

1 9 8 6 - 2

Reg. No. 079370983

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

---

**CUCBA**



**BIBLIOTECA CENTRAL**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ACTIVIDAD DE SALMONELLA  
EN REQUESONES**

**ANGEL JAVIER GUTIERREZ VALDIVIA**

ACTIVIDAD DE SALMONELLA  
EN REQUESONES

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

Aún, no le he puesto nombre

La entiendo y no;  
pero cuán perfecta  
y bella es.

Cuando más cosas  
de ella descubro;  
más ignorancia ostento,  
y lejos de guiarme  
por ella,  
soy presa de la ambición  
y del descontento.

La miro y quiero imitarla;  
pero los hechos muestran  
mi ceguera,  
mi posición  
y mi desoído.

¡ Y aún así !  
Sigue mi tácito afán  
de dominar la ...Naturaleza.

Angel Javier Gutiérrez Valdivia

Agradezco el apoyo, paciencia y  
comprensión que le han dado a -  
mi vida, padres, hermanos, maestr  
tros, compañeros y amigos. Así -  
mismo, a todas aquellas personas,  
que de alguna manera, contribuye  
ron a la realización del presente  
trabajo. Especialmente a:

Eduardo Fernández Escartín,  
Rogelio Camacho García,  
Eduardo Vázquez Vals y  
Graciela Macías Salcedo

## C O N T E N I D O

INTRODUCCION	1
MATERIAL	4
METODOLOGIA	6
RESULTADOS Y DISCUSION	14
CONCLUSIONES	30
RESUMEN	31
BIBLIOGRAFIA	32

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

El interés por llegar a un control efectivo de la salmonelosis se refleja en los numerosos estudios que constantemente se llevan a cabo para conocer la incidencia de la Salmonella en los alimentos que se preparan, consumen e importan en cada país. Los hallazgos observados, varían de acuerdo al tipo de alimento en cuestión, a las condiciones sanitarias en que se maneja y desde luego con la calidad de trabajo de laboratorio desarrollado (17).

Actualmente, la OMS y la FAO han implementado programas de vigilancia que tienden a lograr el control de dicho padecimiento, efectuando una interpretación comparativa de datos notificados por los países miembros; facilitando, gracias a la difusión, sus investigaciones a nivel nacional e indicando los efectos que ciertos contaminantes de origen biológico ejercen en la salud (3).

A través de estos programas se ha detectado que la incidencia de infecciones por S. typhi y S. paratyphi B en muchos sitios está disminuyendo, y que la frecuencia en algunos serotipos de salmonelas está aumentando. Además, varios alimentos se han vinculado a la salmonelosis en el hombre con mayor frecuencia que otros, como es el caso de leche cruda y subproductos lácteos, leche en polvo, mariscos, harinas, levaduras y en mayor proporción, carnes frías, aves de corral y sus productos y alimentos cocinados (3,4 y 7).

Así, en 1972, Australia, Francia, Israel, Nueva Zelandia, Escocia y Yugoslavia reportaron 23 brotes cuyo agente etiológico fue S typhi. Ese mismo año Grecia, Noruega, Suecia, Finlandia, Escocia y Yugoslavia notificaron 18 brotes de fiebre paratifoidea. Datos procedentes de veinte centros nacionales de Europa revelaron que la proporción de brotes no tifoídicos varió mucho (del 7 al 23 %) en países que notificaron intoxicación colectiva por alimentos contaminados (3 y 4).

En 1976, en Gran Bretaña una epidemia causada por S. dublin afectó a más de 700 personas de ambos sexos. El alimento involucrado fue leche cruda. Así mismo en Yugoslavia, el consumo de helados y pasteles de crema contaminados con S. typhimurium provocó numerosos brotes infecciosos ( 15 y 16 ).

Es evidente pues que las fuentes de la salmonelosis son -- principalmente agua y alimentos, que implican básicamente la -- vía oral como puerta de entrada al organismo ( 3 y 7 ).

El empleo de técnicas para detectar, aislar e identificar -- al microorganismo, ha sido un factor importante en el control -- efectivo del padecimiento en países desarrollados, relacionán -- dose con el aporte de datos que hacen a los programas de vigi -- lancia ( 3 ).

La situación, en países subdesarrollados suele ser distinta -- de aquellos, ya que las técnicas de laboratorio carecen de efi -- ciencia para detectar, aislar e identificar al patógeno, lo -- que se refleja en el mínimo aporte de datos a dichos programas. Nuestro país no es la excepción, a pesar de que cuenta con un -- Programa Nacional de Salud, son pocos los casos reportados, en -- tre los que se destacan los siguientes: El brote ocurrido en -- 1972, en la Ciudad de México y estados vecinos que afectó a -- cerca de 15 mil personas de todas las edades pero más notable -- mente al grupo de 5 a 29 años. La causa del brote fue S. typhi ( 13 ). Un año después, en el Centro Deportivo de la Cd. de -- México el puré de papa vehiculizó a S. infantis, provocando -- 57 casos. Y recientemente, Delgado Benítez y Col. ( 5 ), des -- cribieron un brote gastroentérico en mujeres, en octubre de -- 1985, en la Casa Hogar Orientación para Mujeres de la misma -- ciudad. Se reportaron 53 casos de los que se logró aislar S. ty -- phimurium en un 36.4 %. El alimento involucrado fue el jamón -- preparado un día anterior ( 12 y 14 ).

Los productos lácteos como el queso han jugado un papel im -- portante en la incidencia de la salmonelosis. Halverson ( 15 ) demostró que la epidemia ocurrida en cuatro condados de Cali -- fornia, tuvo su origen en diferentes variedades de quesos --

hechos a partir de leche pasteurizada. Más del 90% de los pacientes habían ingerido uno o varios de estos quesos.

En Canadá Gauchier y Forey ( 15 ) describieron una epidemia de fiebre tifoidea causada por el consumo de quesos Cheddar hechos de leche cruda.

Muchas variedades de quesos no son comunes en países desarrollados, pero la información puede ser útil para conocer la actividad del germen en el producto. Los quesos frescos no pasteurizados llamados en nuestro medio panelas son un ejemplo. Se obtienen siguiendo una vía artesanal y estudios hechos por Fernández E.E. y Col. muestran la incidencia de Salmonella en el producto en un 18% ( 8, 9 y 16 ).

Durante la elaboración de estos quesos el suero lácteo -- sirve de materia prima en la obtención de un subproducto, el requesón, que resulta de la precipitación de algunos sólidos solubles, proteínas y minerales contenidos en el suero cuando se somete a ebullición por dos horas aproximadamente. Es un alimento de considerable capacidad nutricional ( cerca de 10 % de proteínas ), de consumo exclusivamente nacional y que hasta el momento se desconoce su implicación en las infecciones e intoxicaciones gastroentéricas, aunque se dispone de alguna información sobre la frecuencia de Salmonella ( 26.7 % ) en el producto muestreado de mercados públicos de la Cd. de Guadalajara ( 10 ).

Dado que el requesón es producido con leche cruda y en condiciones sanitarias deficientes es obvio pensar en un elevado riesgo a contaminarse por bacterias enteropatógenas, lo cual se extiende a la etapa de comercialización donde el alimento se expone a un manejo deficiente y al medio ambiente.

En el presente trabajo se pretende conocer la actividad de una cepa de Salmonella typhimurium en el requesón en función al número de Salmonella contaminante, la temperatura de almacenamiento y la frescura del producto al tiempo de la contaminación con el patógeno.

## M A T E R I A L

- 1.- Balanza analítica con sensibilidad de 0.0001 g
- 2.- Balanza granataria con sensibilidad de 0.1 g
- 3.- Baño maría  $43^{\circ}\text{C} \pm 0.5$  y  $45^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$
- 4.- Estufa de incubación de  $20^{\circ}$  y  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$
- 5.- Termómetro
- 6.- Contador de colonias tipo Quebec
- 7.- Microscopio estereoscópico
- 8.- Potenciómetro Corning 125
- 9.- Agitador Vortex
- 10.- Mechero Fisher y Bunsen
- 11.- Gradillas metálicas con capacidad de 40 y 72 tubos
- 12.- Soporte Universal
- 13.- Pinzas para bureta
- 14.- Abatelenguas estériles
- 15.- Asa de nicromo
- 16.- Frascos estériles
- 17.- Varillas de vidrio con diametro de 4mm y 15 cm de longitud con los últimos 3 cm doblados en ángulo recto y extremos redondeados
- 18.- Tubos de 13 x 100 y 16 x 150
- 19.- Vasos de precipitado de 50 ml
- 20.- Matraces con capacidad de 250 y 150 ml
- 21.- Bureta de 50 ml
- 22.- Pipetas bacteriológicas de 1,2,5 y 10 ml estériles
- 23.- Pipetas Pasteur estériles
- 24.- Cepas de S. typhi y S. typhimurium proporcionadas por el Centro Nacional de Referencias de Enfermedades Tropicales SSA.

## MEDIOS DE CULTIVO

- 24.- Agar cuenta estandar ( ACE )

- 26.- Agar nutritivo ( AN )
- 27.- Agar bilis rojo violeta ( ABRV )
- 28.- Agar papa dextrosa adicionado de 100 mcg/ml de ampicilina sódica y 60 mcg/ml de rosa de Bengala (APD)
- 29.- Medio de APN
- 30.- Caldo tetracionato verde brillante ( CTVB )
- 31.- Agar sulfito y bismuto ( ASB )

#### SOLUCIONES Y REACTIVOS

- 32.- Actidiona al 0.1% en agua destilada ( Up )
- 33.- Ampicilina sódica al 22% en agua destilada ( pentrexil, Bristol )
- 34.- Diluyente de peptona en solución acuosa al 0.1%
- 35.- NaOH 0.1 N
- 36.- HCl 0.1 N
- 37.- Nitrito de Sodio al 6 % en agua destilada
- 38.- Solución acuosa de verde brillante a concentración 1:1 000
- 39.- Solución de yodo-yoduro
- 40.- Sulfadiazina ( Sophia, laboratorios )
- 41.- Sulfato de polimixina B al 6.03 5 en solución acuosa
- 42.- Indicador de fenolftaleína
- 43.- Rosa de Bengala al 0.6 % en agua destilada ( Sigma )
- 44.- Solución salina

## M E T O D O L O G I A

El trabajo cubrió cuatro áreas relacionadas con la actividad de Salmonella en requesón:

- I) Conocimiento de la flora microbiana del producto
- II) Actividad de S. typhi en requesón recién fabricado, almacenado a 20 y 30°C.
- III) Actividad de S. typhimurium en requesón recién fabricado, contaminado previamente con residuos de producto del comercio y almacenado a 20°C.
- IV) Actividad de S. typhimurium en requesón contaminado en diferentes periodos durante su expendio.

### I. Conocimiento de la flora microbiana del producto.

Para este propósito el requesón se adquirió directamente de una fábrica seleccionada al azar entre los productores, cuidando que su ubicación fuese lo más cerca posible y no se dificultara el traslado de muestras subsecuentes al laboratorio. Una vez ahí, al producto se le investigó el contenido de bacterias mesofílicas aerobias, organismos coliformes, bacterias lácticas y levaduras tanto al tiempo de recepción como después de 3, 6, 9 y 24 horas de almacenamiento, tanto a 20 como a 30°C (Esquema 1).

La metodología de análisis se realizó siguiendo las indicaciones señaladas en los manuales correspondientes (12) :

- a) Colocar 10 g de muestra en 90 ml. de diluyente de peptona en un frasco de 250 ml. estéril, que se ha mantenido a baño maría en 45°C.
- b) Agitar vigorosamente para constituir la dilución 1:10 de la muestra.
- c) Continuar las diluciones decimales transfiriendo 1 ml de cada dilución en 9 ml del mismo diluyente.
- d) Transferir 1 ml. de la dilución seleccionada\* a caja petri

\* ( Hasta la dilución 1:10 000 ).

estéril e incorporar el medio de cultivo correspondiente para cada grupo microbiano (Tabla A) por separado, fundido y mantenido a 45<sup>0</sup>C.

- e) Dejar solidificar e incubar en las condiciones de tiempo y temperatura que se indican en la Tabla A para cada grupo microbiano.
- f) Almacenar la muestra a 20 y 30<sup>0</sup>C  $\pm$  1<sup>0</sup>, en bolsas de polietileno para evitar la pérdida de humedad.
- g) Repetir los recuentos al cabo de los periodos antes mencionados.

## II. Actividad de S.typhi en requesón recién fabricado, almacenado a 20 y 30<sup>0</sup>C.

En este estudio se elaboró el producto en el laboratorio siguiendo la metodología similar a la observada por los fabricantes:

- a) Llevar a ebullición el suero lácteo obtenido de una quesería.
- b) Mantener el tratamiento por dos horas y dejar enfriar a 50<sup>0</sup>C.
- c) Se separan sólidos lácteos en la superficie del suero que se van retirados con el uso de una coladera ordinaria dejando escurrir dentro de un recipiente el exceso de líquido.
- 1) Evitando la contaminación por polvo y otras fuentes, dejar enfriar a 25<sup>0</sup>C y contaminar con una suspensión de Salmonella typhi ( Esquema II ).
- 2) La suspensión se separa cultivando el germen en caldo soya -- tripticasa a 35<sup>0</sup>C  $\pm$  2<sup>0</sup>, 18-24 horas y efectuar diluciones decimales en solución salina hasta obtener una concentración próxima a la estimada para cada experimento ( Se estima en 10<sup>9</sup>/ml el contenido del microorganismo de cultivo a 24 horas ).
- 3) Incorporar el inóculo ( 1 ml de la dilución 1:10<sup>7</sup> ) al alimento y homogenizar con abatelenguas estériles. Distribuir en bolsas de polietileno y almacenar a 20 y 30<sup>0</sup>C.
- 4) Efectuar los recuentos microbianos al cabo de las 0, 3, 6 y 24 horas, tanto de organismos coliformes, bacterias lácticas como el germen contaminante, utilizando la técnica y el medio de cultivo correspondiente para cada grupo microbiano ( Tabla A ).

5) Determinar pH y acidez al alimento.

pH.- La muestra se suspende en agua previamente hervida en una proporción 1:5 y se le determina el pH con un potenciómetro Corning 125.

Acidez.- Titular una suspensión de la muestra en agua previamente hervida en proporción 1:5 con una solución de NaOH 0.1 N, utilizando como indicador fenolftaleína.

III) Actividad de S. typhimurium en requesón recién fabricado, contaminado previamente con residuos de producto del comercio y almacenado a 20°C.

Para este estudio se recurrió tanto a sitios de fabricación ( Queserías ) como de comercio ( Mercados Públicos ) - para obtener el producto previo a la inoculación del enteropatógeno, el alimento fresco colectado de queserías, se contaminó discreta y moderadamente con residuos de producto del comercio, auxiliándose de abatelenguas estériles. -- ( Esquema III ).

La contaminación discreta se obtiene incorporando tres partes requesón fresco por una del comercio y la moderada; tres partes de requesón fresco por dos del comercio. Cada una de estas muestras se trata de la siguiente manera:

a) Contaminar por separado con dos concentraciones celulares de S. typhimurium ( 100 y 10 000 ufc\*/g ).

b) Homogenizar cada submuestra con abatelenguas estériles y colocar en bolsas de polietileno.

c) Almacenar a 20°C.

d) Efectuar recuentos microbianos al cabo de las 0, 6 y 24 horas tanto al germen contaminante como a organismos coliformes, bacterias lácticas y levaduras, empleando la técnica y el medio correspondiente ( Tabla A ).

e) Determinar pH y acidez a la muestra como se describió anteriormente.

IV. Actividad de S. typhimurium en requesón contaminado en diferentes periodos durante su expendio.

Esta parte del trabajo incluye tres estadíos de frescura del producto al tiempo de contaminarlo con la Salmonella:

\* ( Unidades formadoras de colonias ).

- 1) Recién preparado en quesería
- 2) De 24 horas de almacenamiento
- 3) De 72 horas de almacenamiento

1.- Recién preparado

Una vez la muestra en el laboratorio se procesa de la siguiente forma:

- a) Tres partes equivalentes se inoculan con diferentes concentraciones del germen\* 50, 500 y 5 000 ufc/g respectivamente
- b) Homogenizar y colocar en bolsas de polietileno
- c) Almacenar a 20<sup>0</sup>C
- d) Investigar el contenido de organismos coliformes, bacterias lácticas, levaduras y Salmonella contaminante tanto a las 0,3, 6 y 24 horas
- e) Determinar pH y acidez al alimento

2.- En este caso, el producto se adquiere de una fábrica estableciendo el tiempo previo de almacenamiento 24 horas. El tratamiento a la muestra es similar que el dado a la anterior, exceptuando una concentración celular del germen ( 50 ufc/g ) y la inclusión de un periodo ( 9 horas ) en los recuentos microbianos.

3.- La muestra es obtenida de un mercado público estableciendo su almacenamiento previo; de 72 horas. En el laboratorio el producto se contamina con el patógeno en una concentración de 1 000 ufc/g ( 1 ml de la dilución 1:10<sup>6</sup> ). A diferencia de los dos ensayos anteriores se almacena a 20 y 30<sup>0</sup>C y en cada periodo del recuento microbiano; 0,6 y 24 horas, se le determina pH a las muestras.

NOTA: El traslado de muestras del sitio de fabricación al laboratorio se efectuaba en frascos estériles y en ocasiones en bolsas de polietileno, a temperatura menor que la ambiente. En tanto que las obtenidas de mercados públicos se trasladaban a temperatura ambiente.

\* ( 0.5 ml de las diluciones 1:10<sup>7</sup>, 1:10<sup>6</sup> y 1:10<sup>5</sup> ).

T A B L A A

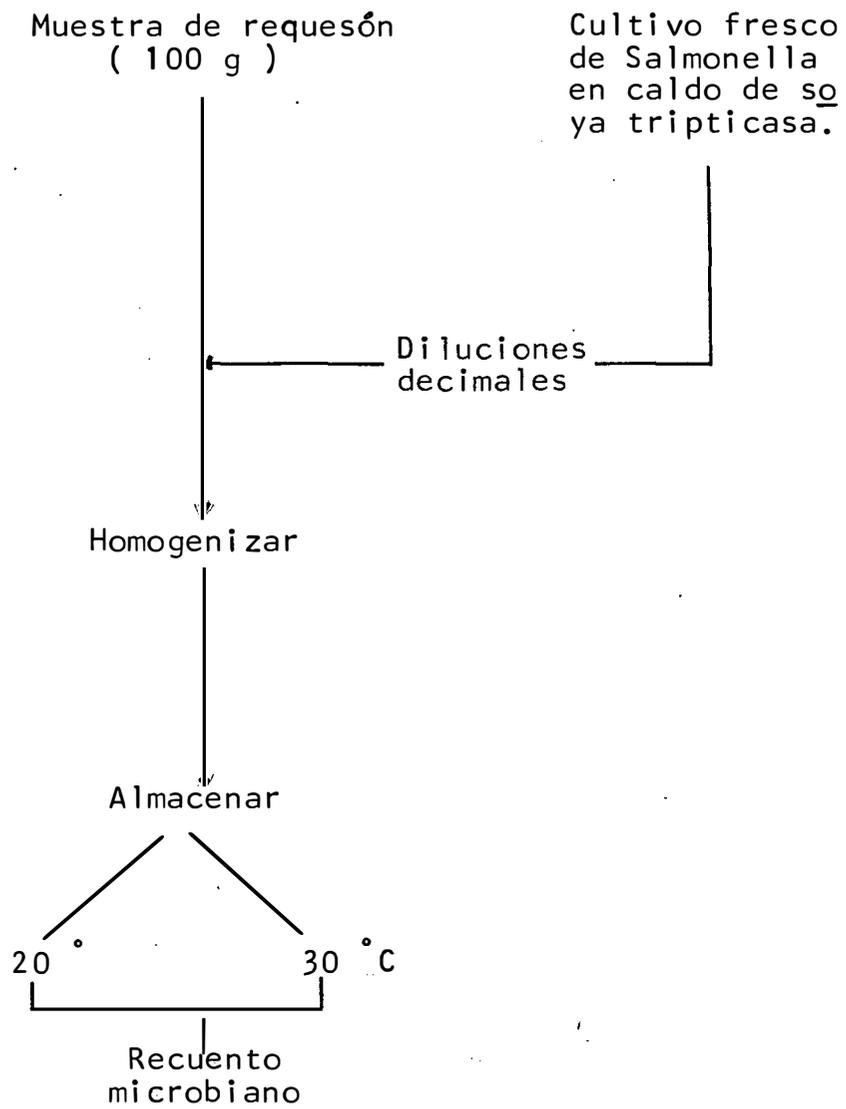
Metodología para el recuento de grupos microbianos

Grupo microbiano	Técnica	Medio de cultivo	Incubación	
			Tiempo	Temperatura
B. M. A.	V. P.	ACE	48 horas	35 °C
O: C.	V. P.	ABRV	24 "	35 °
Lácticos	E. S.	APN	48 "	35 °
Levaduras	V. P.	APD	72 "	20 °
<u>Salmonella</u>	V. P.	ASB	24 "	35 °
	N. M. P.	CTVB	24 "	43 °

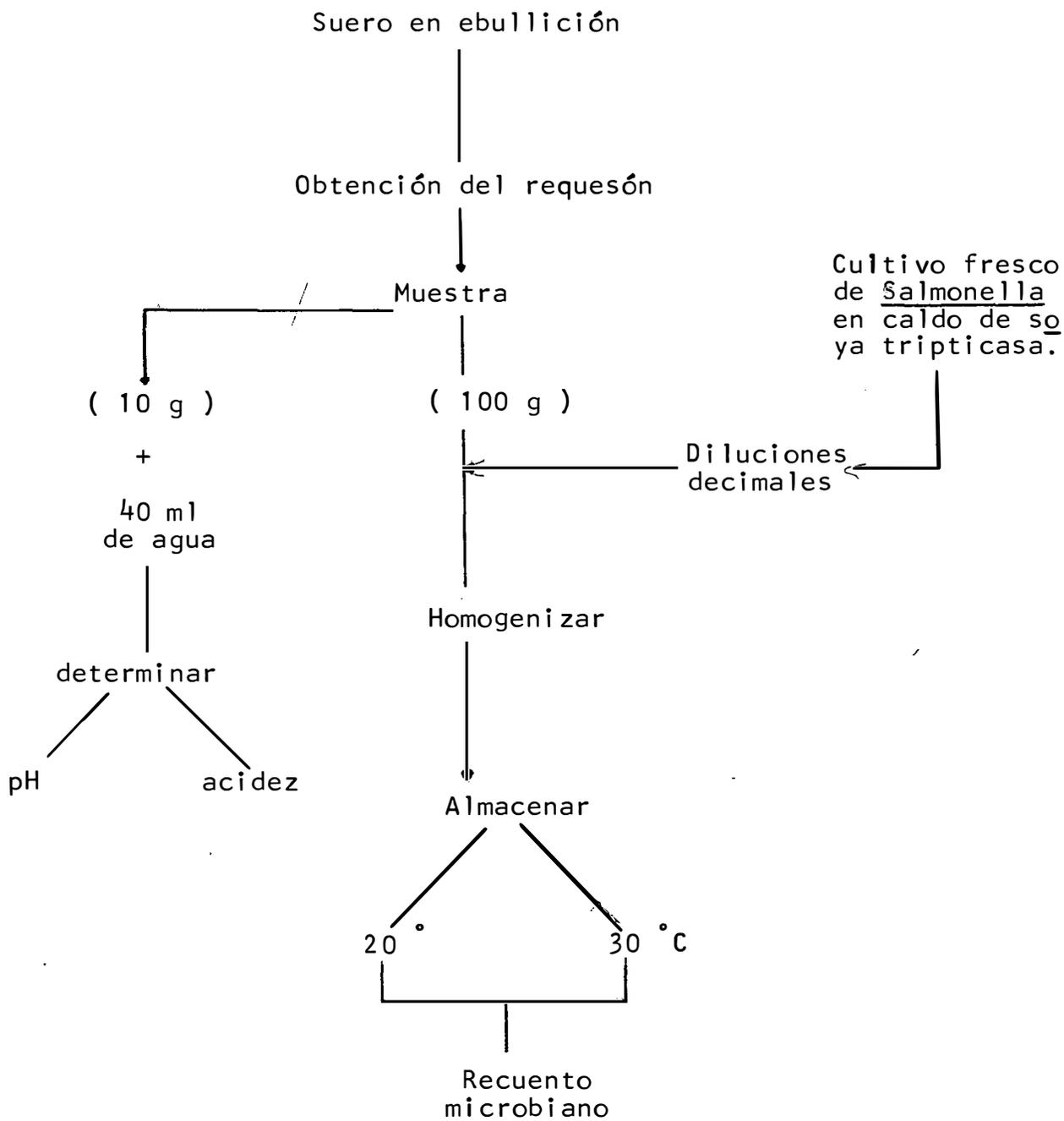
B.M.A.- Bacterias mesofílicas aerobias, O.C.- Organismos coliformes.

V.P.- Vaciado en placa, E.S.- Extensión por superficie, N.M.P.- Número más probable, ACE.- Agar cuenta estandar, ABRV.- Agar bilis rojo violeta, APD.- Agar papa dextrosa, ASB.- Agar sulfito bismuto, CTVB.- Caldo tetracionato verde brillante.

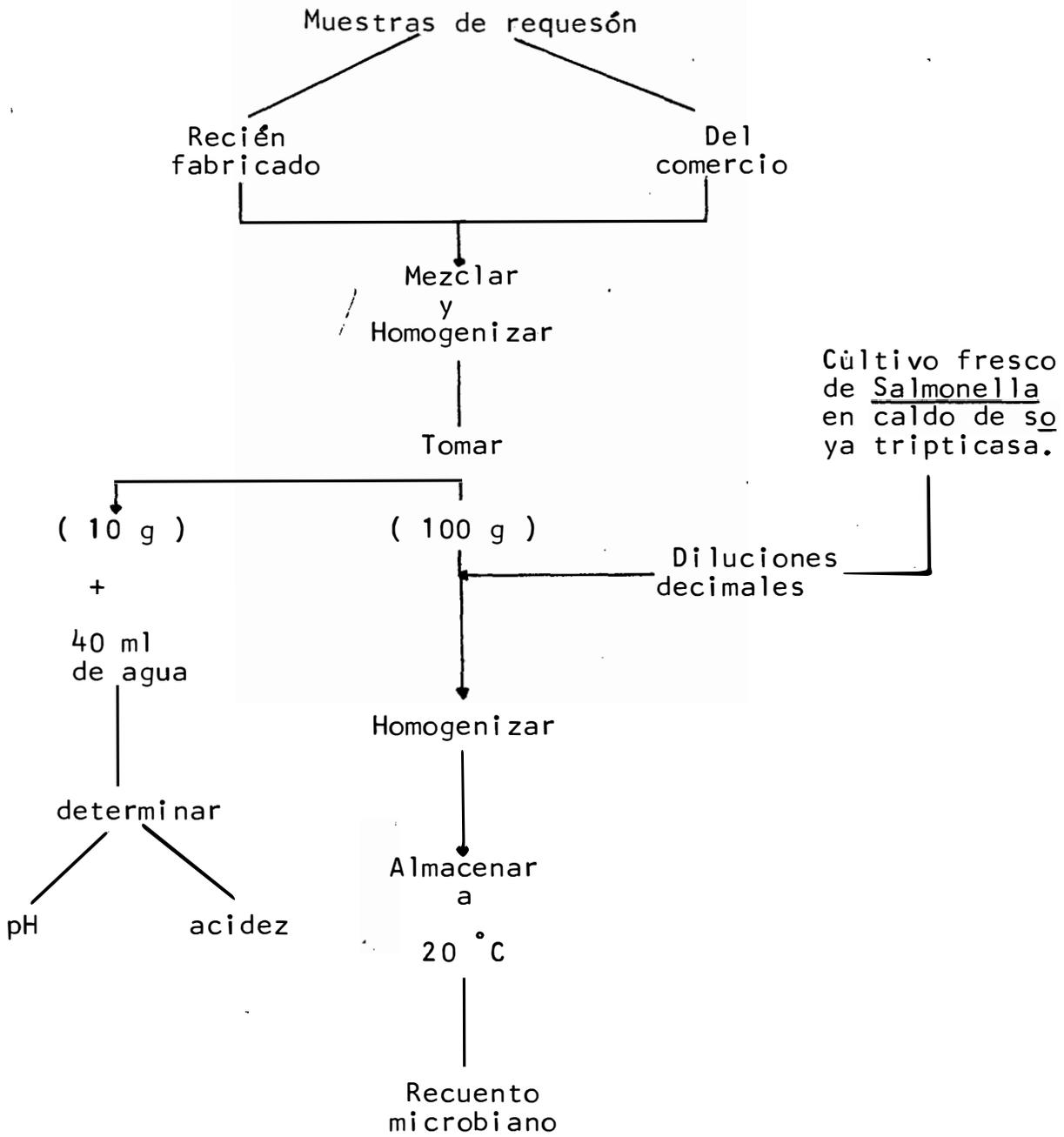
# ESQUEMA 1



ESQUEMA 11



ESQUEMA III



## RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados de un primer estudio para conocer la microbiología del requesón muestreado de una fábrica se presentan en la Tabla 1. Al tiempo de recepción se destaca un número elevado de coliformes  $3.0 \times 10^5$ , la presencia de bacterias mesofílicas aerobias  $1.7 \times 10^6$  y levaduras  $4.5 \times 10^3$  y por el contrario una franca ausencia de bacterias lácticas. Tanto a 20 como a 30°C la flora original continúa su multiplicación manteniéndose en todo momento y en todos los casos, la proporción relativa de cada grupo microbiano. Al cabo de las 6 horas el crecimiento de la flora a 30°C empieza a sobrepasar al detectado a 20°C. La ausencia de lácticos se confirmó al termino del estudio.

Las Tablas 2 y 3 manifiestan la actividad de S. typhi en requesón fabricado en el laboratorio, almacenado a 20 y 30°C. Ambas Tablas revelan la ausencia de la flora asociada y el crecimiento del enteropatógeno. No difiere de manera importante según se utilice un inóculo de 37 ó 170 ufc/g. Es notable la diferencia en el número de Salmonella alcanzando cuando el producto se almacena a 20 y 30°C. Esta diferencia llega a ser mil veces a favor de la temperatura mayor.

La actividad de Salmonella typhimurium y microbiología de requesón 0 horas de fabricado en quesería y mantenido a 20°C se muestra en la Tabla 4. Los resultados son: Una activa proliferación de los tres grupos microbianos incluidos ( coliformes, lácticos y levaduras ) y la multiplicación de enteropatógenos aún a la mayor dilución probada ( 90 ufc/g ). No fue posible en el periodo de 24 horas cuantificar la evolución que tuvieron los inóculos de 900 y 9 000 ufc/g.

El desarrollo de Salmonella typhimurium y la flora asociada en el producto de 24 horas después de fabricado, mantenido a 20°C se expresa en la Tabla 5. Es detectable una activa proliferación de la flora asociada que no fue obstáculo para la multiplicación del patógeno. La cuantificación del

mismo se realizó mediante la técnica del número más probable ( NMP ), no lográndose, aunque todos los tubos se confirmaron positivos, valorar los inóculos empleados en todos los periodos. Siempre estuvieron por encima de los indicados en la Tabla.

Los resultados de las Tablas 6 y 7 muestran la evolución que tienen dos inóculos ( uno bajo 180 y otro alto 18 000 - ufc/g ) de S. typhimurium en dos modelos que simulan el producto de mayor ( Tabla 6 ) y de menor frescura ( Tabla 7 ). En el primer modelo se resalta una actividad morosa de coliformes y lácticos tanto a las 0 como a las 6 horas, para -- después alcanzar  $1.5 \times 10^7$  y  $4.9 \times 10^7$  respectivamente. Por el contrario es evidente la ausencia de levaduras.

En el segundo modelo el número de coliformes y lácticos a las 0 horas es considerable  $4.9 \times 10^4$  y  $1.3 \times 10^6$  respectivamente. En tanto que las levaduras se multiplicaban morosamente alcanzando a las 24 horas  $1.3 \times 10^3$ . El comportamiento de la flora asociada no varió significativamente al detectado en la Tabla 6, sin embargo el contenido de Salmonella en ambas Tablas alcanza un nivel similar después de 24 horas a 20°C. La cifra alcanzada es cercana a 100 000 ufc/g. Hay una diferencia muy pequeña ( 100 veces ) con el inóculo menor del patógeno ( Tabla 7 ).

La actividad de S. typhimurium en requesón de 72 horas de fabricado, almacenado a 20 y 30°C se muestra en las Tablas 8 y 9 respectivamente. En ambas es objetable una flora asociada bien establecida, especialmente los lácticos, en tanto que el enteropatógeno, al cabo de las 24 horas, decrece próximo a un logaritmo en el inóculo inicial ( 1 800 ufc/g ). Así mismo hay un descenso del pH ( 5.4 a 4.78 ).

A las muestras que se les determinó pH presentaron valores próximos al óptimo ( pH 7 ), exceptuando la del caso anterior, y la acidez en las mismas osciló entre 0.27 y 0.31%.

Dadas las condiciones artesanales en las que se elabora el producto, se presentan en la práctica notables variaciones en su composición y microbiología. Se carece de control de calidad de la leche utilizada, la que según los proveedores puede contener o no y en cantidades variables, una diversidad de agentes antimicrobianos. La carga microbiana de esa materia prima también es muy variada como lo son -- tanto las condiciones sanitarias de obtención, como el tiempo y temperatura de almacenamiento previo a la fabricación del producto. Finalmente, las condiciones higiénicas de su manejo en la propia planta, admite en la práctica un espectro muy amplio.

En un estudio previo, realizado en este laboratorio, se encontró una variación acentuada en la incidencia de Salmonella cuando el producto se muestreaba en verano --- ( 38.3% ) o en invierno ( 3.1% ), lo que permite suponer que efectivamente influye la temperatura ambiental en la abundancia del patógeno en este alimento. La prevalencia global fue de 26.7% esto es 53 muestras positivas de 198 analizadas ( 10 ).

Con el propósito de tener una idea del contenido microbiano del requesón en una fábrica seleccionada al azar entre los productores y de estudiar la evolución de esa -- flora durante el almacenamiento a 20 y 30°C, como ocurre con frecuencia en el comercio, efectuamos un primer estudio, donde las cifras más bien altas de los grupos microbianos ( Tabla 1 ) sugieren una intensa contaminación dentro de la planta o una muy activa proliferación de tales -- gérmenes a partir de sustratos donde las condiciones son propicias para mantenerse activos. Es decir, los gérmenes contaminantes no pasan por la fase adaptativa ( lag ) e inician rápidamente su crecimiento. Este hecho se ve favorecido por tratarse de un material rico en nutrientes, con una actividad de agua ( Aa ) y pH cercano al óptimo ( 6.5 ), y

ausencia de flora competitiva ( el tratamiento térmico recibido por el alimento es lo suficientemente severo para inactivar virtualmente a toda la flora microbiana no esporulada).

En función de experiencias previas estimamos que la ausencia de bacterias lácticas es un acontecimiento fuera de lo común; de hecho excepcional. La regla general es la presencia de estas bacterias en el producto y el hallazgo de levaduras un evento ulterior dentro de la metabiosis que suele exhibir este alimento.

El estudio del comportamiento de una bacteria patógena -- cuando contamina a un alimento, tiene gran interés desde el punto de vista epidemiológico porque permite esbozar la magnitud del riesgo que potencialmente tiene ese alimento como causa de enfermedad al ser consumido. Y si se dan las facilidades para una activa proliferación, es de esperar que se incremente el riesgo porque puede alcanzarse la dosis infectante es el caso de un microorganismo infeccioso, o acumularse suficiente tóxima en el caso de agentes toxigénicos. Una variedad de factores influye en dicho comportamiento, la capacidad nutricional de un alimento para el patógeno en cuestión, el tiempo y temperatura de almacenamiento, la presencia de inhibidores naturales o incorporados, la presencia y actividad de la flora antagonista y otros tales como el pH, potencial de óxido reducción ( Eh ) y actividad de agua (Aa). Tan sólo uno de los mencionados, puede ser suficiente para restringir el desarrollo de los microorganismos aunque los restantes factores estén presentes o ausentes, en condiciones favorables para ellos. Por tanto el primer estudio que procede para evaluar el riesgo antes mencionado, consiste en determinar si existen o no los nutrientes en el alimento para que el germen pueda prosperar. Así, en la siguiente etapa de este trabajo estudiamos el comportamiento de una cepa de S. typhi artificialmente inoculada en el producto en ausencia de flora competitiva, es decir, en el producto recién fabricado y protegido de contaminaciones. Esto se logró fabricando el requesón en el laboratorio y preparándolo en condi-

ciones asépticas e incorporándole el patógeno. El estudio se realizó en dos ocasiones ( Tablas 2 y 3 ), almacenando el producto contaminado a 20 y 30<sup>0</sup>C.

Los resultados muestran que ciertamente estamos ante un producto en el cual el efecto de la flora competitiva se encuentra prácticamente anulado. El contenido de coliformes y bacterias lácticas se mantuvo inaparente en ambos estudios. En las dos tablas se aprecia el desarrollo progresivo de S. typhi; hecho que coincide con la observación ya señalada de que la incidencia de Salmonella en el requesón es más elevada durante el verano que en el invierno. El experimento demuestra el riesgo que existe de que un individuo enfermo, convaleciente o portador bacilífero de S. typhi, contamine tempranamente el producto en donde el germen pueda multiplicarse a niveles peligrosos. Por lo demás como se sabe la dosis infectante de esta bacteria es muy baja ( '17 ).

El que S. typhi contaminante vaya acompañada de materia fecal, podría restringir, pero no cancelar el riesgo mencionado.

Más común es la contaminación del producto por otras salmonelas. El siguiente estudio se diseñó para evaluar el comportamiento de una cepa de S. typhimurium en el alimento con la flora normal, contaminándolo recién fabricado. Para tal fin se obtuvo el alimento de una fábrica y tan pronto como llegó al laboratorio, se contaminó con el patógeno a tres niveles y se almacenó a 20<sup>0</sup>C. Periódicamente se determinó el contenido del patógeno y la evolución de la flora asociada ( Tabla 4 ).

Como esperamos una flora asociada escasa con libre multiplicación del patógeno, este último se estimó por la técnica de vaciado en placa. Cuando se aumentó el tamaño del inóculo sobre el producto almacenado a 24 horas, esperamos una flora más elevada que había de interferir con los recuentos del enteropatógeno en las placas. Por esta razón se utilizó la técnica NMP. Aunque no pudimos precisar el número alcanzado por el patógeno, los resultados ( Tabla 5 ) revelan por lo menos una clara capacidad para -----

sobrevivir en presencia de un activo desarrollo de la flora asociada especialmente de la láctica que llegó a ser de tres mil millones por gramo. Lo anterior pone de manifiesto el alto riesgo que se genera cuando el producto se expone a la contaminación por el patógeno aun cuando la carga de la flora asociada se encuentra bien establecida. Los resultados de las Tablas 4 y 5 revelan también la variabilidad de la imagen microbiana del producto aun dentro de la misma planta en diferentes procesos de fabricación.

Con el objeto de estudiar el comportamiento de Salmonella cuando contamina al producto durante su expendio, recurrimos a un modelo que simula la imagen microbiana del alimento en tal situación. Una porción de requesón recién fabricado y recolectado asépticamente fué adicionado y homogenizado con residuos del mismo producto obtenido del comercio con su flora ya bien establecida.

El modelo contaminado discretamente simularía el producto que se contamina tras un breve periodo de comercialización, en tanto que el moderadamente contaminado correspondería a un producto más prolongadamente expuesto a la venta. A través de este experimento confirmamos la influencia de la flora asociada como inhibidora del desarrollo de Salmonella en el producto. En otras palabras, se puede afirmar que la magnitud del riesgo es mayor cuando la contaminación por el patógeno se presenta más próxima a la obtención del alimento. Conforme transcurre el tiempo el riesgo decrece en función de la colonización y sobrecarga de la flora acompañante.

El último experimento (Tablas 8 y 9) es una reafirmación de lo anterior. cuando contaminamos con el enteropatógeno el requesón tras 72 horas de fabricado detectamos que es un alimento capaz de sostener el desarrollo de bacterias patógenas como la Salmonella y que tanto la temperatura de almacenamiento, como el grado de frescura del producto al tiempo de la contaminación afectan la magnitud de dicha proliferación. En situación extrema aun la viabilidad del patógeno llega a verse mermada.

Numerosos estudios señalan a la flora láctica como elemento primeramente determinante de la inhibición de las -- bacterias patógenas en lacticineos similares.

En algunos productos lácteos como leches fermentadas, - yogurt y crema agria, los organismos coliformes tienden a - desaparecer en solo 24 horas a un ritmo que es independien- te de la acidez. Se ha reportado también que cuando los pro- cesos de fermentación se efectúan con cultivos termofílicos de lactobacilo y estreptococos, el efecto antibacteriano es mayor que cuando se utiliza S. lactis ( 7,11 ).

Al parecer los efectos inhibitorios no son el resultado único de una acidificación del medio; otros mecanismos pue- den intervenir y entre ellos se encuentran la producción de agua oxigenada, de antibióticos o de ácidos grasos voláti- les, la secreción de bacterocinas y el agotamiento de nu-- trientes vitales en el medio como la nicotinamida ( 6,7 y 8).

El papel que puede jugar el requesón en las gastroente- ritis humana debe enjuiciarse en función de estos hechos. Se trata de un producto que eventualmente puede dar lugar a gas- troenteritis por bacterias enteropatógenas cuando se dan los acontecimientos que propician la proliferación de tales gér- menes.

El producto debe fabricarse en condiciones que resguar- den de contaminaciones objetables como son la fauna y los ma- nipuladores. A lo largo de su comercialización debe mantener- se a temperatura inferior a los 7°C.

T A B L A 1

Microbiología de requesón muestreado en una  
fábrica, durante su almacenamiento a 20 y 30 C.

Temp. °C	Micro-- organismos	* ufc/g al cabo de horas				
		(0)	(3)	(6)	(9)	(24)
20	B.M.A.	$1.7 \times 10^6$	$1.7 \times 10^6$	$8.8 \times 10^6$	$1.7 \times 10^7$	$2.5 \times 10^9$
	Coliformes	$3.0 \times 10^5$	$7.8 \times 10^5$	$5.5 \times 10^6$	$8.8 \times 10^6$	$1.3 \times 10^9$
	Lácticos	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$
	Levaduras	$4.5 \times 10^3$	$6.6 \times 10^3$	$8.8 \times 10^3$	$7.8 \times 10^4$	$8.1 \times 10^5$
30	B.M.A	$1.7 \times 10^6$	$5.3 \times 10^6$	$1.7 \times 10^7$	$3.4 \times 10^8$	$1.3 \times 10^{10}$
	Coliformes	$3.0 \times 10^5$	$2.0 \times 10^6$	$3.6 \times 10^7$	$6.5 \times 10^7$	$9.0 \times 10^9$
	Lácticos	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$
	Levaduras	$4.5 \times 10^3$	$8.8 \times 10^3$	$4.2 \times 10^4$	$1.3 \times 10^5$	$7.0 \times 10^6$

\* Unidades formadoras de colonias  
B.M.A.- Bacterias mesofílicas aerobias

T A B L A 2

Actividad de Salmonella typhi artificialmente  
inoculada ( 170 ufc/g ) en requesón\*fabricado  
en el laboratorio, almacenado a 20 y 30°C.

Temp.	micro--- organismos	**ufc/g al cabo de horas				
		( 0 )	( 3 )	( 6 )	( 9 )	( 24 )
20	Coliformes	<10	<10	<10	<10	<10
	Lácticos	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>
	<u>S. typhi</u>	2.8x10 <sup>2</sup>	1.9x 10 <sup>2</sup>	2.0x10 <sup>2</sup>	9.0x10 <sup>2</sup>	2.1x10 <sup>3</sup>
30	Coliformes	<10	<10	<10	<10	<10
	Lácticos	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>
	<u>S. typhi</u>	2.1x10 <sup>2</sup>	3.5x10 <sup>2</sup>	1.2x10 <sup>3</sup>	4.6x10 <sup>5</sup>	2.9x10 <sup>6</sup>

\* pH 6.5/ Acidez 0.28% en ácido láctico

\*\* unidades formadoras de colonias

T A B L A 3

Actividad de Salmonella typhi artificialmente  
inoculada (37 ufc/g) en requesón recién fabri-  
cado, almacenado a 20 y 30°C.

Temp. °C	Micro- organismos	ufc/g al cabo de horas			
		( 0 )	( 3 )	( 6 )	( 24 )
20	Coliformes	<10	<10	<10	<10
	<u>Salmonella</u>	60	90	70	5.4x10 <sup>4</sup>
30	Coliformes	<10	<10	<10	<10
	<u>Salmonella</u>	30	20	1.7x10 <sup>3</sup>	1.0x10 <sup>7</sup>

T A B L A 4

Actividad de Salmonella typhimurium y microbiología de requesón\* 0 horas de fabricado - en una quesería y almacenado a 20°C.

Micro-- organismos	ufc/g al cabo de horas			
	( 0 )	( 3 )	( 6 )	( 24 )
Coliformes	$1.5 \times 10^2$	$1.4 \times 10^3$	$1.7 \times 10^3$	$4.3 \times 10^7$
Lácticos	$3.7 \times 10^4$	$2.8 \times 10^5$	$4.3 \times 10^6$	$2.1 \times 10^8$
Levaduras	$4.5 \times 10^3$	$1.0 \times 10^4$	$3.1 \times 10^4$	$3.4 \times 10^6$
<u>S. typhimurium**</u>				
90	$7.0 \times 10$	$8.0 \times 10$	$2.9 \times 10^2$	$4.4 \times 10^4$
900	$1.2 \times 10^3$	$1.2 \times 10^3$	$6.1 \times 10^3$	$> 10^4$
9000	$1.4 \times 10^4$	$1.5 \times 10^4$	$3.8 \times 10^4$	$> 10^5$

\* pH 6.8/ Acidez 0.3153% en ácido láctico

\*\* ufc/g inoculadas

T A B L A 5

Actividad de Salmonella typhimurium y flora asociada en requesón\* inoculado 24 horas después de elaborado en quesería y almacenado a 20°C.

Micro-organismos	ufc/g al cabo de horas				
	( 0 )	( 3 )	( 6 )	( 9 )	( 24 )
Coliformes	$3.0 \times 10^4$	$5.0 \times 10^2$	$1.3 \times 10^3$	$5.6 \times 10^4$	$2.7 \times 10^7$
Lácticos	$1.7 \times 10^4$	$5.0 \times 10^2$	$1.0 \times 10^3$	$5.6 \times 10^4$	$3.0 \times 10^9$
Levaduras	$2.5 \times 10^2$	$1.2 \times 10^3$	$4.0 \times 10^3$	$2.2 \times 10^4$	$8.2 \times 10^4$

S. typhimurium\*\*

1 100	>	$1.1 \times 10^3$								
11 000	>	$2.0 \times 10^4$	>	$1.1 \times 10^4$						

\* pH 6.93/ Acidez 0.31% en ácido láctico

\*\* ufc/g inoculadas

NOTA: La cuantificación de Salmonella se realizó mediante la técnica del número más probable ( NMP ).

T A B L A 6

Actividad de Salmonella typhimurium inoculada en requesón\* recién elaborado en quesería y adicionado de residuos del producto de 36 horas en el comercio.

Temp. °C	Micro-organismos	ufc/g al cabo de horas		
		( 0 )	( 6 )	( 24 )
20	Coliformes	$<10^2$	$<10^3$	$1.5 \times 10^7$
	Lácticos	$<10^3$	$<10^4$	$4.9 \times 10^7$
	Levaduras	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
	<u>S. typhimurium</u> **			
	1 800	$9.0 \times 10^4$	$1.1 \times 10^2$	$1.1 \times 10^5$
	18 000	$2.0 \times 10^4$	$>1.1 \times 10^5$	$>1.1 \times 10^5$

\* pH 6.88 / Acidez 0.27 % en ácido láctico

\*\* ufc/g inoculadas

T A B L A 7

Actividad de Salmonella typhimurium inoculada en requesón\*\* recién elaborado y contaminado moderadamente con residuos de producto del comercio\*\*.

Temp. °C	Micro-- organismos	ufc/ al cabo de horas		
		( 0 )	( 6 )	( 24 )
	Coliformes	$4.9 \times 10^4$	$8.9 \times 10^5$	$3.4 \times 10^7$
	Lácticos	$1.3 \times 10^6$	$1.0 \times 10^7$	$3.9 \times 10^8$
	Levaduras	$< 10^3$	$< 10^3$	$1.3 \times 10^3$
20	<u>S. typhimurium</u> ***			
	180	$2.0 \times 10^2$	$1.1 \times 10^2$	$1.1 \times 10^3$
	18 000	$5.0 \times 10^4$	$1.1 \times 10^4$	$1.3 \times 10^5$

\* pH 6.88/ Acidez 0.27% en ácido láctico

\*\* con 36 horas de almacenamiento

\*\*\* ufc/g inoculadas

T A B L A 8

Actividad de Salmonella typhimurium contaminante de requesón a las 72 horas de fabricado y almacenado a 20 °C.

Micro-organismos	ufc/g al cabo de horas		
	( 0 )	( 6 )	( 24 )
Coliformes	$2.0 \times 10^6$	$2.3 \times 10^8$	$2.2 \times 10^6$
Lácticos	$9.0 \times 10^7$	$2.2 \times 10^8$	$3.7 \times 10^8$
Levaduras	$8.7 \times 10^4$	$1.7 \times 10^5$	$9.8 \times 10^6$
<u>S. typhimurium</u>			
1 800*	$2.0 \times 10^3$	$4.0 \times 10^2$	$4.0 \times 10^2$
pH	5.4	5.07	4.87

\* ufc/g inoculadas

NOTA: La cuantificación al patógeno fue por NMP.

T A B L A 9

Actividad de Salmonella typhimurium contaminante de requesón a las 72 horas de fabricación, almacenado a 30°C.

Micro-- organismos	ufc/g al cabo de horas		
	( 0 )	( 6 )	( 24 )
Coliformes	$2.0 \times 10^6$	$1.8 \times 10^6$	$3.5 \times 10^5$
Lácticos	$9.0 \times 10^7$	$3.2 \times 10^8$	$3.5 \times 10^5$
Levaduras	$8.7 \times 10^4$	$3.6 \times 10^5$	$3.5 \times 10^7$
<u>S. typhimurium</u> (NMP)			
1 800*	$2.0 \times 10^3$	$2.0 \times 10^3$	$4.0 \times 10^2$
pH	5.4	4.87	4.78

\* ufc/g inoculadas

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

- 1.- El requesón es un producto lácteo que puede verse involucrado en brotes de enfermedades por agentes microbianos.
- 2.- El riesgo queda configurado por tratarse de un producto propicio para la rápida proliferación de bacterias enteropatógenas, que pueden llegar al alimento recién fabricado cuando la flora competitiva se encuentra prácticamente ausente.
- 3.- La actividad de la flora asociada se traduce en una inhibición del desarrollo de la Salmonella, y en situación extrema en una merma en su viabilidad.
- 4.- El producto debe mantenerse en condiciones que impidan la contaminación por bacterias enteropatógenas, complementándose esta medida con la refrigeración durante su expendio a temperatura inferior a 7°C.

## R E S U M E N

Se efectuó un estudio sobre el comportamiento de Salmonella typhi y Salmonella typhimurium en el requesón. Se siguió el comportamiento de estos microorganismos en el producto recién elaborado y en diferentes estadios durante su almacenamiento a 20 y 30 °C, tal como ocurre durante su expendio. Simultáneamente se estudió cuantitativamente la evolución de la flora asociada representada por las bacterias coliformes, lácticas y levaduras. Los resultados revelan una franca capacidad de estos patógenos para multiplicarse en el alimento, más a 30 que a 20 °C. Esta actividad se encuentra antagonizada por la flora asociada en el alimento de manera que las posibilidades de desarrollo disminuyen conforme con el producto pierde frescura, es decir, en relación al incremento de la flora asociada.

A fin de disponer de un producto cuyo consumo no implique un riesgo para la salud es indispensable evitar la contaminación por los patógenos, especialmente en el producto recién preparado y manteniéndole permanentemente en refrigeración a temperatura inferior a 7 °C.

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

- 1.- Anónimo. 1974. Informe Epidemiológico Anual, 1973. Salud Pública de México. 16:1029-1066
- 2.- Bessudo, D., González Cortés, A., González C., Becerril, P., Guzmán B.J. y Herrera, G., 1976. Estudio de un brote gastroentérico producido por Salmonella infantis. -- Rev. Inv. Salud Pública 36:215-226
- 3.- Crónica de la OMS, 1975. Vigilancia de la Salmonelosis 29:253-257
- 4.- Crónica de la OMS, 1973. Vigilancia de la Salmonelosis 30:260-262
- 5.- Delgado Benítez Aurea; Marina Hinojosa Ahumada; Sergio Cárdenas Reyes y David Bessudo Madjar, 1986. Estudio de un brote explosivo de gastroenteritis producido por --- Salmonella typhimurium. Resúmenes XVII Congreso Nac. de Microbiol. Asociación Mexicana de Microbiol., Puebla, Pue. 25:145
- 6.- Demeter, Karl J., 1969. Lactobacteriología. II Leche y nata pasteurizada; Ed. Acribia II: 186-187
- 7.- Fernández Escartín E., 1981. Microbiología Sanitaria; Agua y Alimentos. Vol I. Edit. Universidad de Guadalajara
- 8.- Fernández Escartín, E. y Col., 1982. Destino de Salmonella artificialmente inoculada en la leche durante la elaboración de quesos frescos no pasteurizados. II Cambios en pH, acidez y flora microbiana. Rev. Lat. Amer. Microbiol. -- 24: 235-240
- 9.- Fernández Escartín E. y Col., 1982. Incidencia de Salmonella y Stafilococcus aureus en quesos frescos no pasteurizados. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 24:83-88

- 10.- Fernández E. E. y Col., 1983. Salmonella en requesones adquiridos de Mercados Públicos. Laboratorio de Microbiol. Sanit., Fac. de - Ciencias Químicas U. de G., Resúmenes XIV Congreso Nac. de Microb. Asociación Mexicana de Microbiol. Chihuahua, Chih.
- 11.- Fernández E. E. y Col., 1984. Antagonismo de cepas de Streptococcus, Lactobacillus y Leuconostoc procedentes de quesos frescos - no pasteurizados contra algunas bacterias enteropatógenas. Rev.-- Lat. Amer. Microbiol. 26: 47-47
- 12.- Garay H., Ricardson P.H.D., 1985. Standars for the examination of dairy products. 15º th Ed.
- 13.- González, C.A., Heredia, D.A., Guzmán J., Ruiz L., Hernández A.H., Lechuga T.W., Cevallos V. y Vázquez C.H., 1974. Epidemia de tifoidea por cepas cloranfenicol resistentes en México en 1972, Estudios de Trasmisión y Vigilancia. Rev. Inv. Salud Pública ( Méx.). -- 34: 37-64
- 14.- Hook, E.W., 1974. Diarrreal diseases: Salmonella infantis infections correnta problems in epidemiology, treatment & control. Am. J. Trop. Med. Hyp. 23: 771-774
- 15.- Marth E. M., 1969. Salmonella and Salmonelosis Associated With and - Milk Products. A. Review Department of Food Science and Industries - & Food Research Institute University of Wisconsin Madison. J. Dairy Science. 52: 95-100
- 16.- Small, R.G. & Dillenberg, H.O., 1979..A. Milk borne outbreak due to Salmonella dublin. J. Hyg. 82: 95-100
- 17.- U.S. Dept. Agriculture y Food and Drug Adm. 1969. An evaluation of - the Salmonella Problem. Nat. Acad. Sci. Washington. D. C.



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
**Facultad de Ciencias**

Expediente .....

Número 775/86 .....

Sr. Angel Javier Gutiérrez Valdivia  
P r e s e n t e . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "Actividad de Salmonella en Requesones" para obtener la Licenciatura en Biología con Orientación Biomédica.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis el Q.F.B. Rogelio Camacho García.



FACULTAD DE CIENCIAS

A T E N T A M E N T E  
"PIENSA Y TRABAJA"  
Guadalajara, Jal., Agosto 2 de 1986

El Director

Dr. Carlos Astengo Osuna

El Secretario

Dr. José Manuel Copeland Gurdíel.

c.c.p. El Q.F.B. Rogelio Camacho García, Director de Tesis.-Pte.  
c.c.p. El expediente del alumno.

'mjsd