

II. "SALMONELLA" EN HELADOS

Dra. Sara E. Curi de Montbrun

Dr. Rafael A. Fernández

Dr. Alberto S. Ciccarelli

Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina.
Laboratorio de Bromatología, Municipalidad de la Capital, Mendoza, Argentina.

RESUMEN

Se presentan los resultados de un estudio de contaminación de helados de producción local con microorganismos del género *Salmonella*. Durante los meses de noviembre y diciembre de 1976 a 1979, se examinaron 100 muestras obtenidas en heladerías ubicadas en la capital de Mendoza. Las muestras fueron sembradas en los siguientes medios de enriquecimiento: Caldo Nutritivo, Caldo Selenito, Caldo Müller Kauffmann, Caldo Enriquecimiento Enterobacterias y Caldo North y Bartram. Las resiembras se realizaron en Agar *Salmonella-Shigella* y Agar Verde Brillante.

Se aisló respectivamente, *S. enteritidis* y *S. typhimurium* en muestras de helados provenientes de dos establecimientos distintos. En el primero de ellos no fue posible investigar el origen de la contaminación. En el segundo caso, se efectuaron 57 coprocultivos a todos los manipuladores del establecimiento. Se aisló *S. anatum* en dos empleadas hermanas. De los ingredientes utilizados en la preparación de la variedad de helado en la que se demostró contaminación, se examinaron bacteriológicamente las siguientes materias primas: leche entera, crema de leche, dulce de leche y nueces, aislándose de estas últimas *S. typhimurium*.

SUMMARY

A bacteriological survey was carried out to study the contamination with *Salmonella* in ice cream from local production. One hundred ice cream samples were taken in ice cream shops from Mendoza city during the months of november and december of the period 1976-1979. The samples were cultivated in the following enrichment media: Nutrient Broth, Selenite Broth, Müller Kauffmann Broth, Enrichment Enterobacteria Broth and North and Bartram Broth. *Salmonella-Shigella* Agar and Brilliant Green Agar were used as selective media.

S. enteritidis and *S. typhimurium* were isolated in samples from two different sources. In the first case, the epidemiological study to identify the origin of the contamination could not be carried out. In the second case, among the raw materials examined, the implicated serotype (*S. typhimurium*) was recovered from samples of the peeled walnuts used to prepare the ice cream. Coproexamination in the 19 food handlers of the shop resulted in the isolation of *S. anatum* in two sisters.

INTRODUCCION

Son innumerables las publicaciones que, en todo el mundo, se refieren a la importancia de los alimentos y sus manipuladores como fuente de infección en patologías de origen alimentario.⁽¹⁻⁹⁾ Por sus características de composición, elaboración y conservación, los helados constituyen un óptimo vehículo de sus agentes etiológicos. En su elaboración intervienen diferentes materias primas, tanto de origen animal como vegetal. Además, la intervención de manipuladores en las distintas etapas que ella comprende, aumenta el riesgo de contaminación con *Salmonella* y otros agentes.^(4, 7, 9, 12)

Estudios anteriores vinculados al conocimiento de *Salmonella* y salmonelosis en Mendoza⁽⁵⁻⁹⁾ y la descripción de un brote por ingesta de helados⁽⁷⁾ motivaron la realización de este trabajo con la finalidad de estudiar, en nuestro medio, el papel de estos productos como vehículos de aquellos agentes. Se examinaron muestras de helados, materias primas y heces de manipuladores de heladerías de Mendoza.

MATERIALES Y METODOS

Recolección de las muestras

Helados. Las muestras fueron obtenidas por

personal del laboratorio de Bromatología de la Municipalidad de la capital, Mendoza, donde fueron procesadas en la primera etapa de enriquecimiento. Las investigaciones se completaron en la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Médicas, U. N. C.

El muestreo fue practicado durante los bimestres noviembre-diciembre del periodo 1976-1979. En 12 heladerías de la capital de Mendoza fueron tomadas 100 muestras de 250 g en la etapa de expendio al consumidor. Las mismas fueron remitidas en forma inmediata al laboratorio donde se conservaron a -18° C hasta su procesamiento realizado entre las 2 y 72 horas.

Del total de muestras, 60 correspondieron a helados a base de crema y 40 a base de frutas. Los primeros contenían leche, crema de leche, huevos y azúcar, como ingredientes básicos y otros ingredientes adicionales que caracterizaron 20 variedades diferentes. Los segundos correspondieron a 13 variedades preparadas a base de jugos de frutas naturales y jarabe.

Materias primas. De las variedades de helados "milk cream" y "dulce de leche con nueces", en los que se detectó contaminación con *Salmonella*, se examinaron muestras de los siguientes ingredientes: leche entera, crema de leche, dulce de leche y nueces.

Heces de manipuladores. Se estudiaron muestras de materia fecal de diecinueve manipuladores y sus familiares, pertenecientes a uno de los dos establecimientos en los que se detectó *Salmonella* en muestras de helados. Se tomaron tres deposiciones habituales con intervalo de una semana, siguiendo técnicas ya descritas.⁽⁹⁾

Medios de cultivo

Medios de enriquecimiento. 1. Caldo Nutritivo (CN) compuesto de: extracto de carne (Oxoid), 0,5 g %; Triptona (Oxoid), 2,0 g %, y cloruro de sodio, 0,5 g % (pH 7,4). 2. Caldo Müller Kauffmann Tetraciónato (Oxoid) (MK). 3. Caldo Enriquecimiento Enterobacterias (Oxoid) (EE). 4. Caldo Selenito (Oxoid) (CSe). 5. Caldo North y Bartram (NB).⁽¹³⁾ 6. Caldo Kauffmann Tetraciónato (Oxoid) (KT).

Medios selectivos. 1. Agar Verde Brillante (VB) compuesto de: Proteosa Peptona Nº 3 (Difco), 1,0 g %; cloruro de sodio, 0,5 g %; lactosa,

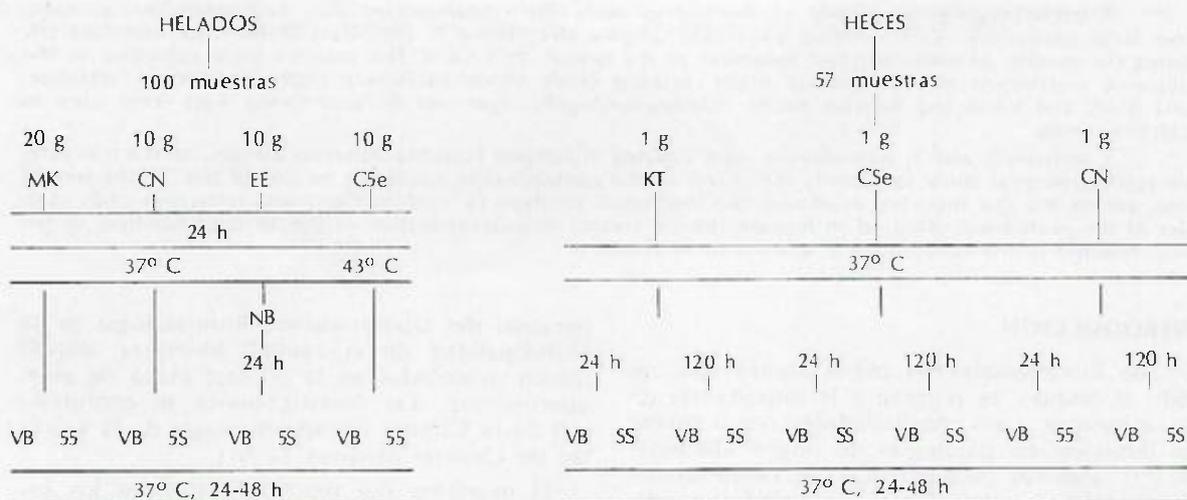
1,0 g %; sacarosa, 1,0 g %; rojo fenol, 0,008 g %; verde brillante, 0,00125 g %, y agar, 2,0 g % (pH 6,9). 2. Agar *Salmonella-Shigella* (Difco) (SS).

Técnicas de ensayo

Se procesaron alícuotas de 50 g de helado con la siguiente metodología (cuadro 1): 20 g fueron sembrados en 70 ml de MK, 10 g en 150 ml de CN, 10 g en 150 ml de EE y 10 g en 100 ml de CSe. Los tres primeros medios se incubaron a 37° C y el cuarto a 43° C. A las 24 horas los cultivos en MK, CN y CSe se estiraron sobre placas de VB y SS y 1 ml de EE fue resembrado en 20 ml de NB, incubado a 37° C 24 horas⁽¹³⁾ y luego subcultivado en VB y SS.

Las heces de los manipuladores se examinaron sembrando 1 g de cada muestra en 10 ml de KT, CSe y CN, respectivamente. Luego de 24 y 120 horas de incubación a 37° C se practicaron subcultivos en placas de VB y SS (cuadro 1).

CUADRO 1
Esquema del procesado de las muestras



Las materias primas fueron procesadas siguiendo la misma operatoria que la aplicada para las muestras de helado.

En todos los casos las placas de VB y SS se incubaron a 37° C, 24-48 horas. Las colonias sospechosas de *Salmonella* se estudiaron por pruebas bioquímicas preliminares de identificación:^(14, 15) siembra en agar triple azúcar hierro (TSI), medio con urea (U), agar para desaminación de fenil-alanina (FA), agua triptonada para producción de indol (I) y agar blando para motilidad (MOT). Las pruebas bioquímicas complementarias realizadas, incluyeron: acción sobre carbohidratos (CH), acción sobre aminoácidos (AA), prueba de Rojo de Metilo (RM), Voges Proskauer (VP), malonato (MAL) y citrato (CIT). Las primeras fueron: glucosa (GL), lactosa (LA), sacarosa (SA), manitol (MA), ramnosa (RA), arabinosa (AR), dulcitol (DU) y salicina (SL). Para aminoáci-

dos (AA) se probó: lisina (LIS), arginina (ARG) y ornitina (ORN). Las pruebas bioquímicas incubadas a 37° C fueron observadas diariamente hasta el cuarto día. Las cepas identificadas como *Salmonella* por su estudio bioquímico, fueron posteriormente sometidas a tipificación serológica (cuadro 2).

CUADRO 2
Identificación de "Salmonella"

Pruebas bioquímicas*	
Preliminares: TSI-U-FA-I-SH ₂ -MOT	
Complementarias	CH { GL-LA-SA-MA RA-AR-DU-SL
	AA: LIS-ARG-ORN RM-VP-MAL-CIT

Serología

* Explicación en el texto.

RESULTADOS

Sobre 100 muestras analizadas se aisló *Salmonella* en dos helados a base de crema (cuadro 3). De dos muestras de las variedades "milk cream" y "dulce de leche con nueces" se aislaron, respectivamente, *S. enteritidis* y *S. typhimurium*. Los productos contaminados procedían de dos establecimientos diferentes.

Los resultados de 57 coprocultivos practicados a 19 manipuladores del establecimiento estudiado figuran en el cuadro 4. Se obtuvieron cultivos positivos para *Salmonella* en dos empleadas hermanas, de quienes se aisló *S. anatum* de dos y de una muestra de sus respectivos coprocultivos seriados. El resultado fue negativo en el resto de manipuladores.

La investigación en las materias primas permitió constatar la presencia de *S. typhimurium* en muestras de nueces peladas. La búsqueda de *Salmonella* en leche entera, crema de leche y dulce de leche resultó negativa.

CUADRO 3

"Salmonella" en 100 muestras de helados Muestras obtenidas en 12 heladerías

Tipo de helado	Positivas	Negativas	Total
Fruta	—	40	40
Crema	2	58	62
Total	2	98	100

CUADRO 4

"Salmonella" en heces de manipuladores implicados

Manipulador Nº	Coprocultivo día		
	0	7	14
1	+	+	—
2	—	+	—
3-19	—	—	—

+ = positivo (*S. anatum*)
— = negativo

DISCUSION

Es ampliamente reconocida la importancia de la selección de la metodología y medios de cultivo aplicados para el aislamiento de *Salmonella*. Sin embargo en este trabajo se lograron resultados similares con los diferentes medios utilizados. Dos muestras de helados de 100 analizadas resultaron positivas. En el establecimiento donde se aisló *S. enteritidis* a partir de la variedad denominada "milk cream" no se pudo completar la investigación tendiente a establecer el origen de la contaminación. Este serotipo es uno de los que con mayor frecuencia se aísla de helados de preparación industrial o casera.^(2, 3, 7) Su presencia ha sido frecuentemente asociada a leche y huevos contaminados. En nuestro medio se lo ha encontrado en alimentos cárneos de origen bovino y porcino,⁽⁶⁾ en casos esporádicos de sal-

monelosis^(5, 7) y asociado a *S. typhimurium* en un brote de toxinfeción alimentaria por helados.⁽⁷⁾

Se considera oportuno aclarar que los establecimientos en los que se tomaron las muestras contaminadas reunían excelentes condiciones de higiene y saneamiento. Ello justifica la necesidad de insistir en un adecuado control bacteriológico periódico obligatorio de instalaciones, procesos de elaboración y manipuladores.

En el establecimiento donde se aisló *S. typhimurium* a partir de una muestra de la variedad "dulce de leche con nueces", se realizó el control bacteriológico al comienzo y final del proceso de elaboración. Este se realiza en equipo integral de moderna concepción y consiste en: mezcla y pasteurización de las materias primas básicas en batidoras a 80° C durante 10 minutos, homogeneización en circuito cerrado, pasaje por placas de enfriamiento refrigeradas por agua a 4° C, descarga por surtidor y pasaje a tina de maduración con batidoras a 4° C de 8 a 10 horas, descarga por surtidor y pasaje a congeladora (—15 a —25° C) de 10 a 15 minutos, y finalmente descarga a recipientes de conservación (—15° C).

Por otro lado, si bien la posibilidad de contaminación del producto a través de los manipuladores es una realidad, en esta oportunidad debemos descartarla, pues en ningún operario del establecimiento se aisló el mismo serotipo contaminante del helado. Ninguno de los manipuladores había manifestado síntomas de gastroenteritis ni recibido antibacterianos durante el lapso que demandó el muestreo para coprocultivos. Sin embargo es interesante destacar el aislamiento de *S. anatum* en heces de dos hermanas eliminadoras transitorias. Si bien la constatación de estas portadoras no ayuda a interpretar la probable vía de contaminación de la muestra problema, reafirma una vez más la importancia del adecuado control sanitario de los manipuladores de alimentos. Descartada la posibilidad de contaminación por intervención de éstos durante el proceso de elaboración, se abordó el estudio bacteriológico de las materias primas. Se aisló *S. typhimurium* en muestras de la misma partida de las nueces peladas utilizadas en la elaboración de los helados. Este serotipo es particularmente frecuente en alimentos contaminados^(1-3, 6, 8) y se ha encontrado asociado a *S. enteritidis* en un brote originado por ingesta de helados en esta provincia.⁽⁷⁾

El hallazgo de las nueces como vehículo de contaminación resulta una novedad ya que no registra antecedentes en la literatura consultada. Las condiciones de su cultivo y recolección en propiedades rurales de esta provincia, generalmente asociadas a la cría de animales de diversas especies, posibilita su contaminación con excretas de dichos reservorios.

Otras posibilidades de contaminación relacionadas con el almacenaje de alimentos y materias primas y con la frecuencia de roedores, insectos y otros vectores mecánicos y biológicos, fue totalmente descartada por las óptimas condicio-

nes higiénico-sanitarias observadas en el establecimiento.

Coincidentemente con lo que acontece en el resto del mundo, *S. typhimurium* se ha demostrado, en nuestro medio, como una de las especies más frecuentes en bovinos,⁽⁸⁾ en algunos tipos de alimentos cárneos⁽⁶⁾ y en casos esporádicos y epidémicos de salmonelosis.^(5, 7) Además resultó incriminada como agente etiológico en tres brotes de toxoinfección alimentaria.⁽⁷⁾

Considerando los resultados del control de calidad durante el proceso de elaboración, el equipamiento usado, la estricta higiene observada, así como los intentos negativos de aislar de los manipuladores el serotipo implicado en

la contaminación del helado, apoyamos la alternativa que incrimina a las nueces como origen de la misma, ya que constituye un ingrediente incorporado en la última etapa de elaboración sin ningún tratamiento previo.

Además se debe insistir en la importancia primordial del control higiénico-sanitario de manipuladores, equipamiento instalado y materias primas utilizadas para la elaboración de alimentos, ya que son múltiples las posibilidades de contaminación por diferentes microorganismos.⁽¹⁵⁾

El aislamiento de *S. anatum* de heces de dos manipuladores, si bien no estuvo en esta oportunidad relacionado con la contaminación de los helados examinados, es coincidente con la frecuencia de este serotipo en Mendoza.⁽⁵⁻⁸⁾

BIBLIOGRAFIA

1. Organización Mundial de la Salud. "Aspectos microbiológicos de la higiene de los alimentos". Serie de informes técnicos 598, Ginebra, 1976.
2. Center for Disease Control. "Salmonella surveillance". Third Quarter 1974, Atlanta Ga., mayo 1975.
3. Center for Disease Control. "Salmonella surveillance". Annual Summary 1974, Atlanta Ga., agosto 1975.
4. Committee on Salmonella, Division of Biology and Agriculture of the National Research Council. "An evaluation of the Salmonella problem". National Academy of Science, Washington D.C., 1969.
5. Curi de Montbrun, S. E.: "Salmonelosis en la provincia de Mendoza". Trih. Méd., 17:159-163, 1973.
6. Curi de Montbrun, S. E., Ciccarelli, A. S.: "Salmonella en algunos tipos de alimentos cárneos". Bol. Of. Sanit. Panam., 87:224-231, 1979.
7. Curi de Montbrun, S. E.; Ciccarelli, A. S.; Ampuero, S.; Fernández, R. A. y Benito, M. A.: "Infecciones por diversas especies de Salmonella en Mendoza, Argentina". Rev. Arg. Microbiol., 13:23-30, 1981.
8. Curi de Montbrun, S. E., Gimenez, D. F.: "Salmonella en bovinos faenados". Bol. Of. Sanit. Panam., 72:50-57, 1972.
9. Curi de Montbrun, S. E.; Giménez, D. F.: "Salmonella en manipuladores de alimentos de hospitales". Bol. Of. Sanit. Panam., 85:498-505, 1978.
10. Pether, J. V. S.; Gilbert, R. J.: "The survival of salmonellas on fingertip fingertips and transfer of the organisms to foods". J. Hyg., 69:673, 1971.
11. Larson, E. L.: "Persistent carriage of Gram-negative bacteria on hands". Am. J. Infect. Control, 9:112-119, 1981.
12. Tamminga, S. K.; Beumer, R. R.; Kampelmacher, E. H.: "Bacteriological examination of ice-cream in the Netherlands: Comparative studies on methods". J. App. Bacteriol., 49:239-253, 1981.
13. Mossel, D. A. A.; Quevedo, F.: "Control microbiológico de los alimentos". Serie de Monografías del CLEIBA. Aparado 5653, 1:52. Lima-Perú, 1967.
14. Eguet, T., D'Empaire, M.: "Actualizaciones de técnicas bacteriológicas. Investigación de enterobacterias". Bioquímica Panamericana, 1 (1), 1971.
15. Ewing, W. H.; Davis, B. R.: "Media and test for differentiation of Enterobacteriaceae". Centro para el Control de Enfermedades. Laboratorio bacteriológico de enfermedades entéricas, Atlanta, Ga., enero 1970.