85-B REG. 78587407

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS

Dinámica de "Salmonella" natural y artificialmente inoculada en una ensalada fría de carne -Salpicón-

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A :

LAURA ELENA QUIÑONEZ ZUBIETA

GUADALAJARA, JAL. 1989

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente .....
Número 076/89

SRITA. LAURA ELENA QUIÑONEZ ZUBIETA
P R E S E N T E . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "DINAMICA DE Salmonella NATURAL Y ARTIFICIALMENTE INOCULADA EN SALPICON" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido aceptada como Directora de dicha Tesis la Q.F.B. Rosa María Puebla Pérez.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Enero 19 de 1989.

EL DIRECTOR

DR. CARLOS ASTENGO OSUNA

FACULTAD DE CIENCIAS

EL SECRETARIO

ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS CARDENAS.

c.c.p. La Q.F.B. Rosa María Puebla Pérez, Directora de Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente de la alumna.

'mjsd

C. ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS CARDENAS.
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS.
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.
P R E S E N T E .

29 de mayo de 1989.

Por medio de la presente me permito solicitar a Usted autorizar ampliación del título de mi anteproyecto de tesis " DINAMICA DE Salmonella NATURAL Y ARTIFICIALMENTE INOCULADA EN SALPICON", por el título " DINAMICA DE Salmonella NATURAL Y ARTIFICIALMENTE INOCULADA EN UNA ENSALDA FRIA DE CARNE (SALPICON), " para mayor claridad del trabajo.

Una vez que ha sido revisado y aprobada por la Q.F.B. Rosa María Puebla Pérez, la cual es mi directora de tesis.

Agradesco de antemano sus finas atenciones prestadas a esta solicitud, sin más por el momento, se despide de Usted su atenta y segura servidora.

Laura E. Quiñónez Zubieta
Laura Elena Quiñónez Zubieta.
Pasante de Lic. en Biología.

Q.F.B. Rosa María Puebla Pérez.
Director de Tesis.

C. ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS CARDENAS.
Director de la Facultad de Ciencias.
Universidad de Guadalajara.
P R E S E N T E .

Por la presente, nos permitimos informarle de nuestra entera satisfacción por el desarrollo y la terminación del trabajo de tesis titulado: " DINAMICA DE Salmonella NATURAL Y ARTIFICIALMENTE INOCULADA EN UNA ENSALADA FRIA DE CARNE (SALPICON)" Realizada por la pasante de la carrera de Licenciado en Biología: LAURA ELENA QUIÑONEZ ZUBIETA.

Agradeciendo de antemano sus finas atenciones, nos despedimos de Usted.

Q.F.B. [illegible] PUEBLA P.
Director de Tesis.

Q.B.P. EDUARDO FERNANDEZ ESCARTIN
Co-Director de Tesis.

Guadalajara, Jal. 8 de mayo de 1989.

"DINAMICA DE SALMONELLA NATURAL Y ARTIFICIALMENTE INOCULADA EN UNA ENSALADA FRIA DE CARNE (SALPICON)"

LAURA ELENA QUIÑONEZ ZUBIETA.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Sanitaria de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guadalajara.

I N D I C E

	Pág.
INTRODUCCION.	1
HIPOTESIS	6
OBJETIVOS	7
GENERALIDADES	8
MATERIAL.	12
METODOLOGIA	14
RESULTADOS Y DISCUSION.	32
CONCLUSIONES.	51
RESUMEN.	53
BIBLIOGRAFIA.	55

INTRODUCCION

Las enfermedades gastrointestinales asociadas al consumo de alimentos de baja calidad sanitaria continúan siendo un problema prioritario en nuestro país (11).

Este problema implica sufrimientos y elevados costos de atención médica, y de manera colateral se asocia también con importantes pérdidas económicas por conepto de descomposición de alimentos, ya que muchas de las causas que propician la peligrosidad de un alimento favorecen también su deterioro (11).

En la actualidad se observa un aumento en el consumo de alimentos cocinados comercialmente preparados para su consumo inmediato (7).

Este tipo de alimentos presenta un riesgo singular por las condiciones particulares en que se preparan, conservan y sirven (3, 4, 6, 9, 12).

Son manipulados intensamente, ya que el trabajador entra en estrecho contacto con el alimento en el momento de su elaboración (3).

En su formulación, en algunos, son totalmente a base

de ingredientes crudos, otros son una mezcla de ingredientes crudos e ingredientes cocidos y donde pueden recibir o nó tratamiento térmico final o de cualquier otra naturaleza que destruya o inhiba a la flora residual, lo que puede darles un carácter franco de perecederos con probabilidades de contener microorganismos patógenos en el momento de ser servidos (3, 6, 12, 18).

Aunado a esto hay que considerar el hecho de que son almacenados a temperaturas ambiente, lo que puede ofrecer facilidades para el desarrollo de los microorganismos que puedan estar presentes (11).

Puede advertirse notable diferencia en las condiciones aparentes de higiene con que se preparan los productos según se trate de hogares, restaurantes y similares, supermercados y aún en la vía pública.

En otros países como Estados Unidos, los alimentos cocinados han empezado a adquirir especial atención, por la magnitud del riesgo que presentan y son objeto de evaluación de laboratorio tendientes a determinar las condiciones de preparación, conservación y servicio de este tipo de alimentos a fin de garantizar su calidad sanitaria (5, 13, 14, 15, 17).

Estos estudios encuentran una amplia justificación al considerar el hecho de que según diversas publicaciones (1, 11, 16), un 20% de los brotes asociados al consumo de alimentos, involucran alimentos preparados en cocinas, mientras que los asociados a productos directamente adquiridos de la industria solo en 4%.

Estudios llevados a cabo en países como Holanda y Canadá (1, 16), para determinar el tipo de contaminación que pueden sufrir estos alimentos, han revelado que la principal contaminación es de tipo microbiano en los brotes asociados al consumo de esos productos. Los agentes etiológicos más implicados han sido S. aureus, Salmonella spp, C. botulinum y C. perfringens.

Prácticamente en todos los países con mayor o menor frecuencia, se presentan brotes de salmonelosis (8) cuya detección y estudio epidemiológico se lleva con una amplitud que depende del nivel de organización y recursos disponibles en las Instituciones Oficiales de Salud.

En México, dentro de los pocos datos epidemiológicos reportados, se encuentra que, en 1973 se presentó un brote que afectó a 226 personas (entre atletas nacionales y extranjeros) en un centro deportivo con internado (2). El

serotipo involucrado fue S. infantis. El alimento responsable fue puré de papas. Las papas utilizadas para prepararlo fueron contaminadas ya cocidas por un empleado que había manipulado pollos crudos. El puré se dejó varias horas a temperatura ambiente antes de ser servido, por lo que el microorganismo tuvo oportunidad de multiplicarse hasta alcanzar cifras elevadas.

La necesidad de controlar las zoonosis y las enfermedades transmitidas por los alimentos ha llevado a considerar la aplicación del sistema de análisis de riesgos y puntos de control crítico (HACCP) (19), para la protección de alimentos.

El control de la Salmonella en los alimentos podría - involucrar: 1) Selección de materiales crudos no contaminados, 2) Destrucción de Salmonella, 3) Prevención de la contaminación, y 4) Prevención de su multiplicación (19). La aplicación de HACCP provee el uso más efectivo de fuentes de control para enfatizar el monitoreo de los CCP más bien que concentración o análisis de producto determinado.

El sistema de HACCP consiste de: a) un análisis de - los riesgos y aseguramiento de su severidad, b) identificación de CCP, y c) monitoreo de estos puntos y la toma de - medidas correctivas necesarias (19). El análisis de ries--

gos considera los riesgos asociados con el crecimiento, procesamiento, distribución, empaquetamiento, preparación y uso de materiales crudos dados en un alimento. Puede, sin embargo, concentrarse sobre ingredientes crudos que entran a una planta y sobre las operaciones que afectan la contaminación, sobrevivencia o multiplicación de patógenos u organismos deterioradores en un establecimiento.

En algunos productos el control de HACCP es tan efectivo que el monitoreo microbiológico puede ser educido a un mínimo.

El conocimiento de la distribución de las bacterias enteropatógenas en el medio ambiente y de su incidencia y potencial de desarrollo en los alimentos es fundamental para el establecimiento de estrategias que conduzcan al control epidemiológico de los padecimientos a que dan lugar (10, 11). A la vez, permite planear con mejores perspectivas, los programas de vigilancia y control sanitarios de los alimentos.

HIPOTESIS

La *Salmonella* contaminante en la ensalada fría de carne cocida (salpicón), puede sobrevivir al efecto del vinagre incorporado al producto, cuando éste se almacena en condiciones de abuso de temperatura.

OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como objetivos:

1) Evaluar cuantitativamente el riesgo de contaminación cruzada por Salmonella que puede generarse al preparar manualmente una ensalada fría de carne cocida con las manos que previamente manejaron carne cruda que contiene el patógeno.

2) Determinar cuantitativamente el potencial de sobrevivencia y desarrollo de la Salmonella en la ensalada preparada a diferentes concentraciones de vinagre y conservada a temperatura ambiente.

3) De acuerdo con los resultados anteriores establecer el riesgo a la salud del producto cuando se propicia la contaminación por Salmonella y se favorece su actividad almacenándola en condiciones de abuso de temperatura.

GENERALIDADES

Existe una información muy variada sobre el género - Salmonella. Este es quizá el patógeno asociado a los alimentos más estudiado.

Es justificable su estudio por una serie de factores y características tales como: su amplia distribución en la naturaleza, ecología, ubicuidad, significado en los alimentos, patogenicidad, además de su capacidad de sobrevivencia, desarrollo y/o muerte en un sustrato determinado.

La Salmonella tiene una amplia distribución en la naturaleza. Se puede enconctrar en el aire, vegetales, utensilios, envases, fomite, en una gran variedad de animales tanto de consumo humano como domésticos, fauna nociva, animales ornamentales, además de silvestres y de diversos alimentos principalmente de origen animal. Se elimina por las heces humanas y de animales infectados. Por lo general -- cuando se realizan malas prácticas higiénicas se favorece la contaminación de los alimentos y del agua en donde pueden conjuntarse una serie de factores que determinan la sobreviviencia, desarrollo o muerte del microorganismo. Su - sola presencia en el agua y alimentos indican un riesgo actual para la Salud (11).

La salmonelosis es un proceso infeccioso cuyo cuadro clínico en el hombre varía desde formas muy agudas que terminan fatalmente, hasta los casos de infección muy leves o del todo asintomáticos.

El período de incubación transcurre dentro de límites que pueden variar desde 3 hasta 72 horas y escepcionalmente más horas, aunque la tendencia del valor modal se encuentra entre las 12 y 20 horas. El tiempo depende de diversos factores como son: El número de gérmenes consumidos (lo que en ocasiones pero no siempre, se relaciona con la cantidad de alimento ingerido), su virulencia y la susceptibilidad del individuo entre los más importantes.

Dentro de un mismo brote es posible observar períodos de incubación extremos. Los síntomas entre los individuos más susceptibles suelen aparecer abruptamente iniciándose con dolor abdominal en la parte alta, náuseas, vómitos y diarreas, hay sensación de malestar septicocémico (entre 2192 casos estudiados, 101 (5%) desarrollaron septicemia) y presentarse una elevación en la temperatura de 38° - 39° o más. En algunos casos la diarrea aparece sanguinolenta e incluso el cuadro clínico puede conducir a una meningitis salmonelósica. La severidad de los síntomas y su duración también son variables dependiendo de los factores mencionados. (11)

Al grupo de bacterias mesofílicas aerobias (BMA) pertenece una gran variedad de microorganismos. La falta de homogeneidad resulta de las escasas limitaciones que la definición del grupo impone para incluirlos: el carácter de aerobio y la capacidad para proliferar entre 20 y 37°, que son los extremos de las temperaturas a las cuales suele realizarse este recuento.

La cuenta de bacterias mesofílicas aerobias se ha propuesto o se utiliza en la microbiología sanitaria con los siguientes objetivos:

a) Como indicador de la posible presencia de gérmenes patógenos.

b) Como indicador del valor comercial de un alimento.

c) Como indicador de las condiciones higiénicas en que ha sido manejado un producto.

d) Como indicador de la idoneidad de un ingrediente crudo que se va a incorporar a un alimento.

e) Para seguir la eficiencia de un proceso germicida o de preservación.

f) Para predecir la vida de anaquel de un alimento.

El estudio de la flora bacteriana mesofílica aerobia es la prueba más utilizada para todos aquellos propósitos, que tienden a explorar el efecto de diferentes agentes físicos y químicos en la bacteriología de un alimento durante su fabricación o conservación, y cuando no existe un problema concreto que implique el uso de gérmenes indicadores específicos.

Por las razones expuestas, el recuento de este grupo de microorganismos es una de las pruebas de laboratorio más comunmente utilizadas en un laboratorio de microbiología de alimentos.

Se aplica a materias primas, productos en proceso, productos terminados, recién fabricados y durante su conservación, bajo diferentes condiciones, así como el equipo, envases, agua y otros materiales que directa o indirectamente pueden afectar la microbiología de un alimento (11).

MATERIAL:

Autoclave

Agua hervida

Asas

Balanza analítica, sensibilidad 0.000Ig.

Balanza granataria, sensibilidad 0.1g.

Baño María a 43° ± 0.5

Bolsas de polietileno

Cajas de petri estériles de 15 x 100 mm.

Contador de colonias Quebec

Cuchillos, abatelenguas y espátulas estériles

Frascos estériles de 200 y 400 ml.

Gradillas metálicas para tubos

Incubadora a 35°

Vasos de licuadora y lincuadora

Pinzas estériles

Pipetas bacteriológicas estériles de 1, 2, 10 ml.

Potenciómetro

Refractarios estériles

Tubos de ensaye de varios tamaños.

MEDIOS DE CULTIVO:

Agua Peptonada

Agar Nutritivo (AN)

Agar Sulfito Bismuto (SB)

Agar Verde Brillante Sulfadiazina (VB)

Agar de Hierro y Lisina (LIA)

Agar de Hierro y Triple Azúcar (TSI)

Caldo Soya Tripticasa (CST)

Caldo Tetrationato Verde Brillante (CTT)

Caldo Selenito Cistina (CS)

Diluyente de Peptona.

Fórmula, preparación y aplicación de medios de cultivo, según referencia (11). Págs. 37 a 93.

REACTIVOS:

Solución de verde brillante para tetrationato.

Solución de yodo yodoforo para tetrationato.

Antisuero polivalentes para antigenos "O" de *Salmonella* grupos A-I.

METODOLOGIA

De acuerdo con los objetivos, el trabajo incluyó los siguientes experimentos:

1. Evaluación del potencial de una cepa de *Salmonella thyphimurium* para desarrollar en carne cocida deshebrada de res almacenada a temperatura ambiente.

2. El mismo estudio antetior aplicado a una ensalada fría de carne deshebrada con diferentes concentraciones de vinagre y almacenada a temperatura ambiente.

3. Estudio cuantitativo de la contaminación de carne cocida de res (CCR) deshebrada por manos que previamente se habían contaminado al manipular carne cruda de cerdo que contenía *Salmonella* en forma natural.

4. Estudio de la dinámica de *Salmonella* naturalmente contaminada en ensalada de carne, según concentración de vinagre, almacenada a temperatura ambiente y preparada en forma similar a la indicada en el estudio No. 2.

Estudio número 1.

300 g. de carne cocida (5' a 110° en autoclave) de - res se deshebraron en condiciones asépticas.

Se preparó el inóculo de S. thyphimurium a partir de un cultivo fresco en caldo soya tripticasa de 24 hrs. del patógeno. Se realizaron diluciones decimales en diluyente de peptona partiendo de una concentración de 10^9 Salm./ml. hasta obtener de tal manera una concentración final aproximada de 200 células viables por gramo de carne deshebrada.

De esta misma suspensión se llevó un recuento total - de colonias en agar nutritivo por vaciado en placa, incubado a 27° por 24 hrs.

Con pipeta estéril se tomaron 6 ml. de la quinta dilución conteniendo al patógeno y se contaminó la CCR, inte-- grándose por homogenización durante tres minutos.

Se almacenó a temperatura ambiente durante ocho horas.

Se efectuaron recuentos del patógeno a las 0, 3, 6 y 8 hrs.de almacenamiento a temperatura ambiente en alícuo-- tas de 20 gr., tomándose seis alícuotas a las 0 hrs. para determinar su distribución en el producto.

Se homogenizaron en 180 ml. de diluyente de peptona - por agitación en vaso de licuadora durante 60 segundos.

Se realizaron diluciones decimales en diluyente de - peptona.

Se sembró en agar sulfito bismuto por vaciado en placa, con incubación a 37° por 24 a 48 hrs.

Se registró la temperatura en cada tiempo, así como - el pH, utilizando potenciómetro, con introducción del electrodo en una porción de 5 g. de alimento suspendido en -- agua destilada recién hervida y enfriada.

Estudio número 2.

Evaluación del potencial de una cepa de S. thyphimurium para desarrollar en la ensalada fría de carne almacenada a temperatura ambiente con diferentes concentraciones de vinagre.

La formulación y preparación de la ensalada fría de - carne (salpicón) se realizó como se indica a continuación.

Con carne cruda de res obtenida de establecimientos - públicos de venta al menudeo de la ciudad y verduras adqui

ridas en mercados de autoservicio, se preparó en el laboratorio el salpicón.

Se siguió una técnica similar a la observada en la mayoría de las cocinas y servicios de comedor.

Se ajustaron las cantidades necesarias que se indican a continuación para cada ingrediente:

Falda de res cocida y deshebrada.	500g.	
Jitomate	450g.	
Cebolla	150g.	
Chícharos (enlatados)	500g.	
Aguacate.	500g.	
Sal	20g.	(cocción de carne)
	+15g.	(al mezclar)
Vinagre	40ml.	
Agua.	1500ml.	
Total	1 Kg.	Salpicón.

Preparación: La falda de res se cuece en 1500 ml. de agua con 20g. de sal en autoclave (5' a 100°).

Se enfría rápidamente.

Se deshebra con las manos higienizadas (en yodóforo por 7

minutos y enjuagadas con agua destilada estéril).

El jitomate, la cebolla y el aguacate se lavan con deter-- gente, se higienizan en yodóforo (excepto la cebolla) por 5 minutos y se enjuagan con agua destilada estéril.

Se pican en condiciones asépticas y junto con los chícaros se mezclan con la carne deshebrada de res incorporando 15g. de sal.

El Salpicón se separa en tres porciones y se adiciona el - vinagre en cantidades de 0, 20 y 40 ml. respectivamente.

Mediante purebas organolépticas se estableció la cantidad de vinagre óptima: 0, 20 y 40 ml. que corresponden a 0, 50 y 100% de concentración.

La dinámica de Salmonella thyphimurium artificialmen- te inoculada en la ensalada fría de carne (salpicón) se - realizó como lo indica el esquema 1.

El Salpicón se distribuyó en 6 porciones de 300g. en condiciones asépticas.

Se adicionó el vinagre a concentraciones de 0, 50 y - 100% por duplicado.

Un duplicado se utilizó para pruebas organolépticas y

medición del pH.

En el otro juego, cada porción se inoculó con una suspensión de S. thyphimurium, de la misma forma que en el estudio anterior.

Se probaron dos inóculos de S. thyphimurium, 200 células viables/g. y 10 000 células viables / g. de ensalada - en experimentos separados.

De esa suspensión se llevó a cabo un recuento total - de colonias en agar nutritivo por vaciado en placa, con incubación a 37° por 24 hr.

Las 6 porciones se almacenaron a temperatura ambiente aproximadamente a 25°, durante ocho horas.

Se realizaron determinaciones de Salmonella, Bacte- - rias Mesofílicas Aerobias (BMA), pH y temperatura a las 0, 3, 6 y 8 hrs.

Se tomaron alícuotas de 20g.

Se homogenizaron en 180 ml. de diluyente de peptona - por ágitación en licuadora por 60 segundos.

Se realizaron diluciones decimales del homogenizado - en diluyente de peptona.

Para el recuento de Salmonella thyphimurium se utilizó agar sulfito bismuto por vaciado en placa con incubación a 37" por 24 a 48 hrs.

Para el recuento de BMA se utilizó agar nutritivo por vaciado en placa con incubación a 37° por 48 hrs.

Estudio número 3.

Estudio cuantitativo de la contaminación de carne cocida de res CCR deshebrada por manos que previamente se habían contaminado al manipular carne cruda de cerdo que contenía Salmonella en forma natural.

Para llevar a cabo este estudio era necesario contar con una muestra de carne cruda de cerdo naturalmente contaminada con una carga aproximada de 10^4 salmonelas viables / g. de carne para a través de su manipulación contaminar manos que posteriormente deshebraron carne cocina de res - (CCR).

Para ello se adquirieron varias porciones de establecimientos de venta al menudeo de la ciudad.

Se analizaron en el laboratorio efectuando el recuento y aislamiento de Salmonella por la técnica del número - más probable (NMP). El procedimiento de muestra en el es-- quema 2.

La técnica del NMP, ha sido comúnmente utilizada para el aislamiento y recuento del grupo de coliformes, donde - el ensayo se extiende a dos o más etapas: En el primero la prueba presuntiva y el segundo la prueba confirmatoria.

Sin embargo, como esta técnica descansa en una base - estadística, matemática inobjetable para expresar cuantitativamente la densidad de microorganismos en material y es incomparablemente más sensible que la técnica de vaciado - en placa, ya que pone de manifiesto unos cuantos gérmenes o uno solo, en un gran volúmen de muestra. Por esta razón encuentra aplicación en el análisis de Salmonella en carne cruda tomando el principio de la técnica del NMP y adaptándola a la técnica tradicional para el aislamiento y recuento de la Salmonella, siguiéndose la Ruta Caldo tetrationato - Sulfito Bismuto (10).

Con la carne cruda de cerdo naturalmente contaminada con Salmonella, se efectuó una contaminación cruzada a la carne cocida de res al momento de deshebrarla; el estudio cuantitativo de la contaminación de CCR se llevó como se -

muestra en el esquema 3 (3A, 3B y 3C).

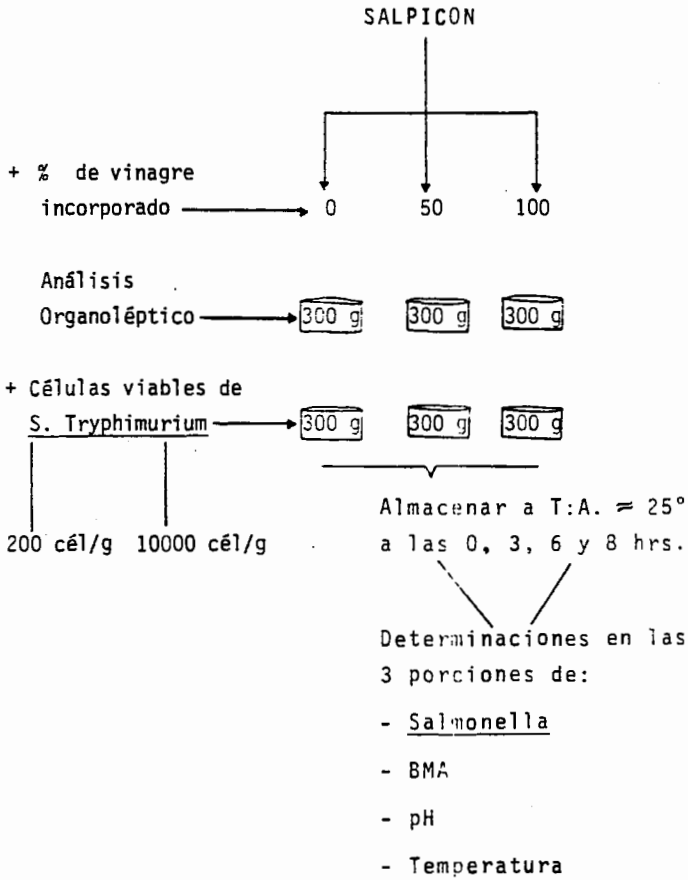
Estudio número 4.

El estudio de la Dinámica de Salmonella naturalmente contaminada en ensalada fría de carne, según concentración de vinagre almacenada a temperatura ambiente y preparada - en forma similar a la indicada en incisos anteriores, se - realizó como se indica en el esquema 4 (4A).

Al término de este estudio, se presentaba la necesi-- dad de evaluar el potencial de desarrollo de la Salmonella en la ensalada fría de carne almacenada durante ocho horas a temperatura ambiente, seguida de almacenamiento en refrigeración hasta las 48 hrs., dado que se tiene conocimiento que en algunas cocinas este alimento se maneja bajo estas condiciones.

El procedimiento seguido se indica en los esquemas 4, (4A, 4B).

Esquema 1. DINAMICA DE SALMONELLA THYPHIMURIUM ARTIFICIALMENTE INOCULADA EN ENSALADA FRIA DE CARNE (SALPICON).



(BMA) Bacterias Mesofílicas aerobias.

Esquema 2. METODOLOGIA PARA EL RECUENTO Y AISLAMIENTO DE SALMONELLA A PARTIR DE CARNE CRUDA DE CERDO. TECNICA DEL NUMERO MAS PROBABLE (NMP).

10 g. de carne

+

90 ml. H_2O Peptonada

↓

Licuar 60"

↓

NMP

10 ml.1:10 1 ml 1:10 1 ml.1:100 1ml.1:1000 1ml1:10000

(1g) (0.1g) (0.01g) (0.001g) (0.0001g)→NMP=0.3-11000 cél.g.

↓ ↓ ↓

Preenriquecer (35° por 24 hrs.).

↓

Enriquecer: Caldo Tetrationato

(43° por 24 hrs.)

↓

Aislar: Agar Sulfito Bismuto

(35° por 24 a 48 hrs.)

↓

Colonias sospechosas

Confirmar Bioquímicamente: TSI y LIA

(35° por 24 hrs.)

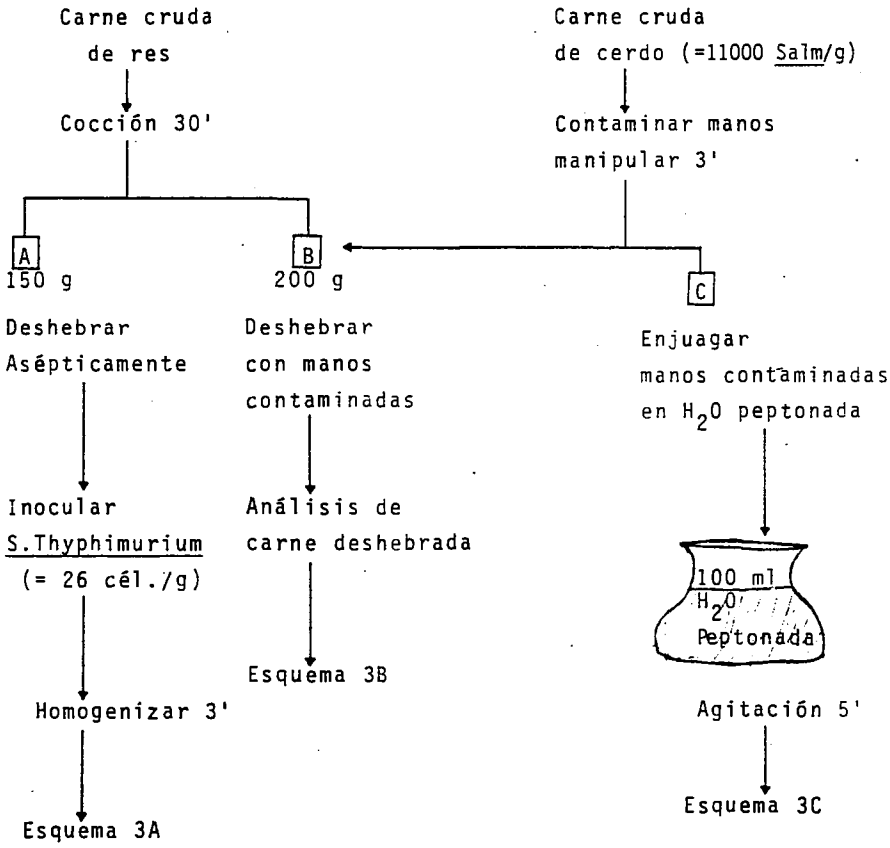
↓

Serología

↓

Cómputo

Esquema 3. CONTAMINACION CRUZADA DE SALMONELLA EN CARNE DESHEBRADA DE RES A PARTIR DE CARNE CRUDA DE CERDO.



Esquema 3A. DESTINO DE SALMONELLA THYPHIMURIUM ARTIFICIALMENTE INOCULADA EN CARNE DESHEBRADA DE RES.

2 Alícuotas de
40 g.

+

180 ml. H_2O Peptonada

↓

Licuar 60"

↓

Recuento de
S. Thyphimurium

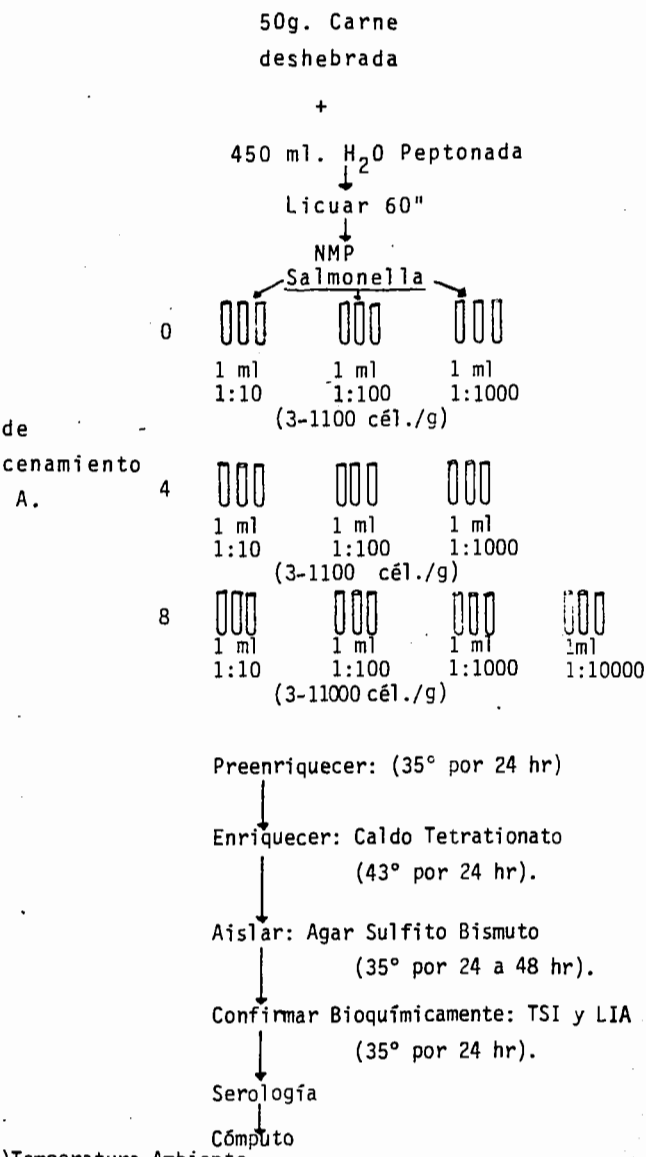
↓

En Sulfito Bismuto
por Vaciado en Placa

↓

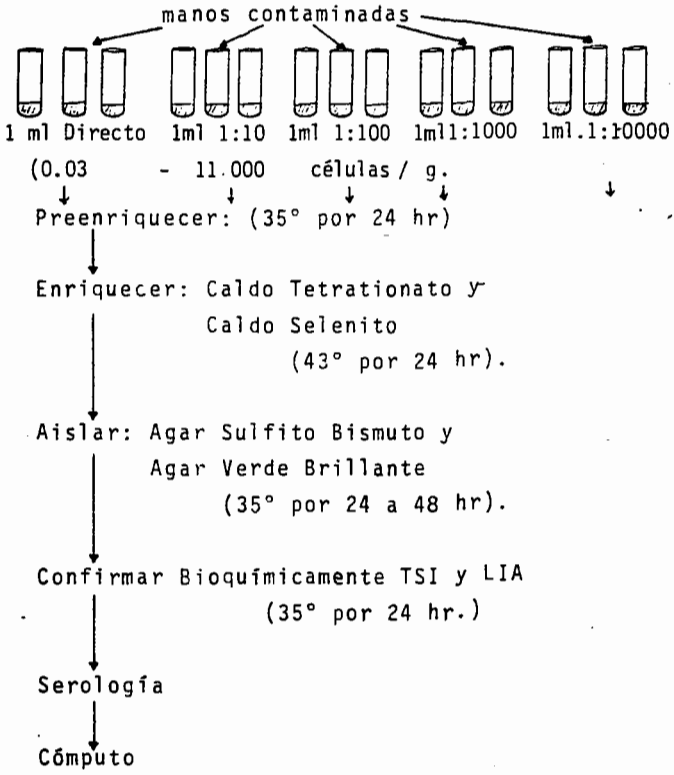
A las 0, 4, y 8 hrs.

Esquema 3B. DESTINO DE SALMONELLA EN CARNE DESHEBRADA DE RES CONTAMINADA CON MANOS QUE PREVIAMENTE MANEJAN CARNE CRUDA DE CERDO.

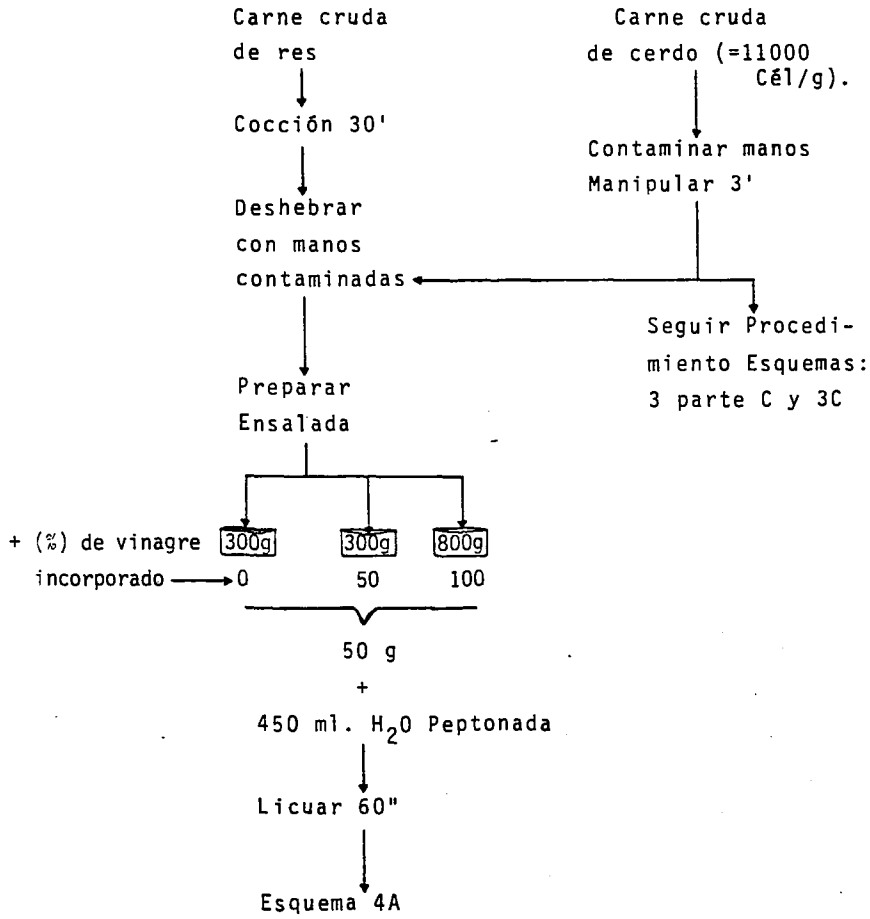


(T.A.)Temperatura Ambiente.

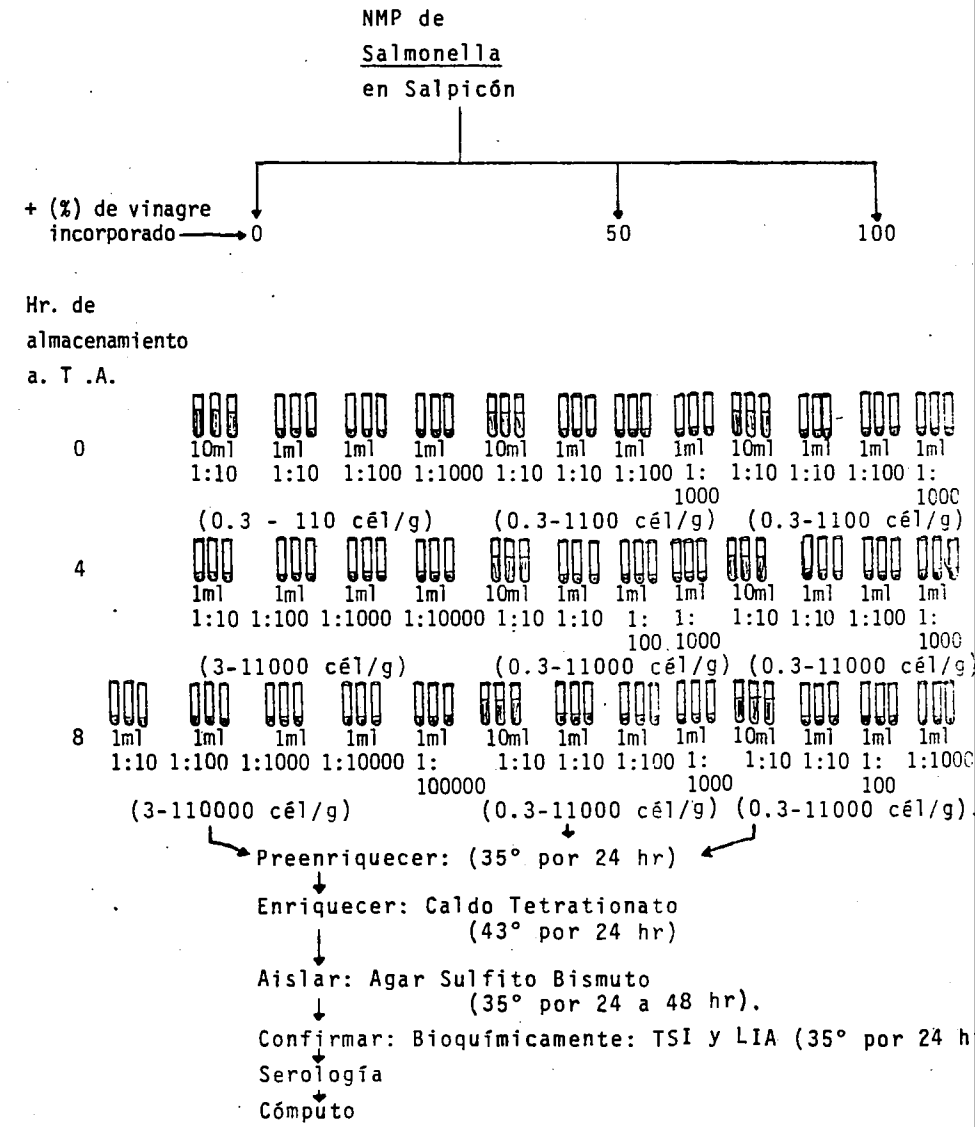
Esquema 3C. NMP DE <u>SALMONELLA</u> EN MANOS QUE MANEJARON CARNE CRUDA DE CERDO. MANOS ENJUAGADAS CON - - 100ml. DE H_2O PEPTONADA.



Esquema 4. DINAMICA DE SALMONELLA NATURALMENTE CONTAMINADA EN ENSALADA FRIA DE CARNE (SALPICON)

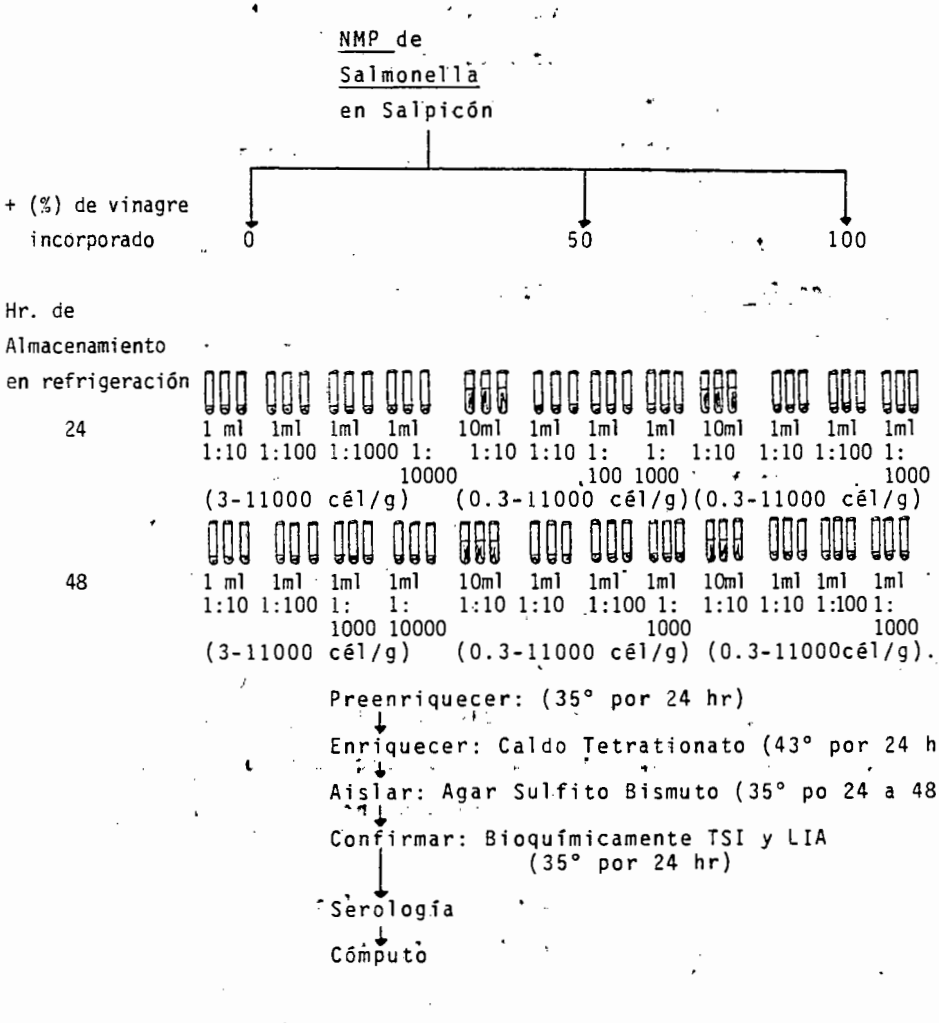


Esquema 4A. RECUENTO DE SALMONELLA NATURALMENTE CONTAMINADA EN ENSALADA FRIA DE CARNE (SALPICON). TECNICA DEL NUMERO MAS POBABLE (NMP).



(T.A) Temperatura Ambiente

Esquema 4B. RECUENTO DE SALMONELLA NATURALMENTE CONTAMINADA EN ENSALADA FRIA DE CARNE (SALPICON). ALMACENAMIENTO EN REFRIGERACION. TECNICA DEL NUMERO MAS PORBABLE (NMP)



RESULTADOS Y DISCUSION

Hoy en día es común observar un aumento en el consumo de alimentos cocinados. Dentro de éstos se encuentran aquéllos denominados mixtos por incluir ingredientes crudos e ingredientes cocidos y que después de su preparación, pueden no recibir tratamiento ulterior alguno previo a su consumo. Este es el caso de la ensalada fría de carne deshebrada conocida comúnmente como salpicón.

De aquí la importancia de estudiar la potencialidad de desarrollo de gérmenes patógenos como la Salmonella en este tipo de productos y determinar el riesgo a la salud que puede estar implicado.

Con frecuencia se intenta valorar el efecto de uno o más componentes del producto y de las condiciones en las que se conserva, las cuales pudieran favorecer o impedir la sobrevivencia y desarrollo del gérmen.

La Salmonella no tolera bien la acidez y su número disminuye en un producto a un ritmo que guarda relación con la intensidad de ésta.

En particular para este caso, se llevaron a cabo estudios tendientes a valorar la influencia del vinagre, como

componente del alimento, sobre la sobrevivencia del gérmen en condiciones de almacenamiento en abuso de temperatura.

Los resultados de la tabla 1 indican una relativa homogeneidad en la distribución del inóculo de la salmonela en la masa del alimento en estudio, lo que daba confiabilidad con esta información de continuar con el objetivo de - investigación.

Así pues, en la tabla 2 se observa que la carne deshebrada de res es capaz de mantener la sobrevivencia de la - salmonela e incluso puede multiplicarse en ella, cuando se parte con inóculo inicial de 220 células/g. de carne, al-- canzando al cabo de ocho horas de almacenamiento a temperatura ambiente una cifra de 2500 células/g. de carne.

En las tablas 3 y 4, gráficas 2 y 3, se observa el - comportamiento seguido por la salmonela en la ensalada -- fría de carne según concentraciones de vinagre.

Cuando se parte de un inóculo de contaminación de 30 célulgas/g. de alimento, en la porción sin vinagre se ob-- serva una ligera multiplicación a lo largo del tiempo de - almacenamiento, sin embargo, en presencia de vinagre a concentración de 50 y 100%, el gérmen se mantiene durante las primeras tres horas y después de ocho horas de almacena- -

miento muestra una tendencia a desaparecer. No obstante en cualquiera de los tres casos se manifiesta su presencia - desde la contaminación del producto hasta el término de - ocho horas de almacenamiento.

Si por el contrario, el nivel de contaminación se eleva a 9 100 células / g. de alimento, la situación se repite en la porción sin vinagre, es decir, la salmonela muestra una franca multiplicación, no así, cuando en presencia de vinagre a concentración de 50 y 100%, se observa que - las salmonelas no solo sobreviven sino que mantienen en número a la proporción inicial de contaminación durante las ocho horas de almacenamiento a temperatura ambiente.

Es evidente que el germen se mantiene presente en todo momento después de la contaminación en presencia de vinagre.

No hay de hecho una disminución en el nivel de la Salmonella cuando la concentración de vinagre en el producto es de 50 ó 100%.

Ante esta información de la dinámica del patógeno artificialmente inoculada en la ensalada fría de carne, prevalecía la inquietud de seguir su comportamiento cuando la contaminación se da en forma natural en el alimento.

Para ello, se procedió a efectuar una contaminación - cruzada de salmonela nativa en carne cruda de cerdo, que - se manipuló simultáneamente a la preparación del salpicón, semejando lo que habitualmente ocurre en una cocina.

Los resultados obtenidos de la contaminación cruzada por salmonela en carne deshebrada de res a partir de carne cruda de cerdo se observan en la tabla 6, e indican que el riesgo de contaminación cruzada de la salmonela puede darse bajo esas condiciones de preparación del alimento y que ésta no solo sobreviven, sino que se multiplica durante - las ocho horas de almacenamiento del alimento.

También se observa cómo puede ser engañoso cuando se llevan a cabo medidas de vigilancia y control sanitario - muestrear solo después de recién deshebrada la carne, ya - que pueden reportarse falsos negativos, sin tomar en cuenta que si ésta es almacenada y además a temperatura ambiente por 3 a 8 horas, la salmonela tiene la oportunidad de - sobrevivir y desarrollarse.

En la tabla 5 se observa el destino de Salmonella - - thyphimurium artificialmente inoculada en carne deshebrada de res, mientras que la tabla 6 muestra el destino de -- Salmonella nativa naturalmente contaminada en carne deshebrada de res. Ambos experimentos tienen como objeto compa-

rar los resultados de la contaminación artificial con la - contaminación natural, partiendo con semejantes niveles de contaminación. Se aprecia que en ambos la salmonela puede sobrevivir y desarrollarse en este tipo de sustrato.

Al comparar los resultados de la tabla 8 con los de - las tablas 3 y 4, se obtienen similares conclusiones, ya - que en ausencia de vinagre se da una ligera multiplicación de la Salmonella en el salpicón, mientras que en presencia de vinagre el gérmen: sobrevive y se mantiene presente durante el almacenamiento por ocho horas a temperatura am- - biente, tanto en una contaminación natural como en una contaminación artificial.

Cuando el producto es almacenado en refrigeración después de haberse mantenido a temperatura ambiente por ocho horas, semejando lo que habitualmente ocurre en una cocina, donde el sobrante es almacenado en refrigeración para posterior consumo, tabla 9, la salmonela contaminante en el - producto sin la interferencia de vinagre se mantiene y se multiplica al cabo de las 24 y 48 horas de almacenamiento de la ensalada fría de carne.

Por otra parte en presencia de vinagre a 50% de con-- centración, parece no afectar la sobrevivencia del germen. sin embargo, cuando la concentración de vinagre en 100% -

parece que ambos factores, la acidez y la refrigeración - inhiben el desarrollo de la salmonela a las 24 horas, no - obstante, ésta sobrevive y logra una ligera multiplicación al término de 48 horas de almacenamiento.

Es importante resaltar que al cabo de 48 hrs. de almacenamiento el producto continúa siendo organolépticamente aceptable.

Tabla 1. DISTRIBUCION DEL INOCULO DE SALMONELLA THYPHIMURIUM ARTIFICIALMENTE INOCULADA EN CARNE DESHEBRADA DE RES.

inóculo: Teórico=200 cél/g. Real=220 cél/g.

Alícuota	Sm
A	28
B	23
C	20
D	25
E	22
F	12

$\bar{x}$ = 22

S = 5

C.V. = 23%

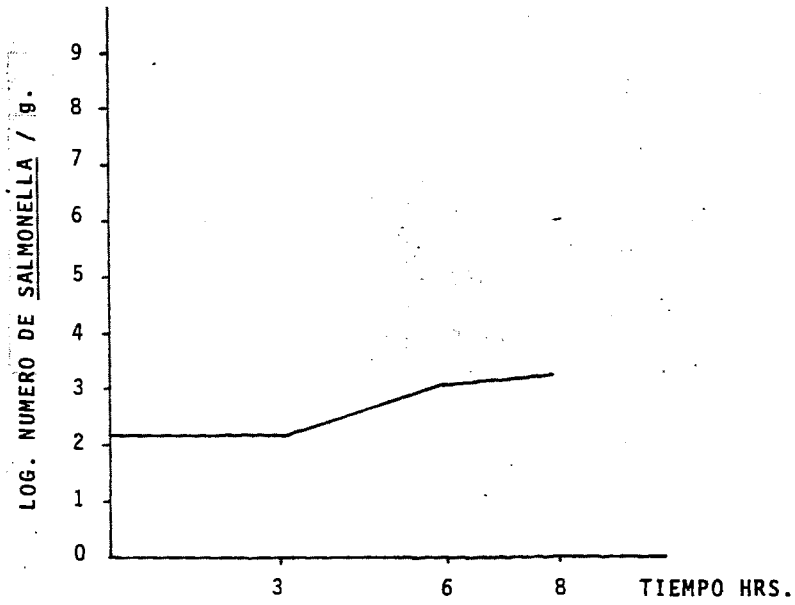
(Sm) Salmonella Thyphimurium

$\bar{X}$ Media.

S Desviación Estándar.

C.V. Coeficiente de Variabilidad.

GRAFICA 1 .- SOBREVIVENCIA DE SALMONELLA THYPHIMURIUM ARTIFICIALMENTE INOCULADA EN CARNE DESHEBRADA DE - RES.



INOCULO: Teórico 200 cél./g.
Real 220 cél./g.

Tabla 2. SOBREVIVENCIA DE SALMONELLA THYPHIMURIUM ARTIFICIALMENTE INOCULADA EN CARNE DESHEBRADA DE RES.

Teórico=200 cél/g.

inóculo

Real=220 cél/g.

Hr. a

T.A.	T°	pH	Sm
0	30°	6.57	220
3	20°	6.60	220
6	22°	6.57	1300
8	23°		2500

(Sm) Salmonella

T.A. Temperatura Ambiente.

Tabla 3. SOBREVIVENCIA DE SALMONELLA THYPHIMURIUM ARTIFICIALMENTE INOCULADA EN SALPICON.

Hr. a			% de vinagre		
T.A.	T°	Determ.	0	50	100
0	21°	Sm	82	82	75
		BMA	$70X10^3$		
		pH	6.20	5.45	5.16
3	24°	Sm	100		
		BMA	$55X10^3$		
		pH	6.20	5.45	5.16
6	24°	Sm	130	160	3 endil:1.10
		BMA	$18X10^4$		
		pH	6.15	5.42	5.19
8	24°	Sm	320	6 endil.1:10	8 endil.1:10
		BMA	$35X10^4$		
		pH	6.21	5.66	5.22

inóculo Teórico=200 cél/g.

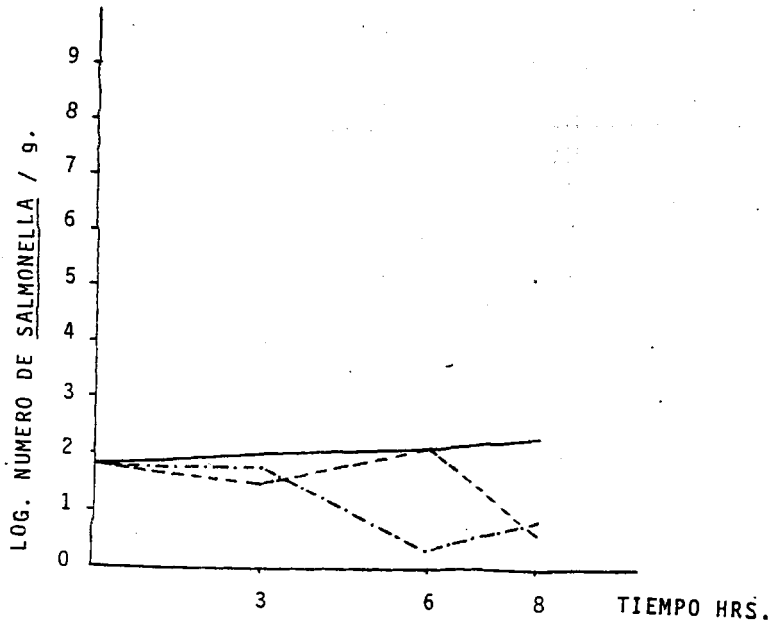
bajo. Real-30 cél/g.

T.A. Temperatura Ambiente

Sm Salmonella Thyphimurium

BMA Bacterias Mesofílicas aerobias.

GRAFICA 2 .- SOBREVIVENCIA DE SALMONELLA THYPHIMURIUM ARTIFICIALMENTE INOCULADA EN SALPICON.



% VINAGRE.

——— 0

- - - - - 50

—·—·— 100

INOCULO: Teórico 200 cél./g.
Real 30 cél./g.

Tabla 4. SOBREVIVENCIA DE SALMONELLA THYPHIMURIUM ARTIFICIALMENTE INOCULADA EN SALPICON.

Hr. a				% de vinagre	
T.A.	T°	Determ.	0	50	100
		Sm	16000	11000	10000
0	24°	B.M.A.	$17X10^3$		
		pH	5.87	5.14	5.04
		Sm	10000	17000	16000
3	24°	BMA	$23X10^3$		
		pH	5.73	5.20	4.95
		Sm	84000	16000	14000
6	22°	BMA	$14X10^4$		
		pH	5.84	5.30	4.92
		Sm	230000	16000	14000
8	22°	BMA	$75X10^4$		
		pH	5.76	5.24	4.95

inóculo Teórico = 10 000 cél/g.

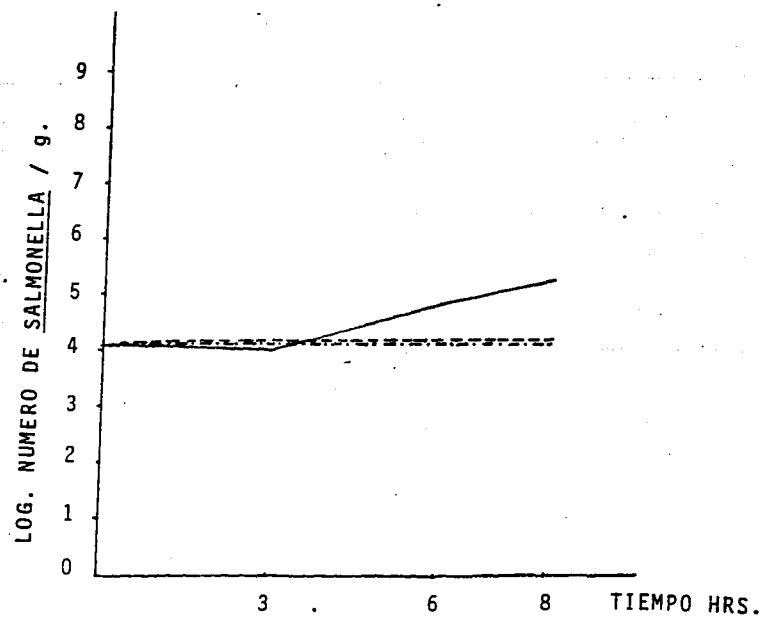
alto Real = 9 100 cél/g.

T.A. Temperatura Ambiente

Sm Salmonella Thyphimurium

BMA Bacterias Mesofílicas Aerobias.

GRAFICA 3 .- SOBREVIVENCIA DE SALMONELLA THYPHIMURIUM ARTIFICIALMENTE INOCULADA EN SALPICON.



% VINAGRE

——— 0

------ 50

-·-·-·- 100

INOCULO: Teórico 10,000 cél./g.
Real 9,100 cél./g.

Tabla 5. DESTINO DE SALMONELLA THYPHIMURIUM ARTIFICIALMENTE INOCULADA EN CARNE DESHEBRADA DE RES.

	Alícuota I			Alícuota II		
Hr. de almacenam. a. T.A.	T°	pH	Salmonella cél/g	T°	pH	Salmonella cél/g.
0	20°	6.14	35	29°	6.14	40
4	20.5°	5.33	1400	30.5°	6.33	1300
8	32°	6.47	170000	32°	6.47	190 000

inóculo

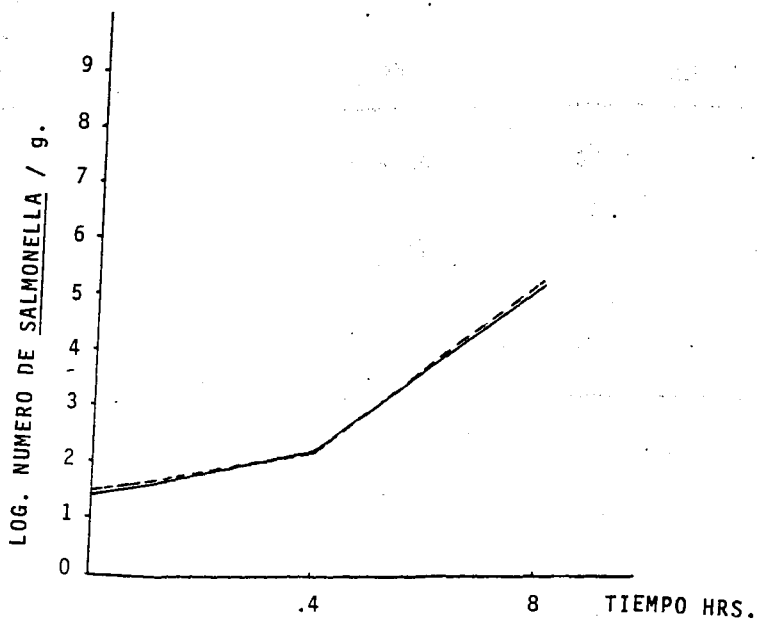
Teórico = 25 cél/g.

Real: = 25 cél/g.

T.A. Temperatura Ambiente

T° Temperatura

GRAFICA 4 .- DESTINO DE SALMONELLA THYPHIMURIUM ARTIFICIALMENTE INOCULADA EN CARNE DESHEBRADA DE RES.



ALICUOTA

——— I

- - - - - - - II

INOCULO: Teórico 26 cél./g.
Real 25 cél./g.

Tabla 6. DESTINO DE SALMONELLA EN CARNE DESHEBRADA DE RES CONTAMINADA CON MANOS QUE PREVIAMENTE MANEJARON CARNE CRUDA DE CERDO.

Hr. de Almacenam. a. T.A.	T°	pH	BMA	Salmonella cél/g.
0	27°	6.38	$1.1X10^5$	7.3
4	30.5°	6.35		23
8	32°	6.23	$1.7X10^8$	90

T.A. Temperatura Ambiente

T° Temperatura

BMA Bacterias Mesofílicas Aerobias.

Tabla 7. NMP DE SALMONELLA EN MANOS* QUE MANEJARON 100 G. DE CARNE CRUDA DE CERDO.

* Manos enjuagadas con 100 ml. de H_2O Peptonada.

Caldo Tetrationato	Caldo Selenito
3-0-0 = 230/manos	3-0-0 = 230/manos.

Tabla 8. DINAMICA DE SALMONELLA EN SALPICON CONTAMINADO CON MANOS QUE PREVIAMENTE MANEJARON CARNE CRUDA DE CERDO.

Hr. a			% de vinagre		
T.A.	T°	Determ.	0	50	100
		NMP Sm/g	0.4	2.3	0.4
0	24°	BMA	$3.5X10^5$		
		pH	5.64	5.32	4.86
		NMP Sm/g	3	0.4	0.4
4	25°	BMA	$3.1X10^5$		
		pH	5.65	5.38	5.3
		NMP Sm/g.	23	0.4	0.9
8	26°	BMA	$3.8X10^6$		
		pH	5.78	5.54	5.20

T.A. Temperatura Ambiente

T° Temperatura

Sm Salmonella Thyphimurium

BMA Bacterias Mesofílicas Aerobias.

Tabla 9. DESTINO DE SALMONELLA NATURALMENTE CONTAMINADA EN ENSALADA FRÍA DE CARNE SEGUN CONCENTRACIONES DE VINAGRE 0;50 Y 100%, ALMACENADO A TEMPERATURA AMBIENTE Y EN REFRIGERACION.

Hr. de Almacenam.			% de vinagre		
a. T.A.	T°	Determ.	0	50	100
0	24°	NMP Salm/g.	20	20	+1,100
4	25°	NMP Salm/g.	50	500	23
8	24°	NMP Salm/g	200	40	23
24	4°	NMP Salm/g	2100	2100	0.3
R 48	4°	NMP Salm/g.	5000	5000	7

T.A. Temperatura Ambiente

T° Temperatura

Salm. Salmonella

CONCLUSIONES

1.- La Salmonella artificialmente inoculada en la ensalada fría de carne al término de su preparación y en almacenamiento en abuso de temperatura durante ocho horas, tiene una ligera multiplicación - cuando el número de células contaminantes es bajo, no así, cuando éste es alto, se observa una marcada multiplicación.

2.- Hay una franca multiplicación del germen en el -- producto sin adición de vinagre, mientras que en presencia a concentración de 50 y 100%, la Salmonella sobrevive y se mantiene en la proporción - inicial.

3.- De lo anterior, es evidente que si se propicia la contaminación con la Salmonella y el alimento es mantenido en condiciones de abuso de temperatura, el germen se mantiene presente, constituyendo un riesgo actual para la salud.

4.- La calidad microbiológica de este producto, se encuentra determinada por:

a) La calidad de la materia prima.

b) Las condiciones de tiempo y temperatura a las que se almacena.

c) Las condiciones de elaboración.

5.- No hay alternativa, el alimento debe prepararse higiénicamente, con ingredientes de buena calidad microbiológica, almacenarse en refrigeración o consumirse de inmediato.

R E S U M E N

La ensalada fría de carne, conocida como Salpicón, es un alimento cocinado con ingredientes crudos e ingredientes cocidos. Se prepara a base de carne cocida de res deshebrada, jitomate, cebolla, chícharos, aguacate, sal y vinagre.

En el presente trabajo estudiamos el comportamiento de una cepa de Salmonella thyphimurium artificiclamente inoculada en el alimento, según concentraciones de 0; 50 y 100% de vinagre conservado a temperatura ambiente por ocho horas. Se inocularon por separado en cada caso dos niveles en el producto; bajo (200 células/g.) y alto (10 000 células/g.).

Las salmonelas se contaron sin dificultad en placas de Agar Sulfito de Bismuto por vaciado en placa. En la porción sin vinagre se presentó un desarrollo manifiesto, alcanzando niveles de miles /g. a lo largo de las ocho horas de almacenamiento a temperatura ambiente, mientras que en porciones con vinagre el germen sobrevive y se mantiene a la proporción inicial con ambos inóculos.

Efectuando una contaminación cruzada de Salmonella nativa en carne cruda de cerdo manipulada con manos que pos-

teriormente deshebraron carne cocida de res, se estudió el comportamiento del patógeno en la ensalada fría de carne en las mismas condiciones del estudio anterior, seguido de almacenamiento en refrigeración hasta las 48 horas.

Las salmonelas se aislaron y contaron por la técnica del NMP con preencriquecimiento en Agua Peptonada, enriquecimiento en Caldo Tetrationato, aislamiento en Agar Sulfito de Bismuto y confirmación bioquímica y serológica. Obteniéndose similares resultados que en estudio anterior. Manteniéndose el patógeno en refrigeración hasta las 48 hr. de almacenamiento. El alimento no mostró signos de deterioro antes de las 8 hr. de almacenamiento a temperatura ambiente, ni en las 48 hrs. seguidas de almacenamiento en refrigeración.

Resulta por tanto imperativo preparar higiénicamente el producto con materiales de buena calidad sanitarias, refrigerar (máximo 8°) el alimento al término de la preparación, en condiciones que aseguren un rápido enfriamiento en toda su masa, o consumirlo no después de 2 horas de preparado.

BIBLIOGRAFIA

1. Beckers, H.J. 1982. Incidencia of foodborne in the Net her lands., Annual Summary, J. Food. Prot. 45: 1338- - 1341.

2. Becerril D., González Cortéz, A., González, C., Bece-- rril, P., Guzmán, B.J. y Herrera, G. 1976. Estudio de un brote explosivo de gastroenteritis producido por - Salmonella enteritidis serotipo infantis. Rev. Inv. Salud Pública. 36: 215-226.

3. Bryan, Frank,L. 1981. Hazard Anaysis of food service - operations. Food Technol: 78-87.

4. Bryan,L. Frank., Bartleson,C.A., Chistopherson, N.1981. Hazard analyses in reference to Bacillus cereus, of -- boilee and fried rice in cantonese style restaurants. J. Food. Prot. 44: 500-512.

5. Bryan, L. Frank., Bartleson,A., Charles and Sugi. 1981. Hazard analyses of char-siu and Roast Pork en Chiness restaurants a and Markets. J. Food. Prot. 45: 422-429.

6. Bryan,LF., Jeanette,B.L. 1984. Critical Control Points of hospital foodservice operations. J. Food. Prot. 47: 950-963.

7. Cuden Henry N. 1973. Food distribution in today's consumer climate. J. Food. Technol. 36.

8. Chalker,R.B. and M.J.Blaser. 1988. A review of human - salmonellosis: III. Magnitude of Salmonella infections in United States. Reviews, Infections diseases. 10: -- 111-124.

9. Doyle,M.P., N.J.Bains, J.L.Shoeni., E.M.Toster. 1982. Fate of Salmonella thyphimurium and Sthaphylococcus - aureus in meat salads prepared with mayonnaise. J. -- Food. Prot. 45: 152-170.

10. E. Fernández Escartín., J. Saldaña, Lozano., y C. Mireles, Hernández. 1983. Incidencia de Salmonella en carnes crudas. Influencia del preenriquecimiento en la recuperación del microorganismo.

11. Fernández Escartín, E. 1981. Microbiología Sanitaria. Agua y Alimentos. Volumen I.

12. Rivituso,C.P. and Snyder,D.P. 1981. Bacterial growt at foods service operating temperatures. J. Food. Prot. - 44: 770-775.

13. Ritter,J., 1979. Fate of selected pathoges inoculated

into foods prepared in slow cokers. J. Food. Prot. 42: 872-876.

14. Ryno R.Richard y Leftwich, W. Marion. 1981. Exposure - time of warm leftovers to temperatures suitable for microbial growth in a home-type refrigerator. J. Food. - 44: 513-515.

15. Steele,E. James. y Stiles.E. Michael. 1980. Food poi-- soning potential of artificially contaminated vacum - packaged sliced ham in sandwiches. J. Food. Prot. 44: 430-434.

16. Tood.Ec. D. 1983. Factors that contributed to foodborne disease in Canada. 1973-1977. J. Food. Prot. 46 : 737-747.

17. Waytt,C.J., Guy,V.H. 1980. Growth of Salmonella Thyphimurium and Staphulococcus aureus in retail pumpkin -- pies. J. Food. Prot. 44: 418-421.

18. Wyatt,C.J., Guy,V.H. 1981. Incidencia and growth of - Bacillus cereus in retail pumkin pies. J. Food. Prot. 44: 770-775.

19. Worl Health Organitation. 1984. Prevention and control of foodborne salmonellosis through tha aplication of - the hazard analysis critical control point sistem. Report of International comission on microbiological -- specifications for foods, (ICMSF) an hoc committee.