

1989-A

CODIGO 080665016

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



"VIABILIDAD DE Salmonella Y SEROTIPOS NATIVOS EN CARNE
CRUDA DE CERDO CONSERVADA EN CONGELACION"

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

MARIA ERMILA VAZQUEZ JAVIER

GUADALAJARA, JAL.

1990



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Sección
Expediente
Número 0949/90

SRITA. MARIA ERMILA VAZQUEZ JAVIER
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "INCIDENCIA CUANTITATIVA DE SALMONELLA EN CARNE DE CERDO Y EFECTO EN LA VIABILIDAD DE SEROTIPOS DURANTE LA CONGELACION" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de Tesis a la Q.F.B. Rosa María Puebla Pérez.



FACULTAD DE CIENCIAS

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara Jal., 20 de Junio de 1990

EL DIRECTOR

ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS CARDENAS

EL SECRETARIO

M.V.Z. MIGUEL CARBAJAL SORTA

cgir.

Al contestar este cupón cruseo fecha y número



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sección
 Expediente
 Número 1314/90

SRITA. MARIA ERMILA VAZQUEZ JAVIER
 P R E S E N T E . -

Por este conducto nos permitimos informar a usted que se autoriza la modificación al tema de Tesis "INCIDENCIA CUANTITATIVA DE SALMONELLA EN CARNE CRUDA DE CERDO Y EFECTO EN LA VIABILIDAD DE SEROTIPOS DURANTE LA CONGELACION", por el tema de "VIABILIDAD DE SALMONELLA Y SEROTIPOS NATIVOS EN CARNE CRUDA DE CERDO CONSERVADA EN CONGELACION".

Sin otro particular nos es grato reiterar a usted la expresión de nuestra consideración más distinguida.



FACULTAD DE CIENCIAS

ATENTAMENTE
 "PIENSA Y TRABAJA"
 Guadalajara Jal., 13 de Septiembre de 1990
 EL DIRECTOR

ING. ADOLFO ESPINOZA DE LOS MONTEROS CARDENAS

EL SECRETARIO

M.V.Z. MIGUEL CARBAJAL SORIA

c.c.p. La Q.F.B. Rosa Maria Puebla Pérez; Directora de Tesis.- Pte.
 c.c.p. El expediente del alumno

cglr.

Guadalajara Jal. 12 de Septiembre de 1990

M. en C. CARLOS BEAS ZARATE
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.
P R E S E N T E:

Por este conducto me permito informar a Ud. que fue revisada la tesis intitulada: "VIABILIDAD DE Salmonella Y SEROTIPOS NATIVOS EN CARNE CRUDA DE CERDO CONSERVADA EN CONGELACION". Que presenta la pasante de Biología María Ermila Vázquez Javier; por lo que no tengo inconveniente en que dicha tesis se imprima, y ruego a Ud. tramita a quien corresponde el exámen respectivo.

Sin otro particular aprovecho la ocasión para reiterarle mi distinguida consideración.

A T E N T A M E N T E



Q.F.B. Rosa María Puebla Pérez.

TRABAJO EFECTUADO EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA
SANITARIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA BAJO LA ASESORIA
DE LA Q.F.B. JOSEFINA SALDAÑA LOZANO.

INDICE

INTRODUCCION.....	1
HIPOTESIS.....	7
MATERIAL Y METODOS.....	8
RESULTADOS Y DISCUSION.....	29
TABLAS Y GRAFICAS.....	34
CONCLUSIONES.....	47
RESUMEN.....	49
BIBLIOGRAFIA.....	50

VIABILIDAD DE Salmonella Y SEROTIPOS NATIVOS EN CARNE CRUDA
DE CERDO CONSERVADA EN CONGELACION.

INTRODUCCION

El conocimiento de la distribución de bacterias enteropatógenas en el medio ambiente y de su incidencia en los alimentos es fundamental para el establecimiento de estrategias que conduzcan al control epidemiológico de los padecimientos a que dan lugar (14, 15).

La salmonelosis ha surgido como un problema de salud pública y veterinario de especial importancia. Esta ocurrencia es mundial y aparentemente se va incrementando en todos los países (10, 14, 17, 21, 23). Por tratarse de una típica zoonosis adquiere especial relevancia conocer la incidencia del agente etiológico en los alimentos de origen animal a los que suele parasitar (3, 15, 21, 23). Los casos más dramáticos de la salmonelosis suelen ocurrir en grandes grupos de personas que han consumido en común un alimento contaminado. Este, es usualmente preparado y retenido ó mantenido a temperatura ambiente por un tiempo suficientemente prolongado para dar oportunidad a que la salmonela se multiplique hasta alcanzar niveles por encima de 10^6 organismos por gramo de alimento. Estas prácticas dan lugar a severos brotes de infección entre los consumidores (11, 23).

La carne de diferentes especies animales es el vehículo principal de los microorganismos que causan brotes de enfermedades (infecciones o intoxicaciones microbianas) asociadas al consumo de alimento (3, 7, 31). En particular la carne de cerdo resulta especialmente riesgosa dada la frecuencia con la cual se pueden recuperar bacterias patógenas a partir del producto crudo. En nuestro país se han obtenido cifras de 87.5% de incidencia de Salmonella en carne cruda de cerdo colectada en carnicerías (15) y 90.4% en empacadoras de la ciudad de Guadalajara (16), 32.4% en carne cruda de cerdo y cecina en localidades del estado de Guerrero (3) y 52.5% en carne cruda de cerdo obtenida después de la matanza en un rastro de la Cd. de Monterrey (25). Aunque se trata de un producto crudo hay que considerar el peligro que resulta cuando se introduce a una cocina ó fábrica. En E.U.A. se encontró Salmonella en 14% de carne de cerdo, 18% en carne para hamburguesas y 3% en carne de cordero cerca de Cincinnati. En Irlanda se aisló Salmonella del músculo de cerdo en 7.5% (6, 17). Los productos cárneos especialmente carne de res, hamburguesas, embutidos y carne de cerdo fueron los alimentos más frecuentemente involucrados (la media es 27.8%), seguida por pollo y pavo (8.7%), vegetales y frutas principalmente

en conserva (8.5%), panes principalmente pizzas y pasteles (7.7%), productos marinos destacándose salmón, atún, camarón y almejas (6.2%) y comida china (5.6%). La mayoría de los brotes se han asociado con carne (la media es 26.6%) y con aves de corral principalmente pavo (19%) (9, 11, 15).

La contaminación microbiana inicial de la carne es consecuencia de diversos factores. Por ejemplo, la penetración de los microorganismos en el sistema vascular al utilizar para el degollado cuchillos contaminados (es decir, para la punción de los vasos sanguíneos y sangría subsiguiente); después de puncionados los vasos, la sangre continúa circulando por un breve período de tiempo y los microorganismos se introducen y diseminan por toda la economía del animal. También puede tener lugar una contaminación subsiguiente con la llegada de microorganismos a la superficie de la carne en casi cada una de las operaciones realizadas durante el procesamiento, corte, procesado, almacenamiento y distribución; así mismo, puede contaminarse al poner en contacto las canales con pieles, extremidades, estiércol, polvo ó con el contenido intestinal si la víscera se punciona. Otras fuentes potenciales de contaminación microbiana son el equipo empleado en cada una de las operaciones realizadas hasta el consumo del producto final, las ropas y manos del personal que lo manipula y el propio entorno físico, incluida el agua empleada para lavar las canales. Las salmueras y el equipo pueden ser una fuente contaminante. Del mismo modo puede verificarse a partir de los microorganismos del aire de las salas de refrigeración de almacenamiento y de maduración o de los locales de procesado y envasado, por lo tanto es obvio que todo aquello que tiene contacto con la carne incluidos otros productos cárnicos, son una fuente potencial de contaminación microbiana (18).

Proteger a la carne de la contaminación, no es la única medida aplicable al control de la salmonelosis. Es fundamental preservarla de la actividad microbiana para evitar un incremento en el número de salmonelas viables, que acentuarían su peligrosidad al ser consumida, o el riesgo de diseminación en cocinas y fábricas de alimentos.

La congelación de la carne es una medida confiable de preservación cuando se aplica con el control técnico adecuado (26). Aunque el desarrollo microbiano prácticamente se encuentra suprimido, la sobrevivencia del patógeno en un alimento congelado le da vigencia al riesgo de contamina -

ción cruzada hacia productos procesados o cocinados (8). La resistencia de las células congeladas dañadas puede incrementarse o reducirse dependiendo de la composición del sustrato en que la bacteria se encuentre. Hay un incremento en la resistencia cuando el alimento es de consistencia viscosa y tiene componentes como proteínas, carbohidratos simples y compuestos, triglicéridos; también se suele asociar con la presencia de ciertos iones, sales inorgánicas, ácidos, componentes activos de superficie y ciertas enzimas como la lisozima, proteasas (11, 23, 28, 31). Los alimentos congelados tienen dos recursos como control de actividad microbiana, por un lado la actividad de agua reducida durante la congelación y la temperatura del producto que evita el crecimiento microbiano. Mediante la congelación puede mantenerse mejor la textura y el sabor de los alimentos que difícilmente se logra con otros procedimientos de preservación (9, 28). Las salmonelas pueden sobrevivir durante muchos meses en congelación de la misma manera que la mayoría de los microorganismos, pero la composición del alimento en el cuál se encuentra influye en esta sobrevivencia. En la carne congelada de res a -17.8° las salmonelas sobreviven períodos mayores a 9 meses (14). El desarrollo de las salmonelas en una gran variedad de alimentos ha sido motivo de muchos estudios, sobre todo en aquellos que más se asocian a casos de gastroenteritis o que potencialmente pueden hacerlo. Con frecuencia se intenta valorar el efecto de uno o más componentes del producto y las condiciones en que se conservan, las cuales pudieran favorecer o impedir el desarrollo (10, 15).

La merma de la viabilidad de los microorganismos; en congelación, se ve influenciada con la composición del alimento, el número de células originalmente presente y los serotipos contaminantes. La sobrevivencia por sí sola es riesgosa, independientemente del número presente.

La aparición de brotes de salmonelosis en Estados Unidos en una revisión efectuada por Bryan entre 1973-1976, se asoció a un inadecuado enfriamiento de los alimentos, al consumo de ingredientes crudos contaminados, tratamiento térmico inadecuado, contaminación cruzada de los alimentos crudos a cocidos, transcurso de uno o más días entre la preparación y el consumo del alimento, falta de higiene en el equipo, temperaturas elevadas durante la maduración, una contaminación por personas infectadas y/o una temperatura inadecuada durante el recalentamiento de alimentos cocidos -

(6, 13).

Para fines epidemiológicos el conocimiento de la presencia de salmone las en un alimento es de gran interés (10, 13, 14, 15). En México se han reportado pocos brotes de salmonelosis. En 1976 se describió uno producido por S. infantis, el cuál afectó a 221 atletas de diversas nacionalidades en una instalación deportiva. Este fué asociado a la ingestión de puré de papas contaminado durante su preparación (5). Otro fué causado por S. heidelberg vehiculizado por frijoles cocidos que se utilizaban en la preparación de tortas en una tortería de la ciudad de México (2). De las personas afectadas en este brote algunos mantuvieron las tortas sin refrigerar varias horas antes de consumirlas. Aparentemente estos individuos presentaron cuadros clínicos más severos y menor período de incubación que las que las consumieron inmediatamente después de prepararse. Entre 1968 y 1977 se registraron en E.U.A. 1420 brotes de enfermedades en los que los diferentes tipos de carne (no alimentos marinos) fueron el vehículo de los agentes patógenos (7). En 225 brotes más los productos cárneos pudieron actuar de la misma forma, aunque esto no se llegó a demostrar. Los agentes patógenos identificados incluyeron las siguientes bacterias: Salmonella, Clostridium perfringens, Shigella y Bacillus cereus, virus (hepatitis A) parásitos (Toxoplasma gondii, Trichinella spiralis), toxinas bacterianas (Clostridium botulinum, Staphylococcus aureus) y sustancias químicas (glutamato de sodio, mercurio y niacina). La Salmonella encabezó la lista con 157 entre los de etiología conocida. En el 50% de todos los brotes el alimento fué mal manejado en establecimientos de servicio de alimentos y en el 24% en hogares. Uno de los brotes más grandes presentados en Suecia que involucró 9 000 casos con 9 muertes, se atribuyó a la carne (6, 7).

El registro de los serotipos aislados tanto de alimentos como de otras fuentes provee información útil en el diagnóstico y eventualmente la detección de brotes, así como en el establecimiento de programas de vigencia y control de la salmonelosis. Gosh reportó S. bredeney, S. heidelberg y S. durbab como los tres serotipos más frecuentes en granjas porcícolas de Inglaterra y S. alachua, S. bredeney y S. give en los mismos especímenes muestreados en una fábrica de tocino (8, 19). Los serotipos de Salmonella más frecuentes aislados de alimentos en México de 1974-1981 fueron S. derby, S. anatum y S. typhimurium (Tabla 1) (4), con S. derby, S.

Infantis en empacadoras de carne en la ciudad de Guadalajara (Tabla II) (24). Sepulveda y col. (27) reportan a S. havana, S. derby y S. heidelberg como los serotipos más habituales en productos cárnicos en Nuevo León durante 1982-1988. Por otra parte, en portadores asintomáticos dentro de la población general en la ciudad de México, Becerril y col. (1) reportan a S. derby, S. anatum, S. agona y S. newport como los más frecuentes.

La información disponible sobre la incidencia de Salmonella en la carne esta bien documentada (15, 16); sin embargo, son escasos los datos en lo que se refiere a la densidad del patógeno en las carnes contaminadas. Conforme la carne progresa a lo largo de la cadena de comercialización se hace mayor la posibilidad de un incremento en su número, de ahí que se tenga interés en conocer la carga bacteriana en el alimento crudo que adquiere la población. Se sabe que la carne es el vehículo principal de los microorganismos o sus toxinas que causan brotes de gastroenteritis asociados al consumo de alimentos. Por regla general, la carne cruda se encuentra contaminada con Salmonella. Aunque no suele consumirse cruda, su manejo en las cocinas o plantas empacadoras de carne constituye un riesgo de contaminación cruzada hacia productos procesados. El problema se agudiza si se considera que la dosis infectante de este microorganismo puede ser tan pequeña como 100 a 200 células.

El conocimiento del nivel de salmonelas en la carne cruda de cerdo y su comportamiento en congelación permite estimar el riesgo implicado en su manejo, industrialización y consumo para establecer acciones más consistentes para su control.

El presente trabajo tiene como objetivos:

1. Determinar el número de salmonelas en la carne cruda de cerdo del comercio.
2. Determinar el patrón de sobrevivencia del microorganismo en el alimento almacenado en congelación.
3. Estudiar el comportamiento de los serotipos nativos a lo largo de la congelación de la carne.

TABLA I

Serotipos de Salmonella más frecuentes
aislados de alimentos .
México 1974 - 1981

Serotipo	Frecuencia	%
<u>derby</u>	453	27.9
<u>anatum</u>	155	9.6
<u>typhimurium</u>	144	8.9
<u>london</u>	109	6.7
<u>infantis</u>	73	4.5
<u>agona</u>	70	4.3
<u>worthington</u>	57	3.5
<u>give</u>	53	3.3
<u>heidelberg</u>	44	2.7
<u>bovis morbificans</u>	32	2.0
otros	429	26.6
TOTAL	1 619	100.0

FUENTE: Ref. 4.

TABLA II .

Serotipos de Salmonella aislados en empacadoras de carne.

Guadalajara 1980 - 1985

Serotipo	P C	P Coc	CH-L	M-M	E-U	S-D	TOTAL	%
<u>derby</u>	3	8	3	14	7	21	56	22.49
<u>infantis</u>	3	6	0	6	1	13	29	11.64
<u>drypool</u>	1	3	3	5	3	7	22	8.83
<u>anatum</u>	3	2	0	7	5	4	21	8.43
<u>worthington</u>	1	3	0	3	2	5	14	5.62
<u>agona</u>	0	5	0	3	3	1	12	4.82
<u>senftenberg</u>	2	3	0	4	0	3	12	4.82
<u>montevideo</u>	0	4	0	4	1	1	10	4.02
<u>livingstone</u>	1	1	1	0	0	7	10	4.02
<u>san diego</u>	0	1	0	1	1	4	7	2.81
<u>heidelberg</u>	0	1	1	1	0	4	7	2.81
<u>london</u>	2	0	0	2	1	1	6	2.41
<u>newington</u>	0	0	0	0	1	3	4	1.61
<u>muenchen</u>	0	0	0	1	1	2	4	1.61
<u>minnessota</u>	0	2	0	0	1	0	3	1.20
<u>ohio</u>	0	1	0	0	0	2	3	1.20
<u>havana</u>	1	0	0	1	0	1	3	1.20
<u>give</u>	0	1	0	0	0	1	3	1.20
<u>typhimurium</u>	1	0	0	1	0	1	3	1.20
<u>adelaide</u>	0	1	0	0	0	1	2	0.80
<u>otros</u>	1	3	3	3	1	5	16	6.40
TOTAL	19	45	11	56	31	87	249	100.00

Nota:

P C: producto crudo

P Coc: producto cocido

CH-L: chorizo y longaniza

M-M: manos y mandiles

E-U: equipo y utensilios

S-D: superficies diversas

FUENTE: Ref. 24.

HIPOTESIS:

La congelación afecta la viabilidad de las células dependiendo del número y el sustrato en que éstas se encuentran.

MATERIAL Y METODOS

- A). EQUIPO Y MATERIAL.
- B). MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS.
- C). METODOLOGIA.

A). EQUIPO Y MATERIAL.

Autoclave.

Incubadora a 35°C.

Baño maría de precisión a 43°C ± 0.5°C.

Baño maría a 47°C.

Baño maría a 50°C.

Balanza analítica, sensibilidad 0.0001 gr.

Balanza granataria, sensibilidad 0.1 gr.

Potenciómetro.

Olla de presión.

Horno para esterilizar material de vidrio a 180°C.

Centrífuga.

Refrigerador.

Cuenta colonias.

Bomba de vacío.

Licuadaora.

Material estéril:

Cuchillos.

Abatelenguas.

Tubos de ensaye de 16 x 175 mm. con tapón de baquelita.

Cajas de Petri.

Probeta graduada de 100 ml.

Vasos de licuadaora.

Frascos con capacidad de 250 ml.

Frascos de boca ancha con capacidad de 500-1 000 ml.

Jeringas de 1 ml.

Pipetas graduadas de 1, 2, 10 y 25 ml.

Mechero Bunsen.

Gradillas metálicas.

Bolsas de polietileno.

Asas de nicromo.

Portaobjetos.

Tubos de ensaye de 12 x 75 mm.

Pipetas Pasteur.

Matraz Kitasato de 500 ml. con conexión para bomba de vacío.

B). MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS.

1). AGUA PEPTONADA.

Fórmula:

Peptona de gelatina.....	10 gr.
Cloruro de sodio.....	5 gr.
Agua destilada.....	1 000 ml.

Preparación:

Disolver los ingredientes en agua destilada, ajustar el pH a 7.2. Distribuir en frascos de 90, 180 ml. y tubos con 9 ml., esterilizar a 121° durante 20 minutos.

2). DILUYENTE DE PEPTONA.

Fórmula:

Peptona de gelatina.....	1 gr.
Agua destilada.....	1 000 ml.

Preparación:

Disolver los ingredientes y ajustar el pH a 7.2. Distribuir en tubos con 9 ml. y esterilizar a 121° durante 20 minutos.

3). CALDO TETRACIONATO VERDE BRILLANTE.

Fórmula:

Mezcla de peptonas.....	5 gr.
Sales biliares.....	1 gr.
Carbonato de calcio.....	10 gr.
Tiosulfato de sodio.....	30 gr.
Agua destilada.....	1 000 ml.

Preparación:

Disolver los ingredientes en agua destilada, calentar hasta ebullición, enfriar a 45º y adicionar 10 ml. de una solución 1:1000 de verde brillante, homogenizar y esterilizar a 117º (12 libras) durante 10 minutos. Antes de usar el medio agregar 20 ml. de una solución de yodo-yoduro por cada 1000 ml. de Caldo tetracionato.

4). CALDO SOYA TRIPTICASA.

Fórmula:

Peptona de caseína.....	17 gr.
Peptona de soya.....	3 gr.
Cloruro de sodio.....	5 gr.
Fosfato dipotásico.....	2.5 gr.
Dextrosa.....	2.5 gr.
Agua destilada.....	1 000 ml.

Preparación:

Disolver los ingredientes en agua destilada, homogenizar. Calentar ligeramente si fuese necesario para completar la disolución, ajustar el pH a 7.3 ± 0.2 . Distribuir en tubos con 3 ml., esterilizar en autoclave a 121º durante 15 minutos.

5). AGAR DE SULFITO Y BISMUTO.

Fórmula:

Mezcla de peptonas.....	10.000 gr.
Extracto de carne.....	5.000 gr.
Dextrosa.....	5.000 gr.
Fosfato disódico.....	4.000 gr.
Sulfato ferroso.....	0.300 gr.
Indicador de Sulfito de Bismuto.	8.000 gr.
Verde brillante.....	0.025 gr.
Agar.....	20.000 gr.
Agua destilada.....	1 000.000 ml.

Preparación:

Disolver los ingredientes en agua destilada y homogenizar. Al lograr una suspensión uniforme, calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Distribuir en

frascos estériles en zona aséptica, dejar enfriar a 45° y agitar el medio o hacer rotar los frascos para dispersar el precipitado, vaciar en las cajas sin dejar de agitarlo usando 20 ml. de medio.

6). AGAR SOYA TRIPTICASA.

Fórmula:

Peptona de caseína.....	15.0 gr.
Peptona de soya.....	5.0 gr.
Cloruro de sodio.....	5.0 gr.
Agar.....	15.0 gr.
Agua destilada.....	1 000.0 ml.

Preparación:

Disolver los ingredientes en agua. Homogenizar ajustar el pH a 7.3 ± 0.2 . Calentar agitando frecuentemente. Una vez disuelto, distribuir en tubos de 13 x 100 mm. con 3 ml. y esterilizar a 121° durante 15 minutos.

7). AGAR CUENTA ESTANDAR.

Fórmula:

Peptona de caseína.....	5.000 gr.
Extracto de levadura.....	2.500 gr.
Glucosa.....	1.000 gr.
Agar.....	15.000 gr.
Agua destilada.....	1 000.000 ml.

Preparación:

Disolver los ingredientes en agua. Homogenizar, ajustar el pH a 7.0 ± 0.1 . Calentar agitando frecuentemente hasta una disolución total. Distribuir en frascos y esterilizar a 121° durante 15 minutos.

8). AGAR DE HIERRO Y TRIPLE AZUCAR.

Fórmula:

Mezcla de peptonas.....	20.000 gr.
Cloruro de sodio.....	5.000 gr.

Lactosa.....	10.000 gr.
Sacarosa.....	10.000 gr.
Dextrosa.....	1.000 gr.
Sulfato de amonio férrico....	0.200 gr.
Tiosulfato de sodio.....	0.200 gr.
Rojo de fenol.....	0.025 gr.
Agar.....	13.000 gr.
Agua destilada.....	1 000.000 ml.

Preparación:

Disolver los ingredientes en agua destilada, homogenizar, ajustar el pH a 7.3 ± 0.2 , calentar hasta disolución. Distribuir en tubos de 13 x 100 con 3 ml. Esterilizar a 121° durante 15 minutos. Inclinar los tubos, procurando un fondo de 2 cm.

9). AGAR DE HIERRO Y LISINA.

Fórmula:

Peptona de gelatina.....	5.000 gr.
Extracto de levadura.....	3.000 gr.
Dextrosa.....	1.000 gr.
L-lisina.....	10.000 gr.
Citrato férrico amoniacal....	0.500 gr.
Tiosulfato de sodio.....	0.040 gr.
Púrpura de bromocresol.....	0.020 gr.
Agar.....	13.500 gr.
Agua destilada.....	1 000.000 ml.

Preparación:

Disolver los ingredientes en agua. Ajustar el pH a 6.7 ± 0.2 , calentar hasta una completa disolución, si es necesario ebulir durante 1 minuto. Distribuir en tubos de 13 x 100 mm. con 3 ml. Esterilizar a 121° durante 15 minutos. Inclinar los tubos procurando un fondo de 2 cm. para la picadura.

10). MEDIO MIO.

Fórmula:

Extracto de levadura.....	3.000 gr.
Peptona de gelatina.....	10.000 gr.
Peptona de caseína.....	10.000 gr.
L-ornitina.....	5.000 gr.
Dextrosa.....	1.000 gr.
Púrpura de bromocresol.....	0.020 gr.
Agar.....	2.000 gr.
Agua destilada.....	1 000.000 ml.

Preparación:

Disolver los ingredientes en agua, homogenizar. Ajustar pH a 6.5 ± 0.2 , calentar hasta una completa disolución. Distribuir en tubos de 13 x 100 mm. con 3 ml., esterilizar a 121° durante 15 minutos.

11). CALDO MALONATO.

Fórmula:

Extracto de levadura.....	1.000 gr.
Sulfato de amonio.....	2.000 gr.
Fosfato dipotásico.....	0.600 gr.
Fosfato monopotásico.....	0.400 gr.
Cloruro de sodio.....	2.000 gr.
Malonato de sodio.....	3.000 gr.
Glucosa.....	0.250 gr.
Azul de bromotimol.....	0.025 gr.
Agua destilada.....	1 000.000 ml.

Preparación:

Disolver los ingredientes en agua. Ajustar el pH a 6.7 ± 0.1 . Distribuir en tubos de 13 x 100 mm. con 3 ml., esterilizar a 121° durante 15 minutos.

12). AGAR DE Mac. CONKEY.

Fórmula:

Peptona o gelisato.....	17.000 gr.
Proteosa peptona # 3 ó polipeptona.	3.000 gr.

Lactosa.....	10.000 gr.
Sales biliares.....	1.500 gr
Cloruro de sodio.....	5.000 gr.
Rojo Neutro.....	0.030 gr.
Cristal violeta.....	0.001 gr.
Agar.....	13.500 gr.
Agua destilada.....	1 000.000 ml.

Preparación:

Disolver los ingredientes en agua, homogenizar. Ajustar el pH a 7.1 ± 0.2 . Calentar hasta una completa disolución. Esterilizar a 121° durante 15 minutos. El medio estéril fundido se enfría a 45° colocándolo en cajas de Petri con 20 ml.

13). AGAR EOSINA AZUL DE METILENO.

Fórmula:

Peptona de gelatina.....	10.000 gr.
Lactosa.....	10.000 gr.
Fosfato de potasio.....	2.000 gr.
Azul de metileno.....	0.065 gr.
Eosina.....	0.400 gr.
Agar.....	15.000 gr.
Agua destilada.....	1 000.000 ml.

Preparación:

Disolver los ingredientes en agua por ebullición y agitación continua. Dejar enfriar a 50° . Ajustar el pH a 7.1 ± 0.1 . Distribuir en frascos y esterilizar a 121° durante 15 minutos. Enfríar a 45° , vaciar a cajas Petri con 20 ml.

14). AGAR DE TERGITOL 7.

Fórmula:

Heptadecil sulfato de sodio..	0.100 gr.
Mezcla de peptonas.....	5.000 gr.
Extracto de levaduras.....	3.000 gr.

Lactosa.....	10.000 gr.
Azul de bromotímol.....	0.025 gr.
Agar.....	15.000 gr.
Agua destilada.....	1 000.000 ml.

Preparación:

Disolver los ingredientes en agua, ajustar el pH a 6.9 \pm 0.1. Disolver al calor agitando continuamente, distribuir en frascos y esterilizar a 121° durante 15 minutos. Dejar enfriar a 45°, agitar y vaciar a cajas de Petri un volumen de 20 ml. de medio.

15). AGAR PARA INDUCCION DE FASES.

Fórmula:

Peptona de caseína.....	10.000 gr.
Gelatina bacteriológica.....	80.000 gr.
Extracto de carne.....	3.000 gr.
Cloruro de sodio.....	5.000 gr.
Agar.....	4.000 gr.
Agua destilada.....	1 000.000 gr.

Preparación:

Disolver la gelatina en 600 ml. de agua destilada y los demás ingredientes en los 400 ml. restantes, calentar ambos por separado hasta una disolución completa, mezclarlos y hervir durante un minuto. Distribuir en tubos de 13 x 100 mm. con 3 ml. Esterilizar a 121° durante 15 minutos.

REACTIVOS.

1). SOLUCION VERDE BRILLANTE AL 0.1%.

Fórmula:

Verde brillante.....	0.1 gr.
Agua destilada.....	100.0 ml.

2). REACTIVO DE KOVAC.

Fórmula:

P-dimetil-aminobenzaldehído....	5.0 gr.
Alcohol amílico.....	75.0 ml.
Acido clorhídrico concentrado..	25.0 ml.

3). SOLUCION DE YODO YODURO.

Fórmula:

Cristales de yodo.....	6.0 gr.
Yoduro de potasio.....	5.0 gr.
Agua destilada.....	20.0 ml.

4). SOLUCION SALINA FISIOLÓGICA.

Fórmula:

Cloruro de sodio.....	8.5 gr.
Agua destilada.....	1 000.0 ml.

Preparación:

Disolver el cloruro de sodio en agua destilada, ajustar pH a 7.0, distribuir en frascos y esterilizar a 121° durante 20 minutos.

Si se utiliza para preparar diluciones de antisueros "O" y "H" se le adiciona 0.6 ml. de formaldehído por 100 ml. de Solución salina fisiológica.

Los siguientes antisueros fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Referencias Epidemiológicas (INRE):

ANTISUEROS POLIVALENTES PARA ANTIGENOS "O" DE SALMONELLA. Comprenden los grupos A-E y A-I.

ANTISUEROS ESPECIFICOS DE GRUPO SOMÁTICO.

ANTISUEROS PARA LA DETERMINACION DE ANTIGENOS "H" O FLAGELARES.

Para el objetivo 1: Determinar el número de salmonelas en la carne cruda de cerdo del comercio.

1. Se adquirieron de carnicerías de la ciudad de Guadalajara 14 muestras de carne cruda de cerdo fraccionada, tal como se expende al público.
 2. Se transportaron al laboratorio en bolsas de polietileno sin refrigerar y se analizaron no después de 1 h. de su recolección.
 3. En cada caso, los cortes se frotaron por fuera de la bolsa durante unos tres minutos entre las manos para distribuir la carga microbiana, incluida la propia Salmonella.
4. Se efectuaron los siguientes estudios:
- A) Recuento de Salmonella por la técnica de Número Más Probable (NMP)----- (14, 22, 29).
 - B) Identificación serológica de las cepas nativas de la carne según el esquema de Edwards y Edwing (12).
 - C) Recuento de bacterias mesófilas aerobias (BMA) por la técnica de vaciado en placa (14).
- A) Para el recuento de Salmonella (NMP) se procedió de acuerdo a la siguiente técnica (Esquema 1).
- a) Pesar 20 g. de carne homogenizada y adicionar 180 ml. de Agua peptonada al 1%. Licuar durante 60 seg.
 - b) Preparar diluciones decimales en Agua peptonada al 1% hasta dilución 10^{-2} y en Caldo nutritivo hasta dilución 10^{-5} . Los límites esperados de detección de salmonelas requieren combinaciones de diluciones que pueden seleccionarse como se indica en el esquema 2.
 - c) Disponer de tres tubos por dilución, así preparada e incubar todos tubos a 35°C durante 24 h. (preenriquecimiento).
 - d) Transferir 1 ml. de cada tubo a 9 ml. de Caldo tetratoniado verde brillante (CTVB) e incubar en baño maría a $43^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}$ durante 24 h.----- (enriquecimiento).
 - e) Inocular cada tubo en placa de Agar sulfito de bismuto (SB) con técnica de aislamiento e incubar a 35°C durante 24-48 h.

- f) Seleccionar las colonias aisladas sospechosas de Salmonella, una por tubo positivo. Inocular por picadura y estría un tubo con Agar de hierro y triple azúcar (TSI), Agar de hierro y lisina (LIA). En caso de no encontrar colonias aisladas reseñar en Agar tergitol -7, incubar a 35°C durante 24 h. y continuar con las colonias sospechosas desarrolladas (identificación bioquímica).
 - g) Identificar los serotipos de las cepas de Salmonella como se indica más adelante.
 - h) Computar el NMP de Salmonella por gramo de carne.
- B) Se efectuó como se indica en el punto 3 de la metodología para el objetivo 3-pag. 19.
- C) Recuento de bacterias mesófilas aerobias:
- a) A partir del homogenizado utilizado para el preenriquecimiento de Salmonella preparar diluciones decimales de las muestras en Agua peptonada al 1%.
 - b) Colocar 1 ml. de cada dilución en caja de Petri y adicionar de 12 a 15 ml. de Agar cuenta estándar (ACE) fundido y mantenido en baño maría a 45°C; incorporar el inóculo al medio por rotación de la placa alternando movimientos circulares y rectos de izquierda a derecha.
 - c) Incubar a 35°C durante 48 h.
 - d) Seleccionar las placas que contengan entre 30 y 300 colonias y contarlas.
 - e) Computar en número de BMA por gramo de carne.

Para el objetivo 2: Determinar el patrón de sobrevivencia del microorganismo en el alimento almacenado en congelación.

1. De acuerdo con los resultados de la densidad de salmonelas contadas en el objetivo anterior, se seleccionaron 2 muestras que contenían 1 500 y 7 salmonelas por gramo.
2. Las muestras obtenidas del comercio se analizaron de inmediato y una porción de aproximadamente 3.0 kg. se almacenó en congelación

(-15°C), en tanto se disponía de resultados cuantitativos. Una vez determinado el NMP de Salmonella se seleccionaron aquellas que permitían mejor, por su densidad, efectuar el estudio de sobrevivencia.

3. Periódicamente (cada una o dos semanas) se retiró del producto almacenado 50 g. y se determinó en cada ocasión, por duplicado, el NMP de Salmonella siguiendo la técnica descrita en el punto 4A de la metodología del objetivo 1.

En un caso el estudio se extendió a 22 semanas y en el otro a 42 semanas.

Para el objetivo 3: Estudiar el comportamiento de los serotipos nativos a lo largo de la congelación de la carne.

1. Tanto al inicio como al término de cada período de recuentos, se identificaron los serotipos prevalentes en las muestras.
2. Para este efecto se seleccionó 1 colonia por placa positiva proveniente de cada uno de los tubos incluidos en cada serie.
3. Identificación serológica. Consta de 5 etapas.

I. Aglutinación polivalente (Esquema 3). El antisuero utilizado contiene anticuerpos para el antígeno O, somático de Salmonella.

- a) Colocar una gota de solución salina fisiológica (SSF) en un portaobjeto.
- b) Tomar un inóculo de un cultivo de 24 h. en TSI y homogenizarlo con la gota de SSF.
- c) A la gota de suspensión preparada unir una gota del antisuero somático polivalente mediante movimientos de inclinación del portaobjeto repetidas veces. La prueba positiva se observa por aglutinación.

d) Proceder según aglutinación somática.

II. Aglutinación somática (Esquema 4).

- a) Sembrar la cepa en Agar soya tripticosa (AST) en placa e incubar a 35°C durante 24 h.
- b) La determinación del grupo somático sólo se deferencia de la aglutinación polivalente en la utilización de antisueros somáticos específicos. Reportar el antisuero que aglutine en un minuto como máximo.
- c) Si aglutina con más de un antisuero realizar un tratamiento

térmico.

III. Tratamiento térmico (Esquema 5).

- a) Sembrar la cepa en AST en placa e incubar a 35°C durante 24 h.
- b) Toma un inóculo y homogenizarlo en 0.5 ml. de SSF.
- c) Ebulir en baño maría durante 10 min.
- d) Centrifugar a 3 500 rev./10 min.
- e) Decantar y agregar 2 gotas de SSF.
- f) Aglutinar inmediatamente con los antisueros somáticos.

IV. Aglutinación flagelar (Esquema 6).

- a) Inocular la cepa en 6 ml. de Caldo soya tripticasa (CST) e in cubar a 35°C durante 24 h.
- b) Adicionar 6 ml. de SSF formalinizada al 0.6%.
- c) Pipetear en tubo: 0.1 ml. del suero flagelar específico de grupo más 0.9 ml. de suspensión formalinizada e incubar en baño maría a 50° durante 1 h.

d) Observar aglutinación:

Reacción positiva. 2 fases, reportar serotipos según las ta -
blas de clasificación.

1 fase, sembrar en Agar para inducción de flagelos.

Reacción negativa.

- Sembrar la cepa en Agar MacConkey ó Agar de eosina y azul de metileno e incubar a 35°C durante 24 h.
- Sembrar pruebas bioquímicas (TSI, LIA , Citrato de Si -
mmons, M10, Caldo malonato, RM-VP).
- Aglutinación flagelar.

V. Inducción de flagelos (Esquema 7).

- a) Fundir y enfriar el medio para inducción de flagelos a 45°C.
- b) Adicionar 0.1 ml. del antisuero flagelar con el que aglutinó la cepa diluido 1:10 con SSF estéril y homogenizar, dejar so -
lificar.
- c) Inocular por picadura (profundidad aproximadamente 2 mm.) la cepa a inducir e incubar a 35°C durante 24 h.
- d) Positivo: desarrollo en el seno del medio.
 - Desechar aproximadamente la mitad del agar donde se observa desarrollo con bomba de vacío.

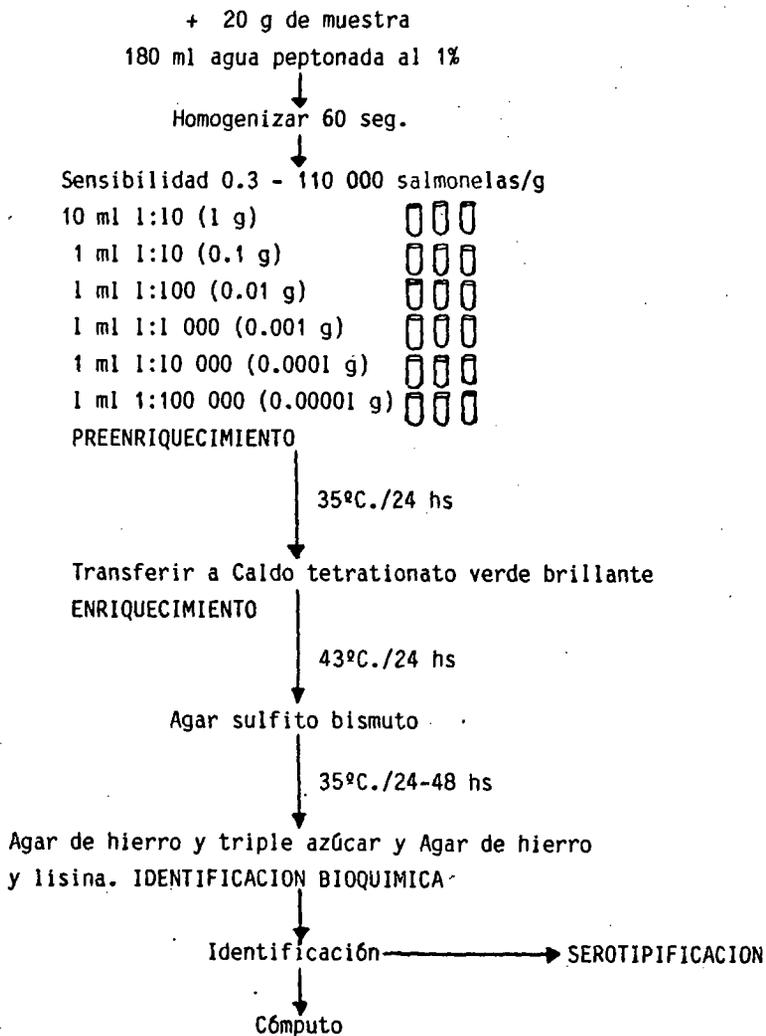
-Sembrar en CST e incubar a 35°C durante 24 h.

-Aglutinación flagelar (con antisueros correspondientes al flagelo inducido).

Negativo: Sin desarrollo, repetir inducción de flágelos.

Esquema 1

NMP DE SALMONELLA EN LA CARNE



Esquema 2

GUIA PARA LA SELECCION DE DILUCIONES EN EL CALCULO DE NMP.

Tres diluciones de tres tubos cada una.

Dilución	g ó ml de dilución por tubo	Límites
Directo	10	
1:10	10	0.03 - 11
1:10	1	0.3 - 110
1:100	1	3 - 1 100
1:1 000	1	30 - 11 000
1:10 000	1	

Cuatro diluciones de tres tubos cada una.

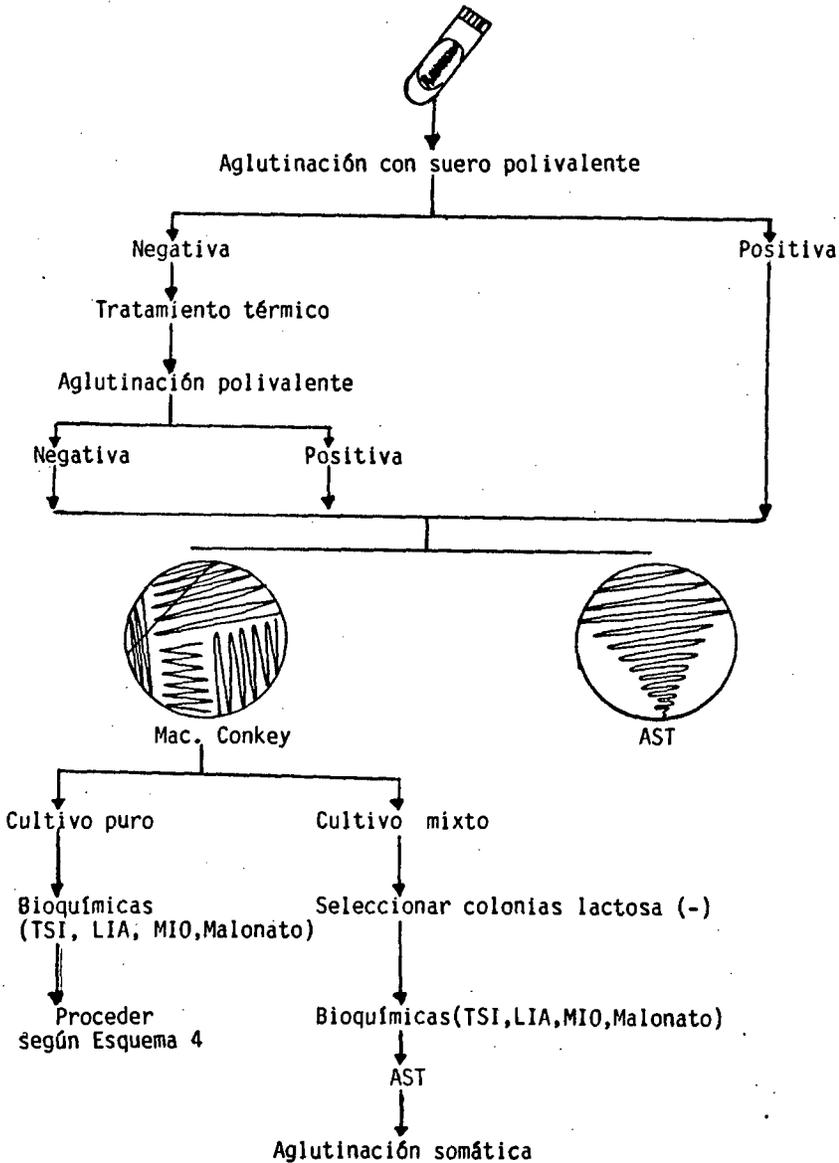
Directo	10	
1:10	10	0.03 - 110
1:10	1	0.3 - 1 100
1:100	1	3 - 11 000
1:1 000	1	
1:10 000	1	

Cinco diluciones de tres tubos cada una.

Directo	10	
1:10	10	
1:10	1	0.03 - 1 100
1:100	1	0.3 - 11 000
1:1 000	1	
1:10 000	1	

Esquema 3

AGLUTINACION CON SUERO POLIVALENTE



Esquema 4

AGLUTINACION SOMATICA

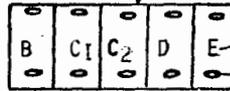


Mac. Conkey

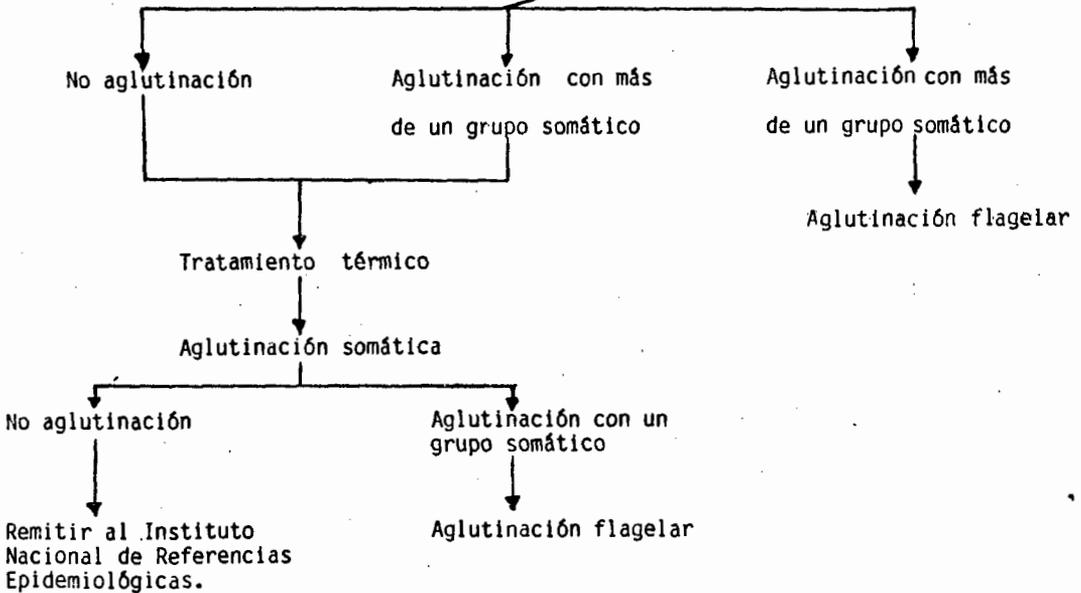


AST

Aglutinación somática



S.S.F.+ Cepa



* Antisueros somáticos

TRATAMIENTO TERMICO



AST

Inocular 0.5 ml de S.S.F.

Ebullición en baño maría por 10 min.

Centrifugar a 3 500 rev./10 min.

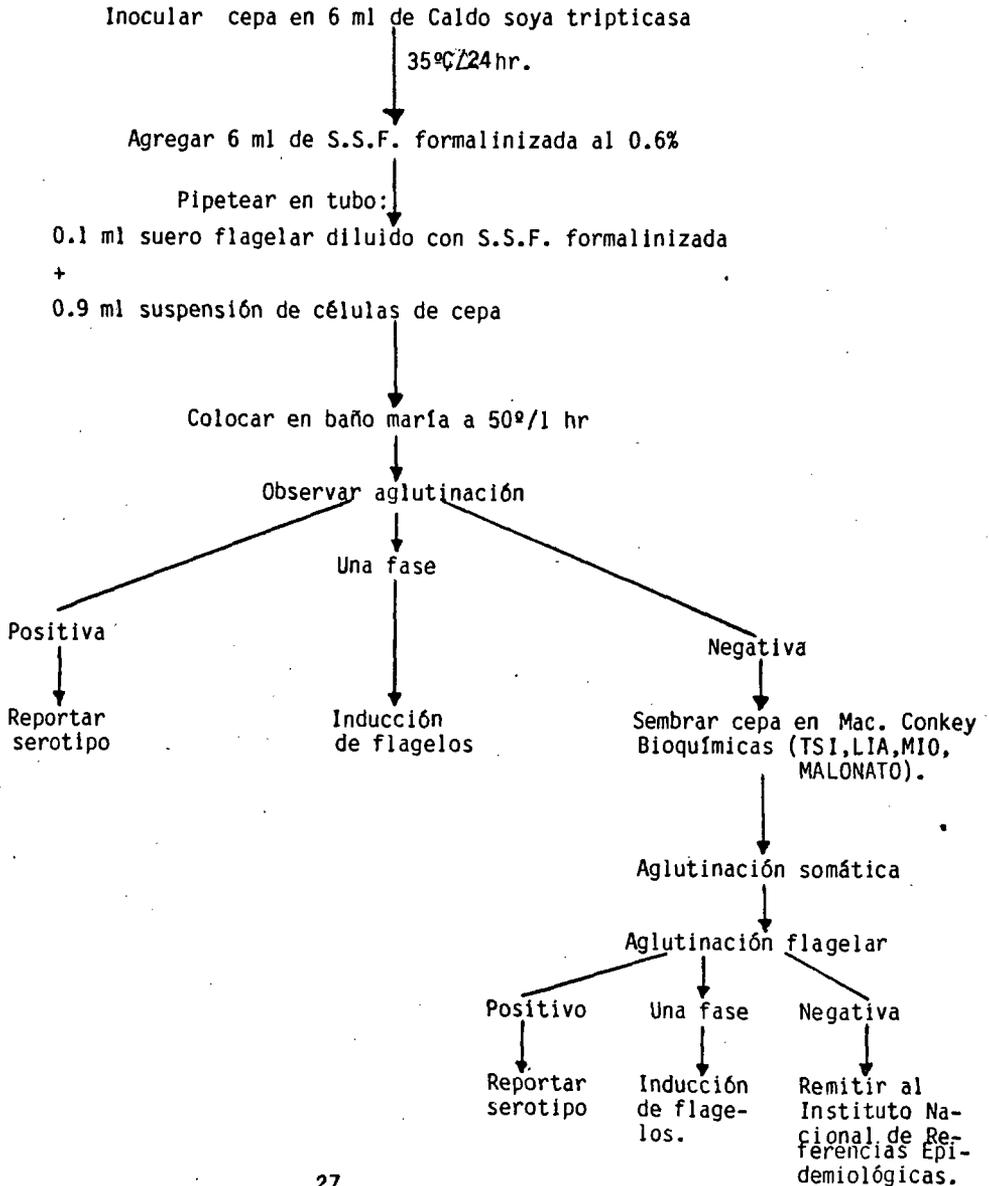
Decantar

Agregar 2 gotas de S.S.F.

Aglutinación somática

Esquema 6

AGLUTINACION FLAGELAR



Esquema 7

INDUCCION DE FLAGELOS

Medio de inducción fundido y enfriado a 45°C

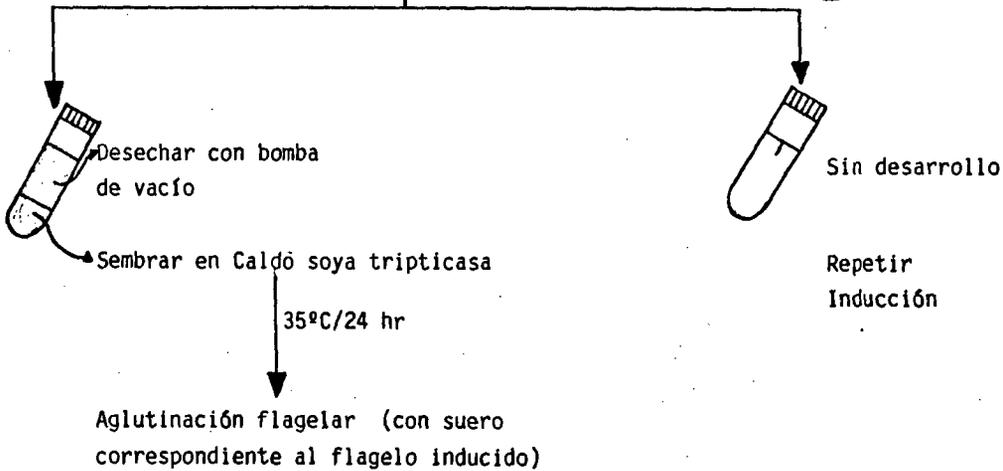
+

0.1 ml de suero flagelar con el que aglutinó
la cepa diluido 1:10 con S.S.F. estéril.

Mezclar perfectamente

Dejar solidificar

Inocular por picadura (profundidad de 2mm) la cepa a inducir
35°C/24 hr (dejar tapa floja)



RESULTADOS Y DISCUSION

Por regla general para el control sanitario de los alimentos el problema que se plantea en relación con los microorganismos patógenos potencialmente presentes, consiste en ponerlos de manifiesto a través de muestras representativas. Se trata de una prueba cualitativa, que sin embargo adquiere un cierto carácter de semicuantitativa al referir su hallazgo a un tamaño determinado de muestra. Si el patógeno se encuentra en números mas bien pequeños (menos de 1/g), será necesario analizar volúmenes mayores de muestra para llegar a un resultado positivo. El interés primario es evitar un resultado falso negativo, que resulta difícil de definir por la razón expuesta. Desde el punto de vista normativo el problema se refiere a la definición del tamaño de muestra que es necesario examinar para tomar una decisión de aceptación o rechazo del lote de alimento bajo estudio. El reporte negativo a Salmonella, carece de validez aún con la aplicación de una técnica probadamente eficiente, si no se especifica el tamaño de la muestra examinada. Hay que tomar en cuenta además que la tolerancia para bacterias patógenas como la Salmonella, Shigella y Campylobacter, en todos los casos es cero. Es decir, no puede liberarse un lote de alimento frente a un reporte positivo a cualquiera de estos patógenos, independientemente del tamaño de la muestra examinada.

Lo anterior es aplicable a alimentos procesados para su control sanitario, en cuyo caso deben implementarse tratamientos que aseguren la inactivación de estos patógenos.

En relación con los alimentos crudos, como la carne, no es práctico manejar el problema en los mismos términos. La ecología de las bacterias enteropatógenas, las condiciones de crianza y explotación de los animales comestibles aún en óptimas condiciones sanitarias con la tecnología y recursos actualmente disponibles, no permiten aún producir en gran escala tales alimentos hasta el consumidor exentos del todo de estos patógenos.

El recuento de bacterias patógenas en los alimentos, sin embargo, tiene interés no solo académico sino valor práctico. Es elemental que en la medida en que se restrinja el número de microorganismos indeseables a una cocina o a una planta de alimentos, se limitan los riesgos de contaminación cruzada, y las operaciones de saneamiento se plantean y ejecutan de acuerdo a la magnitud de esos riesgos.

Para estudiar el comportamiento de un microorganismo sujeto a trata-

mientos que puedan afectar su viabilidad es conveniente diseñar tales estudios en términos de reducción del número de microorganismos.

Finalmente, el conocimiento, en el caso de la Salmonella, no sólo del número de células viables presentes, sino de la variedad de serotipos ponen de manifiesto la multiplicidad de fuentes de contaminación del alimento y en algunos casos las oportunidades para su multiplicación.

En general el higienista rápidamente se familiariza con la incidencia de Salmonella en el medio ambiente y en los alimentos a través de las encuestas que comúnmente se llevan a cabo en muchos países. Pero no tiene idea del nivel de contaminación del producto por este microorganismo. Situación similar se da en el caso del epidemiólogo que en principio atiende sus objetivos de diagnóstico y control epidemiológico de los brotes mediante las mismas pruebas cualitativas. Tan sólo ante esta situación de emergencia en los brotes, cuando se desea conocer la posible dosis infectante y se cuenta con alimento confiable para el estudio, se lleva a cabo el recuento del patógeno.

En este trabajo efectuamos el recuento de la salmonela en muestras de carne cruda de cerdo adquiridas en carnicerías. Debido a que no se tiene la más remota idea del resultado numérico es indispensable en cada caso incluir hasta seis diluciones, cada una con tres tubos, para llegar a una cifra consistente y evitar el reporte de "más de" un cierto número de microorganismos por gramo. En estas condiciones resulta abrumador el trabajo para procesar una muestra, lo que contrasta con la simplicidad de la técnica de vaciado en placa.

La técnica de NMP debió ser implementada en este estudio por dos razones: el bajo número eventualmente presente que llega a ser menor a 1/g y la abundancia de la flora asociada que sabemos ocurre en la carne cruda y, que no permiten el recuento directo en placas de medios aún tan selectivos como el Agar sulfito bismuto y Agar verde brillante.

La tabla 1 presenta los resultados de las 14 muestras de carne cruda examinadas, con las correspondientes cifras resumidas de bacterias mesófilas aerobias (BMA) y de Salmonella por gramo. Todas las muestras resultaron positivas con cifras para Salmonella de 0.15-4 000/g y una mediana de 20. Esta positividad, como es de extrañar, dada las condiciones sanitarias en las que se obtiene y comercializa el producto. Ya se mencionó la cifra

de 87.5% que se detectó en un estudio previo en este mismo laboratorio (14). Es notable la dispersión de los valores: 3 muestras con menos de 1/g, 7 con 7-25/g, 1 con 90 y 3 con más de 1 000. Los límites de BMA se encuentran entre 200,000 y 200'000,000 por gramo. La cifra mediana de 2'000,000 de BMA sugiere productos faltos de frescura (Tabla 2).

Como en otras comunicaciones (1, 4, 25, 27) el serotipo derby (Tabla 1) se recuperó con más frecuencia (en 9 de 14) y agona en 5 de 14. Por otra parte encontramos 3 muestras con 6 y 7 serotipos distintos, de manera coincidente las tres más contaminadas que ponen de manifiesto la exposición a múltiples fuentes de contaminación del producto. Y en el otro extremo, 4 con un sólo serotipo, no obstante haber estudiado 9-12 colonias por muestra. Algunos de los serotipos corresponden a los generalmente considerados de mayor patogenicidad y que más frecuentemente se recuperan de productos cárnicos como el typhimurium, enteriditis, heidelberg y agona. Otros, como el meleagridis, y derby, son recuperados con mucho menos frecuencia del material clínico.

El 24% de las cepas corresponden al serotipo derby y 14% a meleagridis, que junto con heidelberg casi cubren el 50% de los 19 serotipos identificados (Tabla 3).

Dada la laboriosidad y demanda de material requerido para evaluar la viabilidad de la salmonela en la carne congelada, sólo llevamos a cabo 2 estudios. Una muestra contenía un número más bien elevado de Salmonella (1 500/g) y otra un número relativamente discreto (7/g).

Es bien sabido la falta de precisión y aún exactitud de la técnica de NMP para el recuento de microorganismos, que tiene su contraparte en su alta sensibilidad. El problema de la falta de precisión se acentúa en el caso de la carne por la abundante y diversidad de flora competitiva presente y por la heterogénea distribución del patógeno en el alimento. Todas estas limitaciones las tratamos de superar manejando duplicado de muestras para cada período programado de análisis.

La muestra con alto contenido de Salmonella (muestra 2) exhibe una clara tendencia a la inactivación del patógeno, no obstante resultados en algunas etapas a lo largo del estudio que se apartan notoriamente de esa tendencia. Con más de 1 000 salmonelas por gramo al inicio del estudio, al cabo de 42 semanas el microorganismo no había sido erradicado, si bien el

número había llegado a un nivel de sólo 2.3/g (Tabla 4).

La otra muestra de carne (muestra 1) se mantuvo con un contenido de salmonelas discretamente fluctuante pero casi siempre con más de 1 salmone-la/g durante las 22 semanas que duró el estudio. No se advierte una caí da franca en el número de salmonelas desde el principio hasta el final del estudio como lo apreciamos con la muestra anterior (Tabla 5). Por lo de-- más, no era difícil observar caídas acentuadas en los recuentos, dado que se partió de un producto con un número más bien bajo de salmonelas.

Como es sabido, los microorganismos sujetos a congelación exhiben una disminución en su vitalidad y número, más acentuado al inicio del proceso cuyo efecto se va haciendo más lento con el tiempo (20). Es posible que los rendimientos de Salmonella viable en el segundo experimento correspon dan a las células más resistentes al efecto letal de la congelación, como ocurre en las 2 últimas evaluaciones efectuadas en el primer experimento; la magnitud de las cifras es similar en ambos casos.

Debido a que utilizamos la técnica de NMP con preenriquecimiento debe mos descartar, resultados falsos negativos por inhibidores de células da ñadas al ser inoculadas directamente en los medios selectivos, como ocurre cuando se efectúan recuentos de células dañadas directamente en medios se- lectivos. Con la técnica de preenriquecimiento que utilizamos proporciona mos oportunidad a tales bacterias dañadas para su recuperación y ulterior desarrollo en los medios selectivos.

Como se señaló anteriormente la técnica de NMP se caracteriza por una precisión muy restringida. La incongruencia entre los resultados numéricos obtenidos en duplicados de muestras y las alternancias que observamos en elevaciones y descensos alternados a lo largo del estudio habrá que expli- carlos por un efecto agregado de esa falta de precisión inherente a la técnica, y por la desigual distribución de la población de salmonelas en las muestras. A pesar de estas alternancias, la tendencia al decremento en el primer estudio es muy evidente.

El comportamiento de los serotipos de Salmonella a lo largo de la con gelación de las 2 muestras de carne se ilustran en las Tablas 6 y 7.

En la muestra uno se recuperaron nueve serotipos entre los 162 aisla- mientos seleccionados e identificados como indicamos en el capítulo de ma- terial y métodos (Tabla 8). El serotipo heidelberg se aisló del 62% de

todos los aislamientos, y en los 7 períodos en los que se extendió el estudio. Hay poca duda que se trata de una contaminación proveniente de una sola fuente primaria.

En el otro extremo, los serotipos remo, anatum, bredeney, hadar y typhimurium probablemente provienen más bien, dada su esporádica frecuencia, de fuentes secundarias. Es posible que el serotipo london acompañara al heidelberg como contaminante primario. Entre los dos cubren el 80% de los aislamientos. La eventualidad de que los 9 serotipos provengan de un mismo animal, y la diferencia en la frecuencia con la que se aíslan se deba a una distinta capacidad de sobrevivencia o multiplicación, o a una diferencia en el número originalmente presente en la carne, una cuestión puramente especulativa.

En la muestra dos por otra parte podemos identificar hasta 12 serotipos obtenidos en los 7 subestudios o períodos comprendidos en el experimento. Nuevamente 2 serotipos acumulan la mayor parte de los aislamientos, el agona y anatum con 62.5% (Tabla 9). Diez de los 12 serotipos se recuperaron al inicio y en el primer período del estudio; 5 de ellos sólo al inicio (Tabla 8). Nuevamente un serotipo, el agona, se mantuvo presente a lo largo de la investigación, algunos como el muenster, infantis, typhimurium, saintpaul y san diego, sólo se identificaron en una de las etapas, y en ellas en una sola ocasión.

La multiplicidad de serotipos en ambas muestras sugiere un manejo sanitario del producto pobre en extremo, que propicia contaminaciones cruzadas y probablemente oportunidad para su multiplicación. En la literatura se consignan casos de multiplicidad de serotipos a partir de las heces de un mismo individuo (14).

Los resultados del presente estudio ponen de manifiesto la baja calidad sanitaria de la carne cruda de cerdo que se ofrece al público en su comercio al menudeo.

TABLAS Y GRAFICAS

Tabla 1

Bacterias mesófilas aerobias, Número Más Probable de Salmonella y serotipos identificados en 14 muestras de carne cruda de cerdo.

Muestra	BMA / g	NMP <u>Salmonella</u> /g	Serotipos
1	4×10^6	0.9	<u>agona</u> (4) <u>derby</u> (3)
2	1×10^6	9.0	<u>derby</u> (10)
3	2×10^6	0.15	<u>derby</u> (10)
4	1×10^6	15.0	<u>meleagridis</u> (12)
5	3×10^6	23.0	<u>meleagridis</u> (9)
6	2×10^5	0.7	<u>derby</u> (1) <u>schwarzengrund</u> (1)
7	7×10^5	20.0	<u>typhimurium</u> (3) <u>derby</u> (2) <u>worthington</u> (1)
8	5×10^6	20.0	<u>derby</u> (3) <u>agona</u> (1) <u>anatum</u> (1) <u>minnessota</u> (1)
9	5×10^7	1 500.0	<u>derby</u> (5) <u>agona</u> (5) <u>enteritidis</u> (2) <u>benfica</u> (1) <u>infantis</u> (1) <u>worthington</u> (1)
10	2×10^8	4 000.0	<u>worthington</u> (10) <u>montevideo</u> (6) <u>agona</u> (1) <u>derby</u> (1) <u>enteritidis</u> (1) <u>livingstone</u> (1)

(Continuación Tabla 1)

Muestra	BMA / g	NMP <u>Salmonella</u> /g	Serotipos
11	1x10 ⁷	7.0	<u>heidelberg</u> (8) <u>infantis</u> (3) <u>hadar</u> (2)
12	9x10 ⁵	20.0	<u>infantis</u> (5) <u>heidelberg</u> (3) <u>cleveland</u> (2) <u>remo</u> (1)
13	5x10 ⁶	90.0	<u>anatum</u> (7) <u>infantis</u> (3) <u>agona</u> (2) <u>heidelberg</u> (1)
14	2x10 ⁶	2 000.0	<u>give</u> (7) <u>typhimurium</u> (6) <u>enteritidis</u> (2) <u>london</u> (2) <u>agona</u> (1) <u>derby</u> (1) <u>ohio</u> (1)

BMA= Bacterias mesófilas aerobias

NMP= Número Más Probable

()= Frecuencia del serotipo seleccionando una cepa por tubo positivo.

Tabla 2

Contenido de Bacterias mesófilas aerobias y Salmonella
en 14 muestras de carne cruda de cerdo.

	BMA/g	<u>Salmonella/g</u>
Máxima	2×10^8	4 000
Mínima	2×10^5	0.15
\bar{X}	2×10^7	550
Md	2×10^6	20

BMA= bacterias mesófilas aerobias

\bar{X} = media aritmética

Md = mediana.

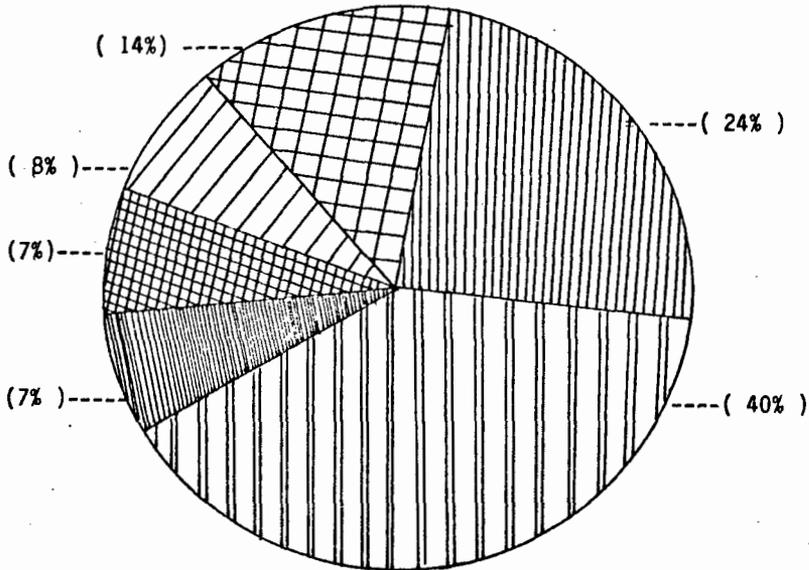
Tabla 3

Frecuencia de serotipos de Salmonella en 14 Muestras de carne cruda de cerdo.

Serotipo	Frecuencia*	%
<u>derby</u>	36	24.0
<u>meleagridis</u>	21	14.0
<u>heidelberg</u>	12	8.0
<u>infantis</u>	11	7.3
<u>worthington</u>	11	7.3
<u>agona</u>	9	6.0
<u>typhimurium</u>	9	6.0
<u>anatum</u>	8	5.3
<u>give</u>	7	4.6
<u>london</u>	7	4.6
<u>montevideo</u>	6	4.0
<u>enteritidis</u>	3	2.0
<u>cleveland</u>	2	1.3
<u>hadar</u>	2	1.3
<u>livingstone</u>	2	1.3
<u>minnesota</u>	1	0.6
<u>ohio</u>	1	0.6
<u>remo</u>	1	0.6
<u>schwarzengrund</u>	1	0.6
	<u>150</u>	<u>100.0</u>

* Frecuencia del serotipo seleccionando una cepa por tubo positivo en las series del NMP.

Serotipos de Salmonella en 14 muestras de carne cruda de cerdo.



-  S. derby
-  S. meleagridis
-  S. heidelberg
-  S. infantis
-  S. worthington
-  Otros 15

Tabla 4

Viabilidad de Salmonella en la Muestra 2 de carne cruda congelada de cerdo.

Semanas en congelación	NMP de Salmonella/g de carne		X
	A	B	
0 ¹	1 500.0	--	
1	9 000.0	--	
3	2 300.0	--	
10	400.0	--	
16	20.0	4.0	12.0
18	90.0	150.0	120.0
22	230.0	230.0	230.0
25	230.0	400.0	310.0
27	400.0	--	
30	23.0	15.0	19.0
34	15.0	7.0	11.0
37	2.1	4.0	3.0
42	2.3	2.3	2.3

NMP= Número Más Probable.

A,B= duplicado de alicuota

X = media aritmética

1 = análisis en fresco

-- = no analizada.

Tabla 5

Viabilidad de Salmonella en la Muestra 1 de carne cruda congelada de cerdo.

Semanas en congelación	NMP de <u>Salmonella</u> /g de carne		X
	A	B	
0 ¹	7.0	--	
4	2.1	1.5	1.8
7	2.0	2.0	2.0
13	1.5	0.23	0.86
17	0.4	11.0	5.7
19	2.2	0.4	1.3
22	1.0	2.2	1.6

NMP= Número Más Probable

A,B= duplicado de alícuota

X = media aritmética

f = análisis en fresco

-- = no analizada.

Tabla 6

Serotipos de Salmonella aislados en la Muestra 1 de carne cruda congelada de cerdo durante 22 semanas.

Semanas en congelación	Serotipos
0 ¹	A <u>heidelberg</u> (8); <u>infantis</u> (3); <u>hadar</u> (2).
4	A* <u>heidelberg</u> (7). B* <u>heidelberg</u> (7).
9	A <u>heidelberg</u> (11). B <u>heidelberg</u> (6).
13	A <u>heidelberg</u> (6); <u>infantis</u> (2); <u>bredeney</u> (1); <u>london</u> (1); <u>typhimurium</u> (1). B <u>heidelberg</u> (2); <u>london</u> (1); <u>typhimurium</u> (1).
17	A <u>heidelberg</u> (6); <u>infantis</u> (6); <u>london</u> (4). B <u>heidelberg</u> (18); <u>london</u> (7).
19	A <u>worthington</u> (7); <u>heidelberg</u> (6); <u>london</u> (2); <u>infantis</u> (1); <u>remo</u> (1). B <u>london</u> (6); <u>heidelberg</u> (2); <u>remo</u> (2); <u>infantis</u> (1); <u>bredeney</u> (1).
22	A <u>heidelberg</u> (10); <u>london</u> (4). B <u>heidelberg</u> (12); <u>london</u> (4); <u>anatum</u> (2); <u>worthington</u> (1).

1 = análisis en fresco

A,B= duplicado de alícuota

() = frecuencia del serotipo seleccionando una cepa por tubo positivo.

Tabla 7

Serotipos de Salmonella aislados en la Muestra 2 de carne cruda congelada de cerdo durante 42 semanas.

Semanas de congelación	Serotipos
0 ¹	A <u>agona</u> (5); <u>enteritidis</u> (2); <u>benfica</u> (1); <u>worthington</u> (1); <u>infantis</u> (1).
16	A* <u>agona</u> (2); <u>anatum</u> (1); <u>muenster</u> (1); <u>saintpaul</u> (1).
	B* <u>agona</u> (2); <u>anatum</u> (1); <u>heidelberg</u> (1); <u>thomasville</u> (1).
22	A <u>agona</u> (4); <u>anatum</u> (2); <u>heidelberg</u> (2); <u>derby</u> (1).
30	A <u>agona</u> (4); <u>thomasville</u> (2); <u>anatum</u> (1); <u>benfica</u> (1); <u>derby</u> (1).
34	A <u>agona</u> (3); <u>typhimurium</u> (1); <u>thomasville</u> (1); <u>worthington</u> (1).
37	A <u>give</u> (2); <u>anatum</u> (1); <u>agona</u> (1).
	B <u>agona</u> (3); <u>give</u> (1).
42	A <u>agona</u> (4); <u>anatum</u> (2).
	B <u>agona</u> (4); <u>sandiego</u> (1); <u>thomasville</u> (1).

1 = análisis en fresco

A,B= duplicado de alícuota

() = frecuencia del serotipo seleccionando una cepa por tubo positivo.

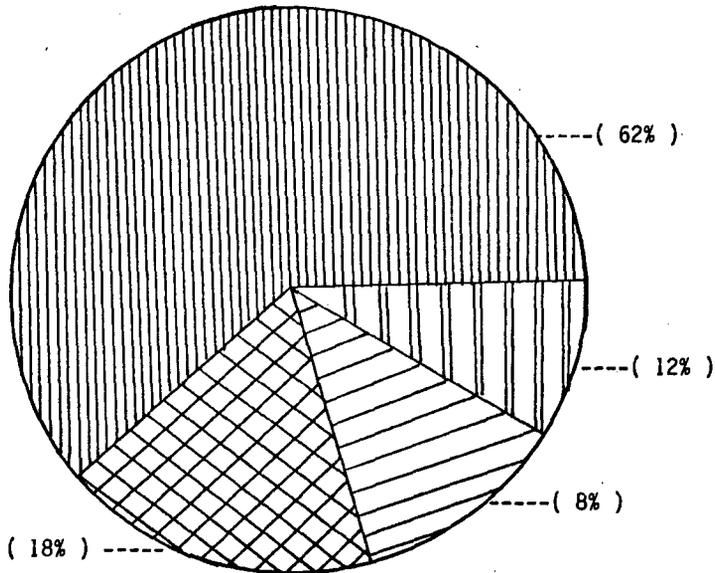
Tabla 8

Frecuencia de serotipos de Salmonella en la Muestra 1
de carne cruda congelada de cerdo.

Serotipo	Frecuencia*	%
<u>heidelberg</u>	101	62.34
<u>london</u>	29	17.90
<u>infantis</u>	13	8.02
<u>worthington</u>	8	4.93
<u>remo</u>	3	1.85
<u>anatum</u>	2	1.23
<u>bredeney</u>	2	1.23
<u>hadar</u>	2	1.23
<u>typhimurium</u>	<u>2</u>	<u>1.23</u>
	162	100.00

* Frecuencia del serotipo seleccionando una cepa por tubo positivo en las series del NMP.

Serotipos de Salmonella en la muestra uno de carne
cruda congelada de cerdo.



-  S. heidelberg
-  S. london
-  S. infantis
-  Otros 17

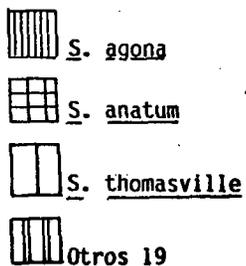
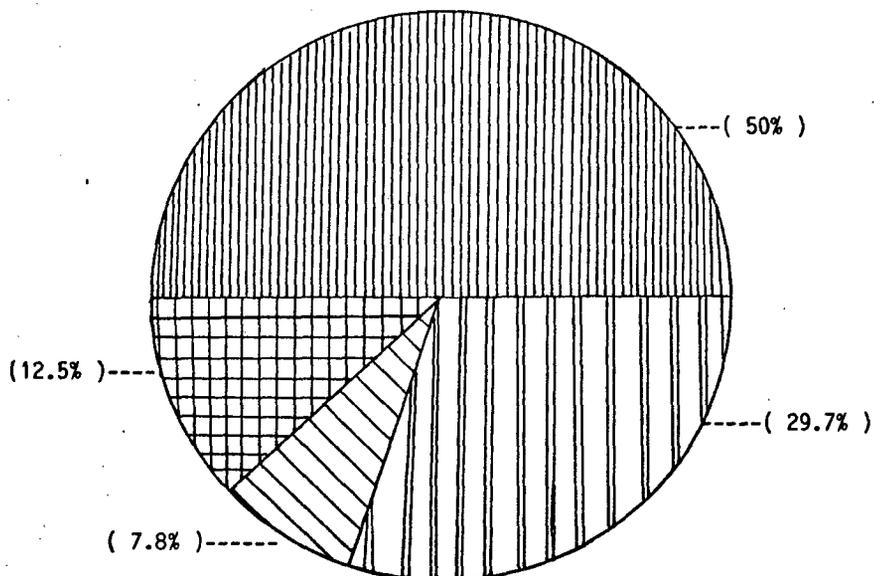
Tabla 9

Frecuencia de serotipos de Salmonella en la Muestra 2 de carne cruda congelada de cerdo.

Serotipo	Frecuencia*	%
<u>agona</u>	32	50.0
<u>anatum</u>	8	12.5
<u>thomasville</u>	5	7.8
<u>heidelberg</u>	3	4.6
<u>give</u>	3	4.6
<u>benfica</u>	2	3.1
<u>derby</u>	2	3.1
<u>enteritidis</u>	2	3.1
<u>worthington</u>	2	3.1
<u>infantis</u>	1	1.5
<u>typhimurium</u>	1	1.5
<u>muenster</u>	1	1.5
<u>saint-paul</u>	1	1.5
<u>san diego</u>	1	1.5
	<u>64</u>	<u>100.0</u>

* Frecuencia del serotipo seleccionando una cepa por tubo positivo en las series del NMP.

Serotipos de Salmonella en la muestra dos de carne cruda congelada de cerdo.



CONCLUSIONES:

1. Las 14 muestras de carne cruda de cerdo analizadas por la técnica de NMP resultaron positivas a Salmonella. Los valores mínimo y máximo fueron 0:15 - 4 000 células/g.
2. En 4 de las 14 muestras se recuperó un sólo serotipo, pero en 3 hasta 6 y 7 serotipos.
3. Los serotipos derby, meleagridis y heidelberg se recuperaron con mayor frecuencia en las 14 muestras de carne, y cubren cerca del 50% dentro de los 19 serotipos identificados.
4. Almacenada la carne en congelación el microorganismo se mantiene viable después de 42 semanas, por lo menos en la muestra estudiada que contenía originalmente 1 500 salmonelas/g. No obstante el número tiende a disminuir y mantenerse viable en el nivel cercano a 1-2 salmonelas/g.
5. En la muestra 1, el serotipo heidelberg se identificó en 62% de todos los aislamientos y en los 7 períodos en los que se extendió el estudio; probablemente se trata de una contaminación proveniente de una sola fuente primaria.
6. En la muestra 2, un serotipo el agona se mantuvo presente a lo largo de la congelación, en tanto que los serotipos muenster, infantis, typhimurium, saintpaul y san diego sólo se identificaron en una de las etapas y en una sola ocasión.
7. El conocimiento del número de salmonelas presentes en un alimento contribuye a tener una imagen más completa y real de la ecología del microorganismo, de su peligrosidad, de la eficiencia alcanzada con la aplicación de medidas de control del saneamiento y de la epidemiología del padecimiento al que da lugar.
8. La multiplicidad de serotipos de Salmonella en la carne de cerdo sugie-

re un manejo sanitario del producto pobre en extremo, que propicia contaminaciones cruzadas ulteriores.

9. El conocimiento de la prevalencia de determinados serotipos en una región o país, sea entre casos humanos, alimentos, animales, o en el medio ambiente, facilita la tarea al higienista cuando pretende diagnosticar el origen de un brote o establecer la importancia de determinado sustrato o alimento como fuente común de infección humana o animal.

RESUMEN

Se efectuó el recuento de Salmonella por la técnica de NMP en 14 muestras de carne cruda de cerdo colectadas en carnicerías de la ciudad de Guadalajara. Según los resultados obtenidos se seleccionaron dos muestras para estudiar la sobrevivencia, viabilidad y determinar los serotipos nativos en la carne congelada a menos 15°. Las 14 muestras resultaron positivas a Salmonella con cifras entre 0.15-4 000/g; con una mediana de 20. Los valores mínimo y máximo de BMA fueron 200,000 y 200'000,000.00/g. Se identificaron 19 serotipos en las 14 muestras; los serotipos derby, meleagridis y heidelberg casi cubren el 50% de 150 cepas identificadas. En el estudio de sobrevivencia, la muestra que contenía 1 500 salmonelas/g exhibe una clara tendencia a la inactivación del patógeno durante 42 semanas, encontramos 9 serotipos. El serotipo heidelberg se aisló en 62% del total de las cepas. La muestra con 7 salmonelas/g se mantuvo hasta con 1 célula/g a las 22 semanas, identificamos 12 serotipos. El serotipo agona estuvo presente durante todo el estudio. La sobrevivencia de Salmonella en la carne congelada le da vigencia al riesgo de contaminación cruzada hacia productos procesados o cocinados. Los resultados del presente estudio ponen de manifiesto la baja calidad sanitaria de la carne cruda de cerdo que se ofrece al público en su comercio al menudeo.

BIBLIOGRAFIA:

- 1 . Becerril, P., Bessudo, D., y González, A. 1979. Búsqueda de portadores de Salmonella en diferentes grupos de la población de la Ciudad de México. Rev. Lat-amer. Microbiol. 21:115-119.
- 2 . Becerril, P., González, A. y Bessudo, D. 1978. Investigación Epidemiológica de un brote de gastroenteritis por Salmonella enteritidis serotipo heidelberg en México, 1975. Sal. Púb. Méx. 20:51-56.
- 3 . Bello Pérez, L. A. y Ortíz Dillanes, D. M. Pérez Memije, E. y Castro Domínguez. V. 1987. Salmonella en carnes crudas: un estudio en localidades del estado de Guerrero. IV Reunión Anual de Microbiología Sanitaria. Agua y Alimentos.
- 4 . Bessudo, D. 1986. Serotipos de Salmonella identificados en México entre 1974 y 1981. Comunicación personal.
- 5 . Bessudo, D., González, A., González, C., Becerril, P., Guzmán, B. J. y Herrera, G. 1976. Estudio de un brote explosivo de gastroenteritis producido por Salmonella enteritidis serotipo infantis. Rev. Inv. Sal. Pub. 36:215-226.
- 6 . Bryan, F. L. 1968. What the Sanitarian Should Staphylococci and Salmonellae in non diary products II, Salmonellae. J. Milk. Food Technol. 31:131-140.
- 7 . Bryan, F. L. 1980. Foodborne diseases in the United States associated with meat and poultry. J. Food Prot. 43:140-150.
- 8 . Cacciarelli, M. A., Stringer, W. C., Anderson, M. E. y Naumann, H. D. 1980. Vacuum Packaged pork loins. J. Food. Prot. 46:231-234.
- 9 . Cohen, M. L. and Blake, P. A. 1977. Hands in food borne Salmonellosis outbreaks: 1963-1975. J. food Prot. 40:798-800.
- 10 . Cherry, W. B., Schergo, M. and Weaver R. H. 1983. The occurrence of Salmonella in retail meats products., Am. J. Hyg. 37: 211-215.
- 11 . Desroiser, N. W. 1984. "Elementos de Tecnología de alimentos". Ed. CECSA. 332.
- 12 . Edwards, P.R., Ewing, W. H. 1972. "Identification of Enterobacteriaceae". Ed. Burgess Publishing Company. 146-205.
- 13 . Emiswiler, B., Kotula, A. W. and Rough, D. K. 1976. Bactericidal

effectiveness of three chlorine sources used in beef carcass washing.

J. Animal Sc:42:1445-1450.

14. Fernández Escartín, E. 1981. "Microbiología Sanitaria. Agua y Alimentos" . Vol. 1. 690-700.
15. Fernández Escartín, E., Saldaña Lozano, J. y Mireles Hernández, C. 1983. Incidencia de Salmonella en carnes crudas. Influencia del enriquecimiento en la recuperación del microorganismo. Rev. Lat-amer. Microbiol. 25:263-269.
16. Fernández Escartín, E., y Mireles Hernández, C. 1983. Fuentes de contaminación de Salmonella en empacadoras de carne. XIV Congreso Nacional de Microbiología.
17. Flowers, Russel S. P. H. D., 1988. Scientific status summary. Bacterias associated with foodborne diseases. Food Technol. 42:181-200.
18. Forrest, John C., Abeñle, Elton D., Hedrick B., Harold, D., Max, Merkel Robert. A. 1979. "Fundamentos de Ciencia de la carne". Ed. Acricbia. 197-202.
19. Gosh, A. C. 1972. An epidemiological study of incidence of Salmonella in pigs. J. Hyg. Camb. 74:271-282.
20. ICMSF. 1980. "Ecología Microbiana de los Alimentos". Vol. II. Ed. Acricbia Zaragoza. 333-409.
21. Lillard, H. S. 1989. Incidence and recovery of Salmonella and other bacteria from commercially processed poultry carcass at selected pre and post-evisceration steps. J. food Prot. 52:82-91.
22. Mac Faddin, J. E. 1984. "Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia química". Ed. Médica Panamericana. 59-308.
23. Nabbut, Nassim H. 1989. Salmonellae isolation, occurrence and distribution in Lebano. Dairy and Food Sanitation. 8:8-10.
24. Padilla Casillas. S.L. 1986. Tesis profesional. Importancia epidemiológica de los serotipos de Salmonella aislados a partir de agua y alimentos en la ciudad de Guadalajara. Universidad de Guadalajara, Facultad de Ciencias Químicas.
25. Rodríguez Cantú, A., Garza Salgado, H. Becerril Montes, P. 1988. Estudio sobre investigación de serotipos de Salmonella en carne fresca procedente del rastro de la ciudad de Monterrey, N. L., V Reunión Anual de Microbiología de Agua y Alimentos.

26. Saldaña Lozano J., Fernández Escartín, E., Rodríguez García, O. y Montiel Falcón, A. 1988. Sobrevivencia de Salmonella en carne cruda con gelada de cerdo. V Reunión Anual de Microbiología Sanitaria Agua y Alimentos.
27. Sepulveda González., E., Becerrill Montes, P. y Márquez Hernández, T. 1988. Reporte de serotipos de Salmonella aislados en el Laboratorio Estatal de Salud Pública en Nuevo León, de diferentes alimentos en el período 1982-1988. V Reunión Anual de Microbiología Sanitaria Agua y Alimentos.
28. Speck, M. L. and Ray B. 1977. Effects of freezing and storage on microorganisms in frozen food. A Review J. Food Prot. 40:336-346.
29. Speck, M. L. 1976. "Compendium of methods for the microbiological examination of foods". 2da. Edición. Edit. Alpha intersociety. 152-162.
30. Tay. Samuel C. K., Robinson, Robert. A. and Pullen, Michael M. 1989. Salmonella in the mesenteric lymph nodes y cecal contents of slaughtered sows, J. food Prot. 52:202-203.
31. Tood, E. C. D. 1976. The first anual summary of foodborne disease in Canada. J. Milk food Technol. 39:426-431.
32. Tood, E. C. D. 1983. foodborne disease in Canada a 5 year summary. J. Food Prot. 5:650-657.
33. Tompkin. R. B. 1976. Detection of Salmonella in food past,present and future Activities and attitudes of the food industry. J. Milk food. Technol. 39:359-361.