



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Profesionales "Cuautitlán"

**Análisis Bacteriológico de los Alimentos del
Centro Hospitalario "20 de Noviembre"**

T E S I S

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a :
MARIA DEL ROCIO LOPEZ ALVAREZ

Director de Tesis: M.C. Jorge Manuel Hill Juárez



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

I N D I C E

	Pág.
Capítulo I INTRODUCCION	1
Capítulo II ANTECEDENTES	3
Capítulo III MATERIAL Y METODOS	32
Capítulo IV RESULTADOS	65
Capítulo V CONCLUSIONES	88
BIBLIOGRAFIA	91

C A P I T U L O I

I N T R O D U C C I O N

El presente trabajo se realizó con el objeto de determinar la calidad bacteriológica de los alimentos consumidos en el Centro Hospitalario "20 de Noviembre", I.S.S.S.T.E., tanto por el personal que ahí labora, como por los enfermos hospitalizados.

La ingestión de alimentos con cargas bacterianas elevadas o con microorganismos patógenos afecta al personal causando bajas económicas al Instituto que se ve obligado a conceder incapacidades. Al mismo tiempo estas personas pueden convertirse en portadores asintomáticos constituyendo una peligrosa fuente de contaminación para el resto de los trabajadores y para los enfermos en su calidad de huéspedes comprometidos.

Para realizar el estudio se eligió la forma lineal, es decir, se obtuvieron muestras sucesivas de los productos desde

su llegada al hospital hasta su distribución en las diferentes áreas para ser consumidos, después de ser manipulados y procesados por el personal. De esta manera puede tenerse una idea más clara de la calidad bacteriológica con que llegan los alimentos al Centro Hospitalario, si hay contaminación por manejo incorrecto y si los procesos de cocción son efectivos para reducir el número de microorganismos.

C A P I T U L O I I

A N T E C E D E N T E S

1) PROBLEMAS DE SANIDAD INTRAHOSPITALARIA

Las infecciones nosocomiales son aquellas que se adquieren durante la hospitalización. (20).

La adquisición y desarrollo de dichas infecciones se ve favorecida por diversas características de los pacientes hospitalizados: edad, terapia antimicrobiana y de otro tipo que contribuya a disminuir los mecanismos de defensa, favoreciendo la diseminación de la flora normal del sujeto y el ataque de microorganismos oportunistas.

En los últimos 30 años dichas infecciones han aumentado y constituyen en la actualidad un riesgo para todo tipo de pacientes. La frecuencia de estas infecciones oscila entre 3 y 4 casos por cada 100 pacientes hospitalizados pero se eleva a tasas mayores en los casos en que las condiciones higiénicas y

las técnicas de aislamiento son deficientes.

Fuentes de Infección:

- a) Contacto con personal médico y paramédico del hospital.- En muchos casos este personal es portador --- asintomático de microorganismos patógenos. Además, - el contacto constante entre enfermo y personal médico da lugar a la transmisión de flora microbiana resistente a múltiples antibióticos.
- b) Contacto con otros enfermos.
- c) Técnicas de asepsia deficientes.- Frecuentemente -- las áreas y el material quirúrgico "estériles" no se encuentran libres de microorganismos. (18).
- d) Ingestión de alimentos contaminados.- Las infecciones pueden deberse al consumo de alimentos en los -- cuales las bacterias se han multiplicado en gran número o bien pueden ser el vehículo a través del que llegan al paciente ciertos gérmenes patógenos. (10).

La tabla 1 muestra los alimentos en que más comúnmente se encuentran microorganismos causantes de procesos patológicos gastrointestinales.

TABLA 1
ALIMENTOS MAS COMUNMENTE INVOLUCRADOS EN PROCESOS PATOLOGICOS

A l i m e n t o s	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)
Carne de aves	x					x			x
Pescado, mariscos, crustaceos	x			x	x	x			x
Carne fresca (cerdo y res)	x		x			x			x
Carne semicocida (cerdo y res)	x					x		x	
Embutidos	x								x
Ensaladas	x	x					x	x	x
Huevos y alimentos que contengan huevo	x								
Leche y productos lácteos frescos	x	x						x	x
Harinas, cereales y alimentos con almidón								x	x
Frutas y vegetales crudos		x	x						
Leche deshidratada	x								x
Leche no pasteurizada	x	x	x						x
Postres y productos para pastelería	x							x	x
Carne (cerdo y res) y pescado ahumado y/o enlatados							x		
Maíz, chícharos, espinadas, ejotes, enlatados							x		
Antojitos mexicanos	x	x				x		x	x
Alimentos estilo oriental				x					

(1) Salmonella sp

(2) Shicella sp

(3) Escherichia coli

(4) Vibrio parahaemolyticus

(5) Vibrio cholerae

(6) Clostridium perfringens

(7) Clostridium botulinum

(8) Bacillus cereus

(9) Staphylococcus aureus

. Referencia: Bryan, F. L. 1978. Diseases transmitted by foods: A classification and summary. Center for Disease Control. Atlanta, Ga.

2) TERMINOLOGIA Y JUSTIFICACION DE METODOS

Se consideran indicadores de contaminación:

- a) Cuenta de gérmenes mesófilos aerobios: Para determinar la eficacia de los sistemas de limpieza y desinfección.
- b) Cuenta de coliformes: Da un índice más o menos real de contaminación posterior a tratamientos térmicos y de eficacia de los sistemas de limpieza.
- c) Cuenta de coliformes fecales: Pone de manifiesto la presencia de Escherichia coli como índice de deficiencia en la limpieza, desinfección, manejo y falta de higiene de los operarios.
- d) Cuenta de hongos y levaduras: Exposición a fuentes de contaminación aérea.
- e) Cuenta de Staphylococcus aureus: En alimentos cocidos son indicadores de probables deficiencias en el manejo y quizá contacto con portadores.
- f) Identificación de Enterobacterias: Ponen de manifiesto la presencia de gérmenes potencialmente patógenos: Escherichia coli, Salmonella sp., Shigella sp., y en general todos los miembros de la familia de enterobacterias.

El hallazgo de Salmonella sp., Shigella sp. puede ser indicio de la presencia de portadores asintomáticos

3) ANTECEDENTES EN MEXICO

En el período 1970-1975 se notó una marcada disminución de las defunciones en general ocurridas en la República Mexicana, aunque no fue significativa en lo que respecta a enfermedades como fiebre tifoidea, paratifoidea, salmonelosis y disentería bacilar, en donde además la población más afectada fue la de los menores de un año. (25).

En lo que respecta a morbilidad de enfermedades transmisibles se ha notado una disminución significativa de casos --- atendidos de shigelosis en el período de 1973-1976; no así en salmonelosis e intoxicaciones alimentarias bacterianas en las que ha habido un aumento en la tasa de padecimientos. (26).

Enseguida se señala el porcentaje de casos atendidos -- por el I.M.S.S. de enfermedades transmisibles en la República Mexicana durante el año de 1976. (26).

Etiología	Porcentaje
Infecciones intestinales	29.4 %
Tifoidea	0.1
Salmonelosis	3.1
Disentería bacilar	0.6
Intoxicación alimentaria bacteriana	1.1

4) EPIDEMIOLOGIA

Bajo el concepto de gastroenteritis se agrupan una serie de enfermedades entéricas específicas tales como shigelosis, salmonelosis, problemas tóxicos e invasivos por Escherichia coli y últimamente se ha demostrado la relación de otras bacterias como Klebsiella sp, Proteus sp y enterococos con cuadros diarreicos. En alimentos que han causado alteraciones intestinales se han encontrado un gran número de bacterias pertenecientes a las especies Proteus vulgaris y Proteus mirabilis, pero no se ha comprobado que produzcan enterotoxina. (10).

Lo anterior se menciona ya que la fuente de infección de estas enfermedades es el consumo de alimentos contaminados.

Los alimentos se contaminan con gérmenes a partir de utensilios, aire, suelo, agua, insectos y animales que actúan como vectores (moscas, cucarachas, roedores); operarios que manipulan los alimentos y que se encuentran en estado de portador. Los alimentos consumidos en crudo son otra fuente importante de agentes patógenos.

a) EPIDEMIOLOGIA DE LOS MAS IMPORTANTES AGENTES CAUSALES DE CUADROS ENTERICOS:

Salmonella sp.- Microorganismo causante de una enfermedad endémica con incidencia máxima en la parte final de la primavera y verano (meses de mayo a septiembre). La clásica cade

na de infección se muestra en la siguiente Fig. 1

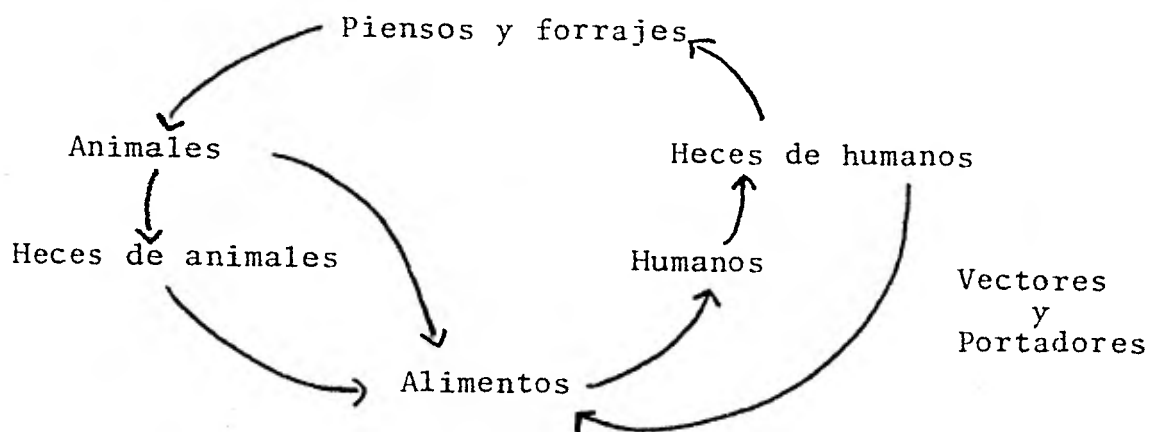


Fig. 1: Cadena de infección de Salmonella sp.

Los animales que se consideran fuentes más frecuentes de contaminación son: aves, sus huevos y los roedores, aunque también están involucrados en la contaminación de alimentos: gatos, perros, cerdos y ganado vacuno. (10).

En la actualidad se consideran una fuente importante de salmonela, las cáscaras de los huevos, huevos líquidos, congelados y en polvo. (24).

Salmonella typhi invade los suministros de agua procedentes de retretes, letrinas y dispositivos semejantes.

La tabla 2 señala la frecuencia con que se han aislado las diferentes especies y serotipos de salmonela en algunos países.

TABLA 2

ESPECIES Y SEROTIPOS DE SALMONELA MAS COMUNMENTE AISLADOS EN ALGUNOS PAISES

	MEXICO	EE UU	CANADA	ARGENTINA	ALEMANIA	MALASIA	NUEVA ZELANDIA	ITALIA	TAILANDIA	ESPAÑA
TYPHIMURIUM	44.8	28	30.7	42.8	43.8	24.6	67.8	18.5	2.8	10.1
TYPHI	8.8	2.3	3.5	0.8		30.6	2.0	3.0	42.6	16.0
NEWPORT	8.0	6.6	3.7	1.1	1.3	3.0		2.7	1.1	2.4
ANATUM	6.4			0.3			7.0	1.5	6.4	
AGONA	4.0	5.6	2.4		2.2			8.3		
DERBY	4.0	1.8		0.7	2.3		2.0	1.5	12.8	
POONA	4.0									
ORANIEMBURG	3.2	1.9		41.8			0.3			
WORTINGTON	2.4									
HEIDELBERG	2.4	6.2	1.7		2.9					
ENTERITIDIS	2.4	6.4	9.2	0.5	6.8		1.0	4.9	0.9	
PANAMA	1.6				11.6			8.5		
SCHARZENGROUND	1.6		1.1							
MUENSTER	0.8									

Nota: Los datos están dados en %
Referencia: Estadística, 1979. Center for Disease Control. Atlanta, Georgia, U.S.A.

Gran número de casos de salmonelosis se reportan en hospitales, escuelas y guarderías, un número menor se asocia a -- restaurantes y hoteles. (30).

Shigella sp.- La mayor incidencia de shigelosis se ha reportado en niños entre 1 y 4 años de edad, siendo poco frecuente en menores de 1 año. La mortalidad por shigelosis en países altamente desarrollados es de 1% y en países en vías de desarrollo del 3-8%

El contagio se produce por vía oral-fecal, a menudo por las manos que tienen contacto con objetos contaminados. Los alimentos más comúnmente involucrados (agua y leche) suelen contaminarse por individuos portadores. En los lugares del mundo donde la enfermedad se presenta de modo endémico, las moscas tienen un papel importante en la contaminación de alimentos. No se conoce con exactitud en que medida los alimentos industrializados pueden ser vectores, pero teniendo en cuenta que basta un pequeño número de microorganismos para producir la infección, las prácticas defectuosas en la manipulación de alimentos suponen un riesgo considerable. (29).

Escherichia coli enterotoxigénica causa diarreas agudas. En México se le reconoce como el agente causal de la diarrea del turista y se ha encontrado que del 72% de los turistas norteamericanos que padecen diarreas, en el 42% de los casos se han aislado cepas toxigénicas de E. coli.

Se han reportado numerosos casos en los soldados norte-

americanos procedentes del sureste de Asia. (6). Se presenta en todas las estaciones del año y la vía de transmisión es --- oral-fecal. Los individuos más afectados son lactantes y pre-escolares, aunque puede presentarse en individuos de todas las edades.

Escherichia coli enteropatógena se ha aislado solamente de lugares cerrados como hospitales y guarderías donde ha sido el agente causal de diarreas en menores de un año.

Staphylococcus aureus.- Los estafilococos productores de toxina llegan a los alimentos a partir del hombre y otros - animales. Proceden en el humano de fosas nasales, piel, forúnculos y heridas infectadas. Además son los causantes de mastitis en vacas y algunos son capaces de producir enterotoxina al desarrollarse en leche y productos lácteos mal conservados. -- (3).

Vibrio cholerae.- Es el agente causal de una enferme-- dad endémica de la India y sudeste de Asia desde donde se ha - extendido a Europa media y Africa. Ultimamente se han involucrado otros países como Estados Unidos, Inglaterra, Australia y las islas del Pacífico. Se propaga de persona a persona en los inicios de la enfermedad, el agua es el principal vehículo de contaminación donde sobrevive hasta 3 semanas la cual se -- contamina por las deyecciones provenientes de personas infecta-- das.

Por cada caso severo hay de 25 a 100 infecciones asinto-- máticas. (20).

Clostridium botulinum.- Las esporas de este microorganismo se encuentran ampliamente difundidas en los suelos, agua e intestino de animales y moscas y por tanto, contaminan vegetales, frutas y otros materiales. Cuando estos alimentos son enlatados o preservados las condiciones de anaerobiosis y nutrientes permiten la germinación de esporas y la producción de toxina. Las esporas de tipo E se encuentran en suelos, lodo marino y de lagos; y en el intestino de pescados contaminados. (10).

Vibrio parahaemolyticus.- Ha sido involucrado en intoxicaciones producidas por el consumo de alimentos marinos. Se han reportado casos en Japón, Estados Unidos, México (estado de Veracruz) y otros países. (14).

5) PROCESOS PATOLOGICOS PRODUCIDOS POR MICROORGANISMOS

Concepto de infección e intoxicación alimentaria.

El término enfermedad alimentaria se emplea con carácter general y se aplica a cualquier enfermedad causada por el consumo de alimentos. Cabe señalar dos conceptos fundamentales:

Intoxicación alimentaria.- Enfermedad ocasionada al ingerir un alimento en el que se encuentra: una toxina elaborada por un microorganismo, un pesticida u otro compuesto de naturaleza similar, o bien, metales pesados.

Dado que muchos microorganismos causan problemas entéri

cos debido a la producción de toxinas, se describen algunas características generales:

Exotoxinas.

- Producidas por ciertas bacterias Gram positivas.
- Están presentes en los filtrados de cultivos en crecimiento. No existe autólisis apreciable.
- Su concentración en el medio de cultivo suele ser proporcional al crecimiento de los microorganismos.
- Son proteínas.

Endotoxinas.

- Son producidas principalmente, si no de manera exclu-siva, por bacterias Gram negativas.
- Son macromoléculas complejas que contienen fosfolípi-dos y lipopolisacáridos.
- Constituyen una parte importante de la pared bacteriana, y sólo son liberadas si se altera la integridad - de esta pared.
- Son relativamente termoestables en comparación con - las exotoxinas.
- Son venenos menos potentes que las exotoxinas y sus - acciones citotóxicas son menos específicas.
- Su toxicidad parece residir en la fracción fosfolípi-da, mientras que su especificidad antigénica reside - en la fracción polisacárida. (4).

Infección alimentaria. - Determinada por la invasión, - multiplicación y alteraciones tisulares del huésped que producen los gérmenes patógenos transportados por los alimentos. -- Son de dos tipos: 1) Aquellas en las que los alimentos no --- constituyen el medio de cultivo de los microorganismos patógenos, pero los transportan: tuberculosis, difteria, disente--- rías, fiebre tifoidea, brucelosis, cólera. 2) Aquellas en que los alimentos constituyen el medio de cultivo de gérmenes patógenos que al multiplicarse aumentan la posibilidad de infectar al consumidor. A este grupo pertenecen los microorganismos -- del género salmonela, excepto Salmonella typhi. (10).

6) AGENTES CAUSALES DE PROCESOS PATOLOGICOS

SALMONELLA SP

Bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, no esporulados, pertenecientes a la familia: Enterobacteriaceae. - Tribu: Salmonellae. Temperatura óptima de crecimiento: 37°C. - con límites de 6.7-45.5°C. Existen más de 1 300 serotipos que se clasifican según sus características antigénicas. Dosis infectante: 10^4 - 10^9 microorganismos ingeridos viables.

Mecanismo de penetración: Los microorganismos invaden epitelio intestinal adhiriéndose a las vellosidades y provocando degeneración parcial de las mismas. Una vez que han penetrado, el daño causado a las vellosidades se repara rápidamente, los microorganismos se multiplican y diseminan por el epitelio intestinal, penetran lámina propia y causan reacción in-

flamatoria aguda con infiltrados de polimorfonucleares. (13).

Salmonella typhi por razones desconocidas produce una respuesta inflamatoria con monocitos, los microorganismos de esta especie son transportados a la circulación dando como resultado fiebre entérica con síntomas sistémicos y bacteremia. (6). Las lesiones características son a nivel de colon donde se presentan alteraciones en la capacidad de absorción de flúidos y electrolitos y efectos osmóticos causados por grandes cantidades de sustancias no absorbidas. Hay movilidad anormal del intestino. (13). La capacidad invasiva no lleva consigo la capacidad de producir diarrea. Estudios realizados por Gianella (13), demostraron que la respuesta inflamatoria que se presenta en la salmonelosis libera una cantidad considerable de prostaglandinas las cuales son capaces de activar la adenil-ciclasa para que esta a su vez forme AMP-cíclico que se acumula intracelularmente causando trastornos en la secreción y absorción de líquidos y electrolitos.

Koupal and Deibel, (17), demostraron la existencia de una enterotoxina en Salmonella enteritidis con características similares en cuanto a comportamiento a las encontradas en Escherichia coli.

Características de la enfermedad:

Período de incubación: 12 a 14 horas o hasta 72 horas en gastroenteritis.

Síntomas: dolor abdominal, diarrea verdosa, semilíquida; algunas veces náuseas y vómito, dolor de cabeza. Puede haber fiebre si hay septicemia. La duración es de días, semanas y meses. El período de incubación y duración de la enfermedad dependen de la especie, número de microorganismos ingeridos y características del huésped. (14).

Control:

- 1) Evitar la contaminación de alimentos por vectores, portadores u otros alimentos contaminados (p.e. huevos).
- 2) Calentar o pasteurizar los alimentos sobre todo si se han mantenido sin refrigeración. Salmonella sp. es un microorganismo medianamente resistente a la temperatura. (ver tabla 3).
- 3) Detectar los factores de riesgo en los alimentos.

Factores:

1. Comida preparada con ingredientes que pueden estar contaminados (p.e. huevos).
2. Comida que en su preparación no tiene un paso de destrucción para salmonela (p.e. ensaladas).
3. Abuso por parte del consumidor.

Riesgo de 1er. grado	Comida con 3 factores
Riesgo de 2º grado	Comida con 2 factores
Riesgo de 3er. grado	Comida con 1 factor.

TABLA 3

TEMPERATURAS DE DESTRUCCION DE ALGUNOS MICROORGANISMOS

Esporas de <u>Clostridium botulinum</u> Tipos A, B. Tipo E.	15', 121° C. 15', 80° C.
Esporas de <u>Clostridium perfringens</u>	1-4 horas, 100° C
<u>Staphylococcus aureus</u>	30', 62.8° C.
<u>Salmonella sp</u>	30', 60° C.

Referencia: Gómez, R. F. Apuntes para el curso de Microbiología de los Alimentos. Instituto Tecnológico - de Massachussets.

Es importante que en hospitales no se consuman alimentos en los cuales el riesgo se considere de 1er. grado.

SHIGELLA SP

Bacilos Gram negativos, aerobios, pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. Tribu: Eschericheae. Temperatura óptima de crecimiento: 37°C. Las especies patógenas son: Shigella dysenteriae, Shigella boydii, Shigella flexneri - - - Shigella sonnei. Infecta al humano y otros primates, 10 organismos virulentos administrados oralmente a voluntarios humanos causan disentería clásica.

Mecanismo de penetración: La penetración a las células epiteliales es el principal mecanismo de patogenicidad. -- Las características del lipopolisacárido de la pared del microorganismo confieren fenómenos de adherencia a las células del epitelio intestinal donde se multiplican y dan lugar a lesiones ulcerativas con el consiguiente efecto de salida de líquidos, electrolitos e infiltración de polimorfonucleares y eritrocitos (diarrea mucosanguinolenta), (12). No se ha observado nunca que el intestino delgado participe de la etiología patógena de shigela. A nivel de colon se producen todos los cambios. (9).

Características de la enfermedad:

Período de incubación: 1 a 4 días.

Síntomas: fiebre y dolor abdominal, seguido de colitis-

clínica. Las heces son líquidas y contienen moco y sangre, su emisión va acompañada de espasmos rectales (tenesmo). Algunos pacientes permanecen como portadores intestinales crónicos y pueden sufrir ataques recurrentes de la enfermedad, (16).

Shigella dysenteriae tipo 1 produce una potente neuro--toxina.

Control:

- 1) Control sanitario de agua y leche.
- 2) Combate de moscas y otros vectores.
- 3) Descubrimiento de casos subclínicos, particularmente de personas que manejan alimentos.
- 4) Detección y prevención del estado de portador. (31).

ESCHERICHIA COLI

Bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos. Pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. Tribu: Eschericheae. Temperatura óptima de crecimiento: 35-37°C. Varias cepas de E. coli se han asociado con la producción de diarreas en animales y humanos. Cuando se estudiaron los mecanismos de patogenicidad en animales y voluntarios humanos fue posible identificar los organismos causales en base a producción de enterotoxina o capacidad invasiva. En el caso de Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC), se ha observado la multiplicación del microorganismo en la superficie del epitelio intestinal, pero no hay penetración ni inflamación, (23). Produce 2 enterotoxinas:

- 1) Toxina termoestable (ST), que es inactivada a los -- 30' de ebullición. Estable al calor $\geq 60^{\circ}\text{C}$.
- 2) Toxina termolábil (LT), es destruída a 60°C .

LT y la toxina del cólera actúan de modo similar (5).

Algunas cepas de Escherichia coli producen sólo ST, todas las cepas que producen LT también producen ST (2).

Se ha observado que la producción de enterotoxina está controlada por un plásmido de estabilidad variable, éste puede ser transmitido de una cepa a otra de la misma especie o a diferentes especies sin ningún cambio en el serotipo del donador o receptor. (22).

Características de la enfermedad:

Dolor abdominal con diarrea acuosa de volumen variable. No hay fiebre. (6).

Escherichia coli enteroinvasiva actúa penetrando mucosa intestinal, invadiéndola y produciendo reacción inflamatoria y lesiones ulcerosas con el consiguiente efecto de salida de líquidos y electrolitos. El ataque de los microorganismos es en la base de las microvellosidades donde penetra a las células epiteliales intestinales. La penetración se efectúa por englobamiento formándose un fagosoma. Así, Escherichia coli es fagocitada por neutrofilos y monocitos en lámina propia. El duodeno y el yeyuno son los primeros sitios de ataque, después el íleon. se observa degeneración de las microvellosidades con -

el consiguiente decremento de la actividad enzimática de fosfa-
tasas, disacaridasas y peptidasas.

El tejido se engrosa a fin de impedir nuevos ataques.

Los síntomas de la enfermedad son similares a los produ-
cidos por shigela. (28).

VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS

Bacilos curvos Gram negativos. Pertenecientes a la fa-
milia Vibrionaceae. Son bacterias enteropatógenas, facultati-
vamente halofílicas, de vida libre marina.

La mayoría de las cepas de Vibrio parahaemolyticus ---
aisladas de pacientes con enteritis presentan el fenómeno ---
Kanagawa positivo (son capaces de lisar linfocitos en un agar-
sangre especial, conocido como medio de Wagatsuma). Otras ce-
pas aisladas de pescado, crustáceos, langostas y aguas marinas
son Kanagawa negativo.

Se ha demostrado que las cepas Kanagawa positivo son pa-
tógenas, mientras que las cepas Kanagawa negativo no lo son. -
La dosis infectiva al humano es de 10^6 - 10^9 células viables ---
Kanagawa positivo. La ingestión de 10^9 - 10^{10} células viables-
Kanagawa negativo no produjeron ningún efecto en voluntarios -
humanos.

Factores patogénicos: hemolisinas. Fujino, T. (11) re-
portó la presencia de una hemolisina termolábil en cepas - ---

Kanagawa positivo. No está claro porqué las cepas Kanagawa negativo son aisladas de alimentos marinos, mientras que las cepas Kanagawa positivo son fácilmente aisladas de excrementos de pacientes. Es dudoso que las hemolisinas sean las únicas toxinas producidas. (14).

Características de la enfermedad:

Período de incubación: 14-17 horas.

Síntomas: dolor epigástrico, náuseas, vómito, diarrea.

Los excrementos son mucosos y sanguinolentos. Puede haber escalofríos y dolor de cabeza. Los síntomas subsisten de 1 a 2 días. (14).

VIBRIO CHOLERAЕ

Bacilos curvos Gram negativos. Pertenecen a la familia Vibrionaceae. Temperatura óptima de crecimiento: 37°C. pH de crecimiento: 8.5-9.5. Es patógeno sólo al hombre. La dosis infectante es de 10^8 microorganismos, viables.

Mecanismo de patogenicidad:

Los microorganismos se multiplican en intestino delgado adheridos a las vellosidades, la capacidad de patogenicidad se debe a la producción de una toxina que se fija a la membrana usando como receptor específico un monosialosilgangliósido o GM_1 para la fracción B o colarogenoide. La fracción A penetra en la membrana (19) y activa la adenilciclase provocando un in

cremento en la producción de AMP cíclico lo cual se traduce en hipersecreción de iones y agua dando como resultado diarrea líquida (8). Gangarosa demostró que durante el cólera no hay alteraciones en la integridad anatómica del intestino delgado.

Características de la enfermedad:

Período de incubación: 1 a 4 días.

Síntomas: Iniciación repentina con náuseas, vómito, diarrea, cólicos abdominales, rápida pérdida de líquidos y sales que producen deshidratación, colapso circulatorio y anuria.

BACILLUS CEREUS

Bacilos Gram positivos, conocidos como causantes del corte de la crema. Anaerobios facultativos, móviles, esporulados. Temperatura óptima de crecimiento: 35°C, con límites de 10 - 45°C. Producen una enterotoxina que causa intoxicación de características similares a las de Staphylococcus aureus y Clostridium perfringens.

Para que se presente la intoxicación se debe ingerir un gran número de células que se lisen y liberen la enterotoxina en el intestino. La toxina daña la mucosa y rompe el equilibrio de intercambio líquido acumulándose agua y electrolitos en el intestino. (14).

Características de la enfermedad:

Período de incubación: 10-12 horas.

Síntomas: Dolor abdominal, diarrea líquida, náuseas moderadas y vómito. No hay fiebre. Duración: 10-12 horas.

CLOSTRIDIUM BOTULINUM

Bacilos Gram positivos. Anaerobio, originario del suelo. Saprófito, esporulado y móvil. Existen cepas proteolíticas y no proteolíticas. Temperatura óptima de crecimiento: -- 25 - 33°C, con límites entre 3.3-50°C, pH óptimo de crecimiento: 4.8-8.9

Produce neurotoxinas de 8 tipos aerológicos diferentes: A, B, C₁, C₂, D, E, F y G. El tipo A es el más común y el más tóxico al hombre. Su actividad aumenta con la tripsina ya que descubre sitios tóxicos en la molécula a pH menor de 7.0 - Tiene dos fracciones A_A (tóxica) y A_B (hemaglutinina). El tipo B es el más común en los suelos del mundo, pero menos tóxico que el tipo A.

Toxicidad:

Tipo A: A_A más A_B = 3×10^{-8} mg LD₅₀ en ratón.

A_A = 5×10^{-8} mg LD₅₀ en ratón.

Tipo B: 6×10^{-8} mg LD₅₀ en ratón.

Tipo C: No es tóxico al hombre. (Toxicidad en ratón: 2.8×10^{-8} mg LD₅₀).

Tipo D: Rara vez tóxico al hombre. (Toxicidad en ratón: 8.3×10^{-8} mg LD₅₀).

Tipo E: Muy tóxico al hombre. Tiene dos fracciones: E_A (tóxico) y E_B. Se encuentra en pescado y derivados. Debe activarse por tripsina; después de activado la toxicidad es de 1×10^{-8} mg LD₅₀ en ratón.

Tipos F y G: Son también activados con tripsina. No se han estudiado.

La toxina se sintetiza durante la fase exponencial, después que las esporas han germinado en el alimento.

Es necesario que el alimento contenga glucosa, o maltosa; todos los aminoácidos esenciales al microorganismo, fuente de carbono, agua y sales inorgánicas.

La síntesis de la toxina es como protoxina (no tóxica) o progenitor-toxina (ligeramente tóxica) y debe activarse por tripsina.

Algunos alimentos que contienen proteínas, al contaminarse con este microorganismo dan olor fétido, otros no.

Algunas cepas no producen gas, por tanto, el abombamiento de las latas no es un signo confiable.

Inactivación de la toxina:

- Tripsina a pH = 7.5

- 80°C, durante 10 minutos.
- Precipitación de proteínas por metales pesados.

Las temperaturas para destruir las esporas de -----
Clostridium botulinum se muestran en la tabla 3.

Características de la enfermedad:

Período de incubación: 12 a 36 horas.

Síntomas: trastornos digestivos, náuseas, vómito, diarrea, dolor de cabeza, desvanecimiento, visión doble y borrosa, asfixia e hinchazón de la lengua y parálisis de músculos involuntarios ya que la toxina interfiere con acetilcolina y no hay transmisión sináptica, (14).

Control:

- 1) Enlatado a temperatura adecuada.
- 2) Rechazar todo bote hinchado.
- 3) No probar ningún alimento sospechoso; olor fétido -- rancio o presencia de gas.
- 4) Evitar consumir alimentos crudos que se han congelado y mantenido después a temperatura ambiente.
- 5) No consumir ningún pescado no congelado en el envío.
- 6) Hervir todo alimento sospechoso durante 15 minutos.

CLOSTRIDIUM PERFRINGENS (WELCHII)

Bacilos Gram positivos, formadores de esporas, anaerobios e inmóviles. Temperatura óptima de crecimiento: 43-47°C.

Muy escaso crecimiento entre 15-20°C, límites: 5.5-55°C. Máxima esporulación y formación de toxinas: 37-40°C.

Produce 6 tipos de enterotoxinas: A, B, C, D, E, F que se producen al formarse las envolturas proteícas de las esporas. Si no hay esporulación, no habrá toxina.

De las enterotoxinas las importantes para el hombre son:

La tipo A (intoxicación alimentaria) y la tipo C (enteritis necrótica).

Toxicidad: Tipo A: 2×10^3 DML (Dosis mínima letal: La más pequeña cantidad inyectada por vía intraperitoneal suficiente para matar 6 de 6 ratones de 18-20 g en 4 días).

El mecanismo de acción de la toxina es similar a la del cólera.

Características de la enfermedad:

Período de incubación: 18-22 horas.

Síntomas: dolor abdominal agudo, diarrea, náuseas, rara vez vómito. Es de corta duración.

Control:

1) Mantener los alimentos por abajo de 4.4°C o por encima de 65.5°C.

- 2) Recalentar los sobrantes.
- 3) Enfriar rápidamente los alimentos una vez cocinados, en cantidades pequeñas.
- 4) Buena higiene personal.

Las células vegetativas son muy sensibles al calor. La resistencia de las esporas al calor se señala en la tabla 3.

STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Cocos Gram positivos. Pertenecen a la familia ----- Micrococacceae, ampliamente relacionados con el hombre.

Tienen una elevada resistencia a la sal (12% de NaCl). Temperatura óptima de crecimiento: 35-37°C, con límites entre 5.6 - 46.6°C; pH mínimo de crecimiento: 4.8 (aerobiosis).

Producen 6 tipos de enterotoxinas: A, B, C, D, E, F.

La enterotoxina tipo A es la más común. La mayoría de los autores coinciden en que las cepas productoras de enterotoxina coagulan el plasma (10) y (14). La prueba de la coagulasa es la más ampliamente utilizada para detectar cepas enterotoxigénicas. No hay ninguna prueba que tenga absoluta correlación con la producción de toxina, (14). Todas las enterotoxinas son resistentes a tripsina, quimotripsina, renina y -- papaína. Son inactivadas con pepsina a pH = 2.0.

La producción de enterotoxina se halla favorecida por -- las condiciones que estimulan el crecimiento de estafilococos y éstas varían con el tipo de alimento. Otros tipos de bacte-

rias de los alimentos que entran en competencia con los estafilococos pueden reprimir su crecimiento lo suficiente para retardar la producción de toxina. Se ha observado la producción de enterotoxina en grandes cantidades en productos cárnicos, pasteles rellenos de crema ya que las proteínas y el almidón en abundancia estimulan la producción de toxina (14).

Algunos alimentos son excesivamente ácidos para el desarrollo de estos microorganismos, pero la adición de ingredientes como huevos y crema, reducen la acidez y los convierten en alimentos peligrosos. Los equipos que conservan calientes los alimentos en las cafeterías y los restaurantes y las máquinas-exendedoras de alimentos calientes son medio propicio para el desarrollo de estafilococos y la producción de enterotoxina. (10).

Los alimentos contaminados con estos microorganismos -- después de un tratamiento térmico constituyen un medio de cultivo para el germen, y por tanto, para la producción de toxina. Los alimentos contaminados no presentan signos aparentes de deterioro.

Mecanismo de patogenicidad:

Tiene efectos primarios a nivel subcelular causando daños reversibles a las mitocondrias, (15). Hay necrosis del tejido intestinal, emesis y diarrea; el sistema circulatorio se ve afectado (hay leucocitosis). En los pacientes tratados con antibióticos donde se ha destruido o inactivado la flora compe

titiva, se favorece la proliferación del germen en la mucosa -
gastrointestinal produciendo enterocolitis pseudomembranosa, --
(14).

Características de la enfermedad:

Período de incubación: 3 a 6 horas.

Síntomas: náuseas, vómito, dolor abdominal, postración-
y diarrea, con duración de 24 horas a pocos días.

Control:

- 1) Utilizar ingredientes que no contengan estafilococos para la preparación de alimentos elaborados (p.e. leche pasteurizada en lugar de leche cruda).
- 2) Evitar el contacto de los alimentos con empleados -- que padezcan resfriados, forúnculos, etc. y también- el que los portadores manejen alimentos.
- 3) Pasteurizar aquellos alimentos termorresistentes antes de exponerlos a temperatura ambiente.
- 4) Refrigerar adecuadamente los alimentos, y en algunos casos, si es posible, aumentar la acidez.

C A P I T U L O I I I

MATERIAL Y METODOS.

MEDIOS DE CULTIVO

El cultivar microorganismos es un procedimiento mediante el cual se promueve el crecimiento de aquellos al proporcionarles las condiciones ambientales adecuadas: nutrientes, pH, temperatura y aereación. Otros factores que deben ser controlados incluyen: concentración salina, presión osmótica, luz y tiempo de incubación.

Como nutrientes los medios de cultivo deben tener: fuente de nitrógeno (que permite a los microorganismos construir aminoácidos), fuentes de carbono (a base de azúcares, alcoholes, ácidos grasos o CO_2), factores de crecimiento (aminoácidos incapaces de ser sintetizados por el microorganismo en cuestión, vitaminas, nucleótidos y sales inorgánicas), inhibidores en el caso de medios selectivos, e indicadores de pH; el

agar solamente se utiliza para solidificar el medio si ésto es necesario. (16).

La selectividad de diversos medios de cultivo es un factor de suma importancia, ya que así se tiene una guía que permite escogerlos de acuerdo a los microorganismos que interese aislar.

Los medios de cultivo utilizados para el desarrollo del presente trabajo fueron los siguientes:

A. Medios sólidos en placa.

1. Selectivos para el aislamiento de enterobacterias:

(1), (7)

- a) Agar MacConkey (Bioxón de México, S.A.)
- b) Agar eosina azul de metileno (Merck).
- c) Agar tergitol-7 (Merck).
- d) Agar xilosa-lisina-desoxicolato (Merck).
- e) Agar verde brillante (Merck).
- f) Agar sulfito de bismuto (Merck).

2. Selectivos para el aislamiento de estafilococos:

- a) Agar S-110 (Bioxón de México, S.A.)

B. Medios sólidos inclinados en tubo.

1. Para diferenciación de enterobacterias: (21)

- a) Agar hierro de Kligler (Bioxón de México, S.A.)

- b) Agar citrato de Simmons (Bioxón de México, --- S.A.)
- c) Agar urea según Christensen (Difco).
- d) Agar fenil-alanina (Difco).

C. Medios semisólidos.

1. Para diferenciación de enterobacterias: (21)

- a) SIM (Merck).

Preparación: Se siguieron las indicaciones según el membrete del preparado comercial.

D. Medios líquidos.

1. De enriquecimiento selectivo de salmonela: (27)

- a) Caldo de tetrionato (Difco)
- b) Caldo selenito-cistina (Merck)

Preparación: Se siguieron las indicaciones según el membrete del preparado comercial.

2. De enriquecimiento de enterobacterias. (29).

Preparado de acuerdo a la siguiente fórmula:

Caldo lactosa bilis verde brillante al 2%.	40	g.
Na ₂ HPO ₄	2.74	g.
KH ₂ PO ₄	2.74	g.
Agua destilada	1 000	ml
pH final = 7.2		

Se sirvieron cantidades de 12 ml. en tubos de 16-x 150 mm. y se esterilizaron a 121°C. ó 15 lb/in² durante 15 ' en autoclave.

3. Selectivos para bacterias coliformes. (27).

a) Caldo EC (Difco)

b) Caldo lactosa bilis verde brillante al 2% ----
(Difco).

c) Caldo lauril sulfato triptosa (Difco).

Preparación: Se siguieron las indicaciones según el membrete del preparado comercial. Las cantidades que se envasaron se indican en metodología.

4. Para diferenciación de enterobacterias. (21).

a) Caldo malonato de Ewing (Difco)

b) Caldo de RM/VP, (Difco).

c) Base de descarboxilasa de Møller, adicionada -
de lisina, arginina u ornitina, (Merck).

5. De enriquecimiento de estafilococos. (27).

a) Caldo soya tripticasa con 10% de NaCl, (Difco).

Preparación: Se siguieron las indicaciones según el membrete del preparado comercial.

6. Diluyente. (29).

a) Agua peptonada al 0.1%

E. Medios para siembra en profundidad.

1. Recuento en placa de gérmenes mesófilos aerobios:

a) Agar cuenta estándar

Preparado de acuerdo a la siguiente fórmula:

Extracto de levadura.....	2.5 g.
Triptona.....	5.0 g.
Glucosa	1.0 g.
Agar	13.1 g.
Agua destilada.....	1 000 ml.

pH final = 7.0

Esterilización: 121°C, ó 15 lb/in², 15' en ---
autoclave.

2. Recuento en placa de hongos y levaduras

a) Agar para dextrosa (Difco)

Preparación: se siguieron las indicaciones según el membrete del preparado comercial.

REACTIVOS

1. Kovac's
2. Barrit para Vogues-Proskauer:
 - A. alfa naftol al 5%
 - B. Hidróxido de potasio al 40%
2. Colorantes para tinción de Gram:
Cristal violeta
Lugol
Alcohol-acetona
Safranina
3. Cloruro de sodio al 0.5%
4. Cloruro férrico al 10%
5. Reactivo para ONPG (Ortonitrofenil beta-D-galactopiranósido)
6. Tolueno
7. Peróxido de hidrógeno al 3%
8. Bacto-coagulasa plasma (Difco)
9. Antisueros polivalentes somáticos para salmonela, (Química-Hoechst)
10. Antisueros monovalentes somáticos para salmonela, (Química-Hoechst)
11. Antisueros polivalentes para shigela, (Química Hoechst)
12. Fenol al 5%

MATERIAL BIOLÓGICO

1. Alimentos sólidos.

Para realizar el análisis se eligió la forma lineal, es decir, se tomaron muestras del mismo alimento en 3 etapas diferentes:

- a) Como materia prima, tomada del almacén de la cocina central.
- b) Como alimento cocinado, tomado de la cocina central.
- c) Como alimento distribuido, tomado de las cocinas de distribución de los diferentes pisos del hospital o de la barra del comedor central.

Los alimentos analizados fueron los siguientes:

Carnes blancas:

- Pescado
- Pollo

Carnes rojas:

- Bistec de cerdo y res.
- Carne molida de res
- Carne maciza de cerdo y res

Embutidos:

- Jamón
- Salchicha

Productos enlatados:

- Atún

Productos lácteos:

- Crema
- Queso tipo Chihuahua

2. Productos líquidos.

Unicamente se tomó una muestra de cada uno de los siguientes productos:

- Agua de grifo.
- Agua de filtro.
- Jarabe.
- Naranjada.

M E T O D O S

PRUEBAS METABOLICAS

Una vez que se logra el crecimiento de colonias de microorganismos según la metodología que se describe más adelante, se procede a la identificación de dichos gérmenes basándose en el antecedente de la selectividad de los medios de cultivo y en el hecho de que microscópicamente las bacterias pueden distinguirse de acuerdo a su morfología y afinidades tintoriales.

Posteriormente se realizan una serie sencilla de pruebas basadas en la detección de los productos finales del metabolismo de los microorganismos para clasificarlos en género y especie.

ALGUNAS CARACTERISTICAS METABOLICAS DETECTADAS EN BACILOS GRAM NEGATIVOS (ENTEROBACTERIAS), PARA SU DIFERENCIACION, (21).

1. Fermentación de glucosa y lactosa.

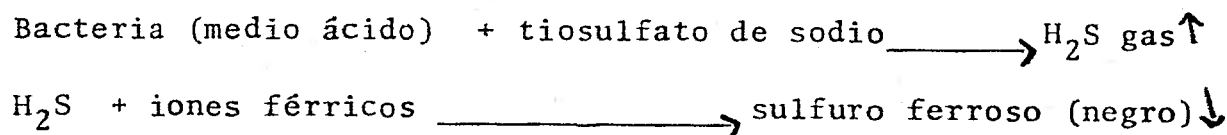
Se utiliza agar hierro de Kligler sembrado por estría e incubado a 37°C, durante 24 horas. La fermentación de glucosa se observa por una reacción ácida del medio en la capa profunda, mientras que la de lactosa por una reacción ácida en la superficie. Un crecimiento sin cambio de color del medio indica que no fueron atacados ninguno de estos carbohidratos, sólo se utilizaron las peptonas.

2. Producción de Gas

Se utiliza agar hierro de Kligler sembrado por picadura, (tubo anterior) e incubado a 37°C. durante 24 horas. Se determina si el microorganismo en cuestión genera gas como producto final del metabolismo de los carbohidratos. Los gases producidos, CO₂ e H₂ se manifiestan por un desplazamiento total del medio del fondo del tubo o por una ligera muesca del medio.

3. Producción de ácido sulfhídrico

La liberación de este compuesto se debe al metabolismo de los aminoácidos que contienen azufre produciéndose una reacción visible de color negro, ya que el medio utilizado para su detección (agar hierro de Kligler, tubo anterior), contiene lo siguiente:



4. Detección de ureasa

Se detecta la capacidad de un microorganismo de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa. La presencia de NH₃ produce alcalinidad en el medio virando el color original del mismo (de amarillo a rosa). El medio que se utiliza es agar urea según Christensen, sembrado por estría e incubado a 37°C. de 6 a 24 horas.

5. Aprovechamiento de citrato

Se observa la capacidad de un microorganismo de utilizar el citrato como única fuente de carbono para su metabolismo, desdoblando las sales de amonio en amoníaco que produce al calinidad en el medio virando el color original del mismo, (de verde a azul). Se utiliza agar citrato de Simmnons, sembrado por estría e incubado a 37°C, 24 a 48 hrs.

6. Utilización de malonato

Se determina la capacidad del microorganismo de utilizar el malonato de sodio como fuente de carbono y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. El compuesto que se produce es hidróxido de sodio, que vira el color original del medio -- (de verde a azul). Se emplea caldo malonato de Ewing incubado a 37°C, de 24 a 48 horas.

7. Descarboxilación de aminoácidos

Mide la capacidad enzimática de un microorganismo para descarboxilar un aminoácido y formar una amina, la cual produce alcalinidad en el medio. La reacción anterior se lleva a cabo en anaerobiosis por lo que es necesario recubrir la superficie del medio con 1 cm³. de vaselina estéril. Los medios -- que se utilizan son: base de Møller adicionada de lisina, arginina y ornitina. Incubación: 37°C, de 1 a 4 días.

8. Producción de indol

Se determina la capacidad de un microorganismo para desdoblar indol de la molécula de triptofano contenida en medio - SIM, sembrado por picadura e incubado a 37°C durante 24 horas.

El indol desdoblado se detecta por medio de reactivo de Kovac's (para-N-dimetil-amino benzaldehído) que da un color rojo al formar un complejo con el indol.

9. Movilidad

Se determina si un microorganismo es móvil o no, utilizando medio SIM, sembrado por picadura e incubado a 37°C durante 24 horas. Los microorganismos móviles migran de la línea de siembra y se difunden en el medio provocando turbidez. --- Cuando el microorganismo es inmóvil se observa un crecimiento acentuado siguiendo la línea de siembra y el medio circundante se mantiene claro.

Cuando no es posible identificar un microorganismo mediante estas pruebas, se utilizan otras pruebas adicionales, de apoyo, para detectar las siguientes características metabólicas.

1. Producción de acetoína

Basada en la capacidad de algunos microorganismos de -- producir acetoína a partir de la fermentación de glucosa (prueba de Voges-Proskauer). El medio utilizado es caldo RM/VP, in cubado a 37°C, durante 24 a 48 horas. Para la detección de -- acetoína se utilizan los reactivos de Barrit: alfa naftol al 5% e hidróxido de potasio al 40%.

2. Detección de fenil-alanina desaminasa

Se detecta la capacidad de un microorganismo para desa-

minar la fenil-alanina en ácido pirúvico, mediante un proceso enzimático. Incubación de agar fenil alanina sembrado por estría: 24 horas a 37°C. Para detectar el ácido pirúvico producido se utiliza cloruro férrico al 10%. La reacción de un complejo colorido verde.

3. Utilización de carbohidratos

Se detecta la capacidad de un microorganismo para degradar un carbohidrato específico incorporado a un medio básico, produciendo acidez. Puede utilizarse base de Andrade incorporada del azúcar específico según se requiera: adonitol, sorbitol, xilosa, arabinosa, inositol, etc. en solución acuosa al 3%, estéril.

4. Detección de betagalactosidasa

Empleada para detectar la presencia de la enzima beta-galactosidasa utilizando el compuesto orgánico ortonitrofenil-beta-D-galactopiranosido (ONPG), capaz de formar, al desdoblarse un compuesto colorido. Incubación: 37°C. de 4 a 24 horas.

ALGUNAS CARACTERISTICAS METABOLICAS IMPORTANTES PARA LA CLASIFICACION DE COCOS GRAM POSITIVOS

1. Detección de la enzima catalasa

Utilizada para diferenciar los géneros Staphylococcus y Micrococcus del género Streptococcus. El reactivo que se utiliza es H_2O_2 al 3%.

2. Detección de la enzima coagulasa

Utilizada para diferenciar Staphylococcus aureus de ---
Staphylococcus epidermidis. Reactivo utilizado: Plasma liofi-
lizado de conejo, incubado a 37°C. de 5 a 24 horas.

METODOLOGIA

1. TOMA DE MUESTRAS

Se observaron una serie de precauciones y condiciones a fin de obtener resultados significativos, para ello:

- a) Se tomaron asépticamente, utilizando material esté--
ril.
- b) Cada muestra se etiquetó especificando el tipo de --
alimento, cuándo y dónde se tomó.
- c) Se trató de mantener el estado original de la mues--
tra protegiéndola de condiciones que pudieran matar--
los microorganismos, para ello el análisis se practi--
có ese mismo día.
- d) Se examinaron las condiciones organolépticas del pro--
ducto.

Alimentos sólidos:

Las porciones del alimento a analizar se tomaron de un lote escogido al azar. De ese mismo lote se tomaron los pro--
ductos cocinados y distribuídos.

Alimentos líquidos:

- Para agua de filtro y de grifo.- La llave se abrió y cerró varias veces para que salieran las partículas adheridas si las hubiera; la superficie externa del conducto se limpió con fenol al 5%, se dejó correr el agua durante un minuto y se recogieron 100 ml. de líquido en un matraz estéril.

- Para jarabes y naranjadas.- Se tomaron asépticamente 100 ml. del lote en matraces estériles. (29).

2. PREPARACION Y DILUCION DE LAS MUESTRAS

Alimentos sólidos:

a) Se pesaron 10 g. de la muestra obtenida de diferentes zonas, fueron transferidos al vaso del homogeneizador y se adicionaron 90 ml. de diluyente (agua peptonada al 0.1%). Este paso y todos los siguientes se realizaron en condiciones estériles.

b) La homogeneización se realizó a 15 000-20 000 rpm. por 2-3 minutos, en un aparato homogeneizador Mixer.

c) La mezcla se dejó en reposo durante 15' a temperatura ambiente para permitir la reactivación de los microorganismos.

d) Se realizaron diluciones 10^{-1} a 10^{-7} , (29)

3. SIEMBRA EN LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

Alimentos sólidos

- a) Se transfirió por duplicado 1 ml. de cada una de las diluciones a cajas de Petri previamente marcadas con los datos pertinentes.
- b) Fueron adicionados de 15 a 20 ml. de agar cuenta estándar fundido y mantenido a 45°C.
- c) A otro juego de cajas conteniendo por duplicado 1 ml. de cada una de las diluciones se agregaron de 15 a 20 ml. de agar papa dextrosa acidificado (con ácido tartárico al 10%), fundido y mantenido a 45°C.

Las cajas de los incisos b) y c) se mezclaron con movimientos rotatorios (27), hasta homogeneizar el inóculo y el medio de cultivo, se dejó enfriar el medio hasta solidificar y se incubaron las cajas con agar cuenta estándar a 37°C, durante 48 horas. Uno de los lotes de cajas con agar papa dextrosa se incubó a 37°C durante 5 días, el lote restante se mantuvo a 22°C, por 5 días.

- d) Se inoculó 1 ml. de las diluciones 10^{-1} a 10^{-5} a cada uno de 3 tubos conteniendo 10 ml. de caldo lauril sulfato triptosa con campana de fermentación. Se incubaron 48 horas a 37°C.
- e) Fue transferido 1 ml. de cada una de las diluciones a tubos que contenían 4.5 ml. de caldo soya triptica con 10% de cloruro de sodio. Se incubaron a 37°C, durante 48 horas. (27).
- f) Se sembró una asada de la dilución 10^{-1} en los siguientes medios de cultivo: placas de agar eosina --

azul de metileno (EMB), xilosa lisina desoxicolato - (XLD), MacConkey y tergitol-7 de tal manera que se obtuvieran colonias aisladas. La incubación se llevó a cabo durante 24 horas a 37°C.

- g) Se transfirió 1 ml. de la dilución 10^{-1} previamente incubada a 37°C. durante 24 horas, a 3 tubos conteniendo cada uno de ellos 12 ml. de caldo de enriquecimiento para enterobacterias. Incubación: 24 horas a 37°C.. (29).
- h) Por separado, se pesaron por duplicado 25 g. del alimento y se homogeneizaron como se indicó anteriormente utilizando en estos casos como diluyente 225 ml. de caldo selenito-cistina y 225 ml. de caldo de tetracionato. El homogeneizado se colocó en matraces de 500 ml. rotulados respectivamente y se incubaron 24 horas a 37°C. (27).
- i) A las 24 horas de incubación del caldo de enriquecimiento para enterobacterias, se sembró una asada del cultivo de cada tubo en placas de agar XLD, EMB, --- MacConkey y tergitol-7 a manera de obtener colonias aisladas. Se incubaron 24 horas a 37°C.
- j) A las 24 horas de incubación de los caldos selenito-cistina y tetracionato se sembró una asada de cada uno en los siguientes medios: placas de agar sulfito bismuto, verde brillante, XLD y MacConkey. Incubación: 24 horas a 37°C.

k) A las 48 horas de incubación del caldo lauril sulfato triptosa se seleccionó un tubo de cada dilución - que presentó formación de gas. Del cultivo de este tubo se sembró una asada (con asa calibrada de 3 mm. de diámetro) en 3 tubos conteniendo cada uno 10 ml. de caldo EC con campana de fermentación, y una asada en 3 tubos conteniendo cada uno 10 ml. de caldo lactosa bilis verde brillante al 2%, con campana de fermentación. Los tubos con caldo EC se incubaron 48 - horas a 44.5°C. Los tubos con caldo lactosa bilis - verde brillante al 2% se incubaron 48 horas a 37°C.

1) Después de 48 horas de incubación, las diluciones en caldo soya tripticasa que presentaron desarrollo se sembraron en placas de agar S-110 (una asada de cultivo con asa calibrada de 3 mm. de diámetro =0.01ml). Las placas se incubaron 24 a 37°C. (27).

DIAGRAMA DE METODOLOGIA REALIZADA PARA ALIMENTOS SOLIDOS

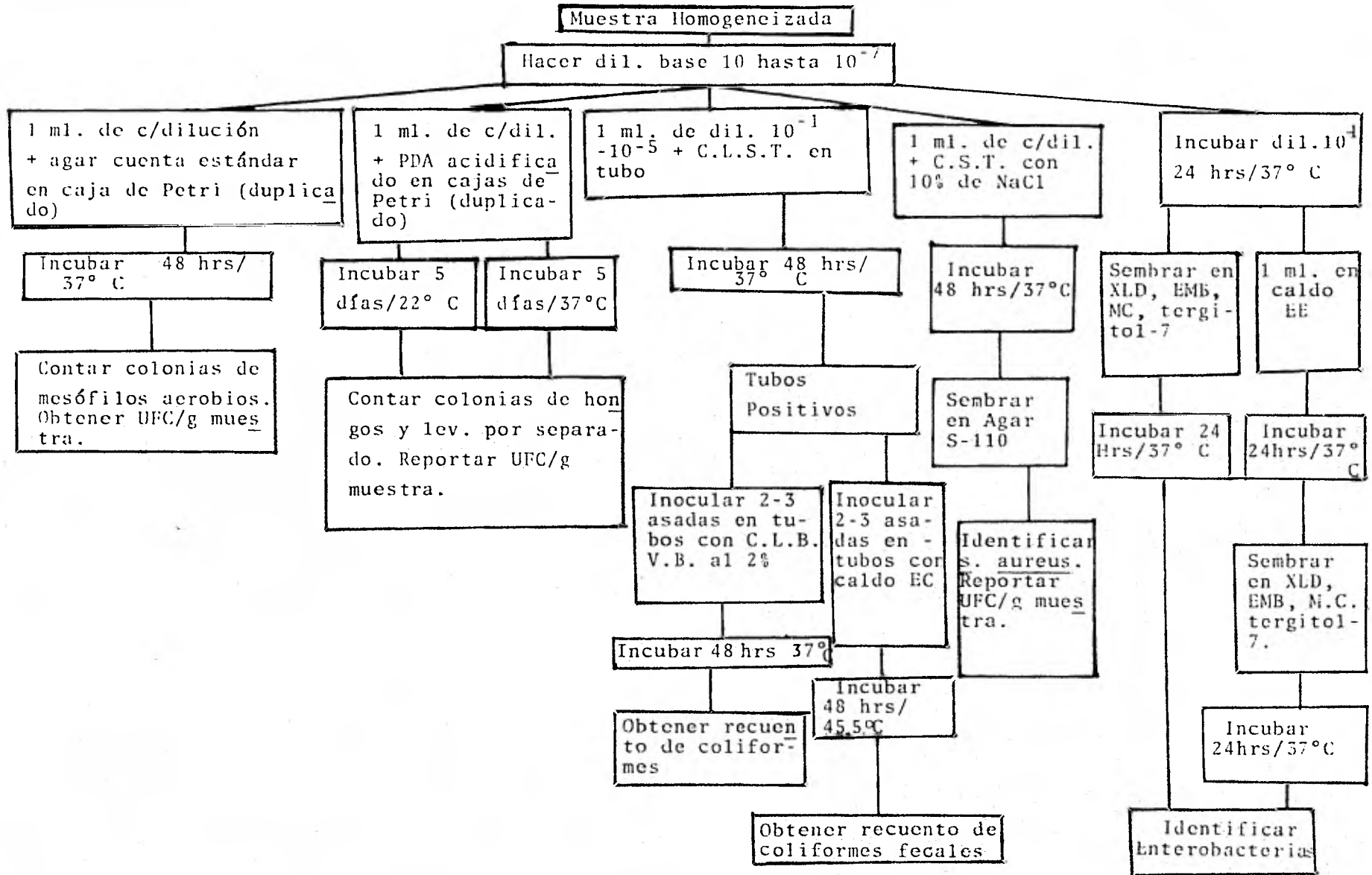
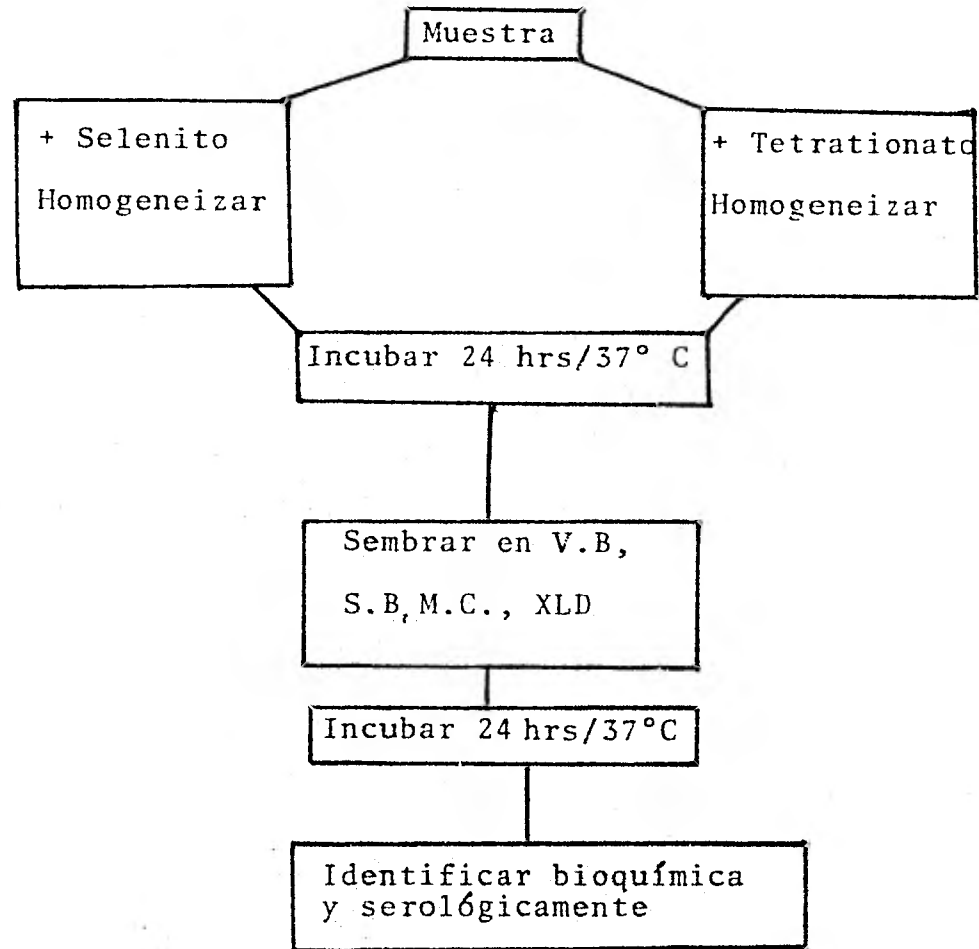


DIAGRAMA-DE- METODOLOGIA PARA AISLAMIENTO DE SALMONELLA SP



Alimentos líquidos

a) Se inoculó 1 ml. de líquido correspondiente a cada una de dos cajas rotulada previamente:

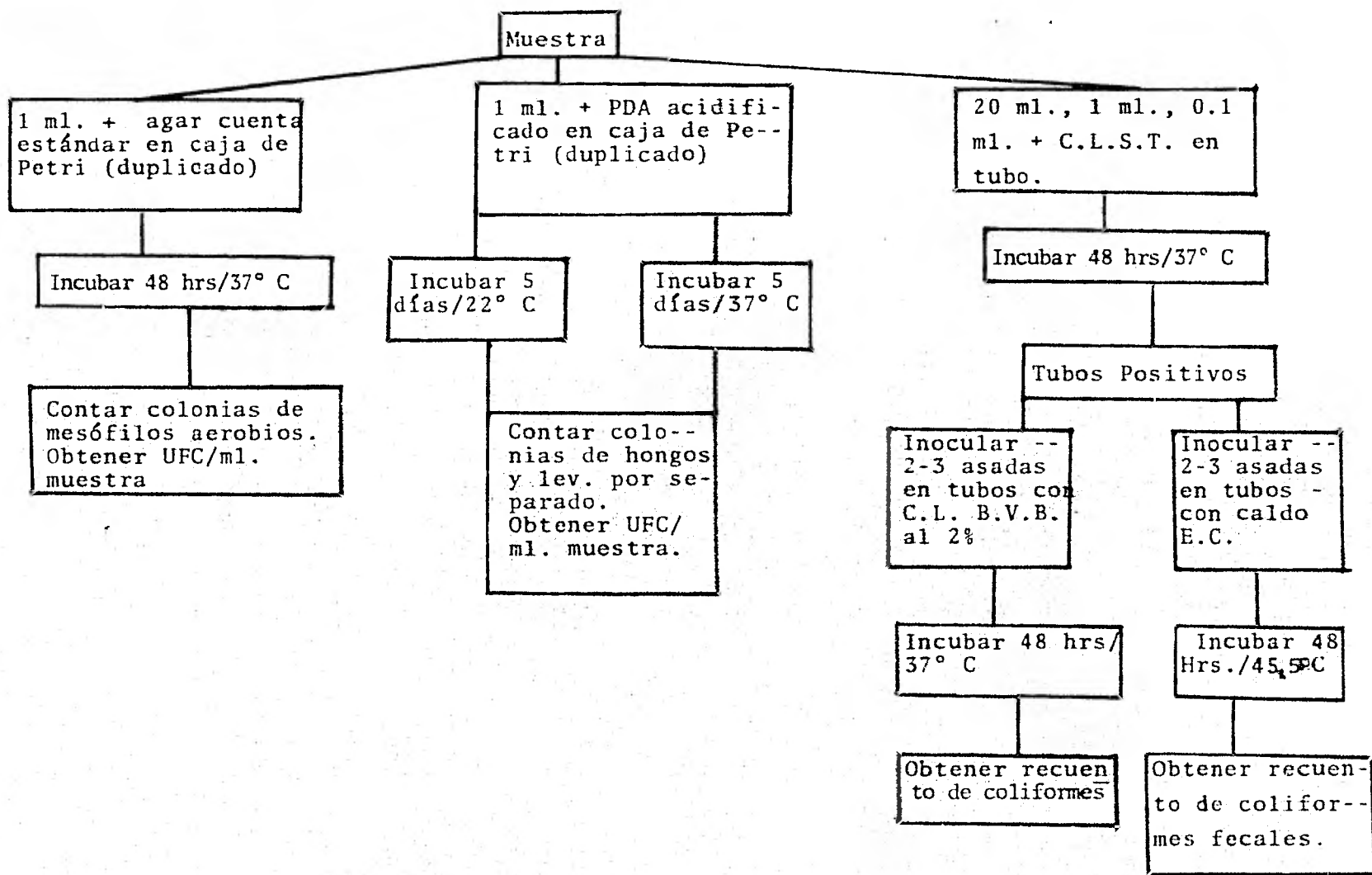
Agua de grifo	Caja de agar cuenta estándar
Agua de grifo	Caja de agar papa dextrosa
Agua de filtro	Caja de agar cuenta estándar
Agua de filtro	Caja de agar papa dextrosa
Jarabe	Caja de agar cuenta estándar
Jarabe	Caja de agar papa dextrosa
Naranjada	Caja de agar cuenta estándar
Naranjada	Caja de agar papa dextrosa

b) Se adicionaron a cada caja 15 a 20 ml. de medio según corresponda.

c) Se mezclaron con movimientos rotatorios, (27), se dejó enfriar el medio hasta solidificar y se incubaron las cajas de agar cuenta estándar a 37°C. durante 48 horas. Uno de los lotes de cajas con agar papa dextrosa se incubó a 22°C. durante 5 días, el lote restante se incubó a 37°C. el mismo tiempo.

d) De cada uno de los diferentes líquidos se inocularon 10 ml. en un juego de 3 tubos conteniendo cada uno 20.0 ml. de caldo lauril sulfato triptosa con campana de fermentación, 1 ml. en un juego de 3 tubos conteniendo cada uno 9.0 ml. de caldo lauril sulfato triptosa con campana de fermentación y 0.1 ml. en un

DIAGRAMA DE METODOLOGIA REALIZADA PARA ALIMENTOS LIQUIDOS



juego conteniendo 9.9 ml. de caldo lauril sulfato -- triptosa con campana de fermentación. Se incubaron durante 48 horas a 37°C.

- e) Después de incubar los tubos del inciso d), se revisaron y de aquellos que presentaron formación de gas, se inocularon de 2 a 3 asadas de cultivo en tubos -- conteniendo caldo lactosa bilis verde brillante al 2%, los cuales se incubaron a 37°C. durante 48 horas. De igual manera se inocularon tubos conteniendo caldo EC y se incubaron a 44.5°C durante 48 horas. (27).

4. RECUESTO DE COLONIAS

- a) Se seleccionaron aquellas placas trabajadas por el método de siembra en profundidad donde desarrollaron de 30 a 300 colonias, ya que en ellas el error es menor.

- Después de 48 horas de incubación se contaron todas las colonias desarrolladas en las placas de agar cuenta estándar, excepto las de hongos. El número de colonias se multiplicó por la inversa de la dilución obteniéndose el número de unidades formadoras de colonia de gérmenes mesófilos aerobios por gramo o mililitro de alimento (UFC/g o UFC/ml. de alimento).

- A los 5 días de incubación se contaron por separado las colonias de hongos y levaduras crecidos a -

22°C. y 37°C. en agar papa dextrosa, el número se multiplicó por la inversa de la dilución y se reportó según el caso en el que el recuento fuera mayor: unidades formadoras de colonia de levaduras - por gramo o mililitro de alimento y unidades formadoras de colonias de hongos por gramo o mililitro de alimento.

5. DETERMINACION DEL NUMERO MAS PROBABLE DE MICROORGANISMOS --
(NMP).

- a) Después de 48 horas de incubación se revisaron los - tubos de caldo lactosa bilis verde brillante al 2%. - Aquellos que presentaron formación de gas se conside- ran positivos. Se consultó la tabla 4 (para alimen- tos sólidos) y la tabla 5 (para alimentos líquidos)- para obtener, de acuerdo al número de tubos positi- vos el número más probable de microorganismos: NMP/g o NMP/100 ml. de alimento, en este caso de colifor- mes (prueba confirmatoria), (27).
- b) De igual manera se revisaron los tubos conteniendo - caldo EC. Se consultaron las mismas tablas, para ob- tener el NMP/g o NMP/100 ml. de alimento de colifor- mes fecales, (27), prueba confirmatoria.

TABLA 4

NUMERO MAS PROBABLE DE MICROORGANISMOS

Tubos positivos			NMP/g	Tubos positivos			NMP/g	Tubos positivos			NMP/g	Tubos positivos			NMP/g
3	3	3		3	3	3		3	3	3		3	3	3	
(0.1)	(0.01)	(0.001)		(0.1)	(0.01)	(0.001)		(0.1)	(0.01)	(0.01)		(0.1)	(0.01)	(0.01)	
0	0	0	-3.0	1	0	0	3.6	2	0	0	9.1	3	0	0	25.0
0	0	1	3.0	1	0	1	7.2	2	0	1	14.0	3	0	1	59.0
0	0	2	6.0	1	0	2	11.0	2	0	2	20.0	3	0	2	64.0
0	0	3	9.0	1	0	3	15.0	2	0	3	26.0	3	0	3	95.0
0	1	0	3.0	1	1	0	7.3	2	1	0	15.0	3	1	0	43.0
0	1	1	6.1	1	1	1	11.0	2	1	1	20.0	3	1	1	75.0
0	1	2	9.2	1	1	2	15.0	2	1	2	27.0	3	1	2	120.0
0	1	3	12.0	1	1	3	19.0	2	1	3	34.0	3	1	3	160.0
0	2	0	6.2	1	2	0	11.0	2	2	0	21.0	3	2	0	93.0
0	2	1	9.3	1	2	1	15.0	2	2	1	28.0	3	2	1	150.0
0	2	2	12.0	1	2	2	20.0	2	2	2	35.0	3	2	2	210.0
0	2	3	16.0	1	2	3	24.0	2	2	3	42.0	3	2	3	290.0
0	3	0	9.4	1	3	0	16.0	2	3	0	29.0	3	3	0	240.0
0	3	1	13.0	1	3	1	20.0	2	3	1	36.0	3	3	1	460.0
0	3	2	16.0	1	3	2	24.0	2	3	2	44.0	3	3	2	1100.0
0	3	3	19.0	1	3	3	29.0	2	3	3	53.0	3	3	3	+1100.0

Tubos inoculados 3 con 1 ml. dilución 1:10 = 0.1 g. muestra
 3 con 1 ml. dilución 1:100 = 0.01 g. muestra
 3 con 1 ml. dilución 1:1000 = 0.001 g. muestra

NUMERO MAS PROBABLE DE MICROORGANISMOS

N° de tubes positivos			NMP/100 ml.	Límites de confianza (95%)	
3 (10ml)	3 (1 ml)	3 (0.1 ml)		Mínimo	Máximo
0	0	1	3	0.5	9
0	1	0	3	0.5	15
1	0	0	4	0.5	20
1	0	1	7	1.0	21
1	1	0	7	1.0	23
1	1	1	11	3.0	36
1	2	0	11	3.0	36
2	0	0	9	1.0	36
2	0	1	14	3.0	37
2	1	0	15	3.0	44
2	1	1	20	7.0	89
2	2	0	21	4.0	47
2	2	1	28	10.0	150
3	0	0	25	4.0	120
3	0	1	39	7.0	130
3	0	2	64	15.0	380
3	1	0	43	7.0	210
3	1	3	75	14.0	230
3	1	2	120	30.0	380
3	2	0	93	15.0	380
3	2	1	150	30.0	440
3	2	2	210	35.0	470
3	3	0	240	35.0	1 300
3	3	1	460	71.0	2 400
3	3	2	1 100	150.0	4 800

Tubos inoculados: 3 con 10 ml. de la muestra
3 con 1 ml. de la muestra
3 con 0.1 ml. de la muestra

Referencia: Técnicas Generales para Análisis Microbiológico de Alimentos, S.S.A., 1979.

6. IDENTIFICACION DE ENTEROBACTERIAS

a) A las 24 horas de incubación de las placas de agar - XLD, MacConkey, EMB, tergitol-7, sulfito de bismuto, verde brillante, se seleccionaron aquellas que presentaron colonias aisladas para sembrarlas en los medios específicos para diferenciación de enterobacterias.

Se identificaron todos los diferentes tipos de colonias de microorganismos desarrollados, dando especial importancia a los que desarrollaron colonias -- lactosa negativa, ya que podrían ser los patógenos: salmonela y shigela. Es importante conocer a grandes rasgos la morfología colonias que desarrollan -- los diferentes tipos de microorganismos, sobre todo cuando no es requerida la identificación de todos -- ellos, sino únicamente de los potencialmente patógenos. La morfología colonial de salmonela y shigela en diferentes medios de cultivo se describe a grandes rasgos en la tabla 6.

Las colonias seleccionadas se sembraron en los medios para diferenciación de enterobacterias. Después de incubarlas el tiempo necesario a la temperatura adecuada, como se indicó anteriormente, fue consultada la tabla 7 para su identificación.

b) Las cepas cuya bioquímica coincidía con ----- Salmonella enteritidis se aglutinaron con sueros específicos para clasificarlas por grupo.

TABLA 6
MORFOLOGIA COLONIAL

MEDIO DE CULTIVO	MICROORGANISMO	
	Salmonella	Shigella
MC CONKEY	Rosa pálida, transparente.	Rosa transparente
X L D	Rosa con centro negro	Roja
TERGITOL	Blanca	Blanca
SULFITO DE BISMUTO	Negra, con brillo metálico.	Transparente
VERDE BRILLANTE	Roja	Roja

*Referencia: Edwards, P. R. and Ewing, W. H., 1972. Identification of Enterobacteriaceae, 3th. Ed. Burgess Publishing Co. Atlanta, Georgia.

TABLA 7

IDENTIFICACION DE ENTEROBACTERIAS

TRIBU	E s c h e r i c h e a e		Edwarsiella	S a l m o n e l l a e		
GENERO	Escherichiae	Shigella	Edwarsiella	Salmonella	Arizona	
ESPECIE	Escherichia coli			S. Typhi	S. enteritidis	A. hinshawii
	A/A o K/A	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A
Kligler	- 0	- 0	+ 98	+ 98	+ 95	+ 98.7
H ₂ S	- 0	- 0	+ 98	+ 98	+ 95	+ 98.7
Indol	+ 99.2	d 37.8	- 1.1	- 1.1	- 0	- 2
Movilidad	d 69.1	- 0	+ 94	+ 94	+ 100	+ 100
Ureasa	-	- 0	- 0	- 0	- 0	- 0
Citrato	-	- 0	d 80.1	d 80.1	-	+ 98
Malonato	- 0	- 0	-	-	- 0	+ 92
L D C	+ 87.9	- 0	+ 99.4	+ 99.4	+ 100	+ 92
A D L	d 17.2	d 7.6	+ 58	+ 58	+ 81	+
O D C	d 63.4	d 20	+ 100	+ 100	+ 100	+ 100
V.P.	-	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	- 2.1	-	+ 92.8

A/A ácido/ácido; K/A alcalino/ácido; + 90% ó más positivo en 1 ó 2 días; - 90% o más no reaccionan; d diferente reacción bioquímica (+, ó -).

L D C - Lisina Descarboxilasa

A D L - Arginina Dehidrolasa

O D C - Ornitina Descarboxilasa

V P - Voges Proskauer

Nota: Todos los valores reportados en esta tabla se dan en porciento.

Referencia: Edwards, P. R. and W. H. Ewing, 1972. Identification of Enterobacteriaceae, 3th. Ed. Burgess Publishing Co. Atlanta, Georgia.

CONTINUACION DE TABLA 7

TRIBU	S a l m o n e l l a e			K l e b s i e l l a e			
GENERO	Citrobacter			Klebsiella			
ESPECIE	C. freundii	C. diversus	C. amalonaticus	K. pneumoniae	K. oxytoca	K. ozaenae	E. rhinoschleromitis
Kliger	K/A o A/A	A/A	A/A	A/A o K/A	A/A o K/A	K/A o A/A	K/A
H ₂ S	+ 81.6	- 0	- 0	- 4	- 4	-	-
Indol	- 7	+ 100	+ 100	- 0	+ 100	- 0	- 0
Movilidad	+ 95	+	+	- 0	- 0	- 0	+ 97.5
Ureasa	d(6*9)69.4	d 77.9 (10*)	+ 85	+ 95.8	+ 95.8	d 14.8	- 0
Citrato	+ 90	+ 99.7	+ 94.7	+ 96.8	+ 96.8	d 28.1	- 0
Malonato	d 21.8	+ 94	- 0	+ 92.5	+ 92.5	- 4	+ 50
I. D. C.	- 0	- 0	+ 97.2	+ 97.2	+ 97.2	d 35.8	- 0
A. D. I.	d 43	d 62	d 62	- 1	- 1	- 6	- 0
O. D. C.	d(0*2)17	+ 99	+ 99	- 0	- 0	- 4	- 0
V. P.	-	-	-	+ 93.7	+ 93.7	- 0	- 0
ONPG	d 74.4	+ 100					

* Porcentajes de positividad después de 48 horas.

CONTINUACION DE TABLA 7

TRIBU	K l e b s i e l l a e						
GENERO	Enterobacter						Hafnia
ESPECIE	E. aerogenes	E. cloacae	E. agglomerans (con gas)	E. agglomerans (sin gas)	E. gergoviae	E. sakazakii	Hafnia alvei
	A/A o K/A	A/A o K/A	A/A o K/A	A/A o K/A	A/A o K/A	A/A o K/A	K/A
Kligler	- 0	- 0	- 0	- 0	- 0	- 0	- 0
H ₂ S	- 0	- 0.5	d 45.5	- 13	- 0	- 16	- 0
Indol	+ 93.7	+ 92.4	+ 90	+ 89	+ 97	+ 94	- 95
Movilidad	- 5	+ 74.6	d 27.3	d 24.8	+ 100	- 0	- 6.6
Ureasa	+ 93.7	+ 99.5	d 65.9	+ 67	+ 97	+ 100	d (58) *
Citrato	d 74	d 80	d 61	d 48	+ 100	- 1.6	d 74
Malonato	+ 97	- 0	- 0	- 0	d 64 (33)*	- 0	+ 99
L D C	- 0	+ 92	- 0	- 0	- - 0	+ 100	- 4.6
A D L	+ 95	+ 93	- 0	- 0	+ 100	+ 97	+ 100
O D C	+ 100	+ 100			d 36		
V.P.							

*Porcentajes de positividad después de 48 hrs.

CONTINUACION DE TABLA 7

TRIBU	P r o t e a e					
GENERO	Proteus					
ESPECIE	P.mirabilis	P.vulgaris	Providencia rettgeri	Providencia stuarti	Providencia alcalifaciens	Morganella
	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A
H ₂ S	+ 94	+ 95	- 0	- 0	- 0	- 0
Indol	- 2	+ 98	+ 100	+ 99	+ 99	+ 99.5
Movilidad	+ 95	+ 94	+ 94	d 55.5	+ 96.2	+ 84
Ureasa	+ 98.4	+ 95	+ 99	- 0	- 0	+ 98
Citrato	d 58.7 (37.1)	d 10.5 (14.1)*	+ 96	+ 93	+ 98	- 0
Malonato	- 1.5	- 0	- 1.8	d 1.2	- 0.7	- 4
L D C	- 0	- 0	- 0	- 0	- 0	- 0
A D L	- 0	- 0	- 0	- 0	- 0	- 0
O D C	+ 99	- 0	- 0	- 0	- 1	+ 97
V.P.		- 0	- 0	- 0	- 0	- 0
Fenil alanina	+	+	+ 97	+ 93	+ 97	+ 95

*Porcentajes de positividad después de 48 hrs.

7. IDENTIFICACION DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

A las colonias desarrolladas en agar S-110 se les practicó: tinción de Gram y prueba de la catalasa. Las colonias que resultaron ser cocos Gram positivos, catalasa positiva, se inocularon en 0.5 ml. de bacto-coagulasa plasma. Cuando esta prueba resultó positiva se reportaron unidades formadoras de colonia de ----- Staphylococcus aureus por gramo de alimento, según la dilución más alta que haya presentado desarrollo de colonias y coagulado el plasma. (1) y (27).

C A P I T U L O I V

R E S U L T A D O S

I N T R O D U C C I O N

Antes de explicar el análisis estadístico a que fueron sometidos los datos experimentales obtenidos, se presentan en las tablas 8, 9, 10, 11, 12, los promedios de cuentas de UFC/g de alimento de los diferentes microorganismos, bajo distintos tratamientos:

- A - crudo
- B - cocido
- C - distribuído

Las tablas 13, 14, 15, señalan el número de muestras -- (del total que fueron procesadas) en que se recuperaron los diferentes géneros y especies de microorganismos de la familia - de Enterobacterias bajo los diferentes tratamientos señalados-

anteriormente.

La tabla 16 nos muestra el tipo de alimentos en que se recuperaron microorganismos del género salmonela y en qué etapa del análisis se encontraron.

TABLA 8

PROMEDIO DE LAS CUENTAS DE UFC/g DE ALIMENTO EN LA RECUPERACION DE MESOFILOS AEROBIOS
BAJO DIFERENTES TRATAMIENTOS

Tratamiento Alimento	A	B	C
Salchicha	225×10^6	75×10^6	11×10^4
C. molida	12×10^8	13×10^8	22×10^7
Jamón y atún	15×10^8	8×10^6	76×10^7
Bistec	42×10^7	29×10^6	3×10^6
C. maciza	11×10^7	10×10^7	10×10^7
Crema	39×10^7	85×10^7	11×10^8
Queso	72×10^7	85×10^7	15×10^7
Pescado	42×10^7	12×10^7	18×10^4
Pollo	17×10^8	83×10^7	84×10^7

TABLA 9

PROMEDIO DE LAS CUENTAS DE UFC/g DE ALIMENTO EN LA RECUPERACION DE COLIFORMES
BAJO DIFERENTES TRATAMIENTOS

Tratamiento Alimento	A	B	C
Salchicha	55×10^3	27×10^3	27×10^3
C. molida	32×10^3	16×10^3	3×10^3
Jamón y atún	28×10^3	6	27×10^3
Bistec	25×10^3	12×10^3	43×10^3
C. maciza	36×10^3	17×10^2	36×10^3
Crema	27×10^3	3	27×10^3
Queso	22×10^3	22×10^3	44×10^3
Pescado	28×10^3	3	0
Pollo	110×10^3	87×10^3	55×10^3

TABLA 10

PROMEDIO DE LAS CUENTAS DE UFC/g DE ALIMENTO EN LA RECUPERACION DE COLIFORMES FECALES
BAJO DIFERENTES TRATAMIENTOS

Tratamiento Alimento	A	B	C
Salchicha	27×10^3	3	3
C. molida	47×10^3	15×10^3	31×10^3
Jamón y atún	27×10^3	62	27×10^3
Bistec	25×10^3	627×10	638×10
C. maciza	73×10^3	31×10	36×10^3
Crema	27×10^3	5	27×10^3
Queso	66×10^3	22×10	14×10^2
Pescado	27×10^3	6	7
Pollo	110×10^3	110×10^3	29×10^3

TABLA 11

PROMEDIO DE LAS CUENTAS DE UFC/g DE ALIMENTO EN LA RECUPERACION DE LEVADURAS
BAJO DIFERENTES TRATAMIENTOS

Tratamiento Alimento	A	B	C
Salchicha	67×10^2	0	0
C. molida	57×10^6	3×10^3	70×10^2
Jamón y atún	90	22×10	0
Bistec	17×10^6	16×10^6	35×10^6
C. maciza	38×10^4	31×10^4	13×10^2
Crema	30×10^2	0	58×10
Pescado	15×10^5	85×10	11×10^2

TABLA 12

PROMEDIO DE LAS CUENTAS DE UFC/g DE ALIMENTO EN LA RECUPERACION DE HONGOS
BAJO DIFERENTES TRATAMIENTOS

Tratamiento Alimento	A	B	C
Salchicha	34×10^2	27	0
C. molida	45×10^2	29×10^2	62×10^3
Jamón y atún	80	95	31×10
Bistec	12×10^3	27×10	62×10^5
C. maciza	50×10^4	11×10^4	11×10^1
Crema	95	0	0
Queso	0	0	0
Pescado	0	0	0
Pollo	63	40	600

TABLA 13

GENEROS Y ESPECIES DE MICROORGANISMOS ENCONTRADOS EN EL ANALISIS
BACTERIOLOGICO DE ALIMENTOS CRUDOS

Alimentos:	Total de muestras procesadas	<i>Escherichia coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. ozaenae</i>	<i>K. rhinoschleromatis</i>	<i>C. freundii</i>	<i>C. diversus</i>	<i>E. agglomerans</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. Cloacae</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. rettgeri</i>	<i>M. morgani</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Salmonella sp.</i>
Salchicha	4	3	0	0	0	0	2	0	1	0	2	1	3	1	0	0	0	0
Carne molida	6	4	4	0	0	0	3	1	3	0	1	3	3	2	1	0	1	2
Jamón	2	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	2	0	0	0	2	0
Bistec	10	4	8	0	2	0	6	1	1	3	6	3	6	0	0	3	0	1
C. maciza	3	2	2	0	0	1	0	2	1	0	1	3	2	2	0	1	0	0
Crema	4	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Queso	5	4	5	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1
Pescado	4	2	0	0	0	0	1	1	2	1	3	3	3	1	1	0	0	0
Atún	2	2	2	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Pollo	4	3	1	0	2	0	0	1	0	1	2	1	3	1	1	1	1	2

Nota: Los números de la 2a. columna en adelante indican el número de muestras del total que fueron analizadas en donde se encontraron los microorganismos señalados.

TABLA 14

GENEROS Y ESPECIES DE MICROORGANISMOS ENCONTRADOS EN EL ANALISIS
BACTERIOLOGICO DE ALIMENTOS COCIDOS

Alimentos	Total de muestra procesadas	Escherichia coli	Klebsiella pneumoniae	K. oxytoca	K. ozaenae	K. rhinoschleromatis	C. freundii	C. diversus	E. agglomerans	E. aerogenes	E. cloacae	P. vulgaris	P. mirabilis	P. rettgeri	M. morganii	S. marcescens	Pseudomonas sp	Salmonella sp
Salchicha	4	0	2	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
C. molida	6	5	3	0	1	0	2	0	3	2	3	2	3	0	0	2	1	2
Jamón	2	2	2	1	1	0	0	2	1	1	1	0	2	0	0	0	1	0
Bistec	10	2	2	1	1	0	4	0	2	3	4	2	9	0	0	0	1	0
C. maciza	3	0	0	2	0	0	0	1	0	0	1	2	1	0	0	0	0	1
Crema	4	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Queso	5	2	2	1	0	0	1	1	2	2	1	0	2	1	1	0	0	0
Pescado	4	1	0	0	0	0	2	1	2	2	2	2	2	0	0	1	1	0
Atún	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pollo	4	2	3	1	1	0	2	0	2	1	2	0	3	1	2	0	1	0

Nota: Los números de la 2a. columna en adelante indican el número de muestras del total que fueron analizadas en donde se encontraron los microorganismos señalados.

TABLA 15

GENEROS Y ESPECIES DE MICROORGANISMOS ENCONTRADOS EN EL ANALISIS
BACTERIOLOGICO DE ALIMENTOS DISTRIBUIDOS

Alimentos	Total de muestras procesadas	Escherichia coli	K. pneumoniae	K. oxytoca	K. ozaenae	K. rhinoschleromatis	C. freundii	C. diversus	E. agglomerans	E. aerogenes	E. cloacae	P. vulgaris	P. mirabilis	P. rettgeri	M. morganii	S. marcescens	Pseudomonas sp	Salmonella sp.
Salchicha	4	0	1	0	0	0	1	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0
C. molida	6	1	1	0	0	0	1	0	1	2	0	0	1	0	0	1	0	1
Jamón	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bistec	10	3	3	0	0	0	1	2	0	2	3	0	4	0	0	2	0	0
C. maciza	3	2	2	0	0	0	1	2	2	0	2	0	0	0	0	1	0	0
Crema	4	1	2	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
Queso	5	4	4	0	0	0	0	1	2	3	3	0	1	0	0	1	0	1
Pescado	4	1	2	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
Atún	2	1	1	0	0	0	0	1	2	2	1	1	0	0	0	0	1	0
Pollo	4	2	1	1	0	0	2	0	0	0	2	1	1	1	1	0	0	1

Nota: Los números de la 2a. columna en adelante indican el número de muestras del total que fueron analizadas en donde se encontraron los microorganismos señalados.

TABLA 16

ALIMENTOS EN LOS QUE SE RECUPERARON MICROORGANISMOS DEL GENERO SALMONELLA

Producto	Crudo	Cocido	Distribuido	Identificación
Bistec	X			S. enteritidis grupo B
Bistec	X			S. enteritidis grupo B
Carne maciza		X		S. enteritidis grupo E ₁
Carne molida	X			S. enteritidis grupo B
Carne molida		X	X	S. enteritidis grupo C ₂
Carne molida	X			S. enteritidis grupo B S. enteritidis grupo E ₁
Carne molida		X		S. enteritidis grupo I
Pollo	X		X	S. enteritidis grupo B
Queso Chihuahua	X		X	S. enteritidis grupo B

ANALISIS ESTADISTICO

Para realizar el análisis estadístico de los promedios de cuentas de UFC/g de alimento de los diferentes microorganismos, encontrados en los alimentos bajo los tratamientos señalados anteriormente, estos números se transformaron a logaritmos base diez con el fin de trabajar con datos de más fácil manipulación y además para normalizarlos, esto es, para transformarlos en una distribución normal y poder así utilizar un modelo estadístico conocido.

El modelo estadístico usado para el análisis de las cuentas logarítmicas de los microorganismos fue el de análisis de varianza para diseño en bloques al azar, donde los tratamientos fueron las tres etapas en que se realizó la cuenta en el alimento, los bloques fueron las distintas muestras del alimento y la variable de respuesta que nos permitió evaluar si existe diferencia estadística significativa en los tres tratamientos fue la cuenta logarítmica de los microorganismos.

Para ejemplificar el tipo de análisis usado se presentan a continuación las cuentas logarítmicas de mesófilos aerobios para salchicha.

Las hipótesis a probar serán:

Hipótesis nula H_0 : No existe diferencia significativa entre los tratamientos.

Hipótesis alterna H_1 : Existe diferencia significativa-
entre los tratamientos.

	A	B	C	ΣX
I	5.7	0	0	5.7
II	8.5	8.5	5.6	22.6
III	8.5	6.0	4.4	18.9
IV	8.5	5.2	2.1	15.8
ΣX_i	31.2	19.7	12.1	63 = G

$$F.C. = \frac{G^2}{rt} \quad \text{Suma de cuadrados totales:}$$

$$SC_t = \sum X_{ij}^2 - F.C.; \text{ con } rt-1 \text{ grados de libertad}$$

Suma de cuadrados A (tratamientos):

$$SC_A = \frac{\sum X_i^2}{r} - F.C. \text{ con } t-1 = \text{grados de libertad}$$

Suma de cuadrados B (alimentos):

$$SC_B = \frac{\sum X_i^2}{t} - F.C. \text{ con } r-1 = \text{grados de libertad}$$

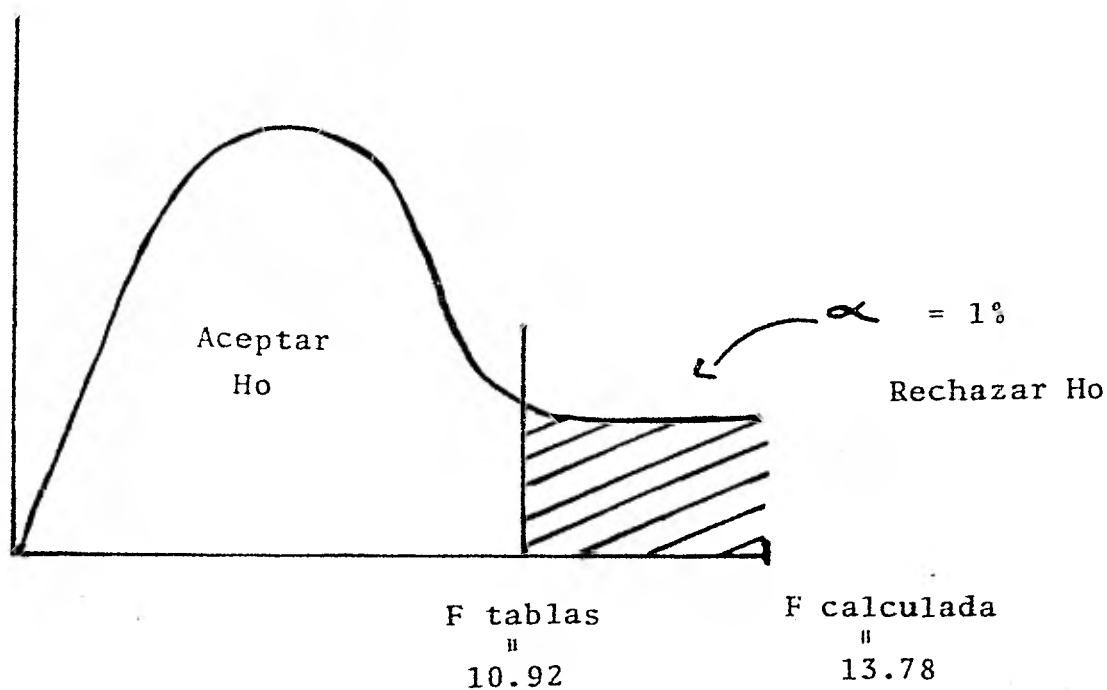
Suma de cuadrados del error:

$$SC_E = SC_t - SC_A - SC_B$$

Cuadrado medio:

$$CM = \frac{SC}{g.l.} \quad F = \frac{SC}{SC_E}$$

		g.l.	C.M.	F
SC_t	- 108.91	11		
SC_A	- 46.235	2	23.117	13.78
SC_B	- 52.616	3		
SC_E	- 10.059	6		



Como F calculada = 13.78 es mayor que la F de tablas = 10.92, rechazamos H_0 y aceptamos H_1 , es decir, encontramos diferencias altamente significativas en las muestras de mesófilos aerobios en los tres tratamientos.

A continuación se resumen en tablas los promedios de las cuentas logarítmicas de microorganismos para cada alimento y su significancia estadística encontrada:

Ver tablas 17, 18, 19, 20, 21.

TABLA 17

PROMEDIO DE CUENTAS LOGARITMICAS EN LA RECUPERACION DE MESOFILOS AEROBIOS

BAJO DIFERENTES TRATAMIENTOS

Tratamiento Alimento	A	B	C	Significancia estadística
Salchicha	7.8	4.92	3.0	altamente significativo
Jamón y atún	7.57	3.2	4.47	no significativo
C. molida	7.5	6.85	3.45	significativo
Bistec	6.82	5.52	4.85	no significativo
C. maciza	7.3	4.16	4.16	no significativo
Crema	8.6	7.3	7.35	no significativo
Queso	6.46	5.92	6.02	no significativo
Pescado	6.125	5.825	2.5	significativo
Pollo	9.26	8.33	8.33	no significativo

A = Crudo

B = Cocido

C = Distribuído

TABLA 18

PROMEDIO DE CUENTAS LOGARITMICAS EN LA RECUPERACION DE COLIFORMES
BAJO DIFERENTES TRATAMIENTOS

Tratamiento Alimento	A	B	C	Significancia estadística
Salchicha	2.725	1.25	1.25	no significativo
C. molida	2.48	0.871	0.77	significativo
Jamón y atún	2.4	0.35	2.25	no significativo
Bistec	2.66	1.85	1.54	no significativo
C. maciza	7.65	3.7	5.5	no significativo
Crema	1.6	0.25	1.5	no significativo
Queso	1.44	1.28	2.68	no significativo
Pescado	2.92	0.225	0	altamente significativo
Pollo	5.0	4.82	3.25	no significativo

TABLA 19

PROMEDIO DE CUENTAS LOGARITMICAS EN LA RECUPERACION DE COLIFORMES FECALES
BAJO DIFERENTES TRATAMIENTOS

Tratamiento Alimento	A	B	C	Significancia estadística
Salchicha	1.4	0.25	0.25	no significativo
C. molida	3.42	0.914	2.7	no significativo
Jamón y atún	2.17	0.85	1.85	altamente significativo
Bistec	2.88	1.48	1.32	significativo
C. maciza	4.33	1.63	2.66	significativo
Crema	1.6	0.325	1.4	no significativo
Queso	3.0	0.88	2.1	no significativo
Pescado	1.6	0.35	0.575	no significativo
Pollo	5.0	5.0	2.925	no significativo

TABLA 20

PROMEDIO DE CUENTAS LOGARITMICAS EN LA RECUPERACION DE LEVADURAS
BAJO DIFERENTES TRATAMIENTOS

Tratamiento Alimento	A	B	C	Significancia estadística
Salchicha	2.925	0	0	significativo
C. molida	5.37	1.142	2.25	altamente significativo
Jamón y atún	0.65	0.725	0	no significativo
Bistec	3.22	2.58	2.92	no significativo
C. maciza	3.3	2.0	1.2	no significativo
Crema	1.825	0	0.85	no significativo
Pescado	1.325	1.275	0.65	no significativo
Pollo	4.65	1.5	1.675	no significativo

TABLA 21

PROMEDIO DE CUENTAS LOGARITMICAS EN LA RECUPERACION DE HONGOS
BAJO DIFERENTES TRATAMIENTOS

Tratamiento Alimento	A	B	C	Significancia estadística
Salchicha	1.85	0.5	0	no significativo
C. molida	1.22	0.54	0.8	no significativo
Jamón y atún	0.625	0.65	0.7	no significativo
Bistec	0.811	0.37	1.91	no significativo
C. maciza	2.06	1.83	0.83	no significativo
Crema	0.65	0	0	no significativo
Pollo	0.5	0.46	0.7	no significativo

NORMAS MICROBIOLÓGICAS

Mesófilos aerobios

- 1) Agua potable en México: 50 UFC/ml. *
- 2) Leche
 - Leche cruda para pasteurizar: No más de 100 000 UFC/ml.
 - Leche pasteurizada y sus productos,
(excepto productos fermentados): No más de 20 000 UFC/ml.
 - Leche en polvo: No más de 30 000 UFC/g.
- 3) Crema entera de leche de vaca: 100 000 UFC/g. *
- 4) Postres helados: De 50 000 a 100 000 UFC/g. o ml.
- 5) Alimentos rellenos de crema: No más de 100 000 UFC/g.
- 6) Carnes crudas
 - Hamburguesas: 250 000 y 10 000 000 de UFC/g.
 - Otras carnes: Menos de 2 000 000 a 5 000 000 UFC/g
 - Aves: Menos de 100 000 UFC/g.
- 7) Embutidos
 - Salchichas: 500 000 UFC/g *
- 8) Pescados y mariscos
 - Pescado: No más de 100 000 UFC/g.
 - Carne de cangrejo: No más de 100 000 UFC/g.

Coliformes

- 1) Agua potable en México: Menos de 2.2./100 ml.
- 2) Leche
 - Leche pasteurizada y sus productos: No más de 10/ml.
 - Leche en polvo: No más de 90/g.

- Leche certificada cruda: No más de 10/ml.
- Leche certificada pasteurizada: 1/ml.
- 3) Crema entera de leche de vaca: 100 UFC/g.
- 4) Productos pasteurizados fermentados: No más de 10 UFC/ml.
- 5) Alimentos congelados precocinados o parcialmente cocinados:
No más de 10 UFC/g.
- 6) Artículos rellenos de crema: No más de 100 UFC/g.

Nota: Las normas marcadas con asterisco, están aprobadas por la Secretaría de Salubridad y Asistencia.

El resto de las normas microbiológicas se obtuvieron de:

(10)

ANALISIS DE RESULTADOS

En algunos alimentos los resultados del análisis estadístico son significativos y altamente significativos, p.e.:

Carne molida	Significativo	}	Coliformes
Pescado	Altamente significativo		
Pescado	Significativo	}	Mesófilos Aerobios
Salchicha	altamente significativo		
Bistec	Significativo	}	Coliformes Fecales
Jamón y atún	Altamente significativo		
Salchicha	Significativo	}	Levaduras
Carne molida	Altamente significativo		

Esto hace concluir que la cocción y una buena manipulación posterior es efectiva para reducir la cantidad de estos microorganismos.

En el resto de los alimentos se observa que disminuye el número de microorganismos en el proceso B (cocinado); sin embargo, esta diferencia no se detecta como estadísticamente

significativa para el tamaño de muestra que fue posible tratar en este estudio.

En el proceso C (distribuído) se observa un aumento en el número de microorganismos que aún y cuando no se detecta como estadísticamente significativo, podría interpretarse como que el proceso posterior a la cocción, o sea la manipulación y transporte a las diferentes áreas del hospital es higiénicamente deficiente.

En las tablas 8, 9, 10, 11, 12, se observa que las cargas bacterianas sobrepasan los estándares normales.

Las tablas 13, 14, 15, señalan la recuperación de microorganismos que tienen importancia como agentes causales de procesos patológicos: Proteus, Escherichia coli, Klebsiella, --- Salmonella, aún en alimentos que han sufrido el proceso de cocción.

C A P I T U L O V

C O N C L U S I O N E S

1. Los alimentos llegan al Centro Hospitalario en su calidad de materias primas con cargas bacterianas elevadas (que sobrepasan las normas microbiológicas establecidas por la S.S. A.).

2. Los procesos de cocción reducen la carga bacteriana en grado significativo.

3. Después del proceso de cocción se encuentran agentes causales de procesos patológicos, disminuidos en número por el tratamiento térmico, pero debe tomarse en cuenta que serán consumidos por huéspedes altamente comprometidos.

4. Aquellos alimentos que no tienen un paso intermedio de destrucción de microorganismos entre su llegada al departamento de cocina y su distribución a los enfermos representan aún un riesgo mayor y exigen excelente calidad y excelentes --

condiciones de manejo a fin de no constituirse en una fuente - importante de contaminación para el enfermo y el personal que labora en el Centro Hospitalario.

5. Los procesos de manipulación posterior a la cocción de los alimentos son higiénicamente deficientes. El hallazgo de microorganismos como Salmonella en esta etapa puede ser indicio de la presencia de portadores entre los manejadores de alimentos.

6. En el control de las infecciones intrahospitalarias - deberán desarrollarse programas que tengan por objeto detectar portadores de microorganismos involucrados en procesos entéricos y retirarlos en forma provisional o definitiva del área de manejo de alimentos.

7. Debido a que el problema más grave radica en la manipulación de los alimentos, se hace necesario elaborar un programa para dar educación a los operarios acerca del papel tan importante que desempeñan, de la trascendencia de su trabajo y de las implicaciones que pueden tener los malos hábitos de higiene personal.

8. Debido a que realizar un examen de este tipo en forma rutinaria es sumamente costoso y laborioso se sugiere se le aplique en forma programada a la materia prima y a los alimentos que se distribuyen a fin de valorar la mejoría lograda al cabo del tiempo.

9. No fue posible realizar análisis estadístico a las -
muestras en que se encontraron microorganismos del género ----
Salmonella, ya que el tamaño de la muestra es estadísticamente
no significativo.

10. No se reportan resultados de alimentos en los que se
encontró Staphylococcus aureus ya que el número de muestras de
alimentos contaminados con dichos gérmenes fue estadísticamen-
te no significativo.

11. No se reportan resultados de alimentos líquidos ya -
que el número de muestras trabajadas fue pequeño y el signifi-
cado estadístico sería erróneo.

B I B L I O G R A F I A

1. BALTIMORE BIOLOGICAL LABORATORIES. 1974. "Manual de procedimientos de laboratorio y de productos". 5a. edición. Ed. Paul A. Rohde, B.A., Cockeysville, Maryland. U.S.A.
2. CARLTON, G.; SO, M. AND STANLEY, F. 1974. "The enterotoxin plasmids of Escherichia coli". J. Inf. Dis. 130: 40-48.
3. CHOPIN, A. 1978. "Bacteriology of dried dairy productos-pathogenic bacteria". Technique Laitie re. 912: 53-55.
4. DAVIS, B.; DULBECCO, R.; EISEN, H.; GINSBERG, H. 1973. "Microbiology". 2th Edition. Medical Department Harper and Row Publishers. - New York, U.S.A.
5. DONTA, S.; MOON, H.; WHEPP, S. 1975. "Detection of heat labile Escherichie coli with the use of adrenal cells in tissue culture". --- Science. 183: 334-336.
6. DUPONT, H. AND HORNICK, R. 1973. "Clinical approach to infections diarrheas". Medicine 52: --- 265-270.

7. EDWARDS, P.R.; EWING, W.H. 1972. "Identificación of Enterobacteriaceae". 3th Edition. Burgess Publishing Company. Atlanta, Georgia.
8. FINKELSTEIN, R.A. 1976. "Progress in the study of cholera - and related enterotoxins". Mechanics - in bacterial toxicology". Ed. Allan W. Bernltermes Wley Medical.
9. FORMAL, S.; GEMSKI, P.; GIANELLA, R. AND AUSTIN, S. 1972. - "Mechanics of Shigella pathogenesis". Am.J. of Clin. Nutr. 25: 1427-1432.
10. FRAZIER, W.C. 1972. "Microbiología de los Alimentos". 2a.- Edición. Ed. Acribia. Zaragoza, España.
11. FUJINO, T.; MIWATANI, T.; TAKEDA, Y.; TOMASU, S. 1969. "A - termolabile direct hemolysin of - - - Vibrio parahaemolyticus". Beken, J. -- 12: 145-148.
12. GEMSKI, P. AND FORMAL, S. 1975. "Shigellosis: an invasive - infection of the gastrointestinal - -- tract". Microbiology. American Socie - ty of Microbiology.
13. GIANELLA, R. 1975. "Pathogenesis of Salmonella enteritidis and diarrhea". Microbiology. American Society of Microbiology.
14. GOMEZ, R. F. 1979.. "Apuntes para el curso de Microbiología de los Alimentos". Instituto Tecnológico de Massachusetts. Boston, Mass. U.S.A.
15. HELMUNTH, S. 1972. "Pathogenesis of Intestinal Infections" Arch. Path. 87: 557-562.
16. JAWETZ, E.; MELNICK, J.; ADELBERG, E. 1975. "Manuel de Microbiología Médica". 11a. Edición. Ed. El Manual Moderno. México. D.F.

17. KROUPAL, N.; AND DEIBEL, N. 1975. "Assay Characterization -- and localization of an enterotoxin produced by Salmonella". Infection and Immunity, 11; 14-22.
18. KUMATE, J.; GUTIERREZ, G. 1980. "Manual de Infectología". - 7a. Edición. Ed. Médicas del Hospital Infantil de México. México, D.F.
19. LAI, C.; MENDEZ, E. AND CHANG, D. 1976. "Chemistry of cholera toxin: the subunit structure". --- J. Inf. Dis. 133: 23-30.
20. LENNETTE, E.H.; BALOWS, A.; HAUSLER W.H. AND TRUANT, J.P. - EDITORS. 1980. "Manual of Clinical --- Microbiology". 3th. Edition. American Society of Microbiology. Washington, - D.C., U.S.A.
21. MAC FADDIN, J.F. 1980. "Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia - clínica". 2a. Edición. Ed. Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
22. MILLICENT, C. AND HERBERT, L. 1976. "Enteropathogenic - - - Escherichia coli: lack of correlation of serotype with pathogenicity". J. -- Inf. Dis. 133: 153-156.
23. POLOTSKII, Y. AND SNIGIREVSKAYA, S. 1974. "Electron Microscopic study of interaction between enterotoxigenic forms of E. coli and the intestinal epithelium". Byulleten Eksperimentalnoi Biologii i Meditsiny. - 77-6: 110-113.
24. SAKAI, S.; ITOH, T.; MARUYAMA, T.; SAITO, K.; ZEN-YOJI, H. - 1978. "Epidemiological and bacteriological surveys on the salmonella food - poisoning in Tokyo during the last decade 1976". Annual Report of Tokyo Metropolitan. Research Laboratory of Public Health, 27(I): 16-23.

25. SECRETARIA DE PROGRAMACION Y PRESUPUESTO. 1980. Coordinación del Sistema Nacional de Información. "Incidencia de la Mortalidad en los Estados Unidos Mexicanos". México D.F.
26. SECRETARIA DE PROGRAMACION Y PRESUPUESTO. 1980. Coordinación del Sistema Nacional de Información. "Manual de Estadísticas Básicas" México, D.F.
27. SECRETARIA DE SALUBRIDAD Y ASISTENCIA. 1979. Subsecretaría de Salubridad. Dirección General de Laboratorios de Salud Pública. "Técnicas Generales para Análisis Microbiológico de Alimentos", México, D.F.
28. STALEY, T.E. 1969. "Attachment and penetration of *E. coli* intestinal of the ileum in newborn pigs". Amer.J. Path. 56: 371-381.
29. TATCHER, F.S.; CLARCK, D.S. 1972. "Análisis Microbiológico de los Alimentos". Ed. Acribia. Zaragoza, España.
30. VERNON, E. 1978. "Food poisoning and salmonella infections in England and Wales (1973-1975)" Public Health 91(5): 225-235.
31. ZEN-YOJI, H.; OHTA, K.; TAJIMA, M. 1978. "Bacteriological and epidemiological surveys on the healthy carriers of shigella and outbreaks of shigellosis in Tokyo, 1966-1975". Annual Report of Tokyo Metropolitan Research Laboratories of Public Health 27(1): 29-35.