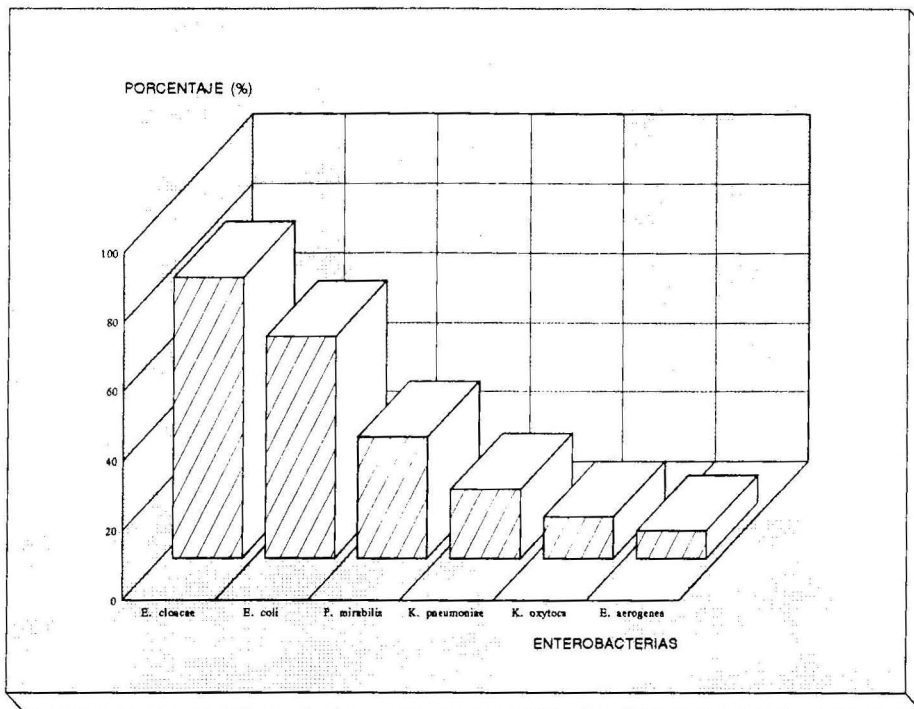
TABLA 12: RESULTADOS DE PRESENCIA - AUSENCIA DE *Klebsiella oxytoca* IDENTIFICADA A PARTIR DE LA POBLACION DE MUESTRAS COMPUESTAS DE PALETAS EN LOS SEIS DIFERENTES SABORES ANALIZADOS.

	SABORES ANALIZADOS						TOTAL (%)
	A	C	F	G	M	Z	
PRESENCIA (+)	2	4	2	4	3	0	15/ 124 (12 %)
AUSENCIA (-)	20	18	17	18	16	20	109/ 124 (88 %)
$\chi^2 = 4.759$ ($p = 0.4460$) No existe relación significativa entre <i>Klebsiella oxytoca</i> y los sabores de paletas analizados A: ARROZ C: COCO F: FRESA G: GUAYABA M: MANGO Z: ZARZAMORA							

TABLA 13: RESULTADOS DE PRESENCIA - AUSENCIA DE *Enterobacter aerogenes* IDENTIFICADA A PARTIR DE LA POBLACION DE MUESTRAS COMPUESTAS DE PALETAS EN LOS SEIS DIFERENTES SABORES ANALIZADOS.

	SABORES ANALIZADOS						TOTAL (%)
	A	C	F	G	M	Z	
PRESENCIA (+)	2	4	1	0	2	1	10/ 124 (8 %)
AUSENCIA (-)	20	18	18	22	17	19	114/ 124 (92 %)
$\chi^2 = 5.608$ ($p = 0.3462$) No existe relación significativa entre <i>Enterobacter aerogenes</i> y los sabores de paletas analizados A: ARROZ C: COCO F: FRESA G: GUAYABA M: MANGO Z: ZARZAMORA							

FIGURA 14: PORCENTAJE DE ENTEROBACTERIAS IDENTIFICADAS A PARTIR DE LA POBLACION DE PALETAS HELADAS ANALIZADAS.



Se muestra el porcentaje de las enterobacterias identificadas a partir de la población de los seis sabores de paletas heladas analizadas que corresponden al total de muestras compuestas: 81 % a *Enterobacter cloacae*, el 64 % *Escherichia coli*, el 35 % *Proteus mirabilis*, el 20 y 12 % a *Klebsiella pneumoniae* y *K. oxytoca* respectivamente y el 8 % a *Enterobacter aerogenes*.

3.- Resultados de la comparación de la calidad bacteriológica de paletas heladas de agua de marca popular contra paletas heladas de agua de marca registrada.

Como parte significativa para el estudio completo de la calidad bacteriológica del tipo del producto, se realizó el análisis con paletas de marca registrada: "B" y "H"; para lo cual se efectuaron 8 muestreos y el mismo tipo de análisis que las muestras de marca popular, los resultados se observan en la TABLA 14.

TABLA 14: RESULTADOS DE LOS VALORES DE NMP DE COLIFORMES TOTALES Y COLIFORMES FECALES EN MUESTRAS COMPUESTAS DE PALETAS DE AGUA DE DOS MARCAS REGISTRADAS

SABORES DE PALETAS DE AGUA ANALIZADAS	MUESTREOS EFECTUADOS	"B"		"H"	
		CT	CF	CT	CF
M A N G O	I	2	< 2	< 2	< 2
	II	2	< 2	< 2	< 2
F R E S A	I	5	< 2	< 2	< 2
	II	< 2	< 2	< 2	< 2

CT= COLIFORMES TOTALES CF= COLIFORMES FECALES

Se determinó la presencia de coliformes totales en el caso de la marca registrada "B", en un promedio de 2.5 NMP/ 100 mL.

Para la marca "H", se determinaron coliformes totales y coliformes fecales en promedio de <2 NMP/ 100 mL, en las muestras analizadas, considerando para el caso de fresa una mejor calidad sanitaria, con respecto a la marca anterior.

Se realizó un análisis comparativo entre las tres técnicas para la identificación de enterobacterias, considerando para 10 muestras, el tiempo requerido, número de pruebas, costo por material y recursos humanos, así como ventajas y desventajas de cada una. Los resultados se observan en la TABLA 15.

TABLA 15: RESULTADOS DE LA COMPARACION DE COSTOS Y REQUERIMIENTOS DE LAS TRES TECNICAS PARA IDENTIFICACION DE ENTEROBACTERIAS A PARTIR DE 10 MUESTRAS

REQUERIMIENTOS	TECNICAS COMPARADAS		
	4 MEDIOS DIFERENCIALES	IMViC	API- 20E
Tiempo de preparación de medios y reactivos	2 días, considerando las 24 horas de la prueba de esterilidad	De 2 a 3 días, considerando las 24 horas para la prueba de esterilidad	Menos de 24 horas para preparar la escala de McFarland
Tiempo de incubación	De 2 a 5 días	De 2 a 5 días	De 18 a 24 horas (rara vez 48 horas)
Número de pruebas efectuadas	Se utilizan 4 pruebas, la técnica no ofrece una mayor opción por el diagrama preestablecido en las claves	Se realizan 4 pruebas, sin embargo en ocasiones se requieren 2 ó 3 más para diferenciar algunos géneros	Se realizan 20 pruebas con la opción de 6 complementarias, en caso de requerirlas
Costo de material	\$ 7.30	\$ 6.65	\$ 98.40
Recursos humanos	\$ 37.5 (3 hora / hombre)	\$ 62.5 (5 horas / hombre)	\$ 3.12 (0.25 hora / hombre)
Ventajas observadas	Para ciertas especies la técnica es confiable y precisa, sin necesidad de incrementar el número de pruebas	Para ciertas especies la técnica es confiable y precisa llegando incluso hasta la especie	Se identifica de forma confiable y precisa a las enterobacterias y otras gram - negativas. Es una técnica rápida y la de menor costos en recursos humanos y control de calidad al incrementar su uso
Desventajas	En algunos géneros no se identifica la especie y en otras ocasiones se llega al mismo género lo que limita la identificación	Para ciertas especies esta técnica incrementa el número de pruebas que aseguren su confiabilidad, por lo que el tiempo, costos y recursos humanos, ya no la hacen tan accesible	La compra de los reactivos y del index de referencia para la identificación incrementa su costo inicialmente

4 Resultados del aislamiento de *Vibrio cholerae* O1 en paletas heladas de agua

Simultáneamente a la cuantificación de coliformes, se procesaron todas las muestras con el objetivo de aislar *Vibrio cholerae* O1 utilizando la técnica de doble enriquecimiento en agua peptonada alcalina (APA) y lograr su identificación por medio del sistema de API-20E. En ninguna muestra de paletas analizadas se logró el aislamiento de la bacteria, como se puede observar en la siguiente tabla.

TABLA 16: RESULTADOS DEL AISLAMIENTO DE *Vibrio cholerae* O1 EN PALETAS HELADAS

MUESTREOS REALIZADOS							
ZONA CENTRO							
I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA
ZONA SUR							
AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA
ZONA OESTE							
AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	**	**
* No se consiguió muestra							

Debido a los resultados negativos encontrados, para confirmar que los productos analizados no estaban contaminados con la bacteria del cólera y que la técnica de doble enriquecimiento en agua peptonada (APA) es válida para este tipo de productos, se realizó la inoculación a una muestra compuesta de cada uno de los seis sabores de paletas heladas de agua con la cepa viable certificada de *Vibrio cholerae* El Tor ATCC 14033, facilitada por el laboratorio de Microbiología del Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA).

La inoculación se realizó mediante la comparación en turbiedad con el tubo número 1 de la escala de Mc Farland (ver ANEXO 3), los resultados obtenidos se observan en la TABLA 17.

TABLA 17: RESULTADOS DEL AISLAMIENTO DE *Vibrio cholerae* O1, POSTERIOR A LA INOCULACION DE LAS PALETAS HELADAS CON LA CEPA DE *Vibrio cholerae* EL TOR ATCC 14033.

	SABORES INOCULADOS					
	ARROZ	COCO	FRESA	GUAYABA	MANGO	ZARZAMORA
ANALISIS POSTERIOR A LA INOCULACION	PRESENCIA	PRESENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA	AUSENCIA

VI DISCUSION

Los resultados obtenidos para coliformes totales y coliformes fecales en el total de paletas heladas analizadas, indican una alarmante contaminación en este producto de gran consumo. Los valores encontrados para coliformes fecales fueron desde 10^2 hasta 10^9 NMP/100 mL (TABLA 6).

Para la zona Centro los meses de muestreo correspondieron de mayo a septiembre (FIG. 10), meses considerados calurosos, existiendo en éstos, un incremento en la incidencia de las enfermedades diarreicas ocasionadas por la reducción en la disponibilidad de agua, lo que dificulta la práctica adecuada de medidas higiénicas en la preparación de alimentos (Arroyo, 1983). Incluyendo la elaboración de las paletas heladas. Los rangos de valores se mantienen de acuerdo a los diferentes sabores analizados.

En ésta zona, las medias de los seis sabores analizados no presentaron diferencias significativas ($p=0.2613$), con respecto a los coliformes totales. Para el caso de coliformes fecales, los sabores fueron estadísticamente diferentes ($p=0.00$), los más contaminados: coco, mango y guayaba, seguidos de arroz y fresa. Finalmente zarzamora con la menor contaminación de tipo fecal (ver TABLA 3).

En la zona Sur, las diferencias significativas se presentaron tanto para coliformes totales ($p=0.0036$) como para coliformes fecales ($p=0.0077$). Siendo los sabores más contaminados: coco, mango y arroz, seguidos de guayaba y fresa, para finalizar nuevamente con zarzamora, que presentó el menor valor de contaminación (ver TABLA 4).

Los meses de muestreo combinaron meses fríos y calurosos (FIG. 11), observándose decremento e incremento en los valores de contaminación respectivamente, confirmando la relación recíproca entre la incidencia de los organismos y la época de calor.

En la zona Oeste, los muestreos combinaron también meses calurosos y fríos, (FIG. 12), lo que explica nuevamente el incremento y decremento en las medias de coliformes totales ($p=0.00$) y coliformes fecales ($p=0.000557$). Los sabores que no presentaron diferencias significativas entre sí y con el mayor rango de contaminación fueron; coco, mango y arroz, en contraparte con guayaba, fresa y zarzamora, sabores estadísticamente iguales, con el menor rango de contaminación (TABLA 5), pero con riesgo potencial para la salud, por los niveles encontrados.

De forma general, los niveles más altos de coliformes totales y coliformes fecales encontrados en las tres zonas fueron los sabores de coco y mango, los intermedios guayaba y arroz mientras que los menores fueron para fresa y zarzamora. Estos resultados se explican debido al pH promedio de las paletas analizadas. Los microorganismos son sensibles a los cambios de pH del medio, la mayoría de las bacterias no crecen cuando el pH es menor a 4.5 y su punto óptimo se localiza a 7.5 (Jawetz y colaboradores, 1992).

El pH promedio del sabor coco fue de 6.7 y para mango fue de 5.0. Lo anterior explica las medias tan altas de coliformes totales y coliformes fecales encontrados en comparación con los demás sabores analizados.

En el caso del sabor arroz, aun cuando el pH promedio fue de 7.0, los niveles de coliformes no fueron tan altos como los de los sabores coco y mango, lo que hace suponer que la cocción del cereal en el proceso de elaboración de la paleta ocasiona una ligera mejora de la calidad del producto final. Sin embargo, los valores de coliformes totales y coliformes fecales de las paletas de arroz, confirman una falta de higiene en el proceso de elaboración y/o distribución del producto (Abbar y Kaddar, 1991).

En comparación, los sabores con menor pH como el caso de fresa (3.3) y zarzamora (2), presentaron constantemente una marcada disminución en los niveles de coliformes totales y

fecales, observándose además la presencia de mohos, que en alimentos se desarrollan en rangos de pH entre 1.5 a 8.5, siendo su óptimo de 4.0 aproximadamente (Jawetz y colaboradores, 1992). Lo anterior sugiere un tipo de competencia entre bacterias y mohos.

Sin embargo, y aunque los valores de coliformes fueron menores con respecto a los demás sabores, la contaminación en tales frutos presenta un serio problema de salud, sobre todo cuando nos referimos a frutos agregados o frutos accesorios, que como el caso de la fresa, donde el verdadero fruto lo constituyen los achenios, localizados en la superficie del receptáculo dulce, carnoso y muy engrosado (Fuller, 1980). Tal morfología requiere de un cuidado especial con respecto a su limpieza, la cual asegure la eliminación de los microorganismos e impurezas y evite con ello una posible causa del deterioro en la calidad del producto.

Existen otros dos factores que pueden determinar el desarrollo de los microorganismos en los alimentos que son: la humedad relativa y el contenido de azúcar. Este último disminuye el efecto de la actividad acuosa, debido a las altas presiones osmóticas, las bacterias no son tolerantes a dichas condiciones en los productos que contienen azúcar, tales como frutas desecadas, compostas o dulces. Aunque si se presenta el crecimiento de mohos (Jawetz y colaboradores, 1992).

Con respecto al efecto de la baja temperatura que supone una disminución en el número de microorganismos en un medio nutritivo que fue sometido a una congelación prolongada (hasta de varios meses), se observa la capacidad de los organismos de subsistir e incluso reanudar sus actividades una vez que el alimento sea descongelado y recalentado a una temperatura adecuada para su crecimiento, por lo que aun pueden ser patógenos.

El porcentaje de las enterobacterias aisladas e identificadas del total de la población de paletas heladas analizadas en orden decreciente fueron (FIG. 16):

- ☛ *Enterobacter cloacae*, 81 %
- ☛ *Escherichia coli*, 64 %
- ☛ *Proteus mirabilis*, 35 %
- ☛ *Klebsiella pneumoniae*, 20 %
- ☛ *K. oxytoca*, 12 % y
- ☛ *Enterobacter aerogenes*, 8 %

Con base en los resultados de presencia-ausencia, se indica que existe una relación significativa entre cada uno de los sabores y las siguientes enterobacterias aisladas e identificadas:

- ☛ *Enterobacter cloacae* (TABLA 8)
- ☛ *Escherichia coli* (TABLA 9)
- ☛ *Klebsiella pneumoniae* (TABLA 11).

Mientras que dicha relación significativa no existe para las siguientes enterobacterias:

- ☛ *Proteus mirabilis* (TABLA 10)
- ☛ *Klebsiella oxytoca* (TABLA 12)
- ☛ *Enterobacter aerogenes* (TABLA 13)

La presencia de tales enterobacterias es alarmante debido a su potencial de patogenicidad en otras parte del cuerpo, como por ejemplo:

- ☛ *E. coli*, ocasiona infecciones piógenas siendo la más común la de las vías urinarias, como las cistitis. Otras infecciones menos frecuentes son los

abscesos y conjuntivitis, también es causante principal de meningitis en lactantes (Jawetz y colaboradores, 1992).

- ☞ *Enterobacter*, causa infecciones naturales, infecciones de vías urinarias y sepsis (Burrows, 1984).
- ☞ *Proteus*, se asocia a pleuritis y peritonitis, así como abscesos en muchas partes del cuerpo, ocasionando además intoxicaciones por alimentos (Burrows, 1984)
- ☞ *Klebsiella* (bacilo de Friedlander), descrito como agente etiológico de la neumonía, se asocia con diversas enfermedades de vías respiratorias en la mayor parte de los casos probablemente sean invasores secundarios, también se asocia con lesiones abscesos hepáticos y meningitis (Burrows, 1984 y Perea, 1992).

Es importante mencionar que en ninguno de los aislamientos obtenidos de las paletas heladas se identificaron los organismos patógenos del género *Salmonella* ni *Shigella* , sin embargo su presuntiva ausencia debe tomarse con cierta precaución, de acuerdo a los datos bibliográficos respecto a la presencia de bacterias viables pero no cultivables que se citan a continuación:

- ☞ Byrd y colaboradores en 1991, mencionan la acción de diversos factores tales como la temperatura o pH extremos y la concentración de nutrientes, entre otros, que ocasionan la alteración de las bacterias patógenas, imposibilitando su identificación y aislamiento.
- ☞ Por otro lado Stewart y Olson en 1992, observaron por medio de técnicas de inmunofluorescencia, la presencia de bacterias que pueden adoptar un estado

"quiescente" en el cual la bacteria no es cultivable, desconociendo los factores que favorecen el vire a la forma infectante y cultivable principalmente durante los periodos interepidémicos (Giono y colaboradores, 1993) y de que forma mantienen su infectividad.

- ☛ Todo esto pone en duda la efectividad de los métodos bacteriológicos estándares para la protección de la salud humana. (González y colaboradores, 1992).

- ☛ Dentro de los géneros donde se ha observado tal característica se pueden mencionar: *Vibrio*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter aerogenes* y *Klebsiella pneumoniae*. Este último perteneciente al grupo de los coliformes frecuentemente aislado de los sistemas de tratamiento de agua, muestran un incremento de 150 veces más su resistencia al cloro libre, en condiciones bajas de nutrientes y capacidad cada vez mayor de resistencia a las cloramidas, esto se debe posiblemente a los cambios del fluido lipídico en la membrana que obstruyen la penetración del desinfectante (Jones y colaboradores, 1992; Stewart y Olson, 1992).

- ☛ Estas bacterias lesionadas son incapaces de crecer y formar colonias en condiciones habituales, lo que ocasionaría una aceptación errónea de condiciones potencialmente peligrosas resultantes de la presencia de patógenos resistentes, ya que los patógenos alterados mantienen su potencial de virulencia (APHA, 1992).

En el caso de la comparación entre las paletas de marca popular y las paletas de marca registrada, se observó una marcada diferencia en la calidad bacteriológica de los productos analizados. En las primeras, los niveles de NMP/ 100 mL de coliformes totales y fecales se

determinaron valores hasta de 10^9 mientras que para las segundas y sólo en las paletas denominadas como "B", la presencia de coliformes totales en promedio fue de 2.5 NMP/ 100 mL, el resto de las muestras presenta valores < 2 tanto para coliformes totales como para coliformes fecales (ver TABLA 14).

Estas diferencias substanciales se deben al control de calidad y condiciones higiénicas en la elaboración, empaquetado y distribución del producto. Siendo que en las compañías de marca registrada encargadas de la elaboración de las paletas, en el proceso de elaboración utilizan agua potable, seleccionan su materia prima de excelente calidad y mantienen un estricto control sobre la limpieza de la maquinaria y los utensilios. Además de contar con el personal capacitado.

Con respecto a las técnicas utilizadas para la identificación de los aislamientos no siempre fue posible determinar hasta la especie, como ocurrió en el caso de la técnica de cuatro medios diferenciales. Con respecto a la técnica del IMViC que es una prueba tradicional para la identificación de bacterias y donde las reacciones en su mayoría son determinantes, requirió del auxilio de otras pruebas básicas como la descarboxilasa en la lisina (LIA) o la movilidad en el SIM, por lo que se incremento de igual forma el tiempo y costo para la determinación final .

En las dos técnicas antes mencionadas, la preparación de medios y reactivos para su lectura puede ser costosa para muchos laboratorios que la utilizan, aumentando el trabajo de control de calidad (ver TABLA 15).

El sistema API-20 E tiene la ventaja de realizar simultáneamente 20 reacciones bioquímicas y seis pruebas complementarias en un período de incubación de 18 a 24 horas, lo que permite obtener resultados con mayor rapidez y precisión. El mayor número de enterobacterias identificadas con este sistema fue mayor con respecto a las otras dos técnicas.

De igual forma permite la identificación de otro tipo de bacterias gram negativas (que podríamos no considerar inicialmente), como el caso de *Vibrio cholerae*, sin que ello incremente tiempo ni costo.

En la totalidad de los análisis realizados en las paletas no se aisló *V. cholerae* (ver TABLA 16), sin embargo después de la inoculación de los 6 sabores con una cepa viable y certificada de *V.cholerae O1* para confirmar la repetibilidad y validez de las técnicas utilizadas, logró recuperarse solamente de los sabores Arroz y Coco (TABLA 17), explicándose lo anterior a causa del pH, que constituye uno de los factores determinantes en su sobrevivencia, debido que a niveles de 6 o menores los vibriones mueren en períodos cortos de tiempo (Dhiman y Greenough, 1992)

Por otra parte los resultados obtenidos sugieren un tipo de competencia entre el grupo coliforme fecal y el género *Vibrio*, lo anterior se explica sobre todo si nos referimos a la relación *V. cholerae* y *E. coli* en la que a mayor número de coliformes, *V. cholerae* se reporta como bajo o ausente (Byrd y colaboradores, 1991).

VII CONCLUSIONES

Las paletas heladas analizadas elaboradas con agua y frutas crudas demuestran una contaminación de bacterias de origen fecal en cantidades alarmantes, siendo un producto de gran consumo, especialmente en las épocas de calor, por la población general y principalmente infantil, constituyendo un alto riesgo de contraer enfermedades gastrointestinales agudas u otro tipo de padecimientos infecciosos de importancia médica, en caso de invadir otros órganos.

La alta contaminación por coliformes fecales en estos productos se debe a las siguientes causas, que pueden presentarse en forma individual o combinadas:

- El uso de agua sucia, o de agua potable que puede contaminarse de coliformes fecales por las personas que elaboran la paleta helada.
- La utilización de frutas que se consumen crudas que pueden haber sido regadas por aguas residuales, debido a que la presencia de indicadores de contaminación fecal en los productos agrícolas para consumo humano está relacionado directamente con la calidad microbiológica del agua de irrigación.
- Por contaminarse a causa de la falta de saneamiento básico, costumbres de siembra, manipulación durante la cosecha, transporte, comercialización en los mercados, y que no son lavadas y/ o desinfectadas durante la elaboración del producto.
- En el caso de las paletas de zarzamora y fresa, que debido al bajo pH de los sabores, se inhibe en cierta medida la presencia de las bacterias coliformes, favoreciendo por otra parte el crecimiento de mohos, lo que a su vez indica una falta de saneamiento, en este tipo de frutos agregados.
- El uso de frutas como el coco que cuando se utiliza seco y endulzado puede llegar a la paletería contaminado de coliformes, o bien cuando se utiliza crudo puede contaminarse durante su manipulación.

- El uso de un cereal como el arroz, que para la elaboración de las paletas heladas tiene que cocinarse, suponiendo que al aplicar una alta temperatura, la eliminación de cualquier contaminación de tipo fecal sería inmediata, no concuerda con los resultados obtenidos. Los elevados valores encontrados confirman una manipulación inadecuada en el proceso de elaboración, los utensilios, así como una distribución en pésimas condiciones higiénicas, incrementa en forma alarmante la presencia de microorganismos en el producto final.
- Otros factores que intervienen en la presencia o ausencia de un tipo de microorganismos en un producto son la temperatura, pH, humedad relativa (actividad acuosa) y el contenido de azúcar que contenga el sustrato.
- De forma conjunta a esos factores, las condiciones ambientales como la época de calor, determinan el incremento o decremento de los valores encontrados para NMP/ 100 mL de coliformes totales y coliformes fecales, como se observó en cada una de las zonas muestreadas.

☞ Las relaciones significativas entre los sabores y las enterobacterias aisladas.

La identificación de las bacterias aisladas, confirmada por las tres pruebas utilizadas, demuestran la validez de dichas técnicas. La identificación de los aislamientos fueron corroborados por una institución oficial de amplio reconocimiento (ver ANEXO 4)

Es importante considerar la posible presencia de enterobacterias patógenas como *Salmonella* y *Shigella*, aplicando técnicas alternativas (tales como epifluorescencia), mediante las cuales se

asegure la ausencia de bacterias viables pero no cultivables y la efectividad en los sistemas de desinfección.

De acuerdo con lo establecido en el reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios (1988), en lo referente a bebidas no alcohólicas congeladas se indica que con la denominación de paletas de agua, producto congelado elaborado con agua potable como base, adicionado de azúcar u otro edulcorante nutritivo, esencia de fruta, frutas frescas o conservadas, deberán:

- 1) Encontrarse libres de patógenos
- 2) La presencia del bacilo coli no excederá de la tolerancia para el agua potable.

En lo referente y para considerar que el agua es potable:

- 1) El número de coliformes totales debe ser como máximo de dos organismos en 100 mL según la técnica de NMP o filtro de membrana.
- 2) No contener organismos fecales.

Debido a la diferencia entre los valores promedio de coliformes a causa del alto índice de contaminación encontrado en las paletas heladas analizadas, se determinó que las paleterías de marca popular carecen de buenas prácticas de manufactura, siendo su producto no apto para el consumo humano.

El alto porcentaje de las especies de enterobacterias aisladas e identificadas, las cuales presentan un elevado potencial de patogenicidad, implica la necesidad de mantener un control

sobre la calidad bacteriológica de las paletas en especial en la época de mayor calor y en especial para sabores como coco, mango, arroz y guayaba.

Se recomienda seleccionar la técnica API 20 E, para la determinación de enterobacterias y otras bacterias gram negativas como el caso de *V. cholerae* debido a:

- a) precisión
- b) rapidez y
- c) validez en la identificación.

En el caso de *V. cholerae*, aunque inicialmente no se aisló en ninguna de las muestras analizadas, debido a la competencia con las bacterias coliformes, sí se logró su recuperación e identificación mediante la inoculación de las paletas con una cepa viable de *V. cholerae* O1, en las paletas de arroz y coco que presentaron un valor promedio mayor de 6, lo cual confirma su inhibición al pH ácido. Esto demuestra que las técnicas propuestas son válidas para el aislamiento e identificación de ésta bacteria.

VIII RECOMENDACIONES

Algunos de los principales objetivos para erradicar la incidencia de enfermedades gastrointestinales en el país son:

- ☞ Contar con agua desinfectada en todos los sistemas de distribución

- ☞ Efectuar monitoreos constantes para detectar riesgos de contaminación bacteriana en las fuentes de abastecimiento de agua que podrían provocar epidemias como el caso del cólera.

- ☞ Asegurar que el riego de hortalizas, verduras y frutas que se consumen crudas con aguas residuales no tratadas quede exento
- ☞ Mantener los subsecuentes controles en las etapas de recolección, empaclado y expendio al público incluyendo el mal manejo (traducido en golpes y magulladuras) que incrementan los focos de infección, instalando estaciones de lavado de hortalizas, verduras y frutas en general antes de su comercialización. Es muy significativa la reducción del riesgo como consecuencia de la aplicación de medidas higiénicas y de saneamiento, tanto en las zonas de cultivo como durante la etapa de comercialización (CEPIS, 1990)
- ☞ Asegurar que el hielo, agua embotellada y otros productos afines como refrescos, helados, paletas heladas, aguas frescas (en cuya elaboración incluyan frutas que a su vez fueron regadas y/ o rehidratadas con agua contaminada) cumplan con las normas de calidad sanitaria.
- ☞ Contar con técnicas probadas y aprobadas que cumplan con los requisitos especificados para llevar a cabo los análisis y en especial en productos cuyo alto consumo presenten un riesgo a la salud pública, constituye la posibilidad de evitar el conjunto de enfermedades infecciosas, resaltando las infecciones del tracto gastrointestinal, (Feachem y colaboradores, 1983), que constituyen la mayor causa de mortandad a nivel mundial y en especial en la población infantil y preescolar en los países en desarrollo.
- ☞ La población debe participar con medidas higiénicas, además de evitar el consumo de alimentos que puedan estar contaminados

- ☞ Es importante identificar los puntos críticos de la ruta donde se produce la contaminación microbiológica y las causas del deterioro de la calidad del producto.
- ☞ Para su logro es importante la participación y compromiso de todo el personal que participa desde la selección de la materia prima, elaboración y distribución del producto terminado. Los productos que presentan peligros microbiológicos suelen ser consecuencia de desviaciones en los procesos de elaboración, su corrección y su prevención anticipada es definitivo para cualquier método de garantía de calidad sanitaria.

- ☞ Es importante realizar monitoreos que incluyan desde la observación, la medición y el registro de parámetros establecidos para el control, permitiendo detectar una desviación en un punto crítico y tomar acciones correctivas inmediatas (SSA, 1993).

Los factores que requieren de una vigilancia y control extremo en un establecimiento que manufacture alimentos son (SSA, 1993):

1.- La higiene personal:

- Cualquier persona que se encuentre en contacto con los productos debe someterse a un examen médico con una periodicidad de un año como mínimo, para evitar que personas con enfermedades contagiosas laboren en contacto directo con los productos
- Portar ropa limpia y adecuada (incluyendo calzado)

- Lavarse las manos y sanearlas antes de iniciar el trabajo, después de cada ausencia del mismo y en cualquier momento cuando las manos puedan estar sucias o contaminadas
- Mantener las uñas cortas, limpias y libres de pintura
- Utilizar cubre-boca (obligatorio) y evitar estornudar y/o toser sobre el producto
- No tener chicles, dulces u otro objeto en la boca durante el trabajo, ya que estos pueden caer al producto en proceso
- Usar protección que cubra totalmente cabello, barba y bigotes
- Evitar la utilización de joyas, adornos, broches, relojes, pulseras, o cualquier otro material que pueda contaminar el producto durante su elaboración
- Evitar cualquier contaminación con cosméticos
- Cubrir cualquier herida con material impermeable, antes de entrar al área de proceso

2.- En el área de trabajo:

- Evitar equipo mal almacenado, desperdicios y chatarra, basura, polvo, drenaje inadecuado, que ocasione la proliferación de microorganismos patógenos y plagas en general
- Contar con ventilación adecuada que evite el calor excesivo, la condensación del vapor, humedad y para eliminar el aire contaminado
- Las tuberías, conductos, rieles, vigas, cables, entre otros, deben tener acceso para su limpieza y no deben estar libres encima de tanques y áreas de trabajo donde el

proceso esté expuesto pues constituyen riesgo de condensación y acumulación de polvo que contamina los productos.

3.- Los equipos y utensilios:

- Deben mantenerse limpios y desinfectados
- Evitar aquellos que no puedan limpiarse adecuadamente.
- Los alimentos congelados requieren en su almacenamiento de áreas de refrigeración tan limpias como cualquier equipo que tenga contacto directo con ellos. Es importante que el establecimiento mantenga un estricto control de calidad, para lo cual se deberá de contar con registros completos del proceso, materias primas y del producto terminado.
- Llevar una bitácora con las desviaciones del proceso y la información de evaluación de la calidad de los lotes.

IX BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abbar, F. y Kaddar H. Kh., 1991. Bacteriological Studies on Iraqi Milk Products. Journal of Applied Bacteriology **71**: 497-500.
- 2.- Arroyo, M., 1983 "Las Diarreas Infantiles Florecen en Primavera" Revista del Consumidor: Salud, **74**: 26.
- 3.- Arroyo, M., 1984 "Llegan los Calores y ... ¡Aguas! con las Nieves y las Paletas. Revista del Consumidor: Alimentos y Nutrición. **87**: 22 - 23.
- 4.- Arteaga, I. H., Zavala, J. T., Schettino S. P.M. y Jiménez P. C.M., 1980. Determinación de la contaminación Fecal en Frutas y Verduras de Mercados de la Ciudad de México. 1-17 p.
- 5.- Biagi, F., 1992. Enfermedades Parasitarias. Ed. La Prensa Médica Mexicana. 3-12 p.
- 6.- Burrows, W., 1984, Tratado de Microbiología. 21^a ed., México. Ed. Interamericana, 215-547 p.
- 7.- Byrd, J.J., Xu, Huai-Shu, and Colwell, R.R., 1991. Viable but Nonculturable Bacteria in Drinking Water. Applied and Environmental Microbiology **57**: 875-878.
- 8.- CEPIS., 1990. Evaluación de Riesgos para la Salud por el Uso de las Aguas Residuales en Agricultura. Lima Perú, 1-32 p.
- 9.- CETESB, Sao Paulo., 1991. Coliformes Totais e Fecais Determinacao pela Técnica de Tubos Múltiplos: Método de Ensaio. Sao Paulo, (Norma Técnica L5.202).31p

- 10.- CETESB, Sao Paulo., 1978. Guía para Avaliacao de Laboratórios Bacteriológicos de Análises de Agua. Sao Paulo.1-32 p.
- 11.- CETESB, Sao Paulo., 1991. Manual de Métodos de Aislamiento e Identificación de *Vibrio cholerae* en Aguas. Sao Paulo,1-32 p.
- 12.- Cortés, M.J., Tejeda G. y Sánchez V.C., 1993. Aprovechamiento de Aguas Residuales en la Agricultura. IMTA - CNA Noviembre, 1-11 p.
- 13.- Desmonts, C., Minet J., Colwell, R. and Cormier, M., 1990. Fluorescent-Antibody Method Useful for Detecting Viable but Nonculturable *Salmonella spp.* in Chlorinated Wastewater. Applied and Environmental Microbiology **56**: 1448-1452.
- 14.- Dhiman, B. y Greenough III, W.B., 1992. Current Topics in Infectious Disease: Cholera. New York, Plenum Medical Box Company, 315-338 p.
- 15.- Feachem, R.G., Bradley, D.J., Garelick, H y Mara, D.D., 1983, Sanitation and Disease Health Aspects of Excreta and Wastewater Management Chichester, John Wiley and Sons. 297-325 pp
- 16.- Fuller, J.H. y Ritchie, D. D., 1980 Botanica General De CECSA,. México 163-165 p.
- 17.- Giono, S.C., Escobar A.G., Valdespino, J.L.G., 1993. Manual de Diagnóstico de Laboratorio de Infecciones Gastrointestinales. México Publicaciones Técnicas del INDRE No. 22, 1-29 p.

- 18.- González, M.J., Iriberrí, J., Egea, L. y Barcina I., 1992. Characterization of Culturability, Protistan Grazing, and Death of Enteric Bacteria in Aquatic Ecosystems. Applied and Environmental Microbiology **58**: 998-1004
- 19.- Grisez, L., Ceusters, R. y Ollivier F., 1991 The Use of API- 20E for the Identification of *Vibrio anguillarum* and *V. ordalii*. Journal of Fish Diseases. **14**: 359-365
- 20.- Havelaar, A.H. y Nieuwstad, Th.J., 1985. Bacteriophages and Fecal Bacteria as Indicators of Chlorination Efficiency of Biologically Treated Wastewater. Journal Water Pollution Control Federation **57**: 1084-1088.
- 21.- Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. 1992. Manual de Identificación y Cuantificación de *Vibrio cholerae*, Programa "Agua Limpia". 2a. Edición. 56 pp.
- 22.- Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI)., 1990 Ciudad de México (Área Metropolitana). "Resultados Definitivos Tabulados Básicos XI Censo General de Población y Vivienda". México IX p.
- 23.- Instituto Nacional De Referencia Epidemiológicos. 1991 Manual de *Vibrio cholerae* Q1.43-48 p.
- 24.- Instituto Nacional De Referencia Epidemiológicos. 1993. Manual de Diagnóstico de Laboratorio de Infecciones Gastrointestinales. Capítulo III-9, 64 pp.
- 25.- Jawetz, E., Melnick, J.L., y Adelberg E.A. 1992. Manual de Microbiología Médica 14ª ed., Ed. Manual Moderno. México 59-230 p.

- 26.- Joklik, W.F., Willett, H.P. y Amos, B. 1992. Microbiología Ed Panamericana México 688-690 p.
- 27.- Jones, M.V., Wood, M.A. y Herd, T.M. 1992. Comparative Sensitivity of *Vibrio cholerae* O1 El Tor and *Escherichia coli* to Desinfectants. Letters in Applied Microbiology **14**: 51-53.
- 28.- King, C.H., Shotts, E.B., Wooley, R.E. and Porter, K.G. 1988. Survival of Coliforms and Bacterial Pathogens Within Protozoa During Chlorination. Applied and Environmental Microbiology **54**: 3023-3033
- 29.- Kuramura, J., 1983. "Aguas, Frutas, Paletas y Raspados...", Revista del Consumidor: Salud, **100**: 33.
- 30.- Lavoie, M.C. 1983 Identification of Strains Isolated as Total and Fecal Coliforms and Comparison of Both Groups as Indicators of Fecal Pollution in Tropical Climates. Canada Journal of Microbiology **29**: 689-693
- 31.- LeChevallier, M.W., Schulz, W. y Lee, R.G. 1991. Bacterial Nutrients in Drinking Water. Applies and Environmental Microbiology **57**: 857-862.
- 32.- McFeters, G.A. y Singh, A. 1991. Effects of Aquatic Environmental Stress on Enteric Bacterial Pathogens. Applied Environmental Microbiology **70**: 115 - 120.
- 33.- Ministerio de Economía Fomento y Recosntrucción 1991. Helados ¿Cuánto Aire Contienen?. Revista Consumidor: SERNAC **6**: 4-5.

- 34.- Perea, E.J., 1992 , Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica Ed. DOYMA España 624-633 p.
- 35.- Public Health Association. 1992. Microbiological Examination in: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 18 ed. Washington, APHA; AWWA, WPCF. 1145 pp.
- 36.- Secretaría de Comercio y Fomento Industrial NOM-AA-42. 1987. Calidad del Agua Determinación del Número Más Probable (NMP) de Coliformes Totales y Coliformes Fecales (Termotolerantes) y Escherichia coli Presuntiva. Norma Oficial Mexicana, NOM-AA-42. 17 pp.
- 37.- Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología, Laboratorio Nacional de Salud Pública. 1989. Manual de Técnicas y Procedimientos para Análisis Microbiológicos de Derivados de Lácteos. Impresiones en la Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios, 31 pp.
- 38.- Secretaria de Salud, 1988 Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades , Establecimientos, Productos y Servicios.: Bebidas no Alcohólicas, Productos para Prepararlas y Productos Congelados de las Mismas. 89-90 p.
- 39.- Secretaría de Salud, Subsecretaría de Regulación y Fomento Sanitario. 1993. Guía para la Autoverificación de la Buenas Prácticas de Higiene en su Establecimiento. Impresiones en la Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios, 31 pp.

- 40.- Secretaría de Salud, Subsecretaría de Regulación y Fomento Sanitario. 1993. Manual de Aplicación del Análisis de Riesgos, Identificación y Control de Puntos Críticos. Impresiones en la Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios, 49 pp.
- 41.- Secretaría de Salud, Subsecretaría de Regulación y Fomento Sanitario. 1993. Manual de Buenas Prácticas de Higiene y Sanidad. Impresiones en la Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios, 64 pp.
- 42.- Sharpe, A.N., Rayman, M.K. y Burgener, D.M. 1983. Collaborative Study of the MPN, Anderson-Baird-Parker Direct Planting, and Hydrophobic Grid Membrane Filter Methods for the Enumerations of *Escherichia coli* Biotype I in Foods. Canada Journal of Microbiology **29**: 1247-1252
- 43.- Stewart, M.H. y Olson, B.H. 1992. Impact of Growth Conditions on Resistance of *Klebsiella pneumoniae* to Chloramines. Applied and Environmental Microbiology **58**: 2649-2653.
- 44.- Tay, Z.J., Aguilera, L.R., Quiroz, G.M. y Castrejón, V.O., 1991 Parasitología Médica Ed. Francisco Méndez Cervantes México 30-35 p.
- 45.- Troyan, J.J. y Hanson, S.P. 1989. Treatment of Microbial Contaminants in Potable Water Supplies: Technologies and Costs. Noyes Data Corporation U.S.A., 98- 153 p.
- 46.- Venosa, A. D. y Russell I. 1987. Desinfection Wastewater Treatment. Journal Water Pollution Control Federation **59**: 421-425.

- 47.- Walsh, S.M. y Bissonnette, G.K. 1989. Survival of Chlorine-Injured Enterotoxigenic *Escherichia coli* in an In Vitro Water System. Applied and Environmental Microbiology 55: 1298-1300.
- 48.- Wayne, D. W., 1988. Bioestadística: Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud. Ed. Limusa México. 283-487 p.

ANEXO 1: DESCRIPCION DE LAS TECNICAS UTILIZADAS EN LA DETERMINACION DE LA CALIDAD BACTERIOLOGICA.

1.1 Técnica del número más probable (NMP), para la determinación de coliformes totales y coliformes fecales

1.1.1.- Diluciones seriadas

- Se efectuaron las diluciones seriadas necesarias de cada muestra, en tubos de ensayo conteniendo 9 mL de solución estéril buffer de fosfatos o agua de dilución de fosfatos.
- Las diluciones se prepararon añadiendo 1 mL de la muestra filtrada al primer tubo de ensayo, (dilución 1:10); de éste tubo se extrajo 1 mL para añadirlo al siguiente, (dilución 1:100) y así sucesivamente hasta obtener la dilución final deseada. Cada dilución preparada se homogeneizó perfectamente antes de su utilización.
- Cuando las muestras fueron analizadas por primera vez, se utilizaron al menos siete diluciones para seis series de cinco tubos de cada una. Posteriormente, se determinó la dilución más probable y como consecuencia el número de la serie de tubos a utilizar para cada sabor que presentaba regularmente la mayor dilución con resultados positivos en al menos uno de los tubos.

1.1.2.- Prueba presuntiva

- Se prepararon series de 5 tubos con medio Caldo lactosado (CL) o Caldo lauril triptosa (CLT) de concentración doble y sencilla y púrpura de bromocresol como indicador.
- Se utilizó el factor 10 de dilución, inoculando múltiplos y submúltiplos de 1 mL del filtrado de la muestra, de la siguiente manera:

Concentración de CL o CLT	Serie de 5 tubos	Volumen inoculado de la muestra (mL)
Doble	1	10 mL
Doble	2	1 mL
Sencilla	3	0.1 mL de la dilución 10^{-1}
Sencilla	4	0.1 mL de la dilución 10^{-2}
Sencilla	5	0.1 mL de la dilución 10^{-3}

- Y así sucesivamente. Los tubos inoculados se incubaron a 35 ± 0.5 °C durante 24 ± 2 horas, se examinaron los tubos que presentaron producción de gas y cambio en el indicador. Los tubos negativos se reincubaron otras 24 horas. Posteriormente a las 48 ± 3 horas los tubos negativos, se desecharon.

1.1.3.- Prueba confirmativa para coliformes totales

- Los tubos positivos de la prueba presuntiva se resembraron por triple asada (en condiciones de asepsia) en tubos de fermentación que contenían Caldo Lactosa Bilis Verde Brillante al 2 % (C.L.B.V.B.) y se incubaron a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.
- A las 24 ± 2 horas, los tubos que no presentaron producción de gas se reincubaron otras 24 horas a la misma temperatura. Los tubos negativos después de 48 ± 3 horas de incubación se desecharon.

1.1.4 Prueba confirmativa para coliformes fecales

- Los tubos positivos de la prueba presuntiva se resembraron por triple asada (en condiciones de asepsia), en tubos de fermentación que contenían caldo EC, que se incubaron a $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ en baño de agua con agitación.
- A las 24 horas los tubos negativos se desecharon.

1.1.5.- Prueba confirmatoria

- Como procedimiento del control de calidad, se efectuó la prueba confirmatoria, realizando el aislamiento de las bacterias con resultado positivo en C.L.B.V.B., en placas de agar eosina azul de metileno (EMB) por estría cruzada incubándolas a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas.

- Las colonias aisladas con crecimiento característico, se inocularon en tubos de caldo lactosado para detectar la presencia o ausencia de gas.
- También se inocularon placas de agar infusión cerebro corazón (BHI), incubando a 35 ± 0.5 °C durante 24 horas, y posteriormente se realizaron las siguientes pruebas:

1.1.6.- Prueba de oxidasa

- Con un palillo estéril, se tomó una colonia perfectamente aislada en la placa de BHI y se aplicó en un papel filtro impregnado del reactivo de oxidasa.

1.1.7.- Tinción de Gram

- De igual forma se realizó la tinción de gram a las colonias de agar BHI, para lo cual se prepararon emulsiones ligeras del crecimiento bacteriano con la ayuda de dos gotas de agua destilada sobre un portaobjetos.
- La emulsión se secó al aire y se fijó acercándola a la flama del mechero, posteriormente se tiñó con la solución de oxalato de amonio-cristal violeta para aclararlo con agua corriente.
- Se aplicó la solución de lugol durante un minuto y se lavó nuevamente con agua corriente.

- La preparación se descoloró con alcohol-acetona durante 30 segundos, posteriormente se aplicó el colorante de contraste, la safranina , durante 15 segundos, para lavarse con agua corriente y secarse con papel filtro o al aire.
- Por último se realizó la observación al microscopio, para confirmar microorganismos gram negativos.

1.1.8.- Cálculos

- Se realizaron los cálculos para obtener de cada muestra el NMP del grupo de coliformes totales y de coliformes fecales.
- El NMP de coliformes totales se obtuvo a partir del código compuesto por los tubos con resultados positivos a la prueba confirmativa en medio de C.L.B.V.B.
- El NMP de coliformes fecales se obtuvo a partir del código compuesto por los tubos con resultados positivos a la prueba confirmativa en el medio EC.
- Para su obtención se utilizaron los códigos formados por tres algoritmos correspondientes al número de tubos con resultados positivos en tres series consecutivas, el primer número seleccionado para componer el código corresponde a la serie de menor volumen de muestra (mayor dilución), con los primeros resultados negativos.

- Encontrándose éste código en las tablas de valores, reportadas en la bibliografía, con límites de confianza al 95% para cada una de las
- combinaciones de tres series consecutivas de tubos positivos posibles. El valor final del NMP se obtiene a través de la aplicación de la siguiente fórmula:
- $NMP = (NMP \text{ de tablas}) \times (10/\text{mayor volumen inoculado})$
- Cuando el código obtenido de las combinaciones no se encontró en las tablas de valores, la densidad bacteriana se estimó mediante la fórmula de Thomas:

$$NMP / 100mL = \frac{(Nan. \text{ tubos positivos})(100)}{\sqrt{(mL \text{ muestra en tubos negativos})(mL \text{ muestra en todos los tubos})}}$$

1.2.- Técnicas para el aislamiento e identificación de enterobacterias

A Aislamiento bacteriano en medio selectivo.

Para el aislamiento bacteriano se sembraron los siguientes medios parcialmente inhibitorios para los principales géneros de enterobacterias.

- Agar Mac Conkey
- Agar Eosina azul de metileno (EMB)
- Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)
- Sulfito de bismuto
- Agar Verde brillante.

Cada uno de ellos es selectivo para uno o más géneros de esta familia.

- Se tomó un inóculo a partir de los tubos positivos de Caldo EC de la técnica del NMP y el aislamiento de colonias se realizó con asa de siembra por estría cruzada esterilizando en cada sección de la placa, totalizando 4 cruces. Se incubaron las placas durante 18- 24 horas a 35 ± 0.5 °C.
- Las placas de sulfito de bismuto se dejaron en incubación hasta 48 horas, antes de eliminarlas si no se observaba crecimiento alguno.

B Selección de colonias

Las colonias se seleccionaron para su identificación en los medios diferenciales de acuerdo a su color según el medio inhibitorio.

- Agar XLD: seleccionar colonias rojas.
 - Agar EMB: seleccionar colonias verdes con brillo metálico.
 - Agar Mac Conkey: seleccionar colonias rosas con halo claro
 - Agar verde brillante: seleccionar colonias blanco rosado con un fondo rojo.
 - Agar sulfito de bismuto: seleccionar colonias negras y/o verdes.
- Para asegurar una identificación exacta, se utilizó un cultivo puro, que se obtuvo inoculando del centro de la colonia bien aislada, con una respuesta típica en el medio selectivo, en placas de agar BHI.
 - Se sembraron a partir de una sola colonia aislada, con el asa en punta, para evitar contaminaciones con colonias adyacentes, aislando por duplicado o triplicado colonias individuales de cada placa de agar .

- El aislamiento se realizó por estría cruzada, esterilizando el asa de siembra en cada sección de la placa, en total 4 cruces.
- Las placas de agar BHI se incubaron a 35 ± 0.5 °C, durante 18 a 24 horas, para obtener colonias aisladas.

1.2.1.- Técnica de identificación por cuatro medios diferenciales

1.2.1.1.- Medio MIO

- El medio semisólido preparado en tubos de vidrio de 13 X 100 con tapón de rosca, se sembró por picadura hasta el fondo , con la ayuda de un asa en punta. Se incubó a 35 ± 0.5 °C, durante 18 a 24 horas.
- La lectura se efectuó de la siguiente forma:
- Movilidad positiva: Turbiedad del medio por crecimiento en todo el tubo.
- Movilidad negativa: Crecimiento sólo a lo largo de la picadura.
- La descarboxilación de la ornitina se realiza en anaerobiosis, por lo tanto la prueba se leyó sólo en el fondo del tubo.
- Ornitina positiva: Color púrpura o morado en el fondo del tubo por alcalinidad del medio.
- Ornitina negativa: Color amarillo en el fondo del tubo, por la acidificación del medio.

- Indol positivo: Al agregar reactivo de Kovacs o reactivo de Erhlich, al formarse un anillo color rosa a rojo.
- Indol negativo: cuando se forma un anillo color amarillo.

1.2.1.2.- Agar de hierro y triple azúcar (TSI)

- En este medio se determinó la fermentación de la glucosa (que se lleva a cabo en el fondo del tubo en condiciones de anaerobiosis), la sacarosa y la lactosa (que se efectúa en el ápice del tubo), utilizando rojo de fenol como indicador de pH.
- El medio preparado en tubos de vidrio de 13 X 100 con tapón de rosca, se inoculó por picadura y por estría, incubando de 18 a 24 horas a 35 ± 0.5 °C.
- La lectura se efectuó de la siguiente forma:
 - Glucosa positiva: fondo del tubo color amarillo.
 - Glucosa negativa: fondo del tubo color rojo, sin cambio.
 - Sacarosa y lactosa positivas: ápice del tubo color amarillo
 - Sacarosa y lactosa negativa: ápice del tubo color rojo
 - Producción de gas positiva: presencia de burbujas de gas en el medio.
 - Producción de ácido sulfhídrico positivo: formación de un precipitado negro en el fondo del tubo o en el sitio de la picadura.

1.2.1.3.- Agar de hierro y lisina (LIA)

- Este medio determina la descarboxilación de la lisina que se lleva a cabo en anaerobiosis, así como la desaminación de la lisina que se realiza en aerobiosis, utilizando como indicador de pH el púrpura de bromocresol.
- Se inoculó por doble picadura y por estría, el medio inclinado preparado en tubos de vidrio de 13 X 100 con tapón de rosca, incubando de 18 a 24 horas a 35 ± 0.5 °C.
- La lectura se efectuó de la siguiente forma:
 - Descarboxilación positiva: Cuando el fondo del tubo es de color púrpura
 - Descarboxilación negativa: Cuando fondo del tubo es de color amarillo.
 - Desaminación positiva: si la superficie del tubo es color rojo vino
 - Desaminación negativa: si la superficie del tubo permaneció sin cambio.

1.2.1.4.- Citrato de Simmons o citrato de sodio

- En este medio se detectó la capacidad de la bacteria para utilizar el citrato como fuente de carbono
- Se inoculó por picadura y estría el medio inclinado preparado en tubos de vidrio de 13 X 100 con tapón de rosca.
- Se incubaron de 24 a 48 horas a 35 ± 0.5 °C.
- En el caso de aquellos tubos que no presentaron cambio en el transcurso de dicho tiempo, se incubaron durante 3 días más a 22-25 °C.
- La lectura se realizó de la siguiente forma:

- Una coloración verde: reacción negativa.
- Una coloración azul: reacción positiva.

En general, para la lectura de las reacciones bioquímicas realizadas en los medios de cultivo descritos, se utilizaron las claves siguientes:

- ☞ A: amarillo, acidificación del medio
- ☞ K: rojo - anaranjado, alcalinización del medio
- ☞ R: púrpura - rojo, desaminación
- ☞ N: medio neutro

Cuando se presentaron dos reacciones en el mismo medio, se expresaron de la siguiente manera:

- ☞ A/A: amarillo (acidificación)/ amarillo (acidificación)
- ☞ K/K ó K/N: rojo (alcalinización)/ rojo (alcalinización)
- ☞ K/A: rojo (alcalinización)/ rojo (acidificación)
- ☞ R/A: púrpura-rojo (desaminación)/ amarillo (acidificación)

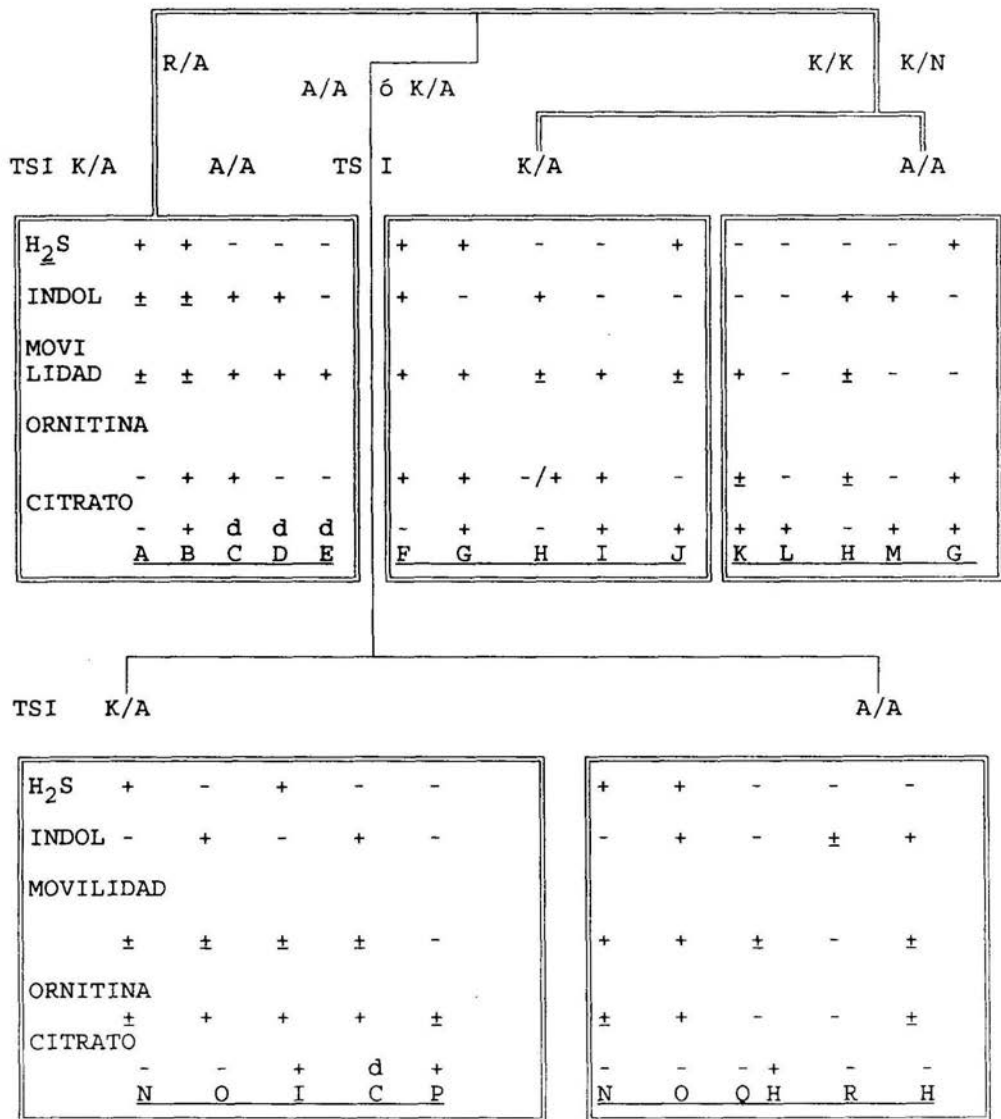
Las lecturas efectuadas se compararon con las claves que incluye las posibles combinaciones bioquímicas (FIG.7).

Las lecturas deben iniciarse con el medio LIA, continuar con TSI, MIO y concluir con el Citrato de Simmons, registrando los resultados encontrados.

FIGURA 7: ESQUEMA DE POSIBLES LECTURAS OBTENIDAS EN LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DE ENTEROBACTERIAS POR CUATRO MEDIOS Y CLAVES CORRESPONDIENTES

DIFERENCIALES

LIA



C L A V E S	
+	POSITIVO
-	NEGATIVO
±	POSITIVO Y/ O NEGATIVO
d	NO DETERMINANTE

Relación de géneros y especies (en algunos casos) identificados de acuerdo a la letra obtenida:

- A) *Proteus vulgaris*
- B) *Proteus mirabilis*
- C) *Morganella*
- D) *Providencia*
- E) *Providencia rettgeri*
- F) *Edwardsiella*
- G) *Salmonella*
- H) *Escherichia coli*
- I) *Enterobacter*
- J) *Salmonella typhi*
- K) *Enterobacter, Serratia, Hafnia*
- L) *Klebsiella pneumoniae*
- M) *Klebsiella oxytoca*
- N) *Citrobacter freundii*
- O) *Citrobacter diversus ó amalonaticus*
- P) *Shigella*
- Q) *Enterobacter agglomerans*
- R) *Yersinia enterocolitica*

1.2.2.- Técnica IMViC

1.2.2.1.- Prueba del indol

- Se inocularon porciones de 4 mL de caldo triptofano contenido en tubos de ensayo con tapón de rosca y se incubaron a 35 ± 0.5 °C durante 24 ± 2 horas.
- Se manifiesta la presencia del indol al agregar de 3 a 5 gotas del reactivo de Ehrlich, la prueba se considera positiva al presentarse un anillo rojo, es negativa al presentarse un anillo amarillo en la superficie del medio.

1.2.2.2.- Prueba del Rojo de Metilo

- Se inocularon 5 mL del medio MRVP con el cultivo puro, y se incubaron a 35 ± 0.5 °C al menos 48 ± 3 horas. En ocasiones se deben incubar los tubos hasta 4 - 5 días para obtener resultados positivos.
- La prueba de rojo de metilo se manifiesta al añadir 5 gotas de la solución indicadora al medio y dejar reposar 10 minutos, para determinar los siguientes resultados:
 - Prueba positiva cuando la coloración fue roja.
 - Prueba negativa cuando la coloración fue amarilla.

1.2.2.3.- Prueba de Voges-Proskauer

- La prueba es positiva si al adicionar 0.6 mL de la solución de naftol y 0.2 mL de KOH a 1 mL de cultivo, a los 5 minutos aparece un color rosa o carmesí. Por el contrario la prueba es negativa si aparece una coloración cobriza.

1.2.2.4.- Prueba del citrato de sodio

- Se inocularon tubos con el medio de Citrato de Simmons por picadura y estría con el cultivo puro obtenido en agar BHI, se incubaron de 24 a 48 horas a 35 ± 0.5 °C. En aquellos casos en que no se presentaron cambios en ese tiempo, la incubación se prolongó 3 días más a 22 - 25 °C.
- La reacción positiva se indica por una coloración azul, y la prueba negativa se indica por la aparición de una coloración verde.

1.2.2.5.- Prueba del SIM (prueba adicional)

- En este medio se puede determinar si la bacteria presenta movilidad por crecimiento difuso en el medio, la presencia de indol y la producción de H₂S.
- Se inoculó el medio de SIM por picadura hasta el fondo con la ayuda de un asa de siembra en punta, incubando de 24 horas a 35 ± 0.5 °C.

1.2.3.- Técnica de API-20 E

1.2.3.1.- Prueba de oxidasa

Se realiza como prueba preliminar para el grupo de enterobacterias, que presentan una reacción oxidasa negativa.

- Con un palillo estéril se tomó una colonia perfectamente aislada de la caja de agar BHI con el cultivo de 24 horas, y se aplicó en un papel filtro impregnado del reactivo de oxidasa.

1.2.3.2.- Preparación de la suspensión bacteriana homogénea

- Se preparó una suspensión bacteriana con una concentración aproximada a 300×10^6 bacterias/ mL de *Escherichia coli*, por medio de la comparación en turbiedad con el tubo No.1 de la escala de Mc Farland (ver ANEXO 2)
- Se tomó con un palillo estéril el centro de una colonia de la caja de agar BHI y se depositó en un tubo con 5 mL de solución salina estéril al 0.85%. Se homogeneizó agitándolo en un vórtex automático.
- Se tomó en consideración que no deben pasar mas de 15 minutos entre la preparación de la suspensión bacteriana y la inoculación de las tiras reactivas.

1.2.3.3.- Inoculación de las galerías o tiras reactivas

- Se etiquetó una cámara de incubación con la clave específica de la muestra y la fecha correspondiente, en la lengüeta lateral de la cubeta. Con ayuda de una piseta, se llenaron los alvéolos con agua destilada para proporcionar a la cámara de incubación una atmósfera húmeda y se colocó dentro la galería o tira reactiva a utilizar.
- Las cámaras de incubación y galerías se incubaron durante 10 minutos a 35 ± 0.5 °C, antes de su inoculación.
- Una vez transcurrido ese tiempo, se llenaron cada uno de los microtubos de la tira reactiva con la suspensión bacteriana perfectamente homogeneizada, de la siguiente manera:
- Cada uno de los microtubos está compuesto por un tubo y una cúpula, los microtubos están marcados por un recuadro, subrayados o sin marca, para diferenciarlos en la forma de inoculación:
 - ☞ Los microtubos marcados con un recuadro, se llenaron completamente, tanto el tubo como la cúpula.
 - ☞ Los microtubos señalados con una raya, se llenaron parcialmente, y después las cúpulas se sellaron con aceite de parafina.
 - ☞ Del resto de los microtubos se llenaron únicamente los tubos.

Se cerraron las cámaras y se incubaron a $35 - 37 \pm 0.5$ °C durante 18- 24 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación se observaron las tiras reactivas, si la prueba de la glucosa y 3 o más microtubos eran positivos, se procedía a leer resultados. En caso contrario, las tiras se incubaron durante 24 horas más.

1.2.3.4.- Lectura de las reacciones

Transcurrido el tiempo de incubación, se agregaron los reactivos correspondientes, y se registraron los resultados considerados para una prueba positiva o una prueba negativa (ver Cuadro 1 y Cuadro 2, para Sistema API-20E Lectura de Reacciones en la Galería)

1.2.3.5.- Obtención del código de identificación

- Si la reacción fue positiva (+) o negativa (-), se registraron las lecturas en el lugar correspondiente del formato proporcionado por el fabricante.
- El formato está dividido en siete triadas, cada prueba tiene un valor numérico asignado: la primera tiene el valor "1", la segunda "2" y la tercera "4".
- Para obtener el valor de cada triada, se sumaron solamente los valores de las pruebas positivas, obteniéndose así siete números que formaron un código, el cual se comparó con los del index del API- 20E, para identificar a la bacteria.

CUADRO 1: SISTEMA API-20E LECTURA DE REACCIONES EN LA GALERIA

TUBO	LECTURA POSITIVA	LECTURA NEGATIVA	OBSERVACIONES
ONPG	Amarillo	Incoloro	1) Un matiz amarillo es una reacción positiva. 2) El tubo VP antes de la adición del reactivo puede ser utilizado como control negativo.
ADH	Rojo o naranja	Amarillo	Un matiz anaranjado puede considerarse como reacción positiva.
LDC	Rojo o Naranja	Amarillo	Un matiz anaranjado puede considerarse como una reacción positiva.
ODC	Rojo o naranja	Amarillo	-----
CIT	Turquesa o azul oscuro	Verde brillante o amarillo	Tubo y Cúpula pueden ser útiles. La reacción se lee en la cúpula.
H ₂ S	Depósito negro	Sin depósito negro	La producción de H ₂ S muchas veces pasa de un depósito negro pesado a una línea negra escasa alrededor del fondo del tubo. Un castaño en el medio es una reacción negativa a menos que un depósito negro este presente.
URE	Naranja	Amarillo	<i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> y <i>Yersinia</i> dan rutinariamente una reacción positiva.
TDA	Adicionar una gota de FeCl ₃ Café	Adicionando una gota de FeCl ₃ Amarillo	Reacción inmediata. Muchos organismos Indol + (que producen Indol) presentan un color anaranjado dorado, debido a la producción de indol, esta es una reacción negativa.
IND	Adicionar una gota de reactivo de Kovacs Rojo (superficial)	Adicionar una gota de reactivo de Kovacs Amarillo	La reacción puede leerse después de 2 minutos de la adición del reactivo de Kovacs. Después de unos minutos el HCl presente en el reactivo de Kovacs muchas veces reacciona con el plástico de la cúpula resultando un cambio de un negativo (amarillo) a un café o rojo, esta es una reacción negativa.
VP	Adicionar una gota de KOH al 40% y luego una gota de alfa-naftol Rojo	Adicionar una gota de KOH al 40% y luego una gota de alfa-naftol Incoloro	Esperar 10 min. antes de considerar la reacción negativa. Un color rosa pálido después de 10 min. será interpretado como negativo. La presencia de un color rosa pálido inmediatamente después de la adición de los reactivos, pero con tonos rosa oscuro o rojo después de los 10 min. será interpretado como positivo.

CUADRO 1: SISTEMA API-20E LECTURA DE REACCIONES EN LA GALERIA (CONTINUACION)

TUBO	LECTURA POSITIVA	LECTURA NEGATIVA	OBSERVACIONES
GEL	Difusión del pigmento	Sin difusión	Las partículas sólidas de la gelatina se pueden difundir por todas partes del tubo después de la inoculación. A menos que la difusión ocurra la reacción es negativa. Cierta grado de difusión es una reacción positiva.
Fermentación MAN IND SOR RHA SAC MEL AMY ARA	Amarillo	Azul Azul verde	Oxidación Gram negativas. La utilización de la oxidación de carbohidratos comienza en la porción aérea del tubo, por tanto esta reacción sólo puede ser leída de la superficie hacia el fondo del tubo. Un color amarillo en la porción superior del tubo y un azul en el fondo indican una utilización oxidativa del azúcar, esta reacción puede considerarse positiva sólo para las no enterobacterias, bacilos Gram negativos. Esta es una reacción negativa para organismos fermentadores semejantes a enterobacterias.
Fermentación GLU	Después de leer la reacción GLU adicionar dos gotas de ácido sulfanílico 0.8% y dos gotas de N-dimetil-alfa-naftalina 0.5 N	Después de leer la reacción GLU adicionar dos gotas de ácido sulfanílico 0.8% y dos gotas de N-dimetil-alfa-naftalina 0.5 N	Antes de la adición del reactivo observe el tubo GLU (positivo o negativo) para burbujas.
Reducción de nitratos	Rojo NO ₂ burbujas amarillas N ₂ después del reactivo y Zinc	Amarillo Naranja después del reactivo y Zinc	Las burbujas son indicadores de la reducción de nitratos a nitrógeno N ₂ . Una reacción positiva puede tomar de 2 a 3 min. para que el color rojo aparezca. Confirme una prueba negativa añadiendo polvo de Zinc o granular. Un color rosa anaranjado después de 10 min. confirma una reacción negativa. Una reacción de color amarillo indica la reducción de nitratos a nitrógeno N ₂ .

CUADRO 2: SIGNIFICADO DE LAS ABREVIATURAS PARA LA LECTURA DEL SISTEMA API-20E

ABREVIATURAS	SIGNIFICADO	ABREVIATURA	SIGNIFICADO
ONPG	O-Nitrofenil-B-d galactosido	MAN	Manitol
ADH	Arginina dihidrolasa	SAC	Sacarosa
LDC	Lisina descarboxilasa	MEL	Melobiosa
ODC	Ornitina descarboxilasa	AMY	Amigdalina
CIT	Utilización de citrato	ARA	Arabinosa
H ₂ S	Producción de ácido sulfhídrico	INO	Inositol
URE	Hidrólisis de la Urea	SOR	Sorbitol
IND	Producción de Indol	RHA	Ramosa
VP	Prueba de Voges Proskauer(acetofn)	GLU	Glucosa
GEL	Hidrólisis de la gelatina		

1.3.- Aislamiento de *Vibrio cholerae*

1.3.1.- Técnica tradicional (doble enriquecimiento)

1.3.1.1.- Primer enriquecimiento

- Se inocularon 10 mL de la muestra homogeneizada y filtrada, en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 10 mL de Agua Peptonada Alcalina (APA) de concentración doble. Los matraces se incubaron durante 6 a 8 horas a 35 ± 0.5 °C.
- Después del período de incubación, los matraces se retiraron cuidadosamente de la incubadora evitando la agitación.
- Con auxilio de una asa de siembra debidamente flameada y fría, se tomaron tres asadas de la biopelícula formada en la superficie del medio de enriquecimiento (APA) y se sembró por estría cruzada en una placa con medio agar selectivo Tiosulfato Citrato de Bilis Sacarosa (TCBS).
- Las placas se incubaron a 35 ± 0.5 °C durante 18 a 24 horas.

1.3.1.2.- Doble enriquecimiento

- Paralelamente a la siembra de las placas de TCBS, con auxilio de una pipeta estéril se transfirieron de 1 a 2 mL del material de la biopelícula superficial de los matraces incubados, a dos tubos de ensayo que contenían 10 mL de APA de concentración simple.
- Los tubos de ensayo inoculados se incubaron a 35 ± 0.5 °C, durante 6 a 12 horas.

1.3.1.3.- Selección de colonias típicas

- Después del período de incubación, de todas las placas de TCBS inoculadas, se revisaron para observar si se presentaron colonias aisladas típicas de *Vibrio cholerae*, que son colonias amarillas, con halo brillante y convexas.

1.3.1.4.- Siembra en kligler

- Se seleccionaron de 3 a 5 colonias aisladas de cada placa y con todos los cuidados de asepsia y utilizando un asa de inoculación se inocularon cada una de ellas a los correspondientes tubos con medio Kligler inclinado, por picadura y estría.
- Los tubos de agar Kligler se incubaron a 35 ± 0.5 °C, durante 18 - 24 horas.
- La lectura de las reacciones en medio Kligler, se realizó de la siguiente manera:

☞ Lactosa (+) positiva, si la superficie del medio fue amarilla

☞ Lactosa (-) negativa si la superficie del medio fue roja

☞ Glucosa (+) positiva si el fondo del tubo fue amarillo

☞ Glucosa (-) negativa si el fondo del tubo fue rojo

☞ Producción de gas: Burbujas de gas en el medio

☞ Producción de ácido sulfhídrico: Precipitado negro en el fondo del tubo o en el sitio de la picadura.

- Se seleccionaron aquellos tubos que no presentaron producción de gas ni H₂S y presentaron una reacción K/A (alcalina/ ácida) y algunos con una reacción A/A (ácida/ ácida).
- El resto de los tubos se desecharon.
- Posteriormente de los tubos positivos para el medio Kligler, se sembraron en placas de agar Infusión Cerebro Corazón (BHI), el aislamiento se realizó por estría cruzada, esterilizando el asa de siembra en cada sección de la placa, en total 4 cruces y se incubaron a 35 ± 0.5 °C durante 18 - 24 horas.

1.3.1.5.- Prueba de oxidasa

- Transcurrido el tiempo de incubación se efectuó la prueba de oxidasa y solamente las cepas que presentaron la reacción de oxidasa positiva, se seleccionaron para realizar pruebas bioquímicas.

1.3.1.6.- Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas para cada uno de los aislamientos positivos a Kligler y oxidasa, en el siguiente orden fueron:

- 1) Caldo arginina, depositando el inóculo y sellando con aceite mineral estéril.
- 2) Medio MIO, siembra por picadura y estría
- 3) Agar de hierro y triple azúcar (TSI), siembra por picadura y estría.

4) Agar de hierro y lisina (LIA), siembra por doble picadura y estría

El inóculo fue realizado en el orden mencionado.

1.3.1.7.- *Lectura de las bioquímicas*

a) Caldo arginina

En este medio se consideraron solamente los tubos donde no se presentó la descarboxilación de la arginina, lo que se observó por la permanencia del color del medio.

b) Agar MIO

En este medio solamente se consideraron los tubos que presentaron la motilidad positiva (el medio se enturbia y se ve crecimiento en todo el tubo), el indol positivo observado por la formación de anillo color rojo en la superficie del medio al agregar el reactivo de Kovacs o Erlich y la ornitina positiva cuando el fondo del tubo fue alcalino y color púrpura o morado se mantuvo.

c) Agar de hierro y triple azúcar (TSI)

Sólo se consideraron los tubos que presentaron glucosa, sacarosa y lactosa positivas (A/A), ausencia de bióxido de carbono en el medio (burbujas de gas) y de ácido sulfhídrico detectándolo por la coloración negra.

d) Agar de hierro y lisina (LIA)

En este medio se determina la descarboxilación de la lisina que se lleva a cabo en anaerobiosis y la desaminación de la lisina que se lleva a cabo en aerobiosis, utilizando como indicador de pH el púrpura de bromocresol.

1.3.1.8.- Prueba serológica

- Una vez identificada la bacteria, se realizó la prueba serológica de aglutinación para determinar el serotipo.
- Para ello se utilizó un cultivo de 24 horas en placa de agar BHI y por medio de la suspensión homogénea de la colonia en dos gotas de solución salina al 85% en un portaobjetos con la ayuda de una asa de siembra perfectamente flameada y enfriada.
- A una de estas se le agregó una gota de antisuero polivalente, mientras que la otra sirvió como testigo negativo. La aglutinación indica la presencia de *Vibrio cholerae* O1, la ausencia de aglutinación indica la presencia de *Vibrio cholerae* No O1.

1.3.2.- Técnica API- 20E

Se continuó con el mismo procedimiento indicado para la identificación de enterobacterias.

ANEXO 2: PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

2.1 Medios de Cultivo

2.1.1 Caldo Lauril Triptosa con Púrpura de Bromocresol (C.L.T.)

(Concentración Doble)

Fórmula

Triptosa	40.00 g
Lactosa	10.00 g
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	5.50 g
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	5.50 g
Cloruro de sodio (NaCl)	10.00 g
Lauril sulfato de sodio	0.20 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agua destilada	1000 mL

pH final a 25 °C después de la esterilización: 6.8 ± 0.2

Preparación

Pesar 71.2 g del medio deshidratado de C.L.T. y 0.02 g de púrpura de bromocresol. Disolver ambos componentes en 1000 mL de agua destilada. Calentar y agitar hasta su completa disolución, evitando alcanzar la temperatura de ebullición. Distribuir volúmenes de 10 mL de medio en tubos de ensayo de 18 mm x 180 mm, conteniendo en su interior tubos de Durham invertidos. Sellar con tapones de acero inoxidable y esterilizar en autoclave a 121 °C, durante 15 minutos. El medio se almacena a temperatura ambiente en un lugar limpio y libre de polvo durante no más de una semana.

2.1.2 Caldo Lauril Triptosa con Púrpura de Bromocresol (C.L.T.)

(Concentración Simple)

Fórmula

→ Triptosa	20.00 g
Lactosa	5.00 g
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	2.75 g
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	2.75 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.00 g
↖ Lauril sulfato de sodio	0.10 g
Púrpura de bromocresol	0.01 g
Agua destilada	1000 mL

pH final a 25 °C después de la esterilización: 6.8 ± 0.2 .

Preparación

Pesar 35.6 g del medio deshidratado C.L.T. y 0.01 g de púrpura de bromocresol. Disolver ambos componentes en 1000 mL de agua destilada. Calentar y agitar hasta su completa disolución, evitando alcanzar la temperatura de ebullición. Distribuir volúmenes de 10 mL de medio preparado en tubos de ensayo de 18 mmx 180 mm, conteniendo en su interior tubos de Durham invertidos. Sellar con tapones de acero inoxidable y esterilizar en autoclave a 121 °C, durante 15 minutos. El volumen final no variará más de 1 mL después de la esterilización. El medio se almacenarse a temperatura ambiente en un lugar limpio y libre de polvo durante no más de una semana.

2.1.3 Caldo lactosado con púrpura de bromocresol (C.L.)

(Concentración Doble)

Fórmula

Extracto de carne	6.00 g
Peptona	10.00 g
Lactosa	10.00 g
Púrpura de bromocresol	0.02 g
Agua destilada	1000 mL

pH final a 25°C después de la esterilización: 6.9 ± 0.2 .

Preparación

Pesar 26.0 g del medio deshidratado C.L. y 0.02 g de púrpura de bromocresol. Disolver ambos componentes en 1000 mL de agua destilada. Calentar y agitar frecuentemente hasta la completa disolución del medio evitando alcanzar la temperatura de ebullición. Distribuir volúmenes de 10 mL de medio preparado en tubos de ensayo de 18 mmx 180 mm, conteniendo en su interior tubos de Durham invertidos. Sellar con tapones de acero inoxidable y esterilizar en autoclave a 121 °C, durante 15 minutos. El medio se almacena a temperatura ambiente en un lugar limpio y libre de polvo durante no más de una semana.

2.1.4 Caldo lactosado con púrpura de bromocresol (C.L.)

(Concentración simple)

Fórmula

Extracto de carne	3.00 g
Peptona	5.00 g
Lactosa	5.00 g
Púrpura de bromocresol	0.01 g
Agua destilada	1000 mL

pH final después de la esterilización: 6.9 ± 0.2 a 25°C

Preparación

Pesar 13.00 g del medio deshidratado C.L. y 0.01 g de púrpura de bromocresol. Disolver ambos componentes en 1000 mL de agua destilada fría. Calentar, agitando frecuentemente, hasta la completa disolución del medio, teniendo cuidado de no alcanzar la temperatura de ebullición. Distribuir volúmenes de 10 mL de medio preparado en tubos de ensayo de 18 mmx 180 mm, conteniendo en su interior tubos de Durham invertidos. Tapar con tapones de acero inoxidable y esterilizar en autoclave a 121°C , durante 15 minutos. El volumen final no variará más de 1 mL después de la esterilización. El medio ya preparado puede almacenarse a temperatura ambiente en un lugar limpio y libre de polvo durante no más de una semana.

2.1.5 Caldo Lactosa Bilis Verde Brillante 2 %.

Fórmula

Peptona	10.0 g
Lactosa	10.0 g
Bilis de buey deshidratada	1.5 g
Verde brillante	4.0 g
Agua destilada	1000 mL

pH final a 25 °C después de la esterilización.

Preparación

Pesar 40 g del medio deshidratado y disolver en 100 mL de agua. Calentar y agitar hasta la completa disolución del medio, evitando alcanzar la temperatura de ebullición. Distribuir volúmenes de 10 mL de medio preparado en tubos de ensayo de 18 mmx 180 mm, conteniendo en su interior tubos de Durham invertidos. Sellar con tapones de acero inoxidable y esterilizar en autoclave a 121 °C, durante 15 minutos. El volumen final no variará más de 1 mL después de la esterilización. El medio se almacena a temperatura ambiente en un lugar limpio y libre de polvo durante no más de una semana.

2.1.6 Medio EC

Fórmula

Triptosa o tripticasa	20.00 g
Lactosa	5.00 g
Mezcla de sales biliares	1.50 g
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	4.00 g
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	5.00 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.00 g
Agua destilada	1000 mL

pH final a 25 °C después de la esterilización: 6.9 ± 0.2 .

Preparación

Pesar 37.0 g del medio EC deshidratado y disolver en 1000 mL de agua destilada fría. Calentar y agitar hasta la completa disolución del medio, evitando alcanzar la temperatura de ebullición. Distribuir volúmenes de 10 mL de medio preparado en tubos de ensayo de 18 mmx 180 mm, conteniendo en su interior tubos de Durham invertidos. Sellar con tapones de acero inoxidable y esterilizar en autoclave a 121 °C, durante 15 minutos. El medio se almacena a temperatura ambiente en un lugar limpio y libre de polvo durante no más de una semana.

2.1.7 Agar Eosina Azul de Metileno (EMB)

Fórmula

Peptona	10.00 g
Lactosa	10.00 g
Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄)	2.00 g
Agar	15.00 g
Eosina	0.40 g
Azul de metileno	65.00 mg
Agua destilada	1000 mL

pH final a 25 °C después de esterilización: 7.1 ± 0.1.

Preparación

Pesar 37.5 g del medio deshidratado agar eosina azul de metileno y disolver en 1000 mL de agua destilada. Dejar en reposo durante aproximadamente 15 minutos. Calentar y agitar hasta la completa disolución, evitando alcanzar la temperatura de ebullición. Esterilizar en autoclave a 121 °C, durante 15 minutos. Si después de la esterilización se forma un precipitado, resuspender mediante agitación lenta antes de distribuir. Dejar enfriar a una temperatura de 45 a 50 °C, evitando que se formen grumos. Distribuir en condiciones de esterilidad volúmenes de 12 a 15 mL en cajas Petri de 15 mm X 100 mm estériles. Después de la solidificación del medio mantener en refrigeración (2 a 10°C), durante no más de una semana. Durante la esterilización, podrá haber decoloración del medio, el cual volverá a su color normal al enfriarse.

2.1.8 Caldo de Tetracionato de Mueller (Difco)

Fórmula

Proteasa, peptona difco	5.00 g
Sales biliares	1.00.g
Tiosulfato de sodio	30.00 g
Carbonato de calcio	10.00 g

Preparación

Disolver 4.6 gramos en 100 mL de agua destilada, calentar a 60°C, agregar 2 mL de solución iodo (se prepara disolviendo 6 gramos de cristales de iodo y 5 gramos de yoduro de potasio en 20 mL de agua destilada). No se debe calentar el medio después de agregar el iodo. Distribuir volúmenes de 10 a 12 mL en tubos estériles. Utilizar el mismo día.

2.1.9 Agar Mac Conkey

Fórmula

Peptona de caseína	17.00 g
Peptona de carne	3.00 g
Lactosa	10.00 g
Mezcla de sal y bilis	1.50 g
Cloruro de sodio	5.00 g
Rojo neutro	0.03 g
Agar-agar	13.50 g
Violeta de cristal	.0.001 g

Preparación

Suspender 50.0 g en un litro de agua recién destilada o completamente desmineralizada, dejar remojar por 15 minutos y hervir con agitación continua hasta completa disolución, esterilizar en autoclave (15 minutos a 121 °C). El medio es vaciado en cajas petri permitiendo que se forme una capa gruesa. Las cajas deben dejarse secar bien antes de usarse.

2.1.10 Agua Peptonada Alcalina

Fórmula

Bacto peptona	10.00.g
NaCl	10.00 g
Agua destilada	1000 mL

Preparación

Los componentes se disuelven en 1000 ml de agua destilada, ajustando el pH a 9.0 con solución 1N de NaOH. Se distribuyen volúmenes de 10 ml en matraces Erlenmeyer o botellas de leche y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

2.1.11 Agua Peptonada Alcalina Doble Concentración

Fórmula

Bacto peptona	20.00 g
NaCl	20.00 g
Agua destilada	1000 mL

Preparación

Los componentes se disuelven en 1000 ml de agua destilada, ajustando el pH a 9.0 con solución 1N de NaOH. Se distribuyen volúmenes de 10 ml en matraces Erlenmeyer o botellas de leche y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

2.1.12 Agar Tiosulfato-Citrato-Sales biliares-Sacarosa (TCBS)

Fórmula

Extracto de levadura	5.00 g
Peptona proteasa	10.00 g
Citrato de sodio	10.00 g
Tiosulfato de sodio	10.00 g
Bacto Oxgall	8.00 g
Sacarosa	20.00 g
Cloruro de sodio	10.00 g
Citrato férrico	1.00 g
Azul de bromotimo	10.04 g
Azul de timo	10.04 g
Agar	15.00 g
Agua destilada	1000 mL

Preparación .

Suspender 89 g del medio deshidratado o a partir de sus componentes en un litro de agua destilada y llevar el pH de la solución a 8.6 utilizando un potenciómetro de laboratorio a 25 °C (en caso de que la temperatura sea superior a la especificada meter al refrigerador un momento) con solución 1N de NaOH, calentar hasta disolución completa. Vaciar sin esterilizar el medio en placas de Petri estériles, su utilización debe ser de preferencia inmediata. No es conveniente usarlo si tiene más de 24 horas de haberse preparado.

2.1.13 Medio Kligler

Fórmula

Extracto de carne	3.00 g
Extracto de levadura	3.00 g
Bacto peptona	15.00 g
Peptona proteasa	5.00 g
Lactosa	10.00 g
Dextrosa	1.00 g
Sulfato ferroso	0.20 g
Cloruro de sodio	5.00 g
Tiosulfato de sodio	0.30 g
Rojo de feno	10.02 g
Agar	12.00 g
Agua destilada	1000 mL

Preparación

Se disuelven 52 g del medio deshidratado o a partir de sus componentes en un litro de agua destilada y el pH final de la solución debe ser de 7.4, se debe mezclar bien y calentar hasta su completa disolución. Distribuir de 3 a 4 ml en tubos de ensayo de 13 x 100, esterilizando posteriormente a 121 °C durante 15 minutos dejándolos enfriar en una posición inclinada. El medio se almacena a 4 °C hasta su uso.

2.1.14 Agar de hierro y triple azúcar (TSI)

Fórmula

Extracto de carne	3.00 g
Extracto de levadura	3.00 g
Bacto peptona	15.00 g
Peptona proteasa	5.00 g
Lactosa	10.00 g
Dextrosa	1.00 g

Sacarosa	10.00 g
Sulfato ferroso	0.20 g
Cloruro de sodio	5.00 g
Tiosulfato de sodio	0.30 g
Rojo de feno	10.024 g
Agar	12.00 g
Agua destilada	1000 mL

Preparación

Se disuelven 65 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada debiendo obtenerse un pH final de 7.4, mezclar bien y calentar a ebullición durante un minuto. Inmediatamente después distribuir de 3 a 4 ml en tubos de 13 x 100 y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Se deja solidificar en posición inclinada, de forma que, sobre una columna de unos 3 cm de altura, se forme una superficie oblicua, elíptica, de unos 5 cm de diámetro mayor. El medio se almacena a 4 °C.

2.1.15 Agar Lisina-Hierro (LLA)

Fórmula

Extracto de levadura	3.00 g
Bacto peptona	5.00 g
Dextrosa	1.00 g
Hidrocloruro L-Lisina	10.00 g
Sulfato ferrosos	0.20 g
Citrato de amonio férrico	0.50 g
Tiosulfato de sodio	0.04 g
Púrpura de bromocreso	10.02 g
Agar	15.00 g
Agua destilada	1000 mL

Preparación

Disolver 34.5 g del medio deshidratado por litro de agua destilada, debiendo obtenerse un pH final de 6.7 a 25 °C. Calentar a ebullición hasta disolución completa y distribuir de 3 a 4 ml en tubos de 13 x 100. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, enfriar y antes de que solidifique inclinar los tubos, conservar los tubos preparados en refrigeración de 2 a 8 °C. Se almacenan a 4 °C hasta su uso.

2.1.16 Medio MIO

Fórmula

Extracto de levadura	3.00 g
Peptona de gelatina	10.00 g
Peptona de caseína	10.00 g
L- ornitina	10.00 g
Dextrosa	1.00 g
Púrpura de bromocreso	10.02 g
Agar	2.00 g
Agua destilada	1000 mL

Preparación

Disolver 31 g del medio deshidratado por litro de agua destilada debiendo obtenerse un pH final de 6.5 a 25 °C, calentar hasta disolución completa, distribuir de 3 a 4 ml en tubos de 13 x 100. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, enfriar y dejarlos en reposo en posición vertical, se almacenan a 4 °C hasta su uso.

2.1.17 Agar BHI (*Infusión cerebro corazón*)

Fórmula

Infusión cerebro de ternera	200.00 g
Infusión de corazón de res	250.00 g
Peptona de gelatina	10.00 g
Cloruro de sodio	5.00 g
Fosfato disódico	2.50 g
Dextrosa	2.00 g
Agar bacteriológico	15.00 g
Agua destilada	1000 mL

Preparación

Disolver 52 g del medio deshidratado o a partir de sus componentes por litro de agua destilada debiendo obtenerse un pH final de 7.4 a 25 °C, calentar hasta disolución completa. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, distribuir el medio en placas de petri dejar solidificar y someter a prueba de esterilidad a 37 C por 24 horas en posición invertida. Si se va a utilizar en tubos de ensaye, distribuir antes de la esterilización. Posteriormente dejar enfriar en posición vertical y conservar los tubos preparados a 4 °C hasta su uso.

2.1.18 Caldo arginina (*Base de Moeller + arginina*)

Fórmula

Extracto de carne	5.00 g
Peptona de gelatina	5.00 g
L- arginina	10.00 g
Dextrosa	0.50 g
Púrpura de bromocreso	10.01 g
Rojo de creso	10.005 g
Peroxida	10.005 g
Agua destilada	1000 mL

Preparación

Rehidratar bacto descarboxilasa base de Moeller, disolviendo 10.5 g en un litro de agua destilada o desionizada. El pH final debe ser de 6.8 a una temperatura de 25.5 °C. Calentar hasta disolución completa, adicionar 10 g de L-arginina o 20 g de DL-arginina y agitar hasta disolver. Distribuir de 3 a 4 ml en tubos de 13 x 100 y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 10 minutos. Almacenar los tubos preparados a 4 °C.

2.2 Soluciones

2.2.1 Buffer de Fosfatos (Agua de dilución).

Fórmula

Solución stock A	1.25 mL
Solución stock B	5.00 mL
Agua destilada	1000 mL

Preparación

Preparar la solución stock A con la siguiente composición:

Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	34.00 g
Agua destilada c.b.p	1000 mL

Disolver el fosfato monopotásico en 500 mL de agua destilada, ajustar el pH a 7.2 ± 0.5 con solución de hidróxido de sodio 1N y completar el volumen a 1 L con agua destilada. Distribuir volúmenes de aproximadamente 100 mL en frascos con tapón de rosca para almacenar. Esterilizar en autoclave a 121 °C, durante 15 minutos. Almacenar en refrigeración a 2-4 °C. La solución es estable durante meses. Desechar cuando haya turbiedad.

Preparar la solución stock B con la siguiente composición

Cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	81.01 g
Agua destilada c.b.p	1000 mL

Disolver el cloruro de magnesio en 500 mL de agua destilada y completar el volumen para 1000 mL con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Almacenar en refrigeración a 2 - 4 °C. La solución es estable durante meses. Desechar cuando haya turbiedad.

Preparación

Adicionar 1.25 mL de la solución stock A y 5 mL de la solución stock B a un litro de agua destilada. Distribuir en tubos con tapón de rosca, los tubos contendrán 9 ± 0.2 mL de diluyente después de la esterilización. Tapar y esterilizar en autoclave a 121 °C, durante 15 minutos. Almacenar a temperatura ambiente no más de una semana.

2.2.2 Solución de Hidróxido de sodio 1N

Fórmula

Hidróxido de sodio (NaOH)	40.00 g
Agua recién destilada	1000 mL

Preparación

Pesar 40.0 gramos de hidróxido de sodio y disolver en 1000 mL de agua recién destilada y libre de CO_2 , para abatir la carbonatación de la solución. Almacenar en frasco con tapón de rosca.

2.2.3 Reactivo de oxidasa

Oxalato de p-aminodimetilanilina	1.00 g
Agua destilada	100 mL

Preparación

Disolver el reactivo en agua destilada estéril ligeramente tibia, agitar hasta disolución. El oxalato puede ser sustituido por N,N,N,N,tetrametil p-feniléndiamino.

Soluciones para Tinción de Gram.

2.2.4 Solución de Cristal Violeta

Disolver 2 g de cristal violeta en 20 mL de alcohol etílico al 95%. Filtrar en papel filtro o algodón. Disolver 0.8 g de oxalato de amonio en 80 mL de agua destilada. Mezclar estas soluciones en partes iguales, 24 h antes de usarse, filtrando nuevamente.

2.2.5 Solución de Lugol

Disolver 2 g de yoduro de potasio (KI) en 5 mL de agua. Adicionar 1 g de cristales de yodo a la solución de yoduro de potasio y agitar hasta que el yodo se disuelva. Aforar a 300 mL con agua destilada.

2.2.6 Solución de Safranina

Solución stock de safranina

Disolver 2.5 g de safranina en 100 mL de alcohol etílico al 95 %.

En el momento de usar la safranina para la tinción, diluir 10 mL de la solución stock en 100 mL de agua destilada.

2.2.7 Solución de alcohol-acetona

Mezclar volúmenes iguales de alcohol etílico al 95% y acetona.

2.2.8 Reactivo de Kovacs

Fórmula

p-dimetil-amino-benzaldehído	5.00 g
Alcohol amílico o isoamílico	75.00 mL
HCl concentrado	25.00 mL

Preparación

Disolver 5 g de p-dimetil-amino-benzaldehído en 75 ml de alcohol isoamílico, posteriormente adicionar 25 ml de ácido clorhídrico y agitar. El reactivo presenta una coloración amarilla.

2.2.9 Reactivo de Erlich

Fórmula

p-dimetil-amino-benzaldehído	1.00 g
Alcohol etílico absoluto	85.00 mL
HCl concentrado	20.00 mL

Preparación

Pesar 1.00 g de p-dimetil-amino-benzaldehído y disolver en 85 ml de alcohol etílico absoluto grado reactivo, posteriormente agregar 20 ml de ácido clorhídrico concentrado y agitar.

2.2.10 Solución Salina 0.85 %

Fórmula

NaCl	8.5.00 g
Agua destilada	1000 mL

Preparación

Pesar 8.5 g de cloruro de sodio y disolver en 1000 ml de agua destilada estéril, esterilizar en autoclave a 121 °C, durante 15 minutos. Guardar en frasco claro.

2.2.11 Estándares Nefelométricos de McFarland

Preparar 10 tubos de ensaye de igual tamaño, que hayan sido cuidadosamente lavados y enjuagados. Preparar ácido sulfúrico (H₂SO₄) puro al 1%. Preparar una solución acuosa de

cloruro de bario (BaCl_2) al 1%. Colocar en cada tubo las cantidades de cada solución como se indica a continuación (cada tubo tendrá un volumen final de 10 mL de sulfato de bario).

Tubo No.	mL de H_2SO_4	mL de BaCl_2	Densidad Celular (Aproximada)
1	9.9	0.1	300×10^6
2	9.8	0.2	600×10^6
3	9.7	0.3	900×10^6
4	9.7	0.4	1200×10^6
5	9.6	0.5	1500×10^6
6	9.5	0.6	1800×10^6
7	9.4	0.7	2100×10^6
8	9.3	0.8	2400×10^6
9	9.2	0.9	2700×10^6
10	9.0	1.0	3000×10^6

Los tubos se sellan.

2.2.12 Acido Sulfúrico al 1%

Acido sulfúrico (H_2SO_4)	1.00 mL
Agua destilada	100. mL

Preparación

Vaciar 1.0 mL de ácido sulfúrico en una matraz y aforar a un volumen de 100 mL con agua destilada, homogeneizar la solución con movimientos circulares suaves.

2.2.13 Cloruro de Bario al 1%

Cloruro de Bario (BaCl_2)	1.00 g
Agua destilada	100 mL

Preparación

Agregar 1.0 g de cloruro de bario en un matraz y aforar a 100 mL con agua destilada y agitar hasta su completa disolución.

ANEXO 3: TABLAS DE RESULTADOS DE COLIFORMES TOTALES Y COLIFORMES FECALES (NMP/100 mL) DE LOS SEIS SABORES DE PALETAS ANALIZADAS.

Se presentan los cuadros con los resultados para coliformes totales y coliformes fecales, (NMP/ 100 mL), de los seis sabores de paletas para cada una de las zonas de estudio. Se indica en cada una:

- ↪ meses de muestreo y
- ↪ pH promedio.

TABLA 3.1: RESULTADOS DE COLIFORMES TOTALES Y COLIFORMES FECALES (NMP/100 mL) PARA LA ZONA NORESTE

FECHA DE MUESTREO	S A B O R E S											
	A = ARROZ pH = 7		C = COCO pH = 6 - 7		F = FRESA pH = 3 - 3.5		G = GUAYABA pH = 4		M = MANGO pH = 5		Z = ZARZAMORA pH = 2	
	CT	CF	CT	CF	CT	CF	CT	CF	CT	CF	CT	CF
MAY I	3.0×10^2	3.0×10^2	5.0×10^4	2.5×10^4	5.0×10^3	5.0×10^3	1.7×10^3	5.0×10^2	***	***	23	23
JUN II	2.2×10^3	1.1×10^3	3.0×10^4	7.0×10^3	***	***	1.6×10^6	3.0×10^3	1.6×10^6	1.6×10^6	< 2	< 2
JUN III	2.3×10^3	2.3×10^3	2.2×10^3	1.4×10^3	8.0×10^4	2.3×10^4	1.6×10^6	9.0×10^3	1.7×10^6	1.7×10^6	23	23
JUL IV	7.0×10^4	2.3×10^4	2.3×10^6	2.3×10^6	2.3×10^4	2.3×10^4	1.3×10^7	1.3×10^7	8.0×10^7	3.0×10^7	2.3×10^3	2.3×10^3
JUL V	9.0×10^4	9.0×10^4	1.6×10^9	1.6×10^9	1.1×10^4	1.1×10^4	1.7×10^7	1.7×10^7	1.7×10^6	1.7×10^6	1.7×10^3	8.0×10^2
AGO VI	1.3×10^3	2.2×10^4	4.9×10^7	1.4×10^7	1.3×10^4	1.3×10^4	1.1×10^7	1.1×10^7	4.9×10^6	1.4×10^6	8.0×10^2	5.0×10^2
AGO VII	8.0×10^3	8.0×10^4	1.8×10^7	3.4×10^6	***	***	7.0×10^6	2.0×10^6	2.0×10^6	2.0×10^6	1.1×10^2	1.1×10^2
SEP VIII	2.3×10^4	2.3×10^4	1.1×10^7	4.9×10^6	3.3×10^4	5.0×10^3	2.3×10^3	2.3×10^3	4.0×10^3	2.0×10^3	2.3×10^2	2.3×10^2

CT: COLIFORMES TOTALES, CF: COLIFORMES FECALES, ***: NO SE CONSIGUIO MUESTRA.

TABLA 3.2: RESULTADOS DE COLIFORMES TOTALES Y COLIFORMES FECALES (NMP/ 100mL) ZONA SUR

FECHA DE MUESTREO	S A B O R E S											
	A = ARROZ pH = 7 - 7.5		C = COCO pH = 6 - 7.5		F = FRESA pH = 3 - 3.5		G = GUAYABA pH = 4 - 4.2		M = MANGO pH = 4.5 - 5		Z = ZARZAMORA pH = 2	
	CT	CF	CT	CF	CT	CF	CT	CF	CT	CF	CT	CF
NOV I	7.9×10^2	2.3×10^2	9.0×10^4	2.0×10^3	1.1×10^2	8	< 2	< 2	2.3×10^4	2.0×10^3	4.0×10^2	50
NOV II	2.3×10^2	2.2×10^2	1.4×10^2	1.1×10^2	< 2	< 2	< 2	< 2	9.0×10^4	4.0×10^4	< 2	< 2
DIC III	8.0×10^2	2.0×10^2	1.2×10^3	3.4×10^2	< 2	< 2	< 2	< 2	2.3×10^3	2.3×10^3	< 2	< 2
ENE IV	3.5×10^2	1.8×10^2	3.3×10^2	1.1×10^2	12	2	< 2	< 2	1.7×10^2	1.7×10^2	***	***
FEB V	1.3×10^3	3.4×10^2	2.2×10^4	2.6×10^3	1.1×10^2	1.1×10^2	20	2	2.7×10^4	1.3×10^4	23	23
MAR VI	2.6×10^3	1.3×10^4	2.6×10^5	2.6×10^5	1.4×10^4	2.6×10^3	1.3×10^3	1.3×10^3	2.7×10^4	2.0×10^4	< 2	< 2
ABR VII	2.7×10^7	1.7×10^7	2.7×10^9	1.1×10^8	1.1×10^4	8.0×10^3	6.0×10^5	6.0×10^5	7.0×10^4	2.6×10^4	2.6×10^2	2.6×10^2
JUN VIII	2.6×10^6	1.3×10^6	2.3×10^7	1.2×10^6	1.4×10^4	1.3×10^4	4.9×10^5	1.1×10^5	3.5×10^4	9.0×10^7	2.0×10^2	2.0×10^2

CT: COLIFORMES TOTALES, CF: COLIFORMES FECALES ***: NO SE REALIZO MUESTREO

TABLA 3. 3: RESULTADOS DE COLIFORMES TOTALES Y COLIFORMES FECALES (NMP/ 100 mL) PARA LA ZONA OESTE

FECHA DE MUESTREO	S A B O R E S											
	A = ARROZ pH = 6.5 - 7		C = COCO pH = 6.5 - 7		F = FRESA pH = 3 - 3.5		G = GUAYABA pH = 4 - 4.2		M = MANGO pH = 4.5 - 5		Z = ZARZAMORA pH = 2	
	CT	CF	CT	CF	CT	CF	CT	CF	CT	CF	CT	CF
JUN I	2.2x10 ⁵	1.8x10 ⁵	1.7x10 ⁶	4.9x10 ⁵	8.0x10 ⁵	8.0x10 ⁵	1.8x10 ³	1.8x10 ³	1.4x10 ⁶	8.0x10 ⁵	***	***
OCT II	2.6x10 ³	2.6x10 ³	1.7x10 ⁶	1.1x10 ⁶	***	***	1.3x10 ⁴	5.0x10 ³	2.4x10 ⁶	1.3x10 ⁶	6.0x10 ²	2.0x10 ²
NOV III	2.3x10 ³	8.0x10 ²	4.9x10 ⁴	4.3x10 ²	1.1x10 ²	20	5.0x10 ²	2.0x10 ²	1.4x10 ³	1.7x10 ²	< 2	< 2
NOV IV	3.1x10 ³	9.0x10 ²	2.6x10 ³	1.7x10 ³	60	< 2	< 2	< 2	8.0x10 ²	5.0x10 ²	< 2	< 2
DIC V	4.0x10 ²	4.0x10 ²	1.8x10 ³	7.9x10 ²	< 2	< 2	20	< 2	***	***	< 2	< 2
DIC VI	4.0x10 ⁵	1.4x10 ⁵	5.0x10 ⁶	1.4x10 ⁵	< 2	< 2	2	< 2	***	***	2	2

CT: COLIFORMES TOTALES, CF: COLIFORMES FECALES, ***: NO SE CONSIGUIO MUESTRA.

ANEXO 4: SOLICITUD DE CERTIFICACION Y FORMATOS DE RESULTADOS DE 64 CEPAS DE ENTEROBACTERIAS AISLADAS E IDENTIFICADAS EN LOS SEIS DIFERENTES SABORES DE PALETAS HELADAS DE AGUA, POR PARTE DEL INSTITUTO NACIONAL DE DIAGNOSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLOGICOS “Dr. MANUEL MARTINEZ BAEZ” (INDRE), DE LA SECRETARIA DE SALUD.



COMISION NACIONAL
DEL AGUA

COMISION NACIONAL DEL AGUA
SUBDIRECCION GENERAL DE ADMINISTRACION
DEL AGUA
GERENCIA DE CALIDAD, REUSO DEL AGUA
E IMPACTO AMBIENTAL.

OFICIO N° BOO.3.3.- 356

ASUNTO: Certificación de cepas.

México, D. F., Septiembre 3 de 1993.

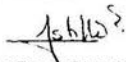
DR. JOSE LUIS VALDESPINO GOMEZ
DIRECTOR DEL INSTITUTO NACIONAL DE
DIAGNOSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLOGICOS
"DR. MANUEL MARTINEZ BAEZ"
PRESENTE

Por este conducto le solicito atentamente la certificación de 16 cepas de *V. cholerae* aisladas de agua de ríos del Estado de Puebla.

Así también enviamos 4 aislamientos de *E. coli* de la Entrada de la Planta de Tratamiento Fersan del Estado de Puebla de muestras tomadas el 26 de julio de 1993 y 64 aislamientos de enterobacterias provenientes de paletas heladas obtenidas de la Delegación Gustavo A. Madero y Estado de México con la finalidad de poder tomar medidas de control y apoyar trabajos de tesis.

Sin otro particular, aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E.
GERENTE DE CALIDAD, REUSO DEL AGUA
E IMPACTO AMBIENTAL


ING. IGNACIO CASTILLO ESCALANTE

ccp. Q. Marisela Vázquez.- Jefe del Laboratorio de Calidad del Agua del Estado de Puebla.- Presente.



INSTITUTO NACIONAL DE DIAGNOSTICO
Y REFERENCIAS EPIDEMIOLOGICOS
"DR. MANUEL MARTINEZ BAEZ"



CARPIO 470

MEXICO, D.F. 11340

TFLS. 341-40-46, 341-48-20, 341-41-54, 341-47-00, 341-48-80, 341-49-53, 341-41-06, 341-47-60

FAX: 341-32-64

ING. IGNACIO CASTILLO ESCALANTE
GERENTE DE CALIDAD REUSO DEL AGUA E IMPACTO AMBIENTAL
OTROS
COMISION NACIONAL DEL AGUA
MEXICO D.F.

FECHA: 23/09/93

COMUNICO A USTED RESULTADOS DE LAS MUESTRAS QUE NOS ENVIÓ CON FECHA: 14/09/93 PARA DIAGNOSTICO DE :

TIPIF DE CEPAS

# Registro	Nombre	Tipo de muestra	Resultado
1764	AX	CEPAS	E. COLI
1765	AY	CEPAS	E. COLI
1766	AZ	CEPAS	ENTEROBACTER
1767	BX	CEPAS	ENTEROBACTER
1768	BY	CEPAS	ENTEROBACTER
1769	BZ	CEPAS	ENTEROBACTER
1770	CX	CEPAS	ENTEROBACTER
1771	CY	CEPAS	ENTEROBACTER
1772	CZ	CEPAS	E. COLI
1773	DX	CEPAS	ENTEROBACTER
1774	DY	CEPAS	E. COLI
1775	DZ	CEPAS	ENTEROBACTER
1776	EX	CEPAS	ENTEROBACTER
1777	EY	CEPAS	ENTEROBACTER
1778	EZ	CEPAS	ENTEROBACTER
1779	FX	CEPAS	ENTEROBACTER
1780	FY	CEPAS	ENTEROBACTER
1781	FZ	CEPAS	ENTEROBACTER
1782	GX	CEPAS	E. COLI
1783	GY	CEPAS	P. MIRABILIS
1784	GZ	CEPAS	E. COLI
1785	HX	CEPAS	ENTEROBACTER

OBSERVACIONES:



ATENTAMENTE,

Lucina G. Gómez
Q. B. P. LUCINA GUTIERREZ GÓMEZ
JEFE DEL LABORATORIO DE BACTERIOLOGIA ENTERICA

INSTITUTO NACIONAL DE DIAGNOSTICO
Y REFERENCIAS EPIDEMIOLOGICOS
SECRETARIA DE SALUD

c.c.p.



INSTITUTO NACIONAL DE DIAGNOSTICO
Y REFERENCIAS EPIDEMIOLOGICOS
"DR. MANUEL MARTINEZ BAEZ"



CARPIO 470

MEXICO, D.F. 11340

TELS. 341-40-46, 341-48-20, 341-41-54, 341-47-00, 341-48-80, 341-49-53, 341-41-06, 341-47-60

FAX 341-32-64

ING. IGNACIO CASTILLO ESCALANTE
GERENTE DE CALIDAD REUSO DEL AGUA E IMPACTO AMBIENTAL
OTROS
COMISION NACIONAL DEL AGUA
MEXICO D.F.

FECHA: 23/09/93

COMUNICO A USTED RESULTADOS DE LAS MUESTRAS QUE NOS ENVIÓ CON FECHA: 14/09/93 PARA DIAGNOSTICO DE :

TIPUS DE CEPAS

# Registro	Nombre	Tipo de muestra	Resultado
1786	HY	CEPAS	ENTEROBACTER
1787	AZ	CEPAS	E. COLI
1788	IS	CEPAS	E. COLI
1789	IY	CEPAS	ENTEROBACTER
1790	IZ	CEPAS	ENTEROBACTER
1791	JX	CEPAS	ENTEROBACTER
1792	JY	CEPAS	P. MIRABILIS
1793	JZ	CEPAS	ENTEROBACTER
1794	KX	CEPAS	P. MIRABILIS
1795	KY	CEPAS	ENTEROBACTER
1796	KZ	CEPAS	ENTEROBACTER
1797	LX	CEPAS	ENTEROBACTER
1798	LY	CEPAS	ENTEROBACTER
1799	MX	CEPAS	E. COLI
1800	MY	CEPAS	ENTEROBACTER
1801	MX	CEPAS	ENTEROBACTER
1802	NY	CEPAS	ENTEROBACTER
1803	OX	CEPAS	E. COLI
1804	OY	CEPAS	ENTEROBACTER
1805	PX	CEPAS	ENTEROBACTER
1806	PY	CEPAS	ENTEROBACTER
1807	QX	CEPAS	P. MIRABILIS

OBSERVACIONES:

ATENTAMENTE.



Lucina Gutierrez
D. B. P. LUCINA GUTIERREZ GUGUO
JEFE DEL LABORATORIO DE BACTERIOLOGIA ENTERICA

c.c.p.

INSTITUTO NACIONAL DE
Y REFERENCIAS EPIDEMIOLOGICAS
SECRETARIA



INSTITUTO NACIONAL DE DIAGNOSTICO
Y REFERENCIAS EPIDEMIOLOGICOS
"DR. MANUEL MARTINEZ BAEZ"



CARPIO 470

MEXICO, D.F. 11340

TELS. 341-40-46, 341-48-20, 341-41-54, 341-47-00, 341-48-80, 341-49-53, 341-41-06, 341-47-60

FAX.341-32-64

ING. IGNACIO CASTILLO ESCOBARTE
GERENTE DE CALIDAD REGIO DEL AGUA E IMPACTO AMBIENTAL
OTROS
COMISION NACIONAL DEL AGUA
MEXICO D.F.

FECHA: 23/05/93

COMUNICO A USTED RESULTADOS DE LAS MUESTRAS QUE NOS ENVIÓ CON FECHA: 14/07/93 PARA DIAGNOSTICO DE :

TIPIS DE CEPAS

# Registro	Nombre	Tipo de muestra	Resultado
1808	QY	CEPAS	P. MIRABILIS
1809	RX	CEPAS	ENTEROBACTER
1810	RY	CEPAS	P. MIRABILIS
1811	SX	CEPAS	P. MIRABILIS
1812	SY	CEPAS	P. MIRABILIS
1813	TX	CEPAS	P. MIRABILIS
1814	TY	CEPAS	P. MIRABILIS
1815	UX	CEPAS	E. COLI
1816	UY	CEPAS	P. MIRABILIS
1817	VX	CEPAS	E. COLI
1818	VY	CEPAS	P. MIRABILIS
1819	WX	CEPAS	ENTEROBACTER
1820	WY	CEPAS	P. MIRABILIS
1821	XX	CEPAS	ENTEROBACTER
1822	XY	CEPAS	ENTEROBACTER
1823	YX	CEPAS	E. COLI
1824	YY	CEPAS	E. COLI
1825	ZX	CEPAS	E. COLI
1826	ZY	CEPAS	ENTEROBACTER



INSTITUTO NACIONAL DE DIAGNOSTICO
Y REFERENCIA EPIDEMIOLOGICOS
SECRETARIA DE SALUD

OBSERVACIONES:

ATENTAMENTE,

Lucina Gutierrez
U.B.P. LUCINA GUTIERREZ COSCO

JEFE DEL LABORATORIO DE BACTERIOLOGIA ENTERICA