

## INVESTIGACION DE MICROORGANISMOS DE LA FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE (Rahn, 1937) EN HELADOS

Fernando Rodríguez Ferri (1)

### INDICE

CAPITULO 1.-INTRODUCCION.-1.1. Definición y Concepto.-1.2. Interés histórico de los helados como productores de toxíinfecciones alimentarias.-1.3. Justificación a un estudio de la microflora bacteriana en este tipo de derivado lácteo.-1.4. El proceso técnico de elaboración en relación con el grado de contaminación del producto.-CAPITULO 2.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.-CAPITULO 3.-REVISION BIBLIOGRAFICA.-3.1. Definición. Clasificación y Nomenclatura de la familia *Enterobacteriaceae*.-3.2. Antecedentes bibliográficos sobre contenido microbiano de los helados.-3.3. Antecedentes bibliográficos sobre la presencia de los distintos géneros y especies de la familia *Enterobacteriaceae* en los helados.-CAPITULO 4.-Parte EXPERIMENTAL.-4.1. Lugares de Trabajo.-4.2. Recogida de muestras.-4.3. Materiales y Métodos generales.-4.4. Diferenciación bioquímica.-4.5. Investigación serológica de estirpes de *E. coli* de carácter enteropatógeno.-4.6. Investigación serológica de microorganismos pertenecientes al género *Shigella*. 4.7. Análisis estadístico.-CAPITULO 5.-RESULTADOS.-5.1. Consideraciones generales.-5.2. Resultados de carga microbiana total.-5.3. Resultados de enumeración de microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae*.-5.4. Resultados de aislamiento e identificación para los distintos géneros de la familia *Enterobacteriaceae*.-5.5. Resultados de identificación serológica de las especies y tipos de los géneros *Escherichia* y *Shigella*.-5.6. Simplificación aplicada de los resultados de aislamiento.-5.7. Análisis estadístico de los resultados. CAPITULO 6.-DISCUSION.-6.1. Significado higiénico-sanitario de la cantidad de microorganismos presentes.-6.2. Aspecto sanitario y valor indicativo correspondiente a los distintos géneros de la familia *Enterobacteriaceae*.-CAPITULO 7.-CONCLUSIONES.-8. RESUMEN.-9. BIBLIOGRAFIA.-10. CUADROS.

ISBN - 84 - 600 - 1049 - X Obra Completa

ISBN - 84 - 600 - 1051 - 1 Tomo II

Depósito legal: O. 72 - 1978

GRAFICAS SUMMA, S. A. Polígono Ind. de Silvota - OVIEDO

(1) El autor de esta Memoria ha disfrutado una Beca del Plan de Formación de Personal Investigador, concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia a través de la Universidad de Oviedo.

## 1. INTRODUCCION

### 1.1. Definición y concepto.

El término helado se usa comúnmente para designar un alimento congelado, integrado por una mezcla de derivados lácteos, con un determinado porcentaje graso y de extracto seco magro, azúcar, aromatizantes, colorantes y estabilizadores, con un proceso de congelación durante el cual estos elementos sufren un batido o agitación con el fin de obtener una textura suave. El Código Alimentario y el Decreto 2130 / 74, añaden al anterior concepto nuevas exigencias tales como la necesidad de que la mezcla se pasteurice y homogeneice convenientemente, de que conserve un grado de plasticidad determinado hasta el momento de la venta, y otras referentes al color, gusto y aroma.

La normalización de este producto está en fase de elaboración en nuestro país. En cualquier caso, tal normalización deberá adaptarse a las condiciones de tipo ambiental y climáticas que le son propias, sin que por ello no deban seguirse normas perfectamente establecidas en países en los que como Estados Unidos o Inglaterra, el consumo de helados alcanza hoy por hoy cifras muy superiores a las que son habituales aquí.

Nuestro Código alimentario establece una clasificación meramente indicativa, en la que se definen diferentes tipos de helados, señalándose a la vez características de composición y microbiológicas, si bien con carácter general. Es indudable que una legislación más amplia, que vaya a desarrollar de forma extensa los preceptos establecidos en el mencionado Código, habrá de apoyarse necesariamente en estudios de investigación y ensayos experimentales que han de poner de manifiesto las características microbiológicas de los helados que se elaboran en el medio ambiente que corresponde a nuestro clima y condiciones sociales. La peligrosidad que puede encerrar el consumo de helados resulta más evidente de lo que cabría pensar cuando se revisa la literatura, ya que son numerosos los accidentes debidos a toxifiinfección alimentaria por este origen.

Las condiciones microbiológicas a que nos hemos referido anteriormente, no suponen una aval suficiente a la calidad higiénica, ya que propiedades como la licuación de la gelatina, exigencia de la ausencia de salmonelas, limitación del número en el grupo coliforme con un máximo de 20 gérmenes / gr., o de 100.000 bacterias banales / gr., son datos muy imprecisos en el mejor de los casos.

En un producto congelado, como su nombre indica, en que no cabe esperar una multiplicación bacteriana, o al menos esto no es posible para gérmenes patógenos, cobra especial significado el aspecto bacteriológico cualitativo, porque si bien no cabe esperar esa multiplicación microbiana, también se hallan preservados los mecanismos competitivos, y sobre todo el frío contri-

buye a estabilizar la flora, de tal manera que no existirá riesgo alguno de producción de toxinas, pero la acción infectante o de virulencia para bacterias del tipo de las enterobacterias, permanece sin variación hasta el momento del consumo. En otras palabras, la dosis infectante se mantiene en perfecto estado por efecto del frío.

### 1.2. Interés histórico de los helados como productores de toxifiinfecciones alimentarias.

Puede afirmarse que tanto el helado como los ingredientes que constituyen materia prima para su elaboración, son objeto de los mismos riesgos de contaminación que otros derivados lácteos. La contaminación por patógenos intestinales, dérmicos y otros microorganismos que asientan en nariz o garganta, tiene lugar ocasionalmente en cualquier eslabón de la cadena de comercialización: fabricación, manipulación, transporte o venta.

Dentro del género *Salmonella*, la especie *S. typhi* ha sido implicada frecuentemente en brotes toxifiinfectivos por esta causa. Le siguen en importancia por frecuencia de aparición los estafilococos. Otros géneros y especies han merecido hasta la actualidad menor importancia.

LUMSDEN (cit. por TANNER, 111), CUMMING, EVANS, HOOBS (55), LAMBION y cols., describen en épocas pasadas casos de fiebre tifoidea y toxifiinfecciones alimentarias en las que los helados fueron implicados directamente como vehiculadores de salmonelas. En estos últimos años PERISIC y JANKOVIC (91) en Yugoslavia describen un brote por *S. enteritidis*. Unos y otros justifican plenamente la creciente importancia que se viene concediendo a este tipo de alimento, como vehiculador de agentes patógenos que casi siempre se han venido identificando con otros tipos de alimentos.

En nuestro país, los datos disponibles son ciertamente pobres, pues a excepción de algunas comunicaciones esporádicas en las que se analiza la cifra total de bacterias o de coliformes, ningún caso de toxifiinfección se ha incriminado al consumo de helados.

### 1.3. Justificación a un estudio de la microflora bacteriana en este tipo de derivado lácteo.

Existen sin duda, una serie de problemas que inciden muy directamente sobre la microflora presente en el producto final «helado». En el supuesto de que la pasterización de la mezcla haya sido correcta, existirán gérmenes resistentes a las combinaciones tiempo-temperatura de pasterización en número más o menos reducido, de acuerdo con la microflora de la leche natural empleada y el proceso de calentamiento. Las combinaciones subsiguientes han de resultar particularmente peligrosas, pues si el producto se mantiene a temperatura ambiente antes de congelar, se producirá un crecimiento sin el

obstáculo de mecanismos bacterianos competitivos y en el mejor de los casos, si el producto se congela a continuación, la contaminación permanecerá inalterada. En este caso, reviste particular interés la posible presencia de microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae*, gérmenes muy frecuentes en hábitats que se caracterizan por la presencia directa del hombre, o indirecta de diferentes especies de animales domésticos. En resumen pues, la microflora resistente a las condiciones de pasteurización, depende de las características de clima y desarrollo económico en su sentido más general, pero la presencia de enterobacterias ha de encontrarse por lo general estrechamente ligada a la existencia de portadores de gérmenes o manipuladores de alimentos, que no siguen unas estrictas normas higiénico-sanitarias. Esta condición puede ser muy variable e influir de una manera sorprendente en la calidad higiénica del producto final elaborado.

En la revisión bibliográfica realizada, sorprende por su escasez, los trabajos que en nuestro país se han ocupado de la microbiología de los helados. GODED y MUR (1958) (47) estudiaron las causas físico-químicas y bromatológicas del deterioro de los helados de leche. IRUJO y LLONA LARRAURI (1963) (57) estudiaron las condiciones higiénicas de elaboración y venta de los helados en la provincia de Vizcaya. ALVAREZ GÓMEZ y SAN PÉREZ (1969) (3) informaron sobre la carga microbiana y condiciones higiénicas de los helados de León, estudiando por separado helados y agua de lavado de cazos y cuchillos. Ya por último, IBARZ AZNARES y BARCELONA MARTÍ (1972) (56) estudiaron la contaminación colibacilar en helados y bebidas refrescantes en la provincia de Tarragona. Todos estos estudios anteriormente reseñados, sin desmerecer su valía, adolecen de una investigación más profunda en la que se llegue a determinar el género o especie de los microorganismos aislados, elemento de juicio realmente interesante a la hora de establecer conclusiones acerca de la peligrosidad potencial de alimento que nos ocupa.

Indudablemente ha sido esta la orientación fundamental que se ha dado a nuestro trabajo, aunque como en los anteriores, se establecen cifras de recuento que incluyen no sólo a la familia *Enterobacteriaceas*, sino también el resto de los gérmenes que configuran el número total de gérmenes viables.

#### 1.4. *El proceso técnico de elaboración en relación con el grado de contaminación del producto.*

Aunquén la calidad del helado se juzga normalmente por las características de cuerpo y textura, fusión, envasado, conservabilidad y coloración es indudable que el contenido bacteriano es el que en definitiva juega el papel decisivo en la calidad sanitaria del mismo. Los métodos usuales utilizados en la medida de la calidad sanitaria, se refieren a la determinación del sedimento, enumeración de bacterias, determinación de coliformes y pruebas para el control de la

pasteurización. Estas pruebas combinadas, indican si ha existido una contaminación con bacterias patógenas o un descuido en los procesos de elaboración; sin embargo, estos métodos si bien facilitan indicaciones, no establecen con la debida precisión el peligro de una salmonelosis pongamos por caso. No hay que olvidar por otra parte, que una máxima calidad en el helado sólo se logra con materias primas e ingredientes de primera calidad, y el control microbiológico de éstas, exige a la vez una normativa microbiológica adecuada en los distintos tipos de componentes. Es indudable que hay factores determinantes muy claros de la calidad microbiológica del producto final, además de la referida calidad de ingredientes, como son: 1.º, el estado de salud y grado de entrenamiento de los empleados, 2.º, los adecuados métodos de elaboración, 3.º, la limpieza y desinfección de la planta, 4.º, el equipo de transformación adecuado y 5.º, los métodos de distribución más convenientes.

No hay que olvidar que independientemente de la calidad higiénica de las materias primas, que puede traer como consecuencia un contejo de gérmenes elevado, éste puede también deberse a métodos de fabricación inadecuados, métodos de desinfección inefectivos o un prolongado almacenaje de la mezcla. Al mencionar aspectos de higiene personal como importantes factores en el mantenimiento de la calidad bacteriológica del producto, debe de entenderse ésta en el más amplio sentido y no comprender únicamente a las personas que operan con el equipo de elaboración, sino también a mecánicos, electricistas, conductores, mecanógrafas, etc... Las características de higiene personal incluyen naturalmente numerosos detalles que no es del caso enumerar, pero no debe de olvidarse la especial importancia que tiene la comprobación anual de posibles enfermedades infecciosas.

El problema de la recontaminación es importante y a la vez complejo, y generalmente se debe a la dificultad de realizar una adecuada desinfección del equipo, o a la contaminación de origen humano.

La problemática de la elaboración del helado comprende una serie de etapas que incluyen primero la mezcla de los ingredientes seguido de un enfriamiento. A continuación se dispone un período de reposo o maduración y finalmente, se procede a congelar el mix.

Con arreglo a la pauta descrita cabe señalar como punto importante de contaminación a los propios derivados lácteos en primer lugar, y en segundo término al resto de materias primas en su totalidad, que de un modo general incluyen (48) las siguientes: Leche desnatada, entera, desnatada condensada, entera condensada, entera concentrada, entera en polvo, desnatada en polvo, nata fresca o congelada, mantequilla sin sal, manteca, margarina, grasas vegetales líquidas, azúcar granulado y líquido, jarabes, yemas de huevo en polvo, huevos enteros y congelados, cacao en polvo, chocolate líquido, estabilizantes y emulgentes.

La flora microbiana que puede hallarse presente en estos productos, ha de

ser en virtud de su propia naturaleza enormemente variable, pero concretándonos a la familia *Enterobacteriaceae*, solamente se hallaran en el producto final si existe un fallo o defecto en el proceso de pasteurización; bien entendido que el pasteurizar y homogeneizar una mezcla del tipo de las descritas es un problema que encierra siempre mayores dificultades que la pasteurización de sustancias líquidas de inferior viscosidad como es por ejemplo la leche natural.

La limpieza y desinfección de pasteurizadores y tanques es una tarea de superior dificultad, cuando se trata de productos que contienen estabilizadores y sustancias que prestan una protección natural a las bacterias. Por otra parte es bien sabido, que los agentes químicos son efectivos únicamente cuando actúan sobre superficies enteramente limpias, a la debida concentración y durante un tiempo determinado. La acción de la materia orgánica sobre la concentración activa del producto, es bien evidente.

Resumiendo pues, puede concluirse que los riesgos que se siguen en el proceso de pasteurización, son más acusados que en productos con menor cantidad de materia orgánica y diferente viscosidad.

En la fase de maduración, cabe señalar que si la temperatura asciende por encima de los 4.ºC, cualquier contaminación de carácter trivial, puede llegar a ser un problema sanitario importante. No hay que olvidar que la fina distribución del aire en la masa del helado resulta indispensable para la obtención de una adecuada textura, pero es un estímulo de primer orden para el desarrollo microbiano.

Quizá sea en el llenado no obstante, donde existen los peligros de contaminación de mayor importancia. Las máquinas de llenado actúan con un producto de elevada viscosidad como es la mezcla de materias primas con aire incorporado, enfriada a bajas temperaturas. Ello dificulta los problemas de manejo, limpieza y desinfección de este tipo de maquinaria, aspectos que requieren el máximo cuidado y control.

No debe de olvidarse tampoco el riesgo de contaminación humana, sobre todo en salas de envasado en que no existe un dispositivo de flujo laminar de aire acondicionado. Otro aspecto importante es el control sanitario de manipuladores para las personas que desarrollan una actividad en esta sección.

La distribución del helado no suele ofrecer problemas. La falta de un transporte con temperaturas adecuadas supondría la descongelación del producto y una nueva congelación está expresamente prohibida, y en todo caso, originaría un producto de muy inferior calidad.

En la fase final de la cadena comercial, pueden detectarse frecuentemente defectos en el manejo del producto, en especial cuando se separan pequeñas porciones para su venta directa al consumidor, mediante la utilización de instrumentos de corte indebidamente desinfectados, de pinzas o cazos

que se mantienen en aguas de aspecto más o menos lechoso, que constituyen medios de cultivo idóneos para el desarrollo microbiano.

El cuantificar el alcance de todos estos riesgos en las condiciones en que actualmente se desenvuelve esta industria en España, necesitaría de numerosos equipos y medios, actuando coordinadamente por períodos de tiempo excesivamente prolongados. Pero además, el punto de partida más lógico que nos va a poner de manifiesto incluso el grado de conveniencia de este tipo de estudios, es la determinación cualitativa y cuantitativa en ciertos aspectos, de la microflora perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* presente en la actualidad, en distintos tipos de helados que se elaboran en nuestro país.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De las consideraciones expuestas en los apartados anteriores se infieren claramente una serie de hechos que hacen pensar en principio en la utilidad de un estudio amplio de la microflora que se integra en la familia *Enterobacteriaceae*. Este estudio informa a la vez sobre el aspecto cualitativo y cuantitativo, pues en definitiva, toda enterobacteria sin una suficiente capacidad patógena directa, se convierte en un microorganismo indicador de posibles contaminaciones realmente peligrosas. El interés de este estudio está avalado por otra parte, por la ausencia de una investigación de la debida extensión en nuestro país.

El estudio planteado ha tenido en cuenta la posible variación anual en este tipo de microflora, así como la existente durante estos períodos en los distintos tipos y formas de helados elaborados por toda clase de industrias que incluyen las de carácter nacional, local o simplemente familiar.

## 3. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

### 3.1 Definición, Clasificación y Nomenclatura de la familia *Enterobacteriaceae*.

La familia *Enterobacteriaceae* ha sido definida en la 8.ª edición del BERGEY'S MANUAL (14) del modo siguiente: «Integrada por pequeños bacilos Gram negativos, móviles por flagelos peritíricos o inmóviles; capsulados o no; no esporulados; no productores lentos de ácido; aerobios o anaerobios facultativos; crecen rápidamente sobre medios con extracto de carne aunque algunos miembros tienen requerimientos especiales para su crecimiento, quimiorganotróficos; de metabolismo respiratorio y fermentativo; producen ácido de la glucosa, otros carbohidratos y alcoholes; normalmente son aerógenos pero pueden estar presentes grupos anaerógenos y mutantes; catalasa positivos con excepción de un serotipo de *Shigella*; oxidasa negativas; reducen los nitratos a nitratos con excepción de algunas cepas de *Erwinia*».

Desde el punto de vista histórico, son numerosos los autores que han realizado aportaciones valiosas para el mejor conocimiento de esta familia. WILSON, KLIGLER y ROHBERTH (1919) son merecedores del honor de ser los primeros que desarrollaron un método base para la definición e identificación de las bacterias encuadradas en el grupo denominado «Coli-tifo-disentérico», el cual descansaba en el estudio de características tales como las diferencias de motilidad, producción de indol, capacidad para licuar la gelatina y más particularmente diferencias en la capacidad para fermentar carbohidratos, especialmente aquellos compuestos como la glucosa, lactosa, sacarosa,

dulcitol y salicina. La introducción con el mismo objeto, de la reacción IMVIC y la utilización de la prueba de crecimiento en medios con citrato, se debe a PARR (1939). STUART, GRIFFIN y BAKER (1939-1940) añadieron además, la fermentación de la celobiosa.

CHRISTENSEN (1946) incorporó al estudio la investigación del enzima ureasa, y el crecimiento en medio hostil con cianuro potásico se debe a BRAUN y MOLLER (1954). MOLLER (1955), CARLQUIST (1956), THIBAULT y LE MINOR (1957) además de FALKOW (1958) incorporaron sucesivamente la investigación de la triptófano-desaminasa y las pruebas de descarboxilación de aminoácidos.

La evidencia del ácido fenil pirúvico de la fenil alanina, fue incorporada por HENRIKSEN y CLOSS (1938), siendo posteriormente modificada la técnica original por BUTTIAUX y cols. (1954) y SINGER y VOLCANI. LE MINOR y BEN HAMIDA (1962) introdujeron el estudio de la beta-galactosidasa, y KAUFFMANN y WHITE (1966) por último, son coautores del esquema antigénico que lleva su nombre, para el reconocimiento de los grupos serológicos y tipos entre salmonelas y organismos relacionados.

El problema de la taxonomía de esta familia entérica no es menos complejo que los abordados hasta aquí. En 1920, WILSON y cols., de la Comisión Americana de Microbiólogos, incluían dentro de la familia *Bacteriaceas*, la tribu *Bacterieas*, con los géneros *Proteus*, *Bacterium*, *Salmonella* y *Shigella*. Esta clasificación incipiente de la actual familia *Enterobacteriaceae*, sufrió en 1939 una modificación con ocasión de la aparición del BERGEY'S MANUAL, en la que se sustituyó el género *Bacterium* por los *Escherichia*, *Aerobacter* y *Klebsiella*. BREE, MURRAY y PARKER, en la 6.<sup>a</sup> edición, dividen la familia en cinco tribus en las cuales se encuadran los siguientes géneros: Tribu I: *Escherichiae*, con los géneros *Escherichia*, *Aerobacter* y *Klebsiella*; Tribu II: *Eruiniae*, con el género *Eruinia*; Tribu III: *Serratae*, con el género *Serratia*; Tribu IV: *Proteae*, con el género *Proteus* y Tribu V: *Salmonelleae*, con los géneros *Salmonella* y *Shigella*.

En 1954, KAUFFMANN considera únicamente tres tribus: I: *Eschericheae*, con los géneros *Escherichia*, *Shigella* y *Salmonella*; II: *Klebsielleae*, con los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia* y *Serratia* y III: *Proteae*, con los géneros *Proteus*, *Morganella*, *Rettgerella* y *Providencia*.

En la 7.<sup>a</sup> edición del BERGEY'S MANUAL se incorporan en la tribu *Eschericheae*, los géneros *Paracolobactum* y *Alginobacter* como única modificación de interés. LE MINOR en 1962, reconoce solamente cuatro tribus.

Más extensión merecen las dos últimas y más recientes clasificaciones; la clasificación de EDWARDS y EWING (1972) y la de la 8.<sup>a</sup> edición del BERGEY'S MANUAL (1974). Los primeros agrupan la familia en cinco tribus, la primera, *Eschericheae* incluye los géneros *Escherichia* y *Shigella*. La tribu *Edwardsielleae*, incluye únicamente el género *Edwardsiella*. La tribu *Salmonelleae*, integra los géneros *Salmonella*, *Arizona* y *Citrobacter*. La tribu IV, comprende los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia*, y finalmente la tribu V *Eruineae*, con el género *Eruinia*. En este estudio, seguimos fundamentalmente esta última clasificación, si bien en algunos aspectos utilizamos elementos tomados de la clasificación de EDWARDS y EWING.

### 3.2. Antecedentes bibliográficos sobre contenido microbiano de los helados.

El contenido microbiano total de un alimento dado ha sido y sigue siendo considerado un índice higiénico muy importante. Entre las razones más fundamentadas hay que considerar el hecho de que gran número de especies consideradas apatógenas en principio, cuando su presencia supera un límite determinado, son consideradas potencialmente patógenas; por otra parte, un contenido microbiano elevado, sea cual fuere la naturaleza de los agentes presentes, es no cabe duda, un índice desfavorable que habla de defectuosos sistemas de fabricación, preparación o venta de un alimento dado. Las legislaciones alimentarias de todos los países aluden precisamente a este índice, estimando siempre unas cifras máximas relativas, por encima de las cuales no se permite la comercialización del producto.

Por revisar únicamente las dos más recientes disposiciones decretadas sobre esta materia en nuestro país, vemos que el Código Alimentario (21), en su capítulo XXVIII, apartado 3.28.16, admite para los helados y sorbetes de frutas ácidas, un máximo de 50.000 bacterias banales / gramo, y en los de frutas, leche, y nata un máximo de 100.000 bacterias banales / gramo. El decreto 2130 / 74 (10), establece en su artículo 10, apartado 4.<sup>o</sup>, las siguientes consideraciones: máximo de 100.000 gérmenes / gramo en el caso de los helados pasterizados en su totalidad y máximo de 200.000 gérmenes / gramo, en el caso de helados con adición de alimentos no pasteri-

zados. En otros países, las disposiciones análogas se pronuncian igualmente en este sentido. En Bélgica, por ejemplo, al igual que en los Países Bajos (76) (84), el máximo permitido es de 100.000 gérmenes / gramo. En Francia (62), se permite un máximo de 300.000 gérmenes / mililitro y en la República Federal de Alemania (65) y según el tipo de helado, los límites máximos establecidos son de 100.000, 150.000 y 300.000 gérmenes / mililitro. En los Estados Unidos, finalmente, (35), los límites máximos permitidos van según los Estados, de 50.000 a 100.000 gérmenes / mililitro.

Idénticas consideraciones de importancia merecen, por otra parte, los denominados «Recuentos de coliformes» y «Recuentos de enterobacterias totales», que en conjunto pueden ser considerados como indicadores de contaminación de origen fecal en el sentido más amplio de la palabra. El término general «Coliforme» abarca fundamentalmente *E. coli*, aunque también incluye otros géneros de la familia *Enterobacteriaceae*.

Los gérmenes coliformes, dada la amplitud con que se considera dicho término, no indican necesariamente contaminación de origen fecal en el sentido de implicar un contacto inmediato con heces o con una superficie contaminada con ellas; no obstante, en un alimento industrializado, los coliformes son índice de un tratamiento inadecuado o una contaminación posterior al tratamiento, muy probablemente a partir de los manipuladores o de instrumentos sucios, máquinas o superficies o también a partir de la materia prima no tratada, contaminada a su vez, por contacto con personas, agua, suelo, etc. En todo caso, la contaminación original casi siempre procederá de heces o aguas contaminadas (residuales) (111).

La utilización de las Enterobacterias Totales como indicadoras de contaminación, nace con la puesta en marcha por MOSSEL y cols. (cit. por THACHER y CLARK), de un nuevo medio de cultivo que permite que todos los miembros de la familia *Enterobacteriaceas* formen colonias, desechariendo de este modo la selección de los lactosa positivos, que constituyen la base de la determinación del índice de coliformes o colimetría.

Respecto al número de coliformes, y aludiendo nuevamente a las referencias legales vigentes, el Código Alimentario establece en el apartado antes citado, un máximo de 20 gérmenes / gramo, pertenecientes al grupo coliforme. El Decreto 2130 / 74, establece por su parte, en el apartado 5.<sup>o</sup>, un máximo de 100 coliformes / gramo en el caso de helados pasterizados en su totalidad. En Bélgica no se admiten coliformes o enterobacterias. En los Países Bajos, se admite un número inferior a 1 germe del grupo coli-aerógenos por 0,1 mililitro. En Francia, se establece que el número de coliformes o enterobacterias por mililitro de muestra, ha de ser inferior a 100. En la República Federal de Alemania, no tenemos conocimiento de ninguna especificación en este sentido, y finalmente en los Estados Unidos, las disposiciones oficiales establecen que el número de coliformes o enterobacterias ha de ser inferior a 1 por 0,1 mililitro.

Algunos autores consideran en el caso particular de los helados, de gran importancia como índices higiénico sanitarios, las cifras de recuento de levaduras, hongos, gérmenes psicrófilos, mesófilos y termodúricos. Las disposiciones legales citadas, no se pronuncian en ningún caso en este sentido.

Bien temprano, a principios de siglo, se tradujo la inquietud por conocer la calidad higiénica de este producto que cada vez era más apetecido por el consumidor. Buena prueba de ello son los trabajos de FAY y OLSEN (1924) (40), los de BARESLEY (6), o los de FOURNELLE y MACY (1942) (43) que bien pudíramos considerarlos pioneros en este tipo de estudios. Más adelante, la mayor disposición de materiales y sobre todo de técnicas, condujo indudablemente a resultados más fiables que los primeros.

MORALES y cols. (1961) (80), en la ciudad de La Plata, sobre un total de 310 muestras pertenecientes a 15 establecimientos distintos, obtuvo una cifra media de recuento de totales de 2.339.466 gérmenes / gramo, con máximos de 50 millones y mínimos de 200 gérmenes / gramo. Los coliformes fueron detectados en 202 muestras (el 65,1 % del total) con máximos por establecimiento del 100 % (3 casos) y mínimos del 0 % (2 casos), estando la media de positividad por establecimiento situada alrededor del 66,9 % de las muestras.

JORGENSEN (1962) (61) resume el desarrollo de la reglamentación sanitaria cualitativa de los helados en Dinamarca y sugiere a la vez el establecimiento de límites máximos de contenido total en medio sólido de leche y peptona, de 100.000, 25.000 y 2.000 gérmenes / ml., según se trate de: 1) mezclas heladas, helados de leche y sorbetes, 2) mixes para helados, polos y sorbetes y 3) limonada helada. PALLADINO (89) sobre 2.520 muestras entre 1959 y 1961, obtuvo en 623 de ellas, 401 (el 64,3 %) con menos de 10.000 bacterias / ml.; 179 (el 28,7 %) entre 10.000 y 50.000

bacterias / ml.; 36 (el 5.7 %) entre 50.000 y 100.000 bacterias / ml. y por último 7 muestras (el 1.1 %), que proporcionaron contenidos bacterianos / ml. superiores a 100.000. En 1960, sobre 827 muestras, en 739 (el 89.3 %) se encontraron cifras inferiores a 10.000 bacterias / ml., en 80 (el 9.6 %) contenían entre 10.000 y 50.000, en 5 muestras (el 0.6 %) entre 50.000 y 100.000. En 1961, y sobre 1.070 muestras, en 924 (el 86.3 %) se encontraron menos de 10.000 bacterias / ml., en 132 (el 12.3 %) contenían entre 10.000 y 50.000, en 11 (el 1.1%) la cifra / ml. estaba comprendida entre 50.000 y 100.000, y finalmente en 3 muestras (el 0.2 %) se superaron los 100.000 gérmenes / ml. El total de muestras estudiadas lo fueron también a la presencia de coliformes, y durante los tres períodos descritos, los porcentajes de positividad fueron respectivamente del 34.6 %, 22.2 % y 29.9 %.

CARIC (1967) (19) estudió en Zagreb 439 muestras de helados de «pequeños fabricantes». Los resultados obtenidos impidieron que 56 muestras fueran declaradas de libre consumo. En tres de ellas, el recuento de totales ofreció cifras superiores a los 200.000 gérmenes / ml.

CUSTOT (24) estudió 102 muestras procedentes a partes aproximadamente iguales, de la industria y de fabricación en pequeña escala, encontrando en una muestra 92 millones de gérmenes. El SHERIF (36) estudió en El Cairo, 60 muestras obtenidas de puestos de venta callejeros. La media de los recuentos de totales fue de 998.400 gérmenes, con límites mínimo y máximo de 240.000 y 3 millones / ml. respectivamente. El recuento de coliformes arrojó cifras medias de 4.196 / ml. con límites máximo y mínimo de 180.000 y 400 respectivamente.

GUARGUAGLINI (1967) (52) estudió en Génova 147 muestras de procedencia industrial y 60 de pequeños fabricantes; 106 y 47 respectivamente, proporcionaron resultados de totales inferiores a 100.000 / ml. y superiores a 100 coliformes / ml. TAMPieri (1967) (110) estudió 582 muestras en Cremona pertenecientes a 361 pequeños fabricantes, el 89 % del total, contenían cifras superiores a 200.000 / gramo, y el contenido de coliformes fue superior a 10 / ml. en 233 casos.

AGUIRRE y cols. (1968) (1) estudiaron 359 muestras en Buenos Aires a lo largo de 7 años. De acuerdo con la composición, dividieron los helados en tres grupos incluyendo en el primero los compuestos a base de crema y leche, en el segundo los que llevaban leche únicamente y en el tercero los que llevaban fruta y no llevaban ni crema ni leche. Con el fin de poder expresar estadísticamente los resultados, éstos fueron agrupados en tres períodos (trianuales los dos primeros y bianual el último). En el primer período excedieron los límites legales el 64,61 %, el 46,51 y el 65,21 % de las muestras respectivamente según el grupo. Durante el segundo período los resultados fueron respectivamente del 30,8, el 36 % y el 30,4 %, siendo durante el tercero y último, del 46 %, del 26,9 % y del 25 % respectivamente.

BARTH (7) entre 1958 y 1967 estudió 841 muestras de helados. El recuento total en placa, sobre pasó la cifra de 300.000 / ml. en un 21,5 % de las muestras, siendo el porcentaje de muestras con un contenido superior a 100.000 / ml., del 35,2 %.

SANDOVAL y cols. (1969) (96) estudiaron 109 muestras de helados en Sao Paulo, observando que la totalidad de las muestras incluían recuentos inferiores a 41.000 gérmenes / gramo, en tanto que la presencia de coliformes fue positiva en 61 muestras.

PAGARIA y SARASWAT (1969) (87) estudiaron 200 muestras de Udaipur, dividiendo las mismas en tres grupos que incluían las obtenidas en las propias plantas de fabricación, las obtenidas en restaurantes y las obtenidas de vendedores ambulantes. La oscilación de los recuentos de bacterias totales fueron en el primer grupo desde 1.300 / gramo a 3,2 millones / gramo; en el segundo de 9.100 a 18 millones / gramo y en el tercero, desde 31.000 / gramo a 36 millones / gramo. En el mismo país, MOKASHI y cols. (1970) (78) estudiaron 100 muestras obteniendo 5 libres de gérmenes y en el resto, oscilaciones variables desde 1.000 / ml. a cantidades innumerables en 36 muestras. Las cifras de coliformes fueron desde 100 / ml., hasta 3.700 / ml.

MALAKI y cols. (1970) (69) estudiaron 297 muestras en Teherán eliminando para el consumo público un total de 136 entre otras razones, por situarse la cifra de recuento en placa por encima de los 2 millones / ml.

Por lo que a nuestro país se refiere, hemos hecho ya mención de la escasez de trabajos experimentales de este tipo. ALVAREZ GÓMEZ y SAN PÉREZ (op. cit.) establecieron como cifras medias de recuento total de gérmenes / gramo, en los helados elaborados en León y puestos a la venta en la misma capital, la de 103.500 para los establecimientos fijos y 508.500 para los establecimientos ambulantes. De igual modo y por lo que a gérmenes coliformes se refiere, en los establecimientos fijos la cifra hallada (media) fue de 56.743 / gramo, en tanto que en los estableci-

mientos ambulantes fue de 1.316 / gramo. Los helados foráneos, todos ellos expendidos en establecimientos de venta fijos, proporcionaron una cifra de recuento total de gérmenes / gramo (media), de 113.740, en tanto que la cifra de coliformes fue de 39.522 / gramo.

IBARZ y BARCELONA (op. cit.), establecieron sobre un total de 138 muestras de helados en la provincia de Tarragona en 1972, que el porcentaje de muestras contaminadas por coliformes, alcanzó la cifra del 43,4 %.

### 3.2.1. Antecedentes Bibliográficos. Género Escherichia.

La especie tipo es *E. coli* cuyo hábitat natural es la última porción del tubo digestivo de los animales de sangre caliente a consecuencia de lo cual, la presencia de este agente en un alimento, se interpreta habitualmente como contaminación de origen fecal. Esta razón hace que *E. coli* sea el indicador clásico de la presencia simultánea de bacterias patógenas entéricas (salmonelas, shigelas, etc.), desde el momento en que la determinación de estas últimas es más difícil y costosa. Es preciso advertir, por otra parte, que esta indicación no implica sino un riesgo de existencia.

Si bien la sospecha de que determinadas cepas de *E. coli* pudieran estar implicadas en casos de gastroenteritis infantil, fue hecha en los años treinta por ADAM, el reconocimiento de tal situación debe de ser atribuida a BRAY quien, conjuntamente, con BEA VAN consiguieron el aislamiento de primer serotipo (actualmente 0111:B4) en 1945 (74). A partir de este momento y cada vez con más insistencia, se viene confirmando el papel etiológico representado por varios serotipos de *E. coli* en las diarreas. El desarrollo reciente de métodos serológicos suficientemente perfeccionados, ha facilitado la diferenciación de estíples y, numerosos investigadores han demostrado una asociación entre algunos tipos de *E. coli* y varias enfermedades en el hombre y animales. Las enfermedades entéricas con estíples enteropatógenas, particularmente durante el período neonatal, son la manifestación más común de la infección por *E. coli* en el hombre y animales. El término *E. coli* enteropatógeno, se utiliza para designar estíples de este organismo provistas de un particular potencial para causar enfermedades diarréicas.

En atención a sus propiedades y sobre todo, a la producción o no de enterotoxina, las estíples de *E. coli* son divididas por SOJKA (107) en dos grupos principales: 1) Enterotoxigénicas, que ocupan en su mayoría la parte superior del intestino delgado, y 2) Invasivas, no toxigénicas, asociadas con síndromes de tipo diarréico.

SMITH (1973) (101), CYLES (53), GLAUTZ (46), SOJKA (108), KHLER (66), GROSS (50), DIFCO (29), EDWARDS y EWING (op. cit.), SEEVEENEY (cit. por MELLADO, op. cit.), SARAN, ROSENZAIG y COHEN (cit. por MELLADO, op. cit.), SATO, NONURA y HASHIMOTO (cit. por MELLADO, op. cit.), así como ALLER GANCEDO y CORDERO DEL CAMPILLO (4), nos han permitido la agrupación de estíples de *E. coli* enteropatógeno que a continuación señalamos y que están relacionadas en el hombre y distintas especies animales con síndromes diarréicos y enterotóxicos.

Colibacilosis humana: Diarrea infantil y síndrome diarréico de los individuos adultos, así como *E. coli* enteropatógeno no toxigénicos. 06: H16. 015:H11. 018:B20. 018:B21. 020:B7. 020:84 (B). 026:B6. 028:B18. 044:K74. 055:B5. 078:H12. 086:B7. 0111:B4. 0112:B11. 0113:B19. 0119:B14. 0124:B17. 0125:B15. 0126:B16. 0127:B8. 0128:B12. 0136:B22. 0143:X1. 0144:X2. 0148:NM (28). Los grupos que con mayor frecuencia se aíslan en casos de gastroenteritis infantiles, son sin duda alguna, los 026:B6. 055:B5. 086:B7. 0111:B4. 0119:B14. 0125:B15. 0126:B16. 0127:B8. y 0128:B12, todos ellos descritos en nuestro país por numerosos autores (GÓMEZ LUS, BUENO SÁNCHEZ, PUMAROLA, MELLADO, ESCRIBANO, BAQUERO, ARCALIS, PRATS y RODRÍGUEZ TORRES (cit. por Mellado, op. cit.).

Colibacilosis porcina: Formas diarréica, septicémica y enfermedad de los edemas. Se incluyen como serotipos enteropatógenos más importantes, los siguientes: 08:K87,K88. 08:K87,K88ab. 08:K87. K88ac. 09:K (?). 045:K88ac. 045:KEG5. K88. 098. 0138:K81. K88ab. 0138:K81 K88ac. 0138:K81 (B):H14. 0139:K82. 0141:K85. K88. 0141:K85 (B):H4. 0147:K89. K88ac. 0149:K91. K88. 0157:K (?). 0157:K (?). K88.

Colibacilosis bovina: En los animales jóvenes, se describen los siguientes serotipos: 08. 09. 013. 019. 015. 020. 021. 026. 055. 078. 086. 0101. 0111ab. 0115. 0119. 0137.

En los animales adultos, los serotipos encontrados son los 012. 042. 082 y 088.

Colibacilosis ovina: Las formas sistémica y entérica, incluyen los siguientes serotipos: 02:H6.

04:H. 08;K85ab, KCo. 09;K35,KCO. 010;K32, KCO. 015, C18:H. 020;K. «X664», 020;K «XB67», 035, 075;K:H8. 078;K80;H1. 0101;K «B41», KCO. 0113;H21. 0115. 0121;H19. 0124;K; NM. 0125. 0137.

Colibacilosis aviar: Pueden estar implicados hasta 75 serotipos, pero por su frecuencia son dignos de mención los siguientes: 01, 02, 02;K1. 05, 09, 016, 041, 071, 078, 078;K80, 079, 084, 086, 0111, 0119, 0126.

Otras especies animales como los gatos, perros, roedores, monos antropoides y conejos, han sido también fuente de aislamientos de estípites enteropatogénicas de *E. coli*, si bien su importancia desde el punto de vista que nos ocupa, no deja de ser secundaria.

Dentro de los nueve serotipos antes destacados por su frecuencia en la colibacilosis humana, los serotipos 0111:B4 y 055:B5, son especialmente importantes según DACK (25).

Los síndromes de diarrea infantil y diarrea de los turistas, se caracterizan en su forma aguda, por una copiosa diarrea acuosa, marcada deshidratación y debilidad circulatoria (49). Las estípites causales, ubicadas fundamentalmente en la parte superior del intestino delgado, elaboran una enterotoxina termolábil, reactiva solamente en esa zona del intestino, donde causan una descarga masiva de fluido tisular a la luz intestinal, siendo causa de diarrea y deshidratación.

Las estípites no toxigénicas de *E. coli* enteropatogénico, pueden calificarse de invasivas y están asociadas asimismo con un síndrome disentérico caracterizado por una colitis que puede afectar por igual a niños y adultos. Estas cepas proliferan en el colon y al igual que las shigelas, son causa de disentería y colitis por invasión de las células epiteliales de la mucosa del colon. Las formas más graves, incluyen disentería, fiebre, postración abdominal y toxemia sistémica severa (33).

Son numerosos los autores que han descrito casos de diarrea producidos por serotipos enteropatogénicos de *E. coli* en los cuales estaban implicados los alimentos como vehículos de los mismos. Los tipos de alimentos más frecuentemente implicados en estos trastornos han sido por lo general, aguas de bebida, leche y productos lácteos. Otros alimentos como carnes, mariscos, vegetales, etc., poseen una importancia más secundaria y, en todo caso, pueden poseer interés por representar algún cometido en los procesos del adulto (MELLADO, op. cit.).

Podría pues resumirse, que dada la cada vez mayor frecuencia de aislamiento de este tipo de agentes en alimentos de mercado, es indudable que la población consumidora está sometida a un peligro potencial de enfermedad, máxime si se trata de alimentos de bajo nivel higiénico.

No conocemos por el momento, al menos por cuanto a nuestro país se refiere, ningún brote diarreico (toxiinfectivo) denunciado por consumo de helados en el que se haya hecho responsable la presencia de *E. coli* enteropatogénico. No quiere esto decir que no se produzcan; más bien, nos inclinamos a pensar que así sea, y que la investigación epidemiológica (caso de que se haga) no haya sido lo suficientemente profunda para llegar al reconocimiento etiológico de la causa exacta. En la actualidad, como ya hemos apuntado, se dispone de medios de diagnóstico suficientemente perfeccionados como para permitir averiguaciones de este tipo sin márgenes de error considerables.

Por cuanto al reconocimiento de *E. coli* como indicador de contaminación fecal se refiere, la literatura abunda en ello con suficiencia; puede decirse que el valor de este germe entérico como índice higiénico-sanitario, hace de él un complemento de las otras dos determinaciones antes ya revisadas, y al igual que en ellas las legislaciones alimentarias se pronuncian en uno u otro sentido. En nuestro país, el Decreto 2130 / 74 establece la ausencia de *E. coli* en 25 ml. de helado fundido. Las legislaciones belga y francesa, establecen el límite de menos de 1 por ml. mientras que en la República Federal Alemana, estos extremos varían según el tipo de helado: de menos de 1, menos de 10 y menos de 30.

Existe un aspecto de la problemática de *E. coli* de gran interés para este estudio, y ello es la supervivencia de este agente en alimentos congelados. A este respecto, SATO y cols. (1968) (97) demostraron un marcado decremento de los recuentos, siendo las células especialmente lábiles durante la fase logarítmica. ALEXANDER y ROTHWELL (1970) (2) llegaron a la misma conclusión utilizando experimentalmente mezclas heladas inoculadas con *E. coli* y con *B. cereus*.

Entre la bibliografía disponible que contempla la presencia de este género en los helados, AGUIRRE y cols (op. cit.) obtuvieron un 39.7 % de determinaciones positivas a la presencia de *E. coli* fecal. CARIC y cols. (op. cit.), de igual modo, declararon fuera de consumo por exceder la cifra de *E. coli* fecal, el 30 % de los helados de leche estudiados y el 19 % de los helados de frutas.

SANDOVÁL y cols. (op. cit.) identificaron *E. coli* en 2 muestras de las 61 en las que se había

diagnosticado la presencia de coliformes. MALAKI y cols. (op. cit.) pusieron de manifiesto la presencia de *E. coli* y otros coliformes, en el 42,64 % de las muestras estudiadas.

BARTH, KASLOV, DORZDOVA entre otros, citan referencias de la presencia de este agente en muestras de helados estudiadas por ellos en distintos lugares y en distintos años.

SING y cols. (99) destaca la presencia de serotipos enteropatogénicos de *E. coli* en helados; sobre todo los serotipos 055:B5 y 0126:B6, siendo menos acusada la incidencia de serotipos pertenecientes a los grupos 020, 026, 0111, 0119, 0124, 0127 y 0128.

Por cuanto a nuestro país se refiere, únicamente ALVAREZ GÓMEZ y SAN PÉREZ (op. cit.) investigaron en el estudio llevado a cabo en León, la presencia de *E. coli* tipo I, llegando como resultados a cifras que alcanzaron los siguientes valores: Los helados elaborados localmente, referidos a tres establecimientos fijos, mostraron respectivamente unos porcentajes de positividad al germe referido, de 33, 50 y 0 %. En tres establecimientos ambulantes, los porcentajes de muestras positivas fueron 2,5, 50 y 2% respectivamente. Los helados foráneos estudiados en cinco establecimientos diferentes, dieron los siguientes porcentajes de positividad: 0, 0, 0, 0,2, y 0 % respectivamente, lo que indica el distinto grado de higiene existente en la preparación y venta de los helados elaborados por industrias de ámbito nacional, comparados con las pequeñas industrias familiares.

### 3.2.2. Antecedentes bibliográficos. Género *Edwardsiella*.

El hábitat natural de este grupo, del que la especie tipo es *E. tarda*, lo constituye probablemente el sistema intestinal de las serpientes (BERGEYS MANUAL, op. cit.) siendo aislado en ocasiones de muestras fecales humanas con diarrea o, en otros casos, de individuos que disfrutan de buena salud, así como de la sangre del hombre y animales, y de orina. También ha sido aislada del agua.

En el aspecto que aquí nos concierne, por lo que a la presencia de especies de este género en helados se refiere, no hemos encontrado referencia alguna al respecto en la bibliografía consultada.

### 3.2.3. Antecedentes bibliográficos. Género *Citrobacter*.

Este tipo de gérmenes se aíslan del agua, alimentos, heces, orina, etc. Parecen ser habitantes normales del aparato digestivo y se aíslan con frecuencia de individuos sanos. Algunos serotipos parecen presentarse de modo esporádico y en gran cantidad de infecciones alimentarias, infecciones del tracto urinario, vesícula biliar, oído medio y meninge. La especie tipo es *C. freundii*.

Respecto a su presencia en los helados, teniendo en cuenta que el grupo indicador denominado «coliformes» engloba entre otros a este género entérico, podemos dar por sentado todo lo dicho en el apartado correspondiente. En cuanto a identificación separada y concreta de especies pertenecientes a este género, únicamente MALAKI y cols. (op. cit.) afirman haber encontrado *Escherichia freundii*, denominación ésta que es sinónima de *Citrobacter freundii*, como es sabido, en un 8,92 % de las 297 muestras estudiadas.

### 3.2.4. Antecedentes bibliográficos. Género *Salmonella*.

Entre las especies bacterianas contaminantes de los alimentos y consideradas de importancia sanitaria por su poder patógeno potencial o real, es quizás el género *Salmonella* el que ha dado lugar a más abundante literatura. Son de todos conocidos los grandes estragos ocasionados en la población consumidora por especies como *S. typhi* o *S. paratyphi*, productoras respectivamente de las fiebres tificas y paralíticas, pero es que el problema no queda reducido ni mucho menos a estos dos casos que no por ser suficientemente demostrativos son únicos. Es sentir unánime de numerosos autores, que cualquier serotipo de salmonela debe de ser considerado potencialmente patógeno para el hombre.

Atendiendo a este criterio, las legislaciones sanitarias internacionales se pronuncian en el sentido de que debe de estar ausente este género en los alimentos, especificándolo claramente, o bien, incluyéndolo dentro del amplio capítulo de gérmenes patógenos.

Desde que se describió el primer brote de salmonelosis en Fraukenhause (Sajonia) por GARTNER en 1888 debido al consumo de carne cruda, hasta nuestros días, el problema de la

salmonelosis ha tomado tanto importancia que a instancias de la O.M.S., y con fondos de distintas procedencias, funcionan en la actualidad Centros Internacionales y Nacionales de Referencia para las salmonelas, a los cuales se les tiene encomendada la vigilancia sanitaria por lo que a las mismas se refiere, teniendo encomendada asimismo la identificación y tipificación de los numerosos serotipos de salmonelas aislados en todo el mundo, así como la propuesta de medidas de todo tipo encaminadas al control del género que nos ocupa. Los alimentos implicados con más frecuencia como origen de salmonelosis, son ciertamente numerosos; así por ejemplo, sobre un total de 67 brotes descritos durante los años 1951, 1952 y 1953 por el Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos (Dack, op. cit.) en 19 de ellos fueron implicados la carne de pollos y pavo, en el resto lo fueron caldo de yemas, yemas de huevos, asado Alaska, jamón asado, espagueti, hígado picado, helados confeccionados con huevos de pata y preparados en casa y crema rellena con chocolate.

El tercer informe del Comité Mixto F.A.O. / O.M.S. de expertos en zoonosis (39) recoge como alimentos que pueden contaminarse por salmonelas, los siguientes: Huevos y productos a base de huevos, que incluyen fundamentalmente huevos de pata, de gallina y alimentos a base de huevos. Carne, que incluye de ave de corral, de vaca, de ternera, de cerdo y de caballo, así como hormonas y otros productos de origen animal. Pescado. Leche. Productos vegetales. Alimentos para animales y fertilizantes y finalmente, agua.

Por su interés como materia prima para la elaboración de helados son de extraordinario interés a este respecto, los huevos y productos a base de huevos, y la leche. Respecto a los huevos de pata, el citado informe afirma que si bien el índice de infección ha descendido a consecuencia de la puesta en marcha de medidas preventivas tales como la ebullición, aún se mantiene relativamente alto. El mayor peligro de contaminación de los huevos de gallina radica precisamente en la existencia de grietas en la cáscara y, finalmente, por cuanto a los alimentos a base de huevo se refiere, el grupo de especialistas F.A.O. / O.M.S., hace hincapié en la elevada frecuencia de contaminación de productos tales como huevos congelados, huevos enteros en estado líquido, clara y yema o huevos en polvo, a consecuencia de los elevados porcentajes de infección subclínica en las aves. Asimismo, el informe señala que cuando la pasteurización se lleva a cabo convenientemente, el tratamiento ofrece garantías suficientes. El peligro de contaminación posterior al tratamiento térmico, obliga a una continua vigilancia sanitaria tanto en las instalaciones como en los manipuladores.

Respecto a la leche, cuando la pasteurización de la misma tiene lugar, el riesgo teórico de contaminación es realmente escaso, aunque siempre existe el fantasma de una posible recontaminación posterior.

Respecto a las especificaciones legales a las que ya nos hemos referido con anterioridad, por lo que al género *Salmonella* se refiere, mientras que en Bélgica se entiende excluida su presencia al denotar la necesidad de que los microorganismos peligrosos o nocivos para el hombre estén ausentes, en los Países Bajos se especifica claramente que debe de haber ausencia de gérmenes patógenos. En Francia, se estima que el contenido de salmonelas en los helados debe de ser inferior a 1 por 25 ml. y en la República Federal de Alemania y Estados Unidos, no se hace especificación alguna al respecto.

En nuestro país, la normativa legal se pronuncia claramente en contra. El Código Alimentario, establece claramente: «no existirán licuadores de la gelatina, ni microbios patógenos (estreptococos, estafilococos, *microbacterium tuberculosis*, brucelas y salmonelas)». Por su parte, el decreto 2130 / 74 dispone: «estarán exentos de gérmenes patógenos y de sus toxinas».

Como referencias bibliográficas de este género en los helados, hemos citado ya los brotes descritos por LUMSDEN y CUMMING. En 1947, EVANS describió un nuevo caso. DEWBERRY (op. cit.) relaciona los brotes de toxioinfección alimentaria por consumo de helados habidos en Inglaterra y Gales entre 1892 y 1954. En tal relación pueden observarse casos de tifoidea en 1892 en Londres, en 1904 en Govan y Glasgow, en 1910 en Eccles, en 1916 en Boldon Colliery, en 1935 en Grays-in-Thurrock y en 1946 en Aberystwyth. Asimismo, se describe un caso de paratíficas originado por *S. paratyphi B* en Southampton en 1937 y tres casos de intoxicación alimentaria en Lincoln (1946), Winchester (1947) y Bradford (1949), cuyas causas fueron respectivamente *S. typhimurium* en las dos primeras y *S. newport* en la última.

Más recientemente, PERIĆ y JANKOVIĆ (op. cit.) describieron en 1967, un brote de toxioinfección con 21 personas afectadas, atribuido al consumo de helados contaminados con *S. enteritidis*.

Gärtner. En el mismo año, Custot (op. cit.) publicó los resultados del análisis de 102 muestras de helados en las que no encontró ninguna salmonela. TAMPIERI y DOSSENA (op. cit.) sobre 582 muestras estudiadas durante 1964 aislaron *S. typhimurium* en dos ocasiones.

MALAKI y cols. (op. cit.) aislaron *salmonella spp.* en el 1,46 % de las 297 muestras de helados estudiadas en 1970 y por último, PATEL y BYAS (op. cit.) pusieron de manifiesto la presencia de *S. cholerae suis* en un total de 7 muestras de helados estudiadas en la India.

En nuestro país, ninguno de los trabajos referenciados, hace comentario alguno sobre la presencia de salmonelas en los helados de fabricación y venta nacionales.

### 3.2.5. Antecedentes bibliográficos. Género *Shigella*.

Existen cuatro especies del género, que a menudo se señalan también como subgrupos. *S. dysenteriae*, constituye el subgrupo A; *S. flexneri*, integra el subgrupo B; *S. boydii* constituye el subgrupo C y *S. sonnei* el subgrupo D. La primera especie citada, constituye la especie tipo y produce generalmente, la enfermedad más grave.

*S. dysenteriae* es aparentemente el único entre los bacilos disentéricos provisto de capacidad de formación además de una endotoxina (complejo polisacárido-lípido-polipéptido), de una exotoxina calificada como neurotoxina, que afecta *S. N. C.* produciendo parálisis. Las infecciones por esta shigela, han sido observadas fundamentalmente en la India, Japón, China y otros países de Asia, siendo destacada recientemente una epidemia en América Central (17).

*S. flexneri* está ampliamente difundida y es en opinión de muchos, la shigela cuyo número de aislamientos abarca el mayor porcentaje. *S. boydii*, posee una patogenicidad muy similar a la de *S. flexneri*, siendo también como ella enormemente ubicua.

La vía oral es la más usual en la transmisión de las especies pertenecientes a este género, siendo los alimentos más corrientemente implicados, el agua, la leche, los huevos y los productos derivados. La cuantía exacta en que los alimentos pueden ser vectores de shigelas, no es conocida con exactitud, pero considerando que es suficiente para producir la infección un pequeño número de gérmenes, es presumible que las defectuosas prácticas de higiene personal en la manipulación de los alimentos, pueden suponer un peligro considerable.

La incidencia de shigelosis por consumo de helados no puede ser calificada importante. En el citado resumen de brotes toxioinfectivos en Inglaterra y Gales, únicamente se registran dos casos en Glasgow y Lanarkshire en 1933 y 1935 respectivamente, culpándose a *S. sonnei* en ambos como causa de los mismos. LAMBION y VEULEMANS (op. cit.) citan también un caso de shigelosis por consumo de helados en 1966 en Bélgica.

En nuestro país, no se ha encontrado ninguna referencia.

### 3.2.6. Antecedentes bibliográficos. Género *Klebsiella*.

*K. pneumoniae*, la especie tipo del grupo, se caracteriza por su amplia difusión aislándose del suelo, agua, granos de cereales, etc. y de modo habitual del tracto intestinal del hombre y los animales. Si bien esta especie es responsable de lesiones localizadas en cualquier parte del cuerpo, no es infrecuente la observación ocasionalmente, en formas graves de enteritis en cierto modo similares a la disentería bacilar (102).

En un estudio efectuado por FOURNELLE y MACY (op. cit.) en 1942 sobre 90 muestras de helados, obtuvieron *Aerobacter aerogenes*. De igual modo, SANDOVAL y cols. (op. cit.) aislaron *Aerobacter aerogenes* de 23 muestras de las 109 en que basaron su estudio. Finalmente, MOKASHI y cols. (op. cit.) sobre 100 muestras, pusieron de manifiesto la presencia de *K. aerogenes* y *K. pneumoniae* en 18 y 5 muestras respectivamente.

En nuestro país, ninguno de los trabajos citados refleja la existencia de flora perteneciente a este género en el alimento que nos ocupa.

### 3.2.7. Antecedentes bibliográficos. Género *Enterobacter*.

La especie tipo de este género, *E. cloacae*, se aísla de heces del hombre y animales, aguas residuales, suelo y agua. Ocasionalmente puede aislarse de orina, pus y otros materiales patológicos procedentes de los animales. *E. aerogenes* puede aislarse además de las fuentes anteriores, de productos lecheros.

FOURNELLE y MACY (op. cit.) aislaron *A. cloacae* tanto de las muestras tomadas en las factorías, como de las muestras tomadas o con cazo o con cuchara. Asimismo, SANDOVAL y cols. (op. cit.) aislaron *A. cloacae* de 14 muestras en un estudio sobre 109. Respecto a nuestro país, las mismas consideraciones hechas en el género anterior, son válidas para éste.

### 3.2.8. Antecedentes bibliográficos. Género *Hafnia*.

La especie tipo de este género, *H. alvei*, se aísla de heces del hombre y de los animales así como de aguas residuales, suelo, agua y productos lácteos (Bergey's Manual, op. cit.).

En la bibliografía disponible, tanto de procedencia nacional como internacional, no se ofrecen resultados que denoten su presencia en el producto que nos ocupa.

### 3.2.9. Antecedentes bibliográficos. Género *Serratia*.

La especie típica es *S. marcescens*, cuyo hábitat natural lo constituyen el agua, suelo y alimentos, entendiéndose por tanto que su distribución sea muy amplia. Ocasionalmente puede hallarse también en materiales patológicos.

Ninguna de las referencias consultadas, tanto nacionales como internacionales, incluyen este género entre la flora estudiada en los helados.

### 3.2.10. Antecedentes bibliográficos. Género *Proteus*.

La especie típica, *P. vulgaris*, se aísla con frecuencia de materiales fecales de la mayor parte de los animales, aguas residuales y suelo, especialmente donde existan proteínas animales en descomposición. *P. mirabilis*, es aislada de los mismos lugares que el anterior encontrándose con más frecuencia que aquél a partir de materiales procedentes de clínica humana. *P. morganii* no posee hábitat conocido, aislándose no obstante con mayor frecuencia a partir de heces humanas. Otro tanto puede afirmarse de *P. rettgeri*, quien se aísla también de material clínico humano y de heces de aves (gallinas) así como *P. inconstans*, que también se aísla de muestras clínicas humanas, especialmente a partir de orina y heces.

Las especies del género *Proteus* tienen en común con *E. coli* su gran afinidad por las vías urinarias, pudiendo revestir incluso más gravedad por el hecho de poseer en su equipo enzimático el enzima ureasa. *Proteus*, se aíslan también en materiales de origen fecal, procedentes de disenterías de carácter agudo, y de la sangre cuando existe bacteriemia (SMITH, op. cit.). *P. morganii* fue aislado precisamente en 1906 por Morgan a partir de heces de niños con disentería estival. La disentería por esta especie, a pesar de su parecido con la producida por las shigelas, a veces cursa con fiebre, como sucede con las salmonelas.

Respecto al género *Proteus*, aunque la legislación española al respecto no contempla de modo concreto su existencia o ausencia, otras legislaciones como por ejemplo la alemana, especifican claramente que su número en los helados ha de ser inferior a 100.000 / ml.; no obstante, la tónica que predomina es la que impera en nuestro país.

La descripción de especies de este género que figura en la bibliografía consultada, se limita únicamente al estudio de MALAKI y cols. (op. cit.) quienes describen que de 136 muestras contaminadas de las 297 en las que se llevó a cabo el estudio, en el 1.46 % se diagnosticaron la presencia de *Proteus spp.*

### 3.2.11. Antecedentes bibliográficos. Género *Yersinia*.

La inclusión del género *Yersinia* dentro de las enterobacterias, obedece a la proposición de THAL en 1954. Desde el punto de vista que nos ocupa, únicamente *Y. enterocolitica* tiene interés para nosotros en razón de su hábitat calificado de ubíco a consecuencia de los numerosos aislamientos conseguidos de heces y ganglios linfoides de animales y hombre. También ha sido aislada de materiales con posibilidades de contaminación por heces, tales como leche o helados. Aparte la referencia citada anteriormente, no disponemos de dato alguno que haga mención a la posible presencia de esta especie a partir de los helados.

### 3.2.12. Antecedentes bibliográficos. Género *Erwinia*.

La bibliografía consultada, ya sea nacional o internacional no refleja en modo alguno aislamientos de esta especie realizados a partir del producto que nos ocupa.

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1. LUGARES DE TRABAJO.

El trabajo que presentamos se inició en 1972 y fue llevado a cabo de manera principal, en las dependencias del Departamento de Microbiología de la Facultad de Veterinaria de León (Universidad de Oviedo), habiéndose repetido algunos experimentos en la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona siendo ya titular de la misma el Director de la Tesis, así como en la Cátedra de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la misma Universidad.

### 4.2. RECOGIDA DE MUESTRAS.

Las cien (100) muestras estudiadas fueron recogidas durante los meses de verano de los años 1972 y 1973. La elección de estos meses descansa en el supuesto de que a pesar de que el consumo de helados en la actualidad es continuo a lo largo de todo el año, durante los meses de verano por ser la temperatura ambiental más alta, se incrementa sensiblemente el consumo en relación con otras épocas y por otro lado, las condiciones de venta (fundamentalmente en los puestos ambulantes) acusan un mayor número de deficiencias en el aspecto higiénico-sanitario.

Las muestras fueron tomadas al azar de puestos de venta callejeros, depósitos (almacenes), plantas de fabricación, etc., en cantidades de aproximadamente 100 ml., depositándose el producto en frascos de vidrio (todo ello estéril en horno Pasteur, durante dos horas a 160°C) utilizando para ello espátulas metálicas estériles y llevando a cabo toda la operación en condiciones lo más higiénicas posibles.

El transporte de las muestras al laboratorio se realizó invariablemente en una nevera portátil dispuesta precisamente para tal servicio, teniendo muy presente en todas las ocasiones en invertir el mínimo tiempo posible a fin de evitar una fusión del producto que ocasionaría una multiplicación indeseable de la flora presente.

En el laboratorio, las muestras se almacenaron hasta el momento del análisis, en un armario congelador a temperatura de -16°C.

El análisis, por sistema, se inició siempre dentro de las veinticuatro horas siguientes a la recepción de las muestras.

#### 4.3. MATERIALES Y METODOS GENERALES.

##### 4.3.1. *Materiales.*

Como material de laboratorio se utilizó el corriente en este tipo de trabajos: frascos de vidrio, espátulas, neveras portátiles, congeladores, baños de agua termostatados, perlas de vidrio, hornos Pasteur, autoclaves, tubos de ensayo de diversos diámetros, campanas Durham, placas de Petri de diversos tamaños, asas de platino, estufas de incubación a diferentes temperaturas, cabina de siembra de flujo laminar, frascos Erlenmeyer, agitadores excéntricos, calentadores-agitadores para la preparación de medios de cultivo, contadores de colonias, portaobjetos, microscopios, pipetas, balanzas de precisión, granatarios, etc.

Los medios y reactivos empleados fueron los siguientes: Equipos de tinción por Gram, equipos de tinción simple, solución Ringer, Caldo E.E., Medio de cultivo bilis, rojo neutro y cristal violeta, Caldo T.S.B., Caldo Selenito, Caldo B.G.M.B., Medio de Levine, Medio de McConkey, Medio S.S., Medio de Desoxicholato Citrato, Medio B.G.N.R.L.A., Medio al Sulfito de Bismuto, Agar Nutritivo, Agar T.S.I., Medio de Kligler, Reactivo para la prueba de la Oxidasa. Medio para la Fenilalanina desaminasa, Reactivo de cloruro férrico, Medio de Triptófano, Reactivo de Kovacs, Medio semisólido para demostración de la movilidad, Medio Descarboxilasa de Müller, Lisina, Ornitina, Medio para la producción de gas a partir de la Glucosa, Medio M.R.-V.P., Reactivo para el rojo de metilo, Reactivo para la reacción de Vogues-Proskauer, Medio de K.C.N., Medio de citrato de Koser, Medio de citrato de Simmons, Medio de Malonato, Medio de Mucato, Medio de Tartrato, Medio con indicador de rojo fenol para la fermentación de azúcares (Dulcitol, Sorbitol, Rafinosa, Ramnosa), Medio de Acetato de sodio, Sueros polivalentes anti-*Salmonella*, sueros polivalentes anti-*Shigella*, sueros polivalentes anti-*E. coli*, sueros cortos anti-*E. coli*, Cepas de referencia.

Algunos medios fueron utilizados a partir de la forma deshidratada procedentes de diversas casas comerciales. El resto, fueron preparados por nosotros.

Las incubaciones se llevaron a cabo en su totalidad a 37°C, a excepción de en las operaciones de recuento, en que se utilizaron temperaturas más altas y más bajas que la expresada con el fin de ampliar los límites del crecimiento óptimo de la flora microbiana presente en las muestras.

##### 4.3.2. *Métodos.*

###### 4.3.2.1. *Introducción.*

Si existe una parcela de la Microbiología en la que la enorme cantidad de

métodos de trabajo haga difícil la elección, puede afirmarse sin temor a equivocarse, que el diagnóstico de la familia *Enterobacteriaceae* es desde este punto de vista uno de los más complicados. Se impone pues, la simplificación del procedimiento, lo que a pesar de todo, implica tanteos iniciales, necesarios para comprobar medios, fórmulas de reactivos, etc.

El protocolo experimental adoptado ha sido basado en esquemas clásicos, utilizando técnicas ya calificadas por sus resultados. En líneas generales, el protocolo fue el siguiente:

1. Preparación de la muestra.
2. Enumeración de gérmenes totales.
3. Enumeración de enterobacterias totales.
4. Preenriquecimiento, Enriquecimiento y Aislamiento de gérmenes entericos.
5. Tinción por el método de Gram.
6. Mantenimiento de los cultivos en agar nutritivo.
7. Identificación bioquímica y serológica de los distintos géneros y especies aisladas.

###### 4.3.2.2. *Preparación de la muestra.*

Las muestras recibidas en el laboratorio eran almacenadas hasta el momento del análisis a -16°C en un armario congelador, iniciándose siempre el análisis antes de las 24 horas de la recepción.

Las muestras se fundían en un baño de agua termostatado a 45°C durante un tiempo de 30 minutos, al cabo del cual se pasaban a matraces Erlenmeyer provistos de perlas de vidrio (todo ello estéril), procediéndose después a una agitación rotativa y en vaivén, que homogeneizaba el producto (41). Cada muestra iba marcada con un número correlativo de entrada, acompañado de los datos de la misma (establecimiento, marca, tipo, clase, sabor, hora de recogida y otras circunstancias).

###### 4.3.2.3. *Enumeración de gérmenes totales.*

A partir de la muestra fundida y homogeneizada, se preparaban diluciones decimales en solución Ringer diluida al 1/4. Las diluciones que se utilizaron fueron las seis siguientes: 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000. Posteriormente, 1 ml. de cada dilución era mezclado en un tubo de ensayo (utilizando un agitador excéntrico) con aproximadamente 10 ml. de un medio de recuento de la siguiente composición: Extracto de levadura, 2,5 gr; Triptona, 5,0 gr; Dextrosa, 1,0 gr; Leche descremada en polvo, 1,0 gr; Agar, 18 gr; y Agua destilada 1 litro.

La mezcla (medio de cultivo más muestra diluida en solución Ringer) se pasaba después a placas de Petri de 11 cm. de diámetro. De cada dilución, se

preparaban dos placas y después de solidificado el conjunto, se mantenían en incubación durante 72 horas a 37 y 40°C (una serie a 37°C y la otra a 40°C) al cabo de las cuales se procedía el recuento eligiendo para ello la dilución con menor número de colonias, multiplicando después dicho número por el inverso de la dilución y expresándose el resultado como una media de las dos series.

#### 4.3.2.4. Recuento de enterobacterias totales.

A partir de la muestra fundida y homogeneizada, se prepara únicamente una dilución 1/10 en solución Ringer diluida al 1/4 y a continuación, se procede como sigue: Se toman 10 ml. del homogeneizado no diluido, individualmente, en cinco matraces Erlenmeyer de 200 ml. en cada uno de los cuales se han preparado 100 ml. de caldo de enriquecimiento para enterobacterias (Caldo E.E., de Oxoid) cuya composición incluye peptona, dextrosa, fosfato ácido disódico, fosfato diácido potásico, sales biliares, verde brillante y agua destilada en proporciones variadas y en cuya preparación se siguieron las instrucciones del fabricante (86).

Posteriormente, 1 ml. de la muestra no diluida, se pasaban individualmente a cinco tubos cada uno de los cuales contenía 12 ml. del mismo medio. El proceso anterior, se repetía luego, utilizando 1 ml. de la dilución 1/10 del alimento homogeneizado.

Todos los tubos y matraces se mezclaban lo mejor posible mediante movimientos rotatorios y de vaivén, incubándose luego a 37°C durante 20-24 horas, al cabo de las cuales se procedía a la siembra con asa de Pt individualmente de cada tubo o matraz a placas de Petri preparadas con el medio de cultivo denominado Agar Bilis Rojo Violeta (Difco) (31).

Las placas se incubaban invertidas durante 20 a 24 horas a 37°C, al cabo de las cuales se procedía a su lectura entendiéndose como cultivo positivo de enterobacterias aquél en el que las colonias en medio sólido, están rodeadas de una zona de precipitación de las sales biliares, acompañada de una decoloración púrpura del agar (THATCHER y CLARK, op. cit.). Por último, se procedía a calcular el número de enterobacterias / gr. de muestra, utilizando una tabla del N.M.P., de las que figuran en cualquier tratado de microbiología.

#### 4.3.2.5. Preenriquecimiento, enriquecimiento y aislamiento de gérmenes entéricos.

Dado que la flora microbiana de los helados está sometida a fuerte stress por efecto del frío («Cold shock»), se hace preciso intercalar esta fase que tiene como fin primordial reactivar tales gérmenes (82). El procedimiento operativo consiste en pipetear 1 ml. de la muestra fundida y homogeneizada a un tubo de ensayo con 10 ml. aproximadamente de caldo de cultivo T.S.B. Después de una incubación durante 2 horas a temperatura ambiente, se pasa a

la siguiente fase o de Enriquecimiento, en la cual se utilizaron dos medios de cultivo líquido, y en ambos el sistema operativo fue el mismo.

A partir de los tubos de T.S.B. (B.B.L.), previa su incubación a temperatura ambiente por el tiempo indicado, se tomaban cantidades de 1 ml. con pipeta estéril y se pasaban a dos tubos de ensayo con caldo Selenito de Leifson (Difco) y otros dos con caldo B.G.M.B. (Caldo Verde Brillante de McConkey) (98) en cantidades de 10 ml. aproximadamente en ambos casos. El caldo B.G.M.B., tiene la siguiente composición: Peptona, 20,0 gr; Manitol, 10,0 gr; Bilis de buey desecada, 5,0 gr; Púrpura de bromocresol, 0,01 gr; Verde brillante 10,0 dcl.; y agua destilada 1,0 litro. Los medios inoculados, se incubaron durante 24 horas a 37°C.

#### Aislamiento de gérmenes entéricos en placa.

Dado nuestro propósito de estudiar en general la familia *Enterobacteriaceae*, se imponía la utilización de medios selectivos que únicamente permitieran el desarrollo de gérmenes Gram negativos; como quiera que algunos de los géneros de esta familia son de crecimiento lento, que resulta oscurecido en presencia de flora abundante de otros géneros, se imponía el uso de dos tipos de medios dentro de los ya elegidos selectivos para bacilos Gram negativos. Medios muy selectivos y medios poco selectivos, con lo cual el aislamiento de toda la familia, quedaba asegurado; por otra parte, preferimos elegir más de un medio selectivo con el fin de eliminar los riesgos de un posible no aislamiento, a la vez que servirnos de este estudio para comprobar tal selectividad respecto a los distintos géneros y especies de la familia. Los medios elegidos, fueron los siguientes: 1 / Como medios poco selectivos, los de LEVINE y MC CONKEY y 2 / Como medios muy selectivos, fueron utilizados los S.S. Agar con citrato y desoxicholato, medio con sulfito de Bismuto y Agar B.G.N. R.L.A., todos ellos de la casa Difco, a excepción de este último, que preparábamos nosotros mismos en el Laboratorio y cuya composición incluía los siguientes componentes: Proteosa peptona N.º3, 10,0 gr.; Extracto de carne, 3,0 gr.; Lactosa 10,0 gr.; Cloruro sódico 5,0 gr.; Sacarosa 5,0 gr.; Agar 20,0 gr.; Rojo neutro 0,1 gr.; y verde brillante (0,1 %) 33,3 ml.

En general para todos los medios, las placas se dividían en dos partes iguales con lápiz graso sembrando una de ellas con inóculo procedente de Caldo Selenito y la otra con inóculo procedente de Caldo Selenito y la otra con inóculo procedente de Caldo B.G.M.B., procediéndose posteriormente a incubarlas durante 24 horas a 37°C.

#### 4.3.2.6. Estudio morfológico de las colonias.

Se llevó a cabo tomando en consideración la siguiente pauta: Forma, tamaño, cromogénesis, opacidad, elevación, superficie, bordes, consistencia, olor, etc.

#### 4.3.2.7. Coloración por el método de Gram modificado.

Se llevó a cabo utilizando la técnica de Gram, modificación de HÜCKER (45).

#### 4.4. DIFERENCIACION BIOQUIMICA.

Antes de abordar este apartado queremos puntualizar que dado que la utilización de medios selectivos implica la existencia de una bacteriostasis parcial sobre algunos géneros o especies, supone un inconveniente el tener que repetir los aislamientos en placa. Para evitar en lo posible este hecho, se deben de elegir colonias bien separadas y cuando se trata de colonias de cierto tamaño (superior a 2 mm de diámetro) conviene tocar únicamente la superficie central prominente para no llegar al agar (Anónimo, cit. por Palomino, 27).

Hemos dividido la identificación bioquímica de los aislamientos, tal y como se acostumbra a realizar con esta familia, en dos fases; en la primera tratamos de acercarnos (mediante pruebas bioquímicas de amplio valor) al género o grupo. Posteriormente mediante la aplicación de series bioquímicas, alcanzamos ya la categoría de especie.

##### 4.4.1. Primera fase. Caracterización inicial.

Al tratar de buscar un encuadramiento taxonómico para microorganismos de un determinado origen del que no existen trabajos anteriores de idéntico signo que nos anticipen soluciones probadas, se nos plantea el problema de que la aplicación de los métodos convencionales no satisface plenamente la diferenciación taxonómica a nivel de género y especie, razón por la cual en principio el número de géneros atípicos o de clasificación dudosa viene a resultar elevado comparativamente. Esto viene a ser una prueba más del propio interés de la investigación, al ofrecérsenos por una parte la posibilidad de intentar la clasificación de enterobacterias de un determinado «habitat» basados en los recursos taxonómicos convencionales, polarizándoles a nuestro problema particular y por otra parte, determinar tipos de estirpes o serotipos, su frecuencia y su posible significación higiénico-sanitaria. En el segundo caso, de diferenciación serológica, en cambio, no han de plantearse problemas de duda, realizada la tipificación antigénica con los sueros adecuados.

Por lo que respecta a la clasificación de enterobacterias, no debemos olvidar que tal clasificación no obedece a un hecho real que se dé en la naturaleza, sino que es algo artificial que trata de sistematizar y encuadrar más bien que grupos bien definidos, otros con formas de transición muy abundantes y que el porcentaje de microorganismos atípicos puede estar relacionado con un determinado origen. En nuestro caso particular, hemos creído conveniente establecer un sistema de clasificación basado en los méto-

dos de trabajo propuesto por EDWARDS y EWING (op. cit.) y la 8.<sup>a</sup> edición del Bergey's Manual (op. cit.) que de modo esquemático exponemos en el cuadro II.

##### 4.4.1.1. Estudio de medios y métodos.

###### Prueba o reacción de la oxidasa o del oxalato de dimetilp-fenilendiamina.

Las enterobacterias son por definición gémenes oxidasa negativos, sirviendo consecuentemente la investigación de este enzima, para diferenciarlas de otros gémenes Gram negativos pertenecientes a familias distintas.

Nosotros utilizamos para esta investigación, la Técnica de Kovacs (100).

###### Investigación de la fenilalanina desaminasa.

La producción de ácido fenilpirúvico a partir de la fenilalanina por desaminación, es característica importante de los géneros *Proteus* y *Providencia* (EDWARDS y EWING, op. cit.).

La práctica de la reacción se llevó a cabo con cultivos pesados del germen de prueba en Agar Fenilalanina (Difco). Como reactivo se utilizó una solución acuosa de cloruro férrico al 10 %.

###### Investigación de la producción de SH2

Se llevó a cabo en Agar T.S.I. (Difco). Este medio fue inicialmente propuesto por SULKIN y WILLET en 1940, y en su formulación actual no es más que una modificación del medio de Hajna quien es a su vez idéntico al medio de Kliger con la sola adición de un 1 % de sacarosa. La presencia del tiosulfato sódico en este medio permite que por la acción de algunos gémenes (*Salmonella*, *Arizona*, *Citrobacter*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis* y *Edwardsiella*, generalmente) se reduzca a sulfuro de hidrógeno, el cual reacciona con la sal de hierro produciendo sulfuro de hierro, de color claramente negro, responsable directo del ennegrecimiento del medio.

Este medio fue para nosotros de gran utilidad, pues además de estudiar en él la producción de SH2, fue asimismo fuente de información orientadora respecto a la actuación del germen de prueba frente a cada uno de los tres azúcares que se integran en su fórmula (glucosa, lactosa, sacarosa). Todavía, utilizamos también el agar T.S.I. como sustrato ideal para efectuar siembras en otros medios y llevar a cabo reacciones (reacciones serológicas, etc.).

En la práctica, una vez preparados los tubos inclinados para utilizar en el día (en caso contrario previamente se fundía el medio y se inclinaban de nuevo) se sembraban por picadura en el fondo y estría en zig-zag sobre la superficie inclinada. Al cabo de 24 horas de incubación a 37°C, se procedía a

la lectura de los resultados, que se prolongaba hasta el 7.<sup>o</sup> día a fin de que no pasaran desapercibidas reacciones tardías.

#### *Investigación de la producción de indol a partir del triptófano.*

Utilizamos con este propósito, un medio de agua de peptona que incluía triptona (1,5 %) y cloruro sódico (0,5 %) (HARRIGAN, op. cit.). La inoculación se efectuó con inóculo joven procedente de T.S.I., incubando a 37°C por espacio de cinco días, al cabo de los cuales se practicó la reacción de puesta en evidencia de la producción de indol, según la técnica de Kovacs, con la cual obtuvimos resultados francamente buenos.

#### *Investigación de la actividad ureasa.*

La presencia de ureasa, característica importante del género *Proteus*, que permite diferenciarle del *Providencia*, se da también en los géneros *Klebsiella* y algunas especies de los *Enterobacter* y *Citrobacter*, aunque con mucha menor intensidad.

Su investigación ha sido llevada por nosotros utilizando el medio «Caldo Urea» (Difco), preparado según la fórmula de Stuart, Van Stratum y Rustigian (109) en cuya preparación y a pesar de que se recomienda la filtración como sistema de esterilización, hemos utilizado con buenos resultados la tyndalización a 60°C en baño de agua durante 30 minutos y 3 días consecutivos.

La procedencia del inóculo fue un cultivo puro en agar inclinado T.S.I., de 24 horas y la siembra se efectuó con tres inóculos pesados mediante asa de platino. Antes de incubar, eran sometidos a una agitación suave que homogeneizaba el cultivo.

La incubación se efectuó a 37°C, leyéndose los resultados transcurridas 12, 24 y 48 horas, al cabo de las cuales y en caso positivo, a consecuencia de la descomposición (hidrólisis) de la urea en CO<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub>, el medio (por efecto de éste último) sufría una alcalinización que permite el viraje del indicador de rojo fenol del amarillo al rojo-púrpura (59).

#### *Utilización del citrato como única fuente de carbono.*

La puesta a punto de un medio con citrato sódico en su composición, ha sido un procedimiento utilizado y recomendado por numerosos autores en la diferenciación de colibacterias fecales y bacterias de los géneros *Enterobacter* y *Citrobacter*, así como ciertas especies del género *Shigella*.

En los tanteos iniciales de nuestro trabajo con las cepas de referencia, comenzamos utilizando el medio líquido de Koser, en el que el crecimiento bacteriano se exterioriza por la turbidez del medio de cultivo, criterio que como puede verse está sujeto a errores de apreciación sustanciales, pues

partículas de material del medio de cultivo no disueltas, pueden simular tal crecimiento sin que en realidad exista. Esta razón nos indujo a sustituir este medio por el de Simmons, el cual posee frente a éste la doble ventaja de ser un medio sólido (con lo cual el crecimiento no se muestra por la turbidez, sino por la formación de colonias en superficie) y la de incluir en su composición un indicador de pH que permite que cuando se degrada el citrato, la alcalinización del medio pueda reconocerse por el viraje de un color verde suave, a azul oscuro.

Es interesante reconocer la conveniencia de que el inóculo de siembra proceda de un agar T.S.I. o agar nutritivo inclinado, con la precaución de cargar poco el asa, evitando asimismo el arrastre en la toma, de partículas del medio de cultivo que aportarían fuentes energéticas no deseables. La siembra fue realizada en amplia estría, finalizando con picadura en la porción columnar del tubo. Despues de incubar a 37°C durante 24 a 48 horas, los cultivos positivos desarrollan un bello color azul turquesa, consecuencia del viraje del azul de bromotimol.

#### *Crecimiento en K.C.N.*

El comportamiento de los microorganismos entéricos ante la presencia de K.C.N. en el medio de cultivo, es distinto según sea su sensibilidad o su resistencia al mismo, circunstancia que sirve de ayuda en su diferenciación, ya que ante dicha sustancia unos resultan inhibidos mientras otros son capaces de multiplicarse y por tanto, enturbian el medio. La fórmula de Möller (79) ha sido seguido por nosotros en la preparación de este medio.

Para realizar la siembra, depositábamos una gota con asa de platino procedente de un cultivo líquido en caldo nutritivo por ejemplo, o de una suspensión bacteriana preparada en solución fisiológica. Despues de un período de incubación a 37°C que se prolongó incluso hasta 4 días, los resultados se anotaban con lecturas diarias. En general, a las 48 horas hemos obtenido siempre los resultados positivos.

Es muy conveniente en este caso, colocar controles de crecimiento con caldos exentos de K.C.N. y controles K.C.N. negativos y positivos.

El resultado positivo se interpreta como una turbidez del medio, siendo negativo cuando éste permanece totalmente limpido. Son positivos a K.C.N. los géneros *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Serratia* y *Providencia*, y negativos el resto.

#### *Fermentación de los azúcares en general, y de la celobiosa en particular.*

La fermentación de los carbohidratos con formación de ácido o de ácido y gas, puede ponerse de manifiesto por gran variedad de métodos. Nosotros hemos preferido atenernos a los sistemas convencionales, más enojosos si cabe

que los modernos sistemas de discos de papel de filtro, pero hemos considerado que de este modo no nos apartábamos del trazado general del trabajo. A un caldo base de la siguiente composición: Peptona, 10,0 gr.; Extracto de carne 3,0 gr.; Cloruro sódico 5,0 gr.; Indicador de Andrade, 10,0 ml.; y agua destilada 1 litro, se le añadía el sustrato fermentescible en la concentración final aconsejada por EDWARDS y EWING (op. cit.); es decir, 1 % para la glucosa, lactosa, sucrosa y manitol y 0,5 % para otros carbohidratos como el dulcitol o la salicina. La siembra fue realizada de forma ligera a partir de un cultivo joven en agar nutritivo, incubándose posteriormente a 37°C por espacio de 4-5 días, con lecturas diarias y anotando tanto la producción de ácido como la de gas (en el caso particular de la celobiosa, únicamente buscamos la producción de ácido) mediante la incorporación de campanas Durham a los tubos de ensayo.

#### *Prueba del rojo de metilo.*

Una diferencia en el comportamiento de las bacterias frente a la glucosa, de gran interés taxonómico-diferencial, puede hacerse evidente mediante la reacción del rojo de metilo, propuesta por vez primera por CLARK y LUBS en 1915 (Manual Merck, op. cit.). Cuando una bacteria en particular únicamente produce ácido a partir de la glucosa, la reacción del medio toma valores inferiores a 4,4. Sin embargo, existen otro tipo de organismos capaces aún, de transformar el ácido formado a su fase previa, tendiendo nuevamente la reacción del medio hacia la neutralidad. El reactivo de rojo de metilo presenta color amarillo por encima de valores de pH de 5,1, tomando únicamente color rojo por debajo de 4,4. Esta capacidad permite por tanto, ser aprovechada para diferenciar esta propiedad bacteriana. El medio de cultivo utilizado en la práctica de esta reacción fue el M.R.-V.P., (Difco), utilizado también en la reacción de Vogues-Proskauer, que más tarde comentaremos.

La solución indicadora se preparó según las instrucciones de HARRIGAN y McCANCE (op. cit.), y la siembra se efectuó como la de cualquier cultivo en caldo, a partir de un cultivo joven de agar nutritivo inclinado incubando a 37°C por espacio de 5 días, al cabo de los cuales se llevó a cabo la lectura de la prueba añadiendo unas 5 gotas del indicador aproximadamente 5 ml. del cultivo de ensayo.

Son rojo metilo positivos, los géneros *Escherichia*, *Shigella*, *Edwardsiella*, *Salmonella*, *Arizona*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Providencia* y algunos *Enterobacter* (EDWARDS y EWING, op. cit.).

#### *4.4.2. Segunda fase. Diferenciación definitiva.*

En el Cuadro III, se expone en forma de clave-esquema dicotomizada, el camino seguido en esta fase para la diferenciación alcanzada con la primera.

#### *4.4.2.1. Estudio de medios y métodos.*

##### *Utilización del tartrato.*

La prueba de crecimiento en tartrato sódico potásico, es un ejemplo claro de la utilización de sales de diversos ácidos orgánicos como criterio en la diferenciación metabólica de diversos grupos de enterobacterias. Algunas bacterias degradan los ácidos orgánicos o sus sales, permitiendo la formación de ácidos libres, cuya presencia en el cultivo es detectada por la incorporación al medio de un indicador de pH tal como pueden ser por ejemplo, el rojo fenol, o el rojo neutro.

El medio de cultivo utilizado ha sido el descrito por JORDAN y HARMON en 1928 (EDWARDS y EWING, op. cit.). La inoculación se efectuó con asa recta, por picadura, a partir de un cultivo en agar nutritivo de 24 horas. Despues de incubar a 37°C, se realizaron lecturas a las 24 y 48 horas, anotando como positivos los tubos que mostraban color amarillo, expresión de la acidificación del medio de cultivo.

##### *Producción de acetilmethylcarbinol (reacción de Vogues-Proskauer).*

La formación de acetoina (acetilmethylcarbinol) a partir de la glucosa, fue utilizada por vez primera en la diferenciación bacteriana por VOCUES y PROSKAUER en 1898. En la actualidad, han sido muchos los autores que han modificado dicha técnica, brindándonos así la posibilidad de elección del reactivo que demuestra en el medio la presencia de tal compuesto. Nosotros, particularmente, hemos elegido la técnica de Barrit modificada (HARRIGAN y McCANCE, op. cit.).

##### *Crecimiento en malonato*

La fórmula original del caldo malonato (LEIFSON, 1953), modificada por la introducción de una pequeña cantidad de extracto de levadura (1 gr. / litro) y glucosa (0,25 gr / litro), es calificada por numerosos autores como de ayuda interesante en la diferenciación de grupo *Salmonella* y del grupo *Arizona*, así como también para la diferenciación de los géneros *Klebsiella*, *Aerobacter* y *Serratia*, o en la diferenciación del género *Citrobacter*. La fórmula del caldo de malonato sódico utilizada por nosotros, es la modificación de EWING y cols. (1957) sobre la fórmula de Leifson antes comentada.

El medio, de color verde-amarillento, fue distribuido a razón de 5-6 ml. por tubo e inoculado de preferencia a partir de un cultivo joven en caldo, procediéndose a continuación a incubar a 37°C durante 48 horas y leyéndose la reacción al cabo de las 24 y 48 horas.

Son positivos a esta reacción los géneros *Arizona* y *Klebsiella*, así como

algunos tipos bioquímicos del género *Enterobacter*, siendo negativos el resto de la familia.

#### Prueba del mucato.

Al igual que en el caso del tartrato, el ensayo de la degradación del ácido mágico, tiene su interés en la diferenciación metabólica de diversos grupos de enterobacterias (géneros *Salmonella*, *Arizona*, *Shigella* y biotipos de *E. coli*). La degradación microbiana del ácido mágico, se traduce por la formación de ácidos libres que determinan el viraje de color del indicador de pH (azul de bromotimol).

La composición del medio de cultivo, incluye como ingredientes los siguientes (EDWARDS y EWING, op. cit.): Peptona, 10,0 gr.; Solución de azul de bromotimol al 0,2 %, 12,0 ml.; Agua destilada, 1,0 litro y Ácido mágico, 10,0 gr. En la preparación, el ácido mágico se añade al resto de los ingredientes que constituyen el medio basal, cuando aún está caliente, facilitando su disolución mediante la adición de NaOH (10 N.) suficiente para elevar el pH del medio hasta un valor 7,4.

#### Investigación de las descarboxilasas de lisina y ornitina.

El interés de la investigación de las descarboxilasas ha sido señalado por numerosos autores tal como CARLQUIST (20), THIBAULT y LE MINOR (114) y EDWARDS y EWING (op. cit.), entre otros. Según GALLE (cit. por Skerman), las descarboxilasas de los microorganismos Gram negativos no actúan más que sobre los aminoácidos que tengan al menos un grupo químico activo distinto del carboxilo terminal y los grupos alfa-aminados. Cuando esto sucede, la lisina es transformada en cadaverina y la ornitina lo es en putrescina.

Hemos utilizado en esta investigación, el método de Moeller (EDWARDS y EWING, op. cit.).

La inoculación fue llevada a cabo a partir de un cultivo joven en agar nutritivo inclinado, con inóculo ligero, utilizando para ello un asa de platino recta, y procediendo tal y como se hace en la siembra por picadura. A continuación, añadímos a cada tubo un aceite mineral estéril (vaselina o parafina) en un espesor de aproximadamente 1 cm. (incluyendo los controles).

Son lisina descarboxilasa positivos, los géneros *Salmonella*, *Arizona*, *Serratia*, y *Edwardsiella*. La ornitina descarboxilada es por otro lado, utilizable en la separación de especies de los géneros *Shigella* y *Escherichia*, así como para la separación de algunas especies del género *Salmonella*, *P. morganii* y *P. rettgeri*.

#### Investigación de la degradación del acetato.

TRABULSI y EWING, pusieron de manifiesto en 1962 (Manual Merck, op. cit.)

que ciertas bacterias son capaces de utilizar acetato en su metabolismo como única fuente de carbono, siempre que exista nitrógeno inorgánico presente. Así, son capaces de esta degradación, las especies del género *Shigella* y la mayoría de las cepas de los géneros *Proteus* y *Providencia*, diferenciables por tanto de otros géneros como *Escherichia*, *Salmonella*, *Arizona*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Aerobacter* y *Serratia*, que no poseen tal propiedad.

El medio de cultivo es una modificación original de TRABULSI y EWING (EWING, 1969), que incluye los siguientes ingredientes: Cloruro sódico, 5,0 gr.; Sulfato magnésico, 0,2 gr.; Fosfato monoamónico 1,0 gr.; Acetato sódico, 2,5 gr.; Fosfato dipotásico, 1,0 gr.; Agar noble, 20,0 gr.; Agua destilada, 1,0 litro; Azul de bromotimol (sol. 1:500), 40,0 ml.

#### Investigación de la producción de gas a partir de la glucosa.

Utilizada en la diferenciación de los géneros *Escherichia* y *Shigella*, esta propiedad permite también la diferenciación de los miembros de los géneros *Proteus* y *Providencia*. En su investigación hemos utilizado el procedimiento de Gibson y Abd-el-Malek, modificado por STAMER y cols. (HARRIGAN y MC CANCE, op. cit.).

La incubación, hasta 14 días, se llevó a cabo a 37°C con lecturas diarias. En caso positivo, el medio y el cierre de agar, recogen el CO<sub>2</sub> producido, ocasionando éste la ruptura de aquéllos, además de hacerse evidente por las numerosas burbujas existentes.

#### Fermentación de adonitol, dulcitol, inositol, sorbitol, ramnosa, lactosa y rafinosa.

La fermentación de todos estos azúcares y polialcoholes fermentescibles sigue en todo punto la sistemática expuesta en el lugar oportuno para el caso de la cellobiosa, cambiando únicamente el sustrato en cuestión.

#### 4.5. INVESTIGACION SEROLOGICA DE ESTIRPES DE *ESCHERICHIA COLI* DE CARACTER ENTEROPATOGENO.

La clasificación de *E. coli* basada en los caracteres bioquímicos ya enumerados en el apartado correspondiente, debe de complementarse con el estudio serológico de los mismos.

Es bien sabido que tres tipos de antígenos constituyen la composición antigénica de *E. coli*: O, K y H. Los antígenos O o somáticos, constituyen un total de 153 grupos, numerados del 01 al 0157. Los antígenos K integran 92 grupos, numerados del K1 al K92 y 50 grupos los antígenos H, del H1 al H50 (SOJKA, op. cit.). El estudio de los tres tipos, permite definir la fórmula antigénica de un serotipo dado.

Los antígenos 0 son termostables y su detección se alcanza mediante titulación en tubo. Los antígenos K, de envoltura, son termolábiles, existiendo tres variedades designadas con las iniciales L, A y B, diferenciables por su comportamiento frente al calor. Los antígenos H o flagelares, se detectan también por aglutinación en tubo.

En términos generales, una vez identificado un microorganismo como *E. coli* mediante la utilización de las pruebas bioquímicas más convenientes, se impone en confirmación serológica y más aún, el conseguir averiguar de qué serotipo se trata, circunstancia a la que se llega como hemos dicho, mediante el estudio de su fórmula antigénica (30). A tal efecto, se comienza por sembrar el gérmen en cuestión en un medio de cultivo que permita por su riqueza en nutrientes, la exaltación de las propiedades del microorganismo en cuestión, tal como puede ser por ejemplo el agar con infusión de corazón de ternera (Difco) utilizado por nosotros en este caso y en el cual al cabo de 24 horas a 37°C, se separa el crecimiento y se obtiene una suspensión microbiana densa, que se prueba frente a antisueros polivalentes mediante una técnica simple de aglutinación en placa. Si la aglutinación tiene lugar, se procede después a separar una fracción de la suspensión que se calienta durante una hora a 100°C, probándose junto con otra fracción no calentada, frente a antisueros individuales 0 y 0K incluidos en el antisuero polivalente con el cual aglutinó en principio (utilizando nuevamente técnica en placa). La identificación del antígeno K presente, se consigue cuando se obtiene una aglutinación de la suspensión sin calentar frente a un antisuero 0K y por el contrario, no se obtiene frente al antisuero 0 correspondiente. La aglutinación de la suspensión calentada frente a ambos antisueros 0K y 0, identifica el grupo antigénico 0. En el caso de que la suspensión sin calentar proporcione reacciones de aglutinación positivas frente a los antisueros 0K y 0, el cultivo se siembra en placa conservándolo para estudios posteriores. La práctica de la aglutinación simple en placa para los antígenos 0B y 0K consiste en disponer en un portaobjetos o cubreobjetos, una gota de antisuero y otra del antígeno a probar, haciendo intervenir asimismo una tercera gota de solución salina. Después de agitar brevemente con el fin de mezclar los ingredientes, en caso positivo debe de aparecer aglutinación en forma inmediata y completa. Una reacción de este tipo, positiva frente a un antisuero polivalente, seguida de reacción positiva utilizando microorganismos vivos frente a antisueros 0K individuales y finalmente una reacción positiva frente a ambos antisueros homólogos 0 y 0K del mismo serogrupo, con los cultivos calentados, completa la identificación presuntiva.

La confirmación del contenido antigénico 0, es obtenida luego usando un antisuero 0 con una prueba de aglutinación en tubo. La identificación final, presupone también el contenido de los antígenos K (B) y H (éste último al menos, se identifica también por aglutinación en tubo).

La titulación del antígeno O supone el empleo de una prueba de aglutinación en tubo. Para ello y una vez preparada la suspensión bacteriana en solución salina fisiológica a partir del crecimiento en medio de infusión de corazón de ternera según dejamos indicado antes, se procede a su calentamiento en un baño de agua hirviendo durante 30 minutos. Se enfría después, y se añade solución salina para diluir hasta una densidad aproximada a la del standard número 3 de McFarland, añadiendo luego formalina hasta una concentración final del 0,5 %. A continuación se preparan diluciones del antisuero O en tubos de Kahn, de 1 : 1.280 (8 tubos), añadiendo después a cada tubo 0,5 ml. de la suspensión bacteriana calentada e incubando en baño maría a 50°C durante 18 horas. Finalmente, se hace la lectura considerando que los cultivos que aglutinan a la dilución 1:320 o superior, contienen el mismo antígeno O que el antisuero.

Para titular el antígeno H y siguiendo la misma pauta anteriormente establecida, es preciso advertir la conveniencia y si se quiere necesidad, de llevar a cabo una serie de pases por un medio de cultivo apropiado que exalte la movilidad. Luego ya, se siembra en tubos de agar inclinado con infusión de corazón de ternera. Seguidamente se añade formaldehido hasta una concentración final del 0,3 % con el fin de inactivar el cultivo y finalmente, se procede a la práctica de la aglutinación propiamente dicha: se depositan 0,5 ml. de una dilución 1:500 del antisuero H en un tubo de Kahn y se añaden después 0,5 ml. del antígeno de prueba. Despues de incubar y agitar a 50°C en un baño maría durante una hora, se procede a la lectura.

La tipificación serológica de las cepas de *E. coli* aisladas en nuestro trabajo, fue llevada a cabo de forma parcial con antisueros polivalentes. Los resultados fueron completados y confirmados (según los casos) en el Statens Serum Institut de Copenhagen. Los antisueros utilizados por nosotros, OB y OK, polivalentes A, B, C, D y E procedían de la casa Difco y del Instituto Pasteur de París.

#### 4.6. INVESTIGACION SEROLOGICA DE MICROORGANISMOS PERTENECIENTES AL GENERO SHIGELLA.

El estudio serológico de los cultivos confirmados ser bioquímicamente pertenecientes al género *Shigella*, se llevó a cabo mediante el uso de aglutinación rápida e placa, utilizando antisueros polivalentes de Difco, cuya referencia es la siguiente: 1. Antisuero *Shigella*, polivalente grupo A, tipos 1 al 7 de *S. dysenteriae*; 2. Antisuero *Shigella* polivalente A, tipos 8ab8ac, 9, 10 y serotipo provisional 387350 de *S. dysenteriae*; 3. Antisuero *Shigella* polivalente grupo B, tipos 1 al 6 de *S. flexneri*; 4, Antisuero *Shigella* polivalente grupo C1, tipos 8 al 11 de *S. boydii*; 6. Antisuero *Shigella*, polivalente grupo C2, tipos 12 al 15 de *S. boydii*; 7. Antisuero *Shigella* polivalente grupo D, tipos I y II de *S. sonnei* y 8. Antisuero *Shigella* polivalente grupo *Alkalescens-dispar*.

#### 4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Hemos utilizado el análisis de varianza según el método establecido por SNEDECOR (106). En el caso particular de la carga microbiana total y debido a la asimetría de la distribución de los valores experimentales, fue necesario recurrir a la transformación logarítmica de los datos, siguiendo las directrices del citado autor. Se contrastaron los resultados mediante el cociente F (de Fisher) y en el caso de significación a un nivel inferior al 5 %, fueron establecidas comparaciones entre medias siguiendo para ello el método de Student.

Se determinó también en otros casos, tales como el número de cepas aisladas y el logaritmo del número total de gérmenes, el coeficiente de correlación y la recta de regresión.

Los resultados se contrastaron en las tablas estadísticas de FISHER (42).

### 5. RESULTADOS

#### 5.1. CONSIDERACIONES GENERALES.

Las 100 muestras de helados estudiadas, fueron obtenidas de empresas que por su categoría (volumen de ventas, expansión geográfica, etc.) podríamos clasificar en «importantes» y «de segundo orden». Las primeras, fueron investigadas en número de 3 (el 23,06 % del total) y en número de 10 (el 76,94 %) las segundas. Asimismo, el número de establecimientos investigados por cada tipo de empresa, fueron por lo que se refiere a las calificadas «importantes», de 13, 5 y 3 respectivamente, lo que supone unos porcentajes del 40,62; 15,62 y 9,37 sobre el total de establecimientos consultados (empresas importantes y de segundo orden) y del 61,90; 23,80 y 14,28 respectivamente si únicamente lo referimos a establecimientos consultados dentro del capítulo de las empresas clasificadas como «importantes». Paralelamente, los establecimientos investigados dentro de las empresas «de segundo orden» fueron respectivamente 2; 1; 1; 1; 1; 1; 1; 1; 1; 1; 1 lo que supone unos porcentajes totales del 6,21 y 3,12 (repetido en nueve ocasiones) y unos porcentajes relativos del 18,18 y 9,09 (repetido en nueve ocasiones) respectivamente.

Es interesante destacar que las muestras de helados fueron clasificadas teniendo en cuenta en lo posible la pauta marcada por el Código Alimentario Español; ahora bien, dado que en las fechas de muestreo la puesta en vigor del mencionado Código aún no había tenido lugar, no es de extrañar las dificultades que se nos plantearon en algunos casos particulares, que por lo general coincidían con productos elaborados y vendidos por pequeños fabricantes. Es destacable a este respecto, la casi absoluta dominancia de muestras de tipos como el mantecado (24 %), los helados que incluían frutas en la composición en los porcentajes mínimos establecidos (27 %), los helados de crema y los elaborados a base de chocolate (9 %), siguiendo después otros menos popula-

res como los helados de leche merengada, café, tartas heladas, helados especiales, etc. (Cuadro V). En la segunda parte de este mismo cuadro, se ofrece también la clasificación de las muestras estudiadas atendiendo no al tipo, sino a la forma de presentación. Se observa así, cómo los helados vendidos en cucuruchos que se rellenan en el momento, siguen siendo con los popularmente denominados «helados de corte» los más frecuentes (55 % y 18 % respectivamente). Esta circunstancia pone de manifiesto un hecho que quisieramos resaltar, tal cual es la necesidad de que esta forma de presentación exige de un instrumento mecánico (cucharas, cuchillos, etc.) que suponen un motivo más de contaminación del producto, máxime si se tiene en cuenta que en este paso y para facilitar la operación, se utilizan tradicionalmente recipientes con agua que en el mejor de los casos se cambia una vez al día y que sirven para lubrificar el instrumento y permitir que el helado no quede adherido a la superficie metálica de la cuchara o el cuchillo. A pesar de este sistema, predominante en la actualidad, de presentación del helado, debemos reconocer que otras formas de envasado más higiénicas (vasitos, tarrinas, cucuruchos envasados en la propia planta de elaboración, etc.) van abriendose paso con grandes perspectivas de aceptación por lo que al consumidor se refiere.

#### 5.2. RESULTADOS DE CARGA MICROBIANA TOTAL.

Los resultados de la determinación cuantitativa de la carga microbiana total (recuento en placa) se expresan en los cuadros VII, IX y X.

En el cuadro VII se relacionan los resultados de carga microbiana total en cada una de las cien muestras de helados objeto de este estudio. Los límites de variación son, como puede apreciarse, enormemente amplios; van desde 70 gérmenes / ml. en la muestra número 47, a 720.000.000 en las muestras números 83, 89, y 90, con una cifra media de 33.522.102, 42 gérmenes / ml.

Es de destacar que un total de 61 muestras (el 61 %) sobrepasan a este respecto, los límites máximos permitidos en el Código Alimentario Español y Decreto 2.130 / 74; y aún más, de estas, 40 muestras (el 65 %) sobrepasan la cifra de 1.000.000 de gérmenes / ml., lo que es altamente significativo desde el punto de vista higiénico. No hay que decir que la media obtenida resulta elevada en comparación con las exigencias legales.

En el cuadro IX se expresan conjuntamente los resultados de gérmenes totales y enterobacterias por cada tipo de helado. En términos absolutos las medias más altas (haciendo abstracción de los helados de café, cuyo único representante no es significativo) se encuentran entre los helados de nata, de mantecado, de crema y de chocolate, con cifras de 123.004.116,6; 58.670.903,04; 50.491.708 y 20.755.955 respectivamente. El resto de los tipos, se encuentran situados alrededor de los tres millones de gérmenes / ml. En el cuadro X, hemos separado los resultados con arreglo al año en que fueron

tomadas las muestras observándose y por lo que al recuento de gérmenes en placa se refiere, mayor contaminación en las muestras tomadas en 1973 (46.134.763,3 de media) que en 1972 (14.374.418,9 de media).

En el cuadro XI, se hace un resumen de cuanto se ha dicho en el párrafo anterior expresando asimismo y por separado, los intervalos por cada tipo de helados.

### 5.3. RESULTADOS DE ENUMERACION DE MICROORGANISMOS DE LA FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE.

Dado que la introducción de este tipo de análisis se llevó a cabo en el segundo año de nuestro estudio, únicamente podemos ofrecer resultados de las muestras tomadas durante este período (números 41 al 100, ambos inclusive). Hay que señalar también, que dado que cuando pensamos en este estudio se trató de que esta prueba sustituyera con ventaja a los clásicos análisis del grupo coliforme, cuyos máximos permitidos por el Código Alimentario están cifrados en 20 gérmenes / gr., consideramos suficiente la utilización de cinco partes alícuotas de 10 ml., de 1 ml., y de 0,1 ml., ya que la cifra máxima alcanzada por tal método, supera con creces los límites legales antes señalados. Esta es la razón de que en la mayoría de los casos no alcancemos a precisar la cifra exacta de enterobacterias presentes, limitándonos a señalar que ésta supera la cifra de 16.090 / ml.

El cuadro VIII nos ofrece estos resultados antes comentados, permitiéndonos a pesar de todo destacar que a excepción de dos muestras (el 3,3 %) el resto fueron todas positivas a esta determinación y que en 44 muestras (el 73,3 %) la cifra de enterobacteriaceas presentes superaba el techo de 16.090 por las razones antes señaladas. En el cuadro IX se nos ofrecen estos resultados, expresándolos en función del tipo de helado. En el cuadro X, además de intervalos y medias, se pretende ofrecer una diferenciación de los resultados con arreglo al año en que fueron tomadas las muestras, al igual que en el caso de los gérmenes totales; ahora bien, esta última particularidad, no tiene efecto en este caso, por cuanto se llevó a cabo este tipo de análisis en las muestras tomadas durante 1973. En el cuadro XI finalmente, se ofrecen resúmenes de los resultados por cada tipo de helados, al igual que en el caso de los gérmenes totales (recuento en placa).

### 5.4. RESULTADOS DE AISLAMIENTO E IDENTIFICACION PARA LOS DISTINTOS GENEROS DE LA FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE.

#### 5.4.1. *Resultados de aislamiento.*

Las muestras fueron estudiadas desde el punto de vista del aislamiento y posterior identificación, tal y como se describió en el apartado correspondiente

de Materiales y Métodos. El número de cepas aisladas que por sus caracteres morfológicos, culturales y tintoriales respondían a las características generales de la familia *Enterobacteriaceae*, ascendieron a 893, tal y como se desprende de los cuadros XII y XIII.

En el cuadro XII, se indica el número de cepas estudiadas por cada una de las 100 muestras estudiadas. Como puede observarse, de las 100 muestras estudiadas, 18 no ofrecieron crecimiento alguno en la totalidad de los medios selectivos de aislamiento utilizados, lo que permite asegurar una ausencia de microorganismos de este grupo. El número máximo de aislamientos efectuados tuvo lugar en la muestra número 25, con un total de 20 aislamientos y la media total fue de 8,93 aislamientos por muestra.

Es indudable que el empleo de cinco medios de cultivo distintos con un mismo objetivo concreto, como es el aislamiento de bacterias entéricas, tiene una gran ventaja y simultáneamente, un pequeño inconveniente. La ventaja está representada porque en estas condiciones, y cuando son respetadas rigurosamente las circunstancias de incubación referidas a temperaturas y tiempos fundamentalmente, puede afirmarse que el límite de confianza se acerca a 100. Es decir, que los medios se complementan unos a otros y el resultado será en teoría más fiable; por otra parte, el grado de selectividad de cada medio es distinto no solamente con referencia a un género determinado, sino para diferentes especies dentro de un género perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* y uno de los objetivos a fin de asegurar los resultados era el de no perder estirpes inicialmente.

El inconveniente que se plantea estriba a nuestro juicio, en la repetición de especies aisladas en distintos medios utilizados con la misma muestra aún cuando los caracteres morfológicos de las colonias fuesen diferentes. Este inconveniente supone un mayor trabajo y viene a representar el precio de la mayor exactitud pretendida.

En el cuadro XIII, se expresan el número de cepas aisladas por cada tipo de medio utilizado en cada muestra concreta. Tal y como puede observarse, se utilizaron un total de 6 medios de cultivo y si bien la técnica seguida requería el empleo de cinco únicamente, debemos tener presente la sustitución del medio de Levine en la segunda fase de nuestro estudio por el medio de McConkey de menor grado de selectividad. Las cifras de aislamiento por cada medio fueron 2,2; 1,42; 1,51; 2,01; 1,58; y 2,5 respectivamente para Levine, S. S., Citrato desoxicholato, B.G.N.R.L.A., Sulfito de bismuto y McConkey. Las más altas corresponden como es lógico, a los medios menos selectivos.

#### 5.4.2. *Resultados de identificación.*

Como tarea preliminar nos impusimos posteriormente al aislamiento, la práctica de la prueba oxidasa que, por definición, excluye a los miembros de

esta familia en caso positivo. El resultado fue que 45 cepas (el 5 % aproximadamente del total) pertenecientes a los aislamientos efectuados en 22 muestras distintas fueron oxidasa positivas. La distribución de estas cepas por cada muestra, fue la que se indica en el cuadro XIV.

A continuación y siguiendo la clave reseñada en el apartado correspondiente, fueron comprobadas la totalidad de las cepas con una batería de pruebas bioquímicas que incluían las siguientes: Fenilanina desaminasa, producción de SH2, producción de Indol, crecimiento en K.C.N., fermentación de la celobiosa con producción de ácido, prueba del Rojo de Metilo, presencia de Ureasa y crecimiento en Citrato de Simmons, y con las cuales perseguíamos la diferenciación primera. Los resultados se expresan en el cuadro XV.

La siguiente fase de identificación, incluía la utilización de pruebas bioquímicas capaces de diferenciar a nivel de especie los grupos delimitados en el apartado anterior. Se utilizaron el crecimiento en Tartrato, reacción de Vogues-Proskauer, crecimiento en Malonato, presencia de Lisina y Ornitina Descarboxiladas, crecimiento en Ácido Mucico y Acetato de Sodio, fermentación de la Ramnosa, Lactosa, Adonitol Inositol y Sorbitol y finalmente, producción de gas a partir de la glucosa.

A excepción de 27 cepas, todas las demás pudieron clasificarse perfectamente mediante este procedimiento. A estas cepas referidas que se ajustaban perfectamente a las características de una especie concreta salvo en una prueba o reacción particular, se decidió el considerarlas atípicas o variantes en tal reacción, incluyendo la misma en su denominación y en todo caso, considerarlas por separado.

El cuadro XVI nos señala los resultados definitivos de identificación referidos a la categoría de género, con expresión de datos numéricos y porcentuales; vemos así, cómo el género *Enterobacter* ha sido el más frecuentemente encontrado en este estudio, con un 49,94 %, mientras que los géneros *Shigella* y *Proteus* no han superado el 0,94 % cada uno y géneros como *Salmonella*, *Serratia* y *Yersinia* no han proporcionado ningún representante de los mismos.

En el cuadro XVII y en distintos apartados se expone la distribución de las distintas especies y su significación porcentual sobre el total de cepas aisladas y estudiadas, observándose el gran predominio sobre el resto de *Enterobacter cloacae*, cuyo 37,74 % sobre el total, es de sobra significativo. *P. mirabilis* y *P. vulgaris*, con un único representante cada uno, son indudablemente las especies menos representadas (entre las encontradas).

##### 5.5. RESULTADOS DE IDENTIFICACION SEROLOGICA DE LAS ESPECIES Y TIPOS DE LOS GENEROS *ESCHERICHIA* Y *SHIGELLA*.

La identificación serológica del género *Escherichia* (*E. coli*), se expresa en el cuadro XVIII, donde puede observarse que un 25,56 % del total de las

cepas calificadas como pertenecientes a este género, no pudieron ser serológicamente identificadas como representante de *E. coli* enteropatógeno, al no aglutinar frente a los antisueros polivalentes reseñados en el apartado correspondiente. El resto, se distribuyeron entre 21 tipos serológicos distintos, entre los cuales el más frecuente resultó ser el 0125ac: H30, que representó por sí solo el 14,44 % del total de *E. coli* confirmado serológicamente.

La identificación serológica de las cepas pertenecientes al género *Shigella*, se expresa en el cuadro XIX, con dos únicos representantes (*S. boydii* y *S. dysenteriae*).

##### 5.6. SIMPLIFICACION APLICADA DE LOS RESULTADOS DE AISLAMIENTO.

Al comenzar la exposición de los resultados de aislamiento e identificación, hicimos notar que a consecuencia del empleo de hasta cinco tipos distintos de medios de aislamiento, el inconveniente inmediato que se planteaba era la posibilidad de aislamientos idénticos repetidos en una misma muestra. Evidentemente los resultados expuestos confirman tal suposición. A tal efecto, el cuadro XX expone en resumen los verdaderos hallazgos de este estudio en el que por cada muestra, se ha tomado de todos los aislamientos idénticos, un único representante. El cuadro citado indica la importancia cuantitativa de cada género representado sobre el total de identificaciones efectuadas sobre un total de 304 especies, sigue figurando el género *Enterobacter* con 100 representantes (el 32,90 %) a la cabeza, seguido a distancia por el género *Citrobacter* con 62 representantes (el 20,39 %) y al final de la lista figura el género *Proteus* con únicamente 6 representantes (el 1,97%).

En el cuadro XXI y en distintos apartados, se relaciona la significación real de cada especie. Dentro del género *Edwardsiella*, la especie *E. tarda* supone el total de las identificaciones efectuadas con un total de 11 representantes que suponen el 3,62 %. El género *Citrobacter* está representado por tres especies: *C. freundii*, *C. intermedium* biotipo a y *C. intermedium* biotipo b. El género *Klebsiella*, incluye dos biotipos propios de *K. pneumoniae*, que hemos dado en denominar I y II a efectos de diferenciar la peculiaridad que les caracteriza, *K. ozaenae*, *K. rhinoscleromatis* y dos variedades atípicas una de *K. pneumoniae* (malonato negativo) y otra de *K. ozaenae* (malonato positivo) ya apuntadas en otro apartado de este mismo capítulo. El total de representantes de este género, abarca la cifra de 49, que suponen un 16,12 % sobre el total de especies identificadas.

El género *Enterobacter*, representante más numeroso de todos, ya destacado al principio, incluye las siguientes especies: *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. liquefaciens* y *E. hafniae* (=*Hafnia alvei*), además de variedades atípicas de *E. cloacae* (ramnosa negativo y sorbitol negativo) y de *E. hafniae* (ramnosa negativo).

El género *Proteus* incluye como representantes a *P. morganii*, *P. rettgeri*, *P. mirabilis* y *P. vulgaris*, y finalmente el género *Erwinia* se halla representado por la presencia de *E. rhamponcici*, *E. carotovora* y *E. cypripedii* y *E. chrysanthemi*, cuyo conjunto hace un total de 28 representantes de este género, lo que supone un 9,21 % sobre el total de las 304 especies identificadas.

En el género *Escherichia* (*E. coli*), los resultados se ofrecen en el cuadro XXII, con un total de 40 representantes, unos confirmados serológicamente y otros no confirmados. El género *Shigella*, representado por dos especies: *S. boydii* y *S. dysenteriae*, incluye en realidad cuatro serotipos distintos tal y como se deriva de los resultados conseguidos merced a la utilización únicamente de sueros polivalentes; así, se pueden observar dos resultados distintos por lo que a cada una de las especies de *Shigella* se refiere. Existen reacciones positivas frente a antisueros de *Shigella*, que incluyen serotipos anti-*S. boydii* tipos 1 al 7 y serotipos 12 al 15, al igual que ocurre con los antisueros anti-*S. dysenteriae*, que ofrecen resultados positivos frente a los tipos 1 al 7 y otros que incluyen los tipos 8ab8ac, 9 y 10 y serotipo provisional 387350. El resultado se expresa en el cuadro XXIII.

Finalmente, el cuadro XXIV, expresa el resumen de las especies atípicas encontradas.

#### 5.7. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS.

En una primera fase, se planteó el aspecto que se refiere a la carga microbiana total de las muestras (recuento en placa). Como una aproximación, fueron distribuidas las muestras de acuerdo con los diversos sabores y el tipo de empresa («importante» o de «segundo orden»). Ya en los primeros pasos, observamos que la enorme amplitud de los resultados originaba una varianza muy grande y lo que es más importante, una gran diferencia entre las varianzas de las distintas muestras. Este aspecto fue estudiado por Snedecor (op. cit.) que ya apreció que las inferencias que de este tipo de situaciones se extrajeran, podrían estar bastante viciadas.

Ante este tipo de situaciones, el citado autor recomienda practicar una transformación de los datos y, uno de los métodos recomendados a tal efecto, es la transformación logarítmica, que en nuestro estudio nos ofreció los mejores resultados.

Así pues, todos los valores de carga microbiana total, fueron a efectos del análisis, transformados en su logaritmo (cuadro XXV), con lo cual las varianzas muestrales dejaron de ser significativamente diferentes.

Una vez aclarado este aspecto importante en el futuro desarrollo analítico, realizamos una nueva distribución de los datos en los respectivos sabores: mantecado, chocolate, frutas, nata, crema y especiales. Con estos datos, se practicó un análisis de varianza con el fin de descubrir si existían diferencias

entre los distintos grupos en cuanto a la carga microbiana. El resultado de este análisis, fue el que se expresa en el cuadro XXVI.

El valor  $F 1,1607$  para 5 y 92 grados de libertad, no es significativo, lo cual nos indica que no podemos demostrar ninguna diferencia en la carga microbiana total de los distintos sabores, o dicho de otro modo, que el sabor de los helados no parece influir en el número de gérmenes que en ellos hallamos. No sucede lo mismo cuando las muestras son clasificadas de acuerdo con el tamaño de la empresa elaboradora que las originó, ya que encontramos diferencias significativas entre las medidas de las muestras de todos los tipos de sabores salvo nata. Esto nos permite afirmar que parece existir una clara diferencia entre las empresas grandes y pequeñas en cuanto a la carga microbiana total, lo cual es manifiesto para todos los sabores. Los mayores valores medios de carga microbiana los hallamos en las empresas pequeñas.

Este análisis fue practicado mediante el método de Student. Los valores y la significación en los diversos sabores, fueron los siguientes:

Sabor mantecado	$t = 3,187$ (**)
Sabor nata	$t = 2,120$
Sabor chocolate	$t = 2,534$ (*)
Sabor fruta	$t = 4,7995$ (***)

Para los sabores crema y especiales, no pudo ser practicado ningún análisis, ya que todas las muestras correspondían a empresas grandes.

Podemos pues, en resumen, extraer como conclusión, que la división de las muestras de acuerdo con el tamaño de la empresa, se ha visto confirmado con el análisis de los resultados y, ciertamente corresponde a una situación real. No así, la distribución de acuerdo con el sabor, ya que éste no ha demostrado ser criterio que exprese diferencias.

También se hace en el texto, expresión de la clasificación en función de la forma de presentación, destacando la aparición de un nuevo elemento que es el instrumento para llenar o partir alguno de estos tipos.

La clasificación que se establece es: cuchara, bloque, cucurcho envasado, vasito o tarrina y otros; es decir, cinco tipos donde se incluyen las 100 muestras del estudio. El análisis de varianza de las distintas formas, nos proporcionó los resultados que se expresan en el cuadro XXVII.

El valor  $F 2,81$  es para 4 y 94 grados de libertad significativo a un nivel de 5 por 100, lo cual nos indica que existen diferencias entre los valores medios estimados para cada forma de presentación. Este hallazgo nos permite seguir profundizando en el análisis, haciendo comparaciones entre medias. Debido al distinto tamaño de las muestras, estas comparaciones han de ser practicadas entre medias individuales. La metodología seguida ha sido tomada de Snedecor (op. cit.) y responde en síntesis a las siguientes postulaciones:

Una comparación entre medias, se define como  $L = \sum \lambda_i x_i$ , siempre que  $\sum \lambda_i = 0$ . El error standard cuando las muestras son de distinto tamaño,

responde a la fórmula:  $S_0 = \sqrt{S^2 \left( \frac{1}{\mu_i} + \frac{1}{\mu_k} \right)}$

Como se sabe, el cociente  $L / S_0$  sigue la distribución t, por lo que directamente se puede observar en las tablas de significación.

Siguiendo esta metodología, hallamos como más importantes, las siguientes diferencias: 1 / A nivel de 5 por 100, el valor medio del logaritmo de los gérmenes totales en el caso de los helados de cuchara es significativamente diferente de los valores medios de bloque, de cucurcho envasado y de tarrina. 2 / El valor promedio de los valores de cuchara y bloque es significativamente diferente del valor promedio de cucurcho envasado y tarrina.

Probamos también de hacer alguna inferencia en el caso de los helados de cuchara en el aspecto del tamaño de la empresa. En los otros casos no era posible ya que el número de muestras de empresas pequeñas era nulo o tan escaso que impedía cualquier deducción.

El valor t para la diferencia entre los valores medios de gérmenes totales en los helados de cuchara entre empresas grandes y pequeñas, resultó ser significativo al 1 por 1.000, lo que revela una clara diferencia entre las empresas elaboradoras.

Los valores medios de las muestras (en logaritmos) fueron para las empresas pequeñas, de 6,4428 y para las grandes de 4,9531. Tiene gran importancia este descubrimiento, porque prácticamente invalida el anterior análisis, ya que la diferencia encontrada entre formas de presentación, se produce porque prácticamente todos los helados, entre los estudiados, que fueron elaborados por empresas pequeñas, han correspondido al grupo de cuchara.

En el caso de los análisis del N.M.P. de enterobacterias totales y debido a la naturaleza de los datos, no es posible aplicar ningún cálculo estadístico. Nos ha causado sorpresa observar que solamente un caso de los helados elaborados por empresas pequeñas, no se llega a la cifra de 16.090 enterobacterias. Curiosamente, esta excepción ha resultado también ser la única entre todo el material que dio resultado totalmente negativo. Por lo que se refiere al estudio estadístico del número total de cepas aisladas por cada muestra, hemos de admitir que:

1) Existe correlación entre el número total de cepas aisladas y el logaritmo del número total de gérmenes (recuento en placa). El coeficiente de correlación r, es 0,6548. La recta de regresión del número de cepas sobre el total de gérmenes, está determinada por la ecuación  $Y = 2,2124 x - 3,4266$ , siendo x = logaritmo de gérmenes. El coeficiente de determinación  $R^2 =$

0,4287, lo que indica que el 42,87 por 100 de la variación de la muestra en el número de cepas aisladas es debido a la variación en el logaritmo del número total de gérmenes.

2) En la distribución de las cepas totales de acuerdo con el sabor de los helados, no hallamos diferencias significativas entre los distintos grupos formados (cuadro XXVIII). Si encontramos diferencias significativas entre las empresas grandes y pequeñas para los sabores mantecado y chocolate. El número total de cepas, es mayor para las empresas pequeñas. Para el total de muestras, hallamos diferencias significativas entre las empresas grandes y pequeñas a un nivel del 1 por 1.000.

3) En la distribución del número de cepas de acuerdo con la forma de presentación, tampoco conseguimos demostrar diferencias entre los diversos grupos (cuchara, bloque, cucurcho, etc.) (cuadro XXIX). En el caso de los helados de cuchara, obtuvimos diferencias significativas entre las empresas grandes y pequeñas. En el resto de las formas no se pudo practicar ningún tipo de análisis por cuanto el total de las muestras pertenecían únicamente a empresas grandes.

Finalmente, el estudio estadístico de los resultados de las especies reales, por cada muestra reveló lo siguiente:

1) La distribución de acuerdo con el sabor nos permitió encontrar diferencias significativas entre los distintos grupos (cuadro XXX). Si hallamos diferencias significativas entre las empresas grandes y pequeñas para los sabores mantecado, chocolate, frutas y helados especiales, aunque los valores medios son en todos los casos superiores en las empresas pequeñas que en las empresas grandes.

2) Clasificadas nuevamente de acuerdo con la forma de presentación y practicando el análisis de varianza, encontramos diferencias significativas entre los distintos grupos (Cuadro XXXI), sin embargo estas diferencias fueron producidas al igual que en el caso del número total de gérmenes al corresponder al grupo de cuchara la mayoría de los helados elaborados por empresas pequeñas, como se demuestra al establecer diferencias entre medias ya que la media de 3,62 cepas por helado de cuchara es debido al mayor valor que se obtiene con el subgrupo de las empresas pequeñas. Si comparamos únicamente la media de las empresas grandes con el resto de los grupos, no obtenemos ninguna significativa diferencia.

(El resto de esta Tesis, será publicado en el próximo número de estos ANALES).