

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

**SOBREVIVENCIA DE VIBRIO CHOLERAE O1, SEROTIPO INABA,
BIOTIPO EL TOR EN REFRESCO Y TORTILLAS DE MASA DE MAIZ Y EN
VEGETALES QUE COMUNMENTE SE CONSUMEN CRUDAS.**

INFORME FINAL DE TESIS

PRESENTADO POR
MARIA ELENA ESTRADA LAINFUESTA

PARA OPTAR AL TITULO DE
QUIMICO BILOGO

GUATEMALA, MARZO DE 1994

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

T(1474)

JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

DECANA	LICDA. CLEMENCIA GALVEZ DE AVILA
SECRETARIO	LIC. JOSE FRANCISCO MONTERROSO SALINAS
VOCAL I	LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR
VOCAL II	LICDA. THELMA ESPERANZA ALVARADO DE GALLARDO
VOCAL III	LIC. MIGUEL ORLANDO GARZA SAGASTUME
VOCAL IV	BR. JORGE LUIS GALINDO AREVALO
VOCAL V	BR. EDGAR GARCIA DEL POZO

ACTO QUE DEDICO

A Dios	Por todo lo que me ha dado en la vida
A la Virgen María	Mi refugio y fortaleza
A mis Padres	Dr. Francisco Estrada Ligorria Lissette Lainfiesta de Estrada Por su buen ejemplo en todo momento
A mi esposo y a mi hijo	José Herbert y José Rodrigo Sandoval Con todo mi amor
A mis hermanos	Francisco, Roberto, Zoila, Vivian y Fernando
A mis abuelitos	Héctor Lainfiesta †, Elena de Lainfiesta Francisco Estrada † y Blanca Elisa de estrada
A mis amigos	En especial a: Claudia Reyes, José Víctor López y Roberto Castillo

TESIS QUE DEDICO

A GUATEMALA

Con la esperanza de un mejor mañana para ella

A Universidad de San Carlos de Guatemala

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

A quienes debo mi formación humana

AGRADECIMIENTOS

A Licda. Floridalma Cano Granados

Al personal Profesional y Técnico del Laboratorio de Microbiología del
INCAP

A Señorita Liggia Barrios Escobar

A Señorita Ingrid Fabiola Cabrera

A todas las personas que de una u otra forma colaboraron en la realización
de este estudio

INDICE

	Pág
1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCION	4
3. ANTECEDENTES	5
3.1 EL COLERA	5
3.2 AGENTE CAUSAL DEL COLERA	5
3.3 EPIDEMIOLOGIA	7
3.4 CONTAMINACION Y SOBREVIVENCIA DE <i>V. cholerae</i> EN AGUA Y ALIMENTOS	8
3.5 METODOLOGIA DE RECUPERACION, AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <i>V. cholerae</i> EN ALIMENTOS:	10
3.6 ALGUNOS METODOS DE REDUCCION Y ELIMINACION DE MICROORGANISMOS EN ALIMENTOS:	11
4. JUSTIFICACIONES	14
5. OBJETIVOS	15
6. HIPOTESIS	16
7. MATERIALES Y METODOS	17
7.1 UNIVERSO DE TRABAJO	17
7.2 RECURSOS	17
7.3 PROCEDIMIENTOS	19
7.4 DISEÑO EXPERIMENTAL	24
8. RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS	26
8.1 SOBREVIVENCIA DE <i>Vibrio cholerae</i> O1 EN MASA Y TORTILLAS DE MAIZ:	26
8.2 REDUCCION DE LA CONTAMINACION CON <i>V. cholerae</i> EN HORTALIZAS: LECHUGA, APIO Y PEREJIL:	27
9. CONCLUSIONES	32
10. RECOMENDACIONES	34
11. REFERENCIAS	35
12. ANEXOS	40

1. RESUMEN

La epidemia latinoamericana del cólera se extendió a Centro América, afectando a Guatemala en 1991. Desde entonces, han ocurrido varios brotes de cólera en la mayoría de los departamentos de nuestro país.

La transmisión del cólera es por vía feco-oral. El agua y los alimentos contaminados con *Vibrio cholerae* O1 son los vehículos principales. Dentro de los alimentos que pueden intervenir como posibles vehículos están los que sufren una manipulación excesiva, condiciones que ocurren en la preparación de masa de maíz y en la elaboración de tortillas. También se encuentran las hortalizas, que son consumidas crudas y que muchas veces han sido regadas o refrescadas con agua contaminada. Por lo que el principal objetivo de este estudio fue el evaluar a nivel experimental la eliminación o bien la reducción de la contaminación con esta bacteria en estos alimentos.

La dosis infectiva de *V. cholerae* O1, biotipo El Tor es de 10^6 vibriones, dosis que depende de factores como forma de ingerir la bacteria y estado inmunológico del paciente. El inóculo de contaminación en este estudio fue mayor pensando en que los alimentos evaluados podrían estar contaminados con dosis mayores.

Para ello, se contaminaron porciones de masa de maíz con un inóculo de 10^7 - 10^8 vibriones por cada 50 gramos y en las hortalizas se utilizó el mismo inóculo por cada 25 gramos. Luego se determinó en el caso de alimentos derivados de masa de maíz, la sobrevivencia de este agente, después de tratamientos con calor; y en el caso de hortalizas que comúnmente se consumen crudas (lechuga, apio y perejil), la reducción de la contaminación con tratamientos de lavado con agua de chorro y sumergido en soluciones desinfectantes.

En los alimentos de masa de maíz se obtuvieron los siguientes resultados: Se determinó el tiempo de sobrevivencia de *V. cholerae* O1 en masa y tortillas dejadas a temperatura ambiente, siendo éste de 18 horas en la masa y 7 días en las tortillas. La cocción y el recalentado de tortillas eliminaron la contaminación con el agente causal del cólera alcanzando una temperatura promedio de 75.9°C y 66.5°C , respectivamente, por un tiempo promedio de 3 minutos, 22 segundos en la cocción y un tiempo establecido de 1 minuto de cada lado para el recalentado. Así también el llevar a ebullición el refresco de masa por un minuto, eliminó la contaminación con dicha bacteria.

Los resultados obtenidos con hortalizas son los siguientes: El lavado de 25 g de hortalizas con agua de chorro por 30 seg eliminó más del 90% de la contaminación con *V. cholerae* O1 y este efecto se vió aumentado al sumergir las porciones de hortalizas en soluciones desinfectantes de hipoclorito de sodio "cloro líquido Magia Blanca" (HS) de 25, 50 y 100 partes por millón (ppm) e hidrocioruro de biguanida más cloruro de benzalconio "Biocycle" (B) 273 ppm, durante 10, 15 y 30 minutos; el sumergido durante 5 minutos no posee un efecto significativo en la reducción de la contaminación. Al aumentar la concentración del HS y el tiempo de sumergido en ambos desinfectantes, se aumentó la reducción de la contaminación con *V. cholerae* O1. Los tratamientos desinfectantes para hortalizas recomendados en este estudio, que acompañados del lavado con

agua de chorro redujeron el 99% o más de la contaminación con *V. cholerae* O1, sin alterar las características sensoriales de las hortalizas fueron: Biocycle 273 ppm (1 tapaderita del recipiente comercial por litro de agua) por 10 minutos e hipoclorito de sodio 50 ppm (16 gotas por litro de agua) por 15 minutos, siendo éste el único tratamiento de los de HS que proporciona una reducción mayor al 99% y que no afecta las propiedades sensoriales de las hortalizas evaluadas.

2. INTRODUCCION

La epidemia latinoamericana de cólera, la cual forma parte de la séptima pandemia mundial, se inició en enero de 1991 en Perú. En julio del mismo año, esta epidemia se extendió a Centroamérica, siendo Guatemala el primer país afectado. El agente causal del cólera es *Vibrio cholerae* O1; la cepa responsable de la epidemia pertenece al biotipo El Tor y serotipo Inaba en un inicio; posteriormente, el serotipo Ogawa ha sido también aislado.

La transmisión del cólera se lleva a cabo por vía feco-oral; siendo el agua y los alimentos contaminados con *V. cholerae* O1 los vehículos principales. Este agente puede llegar a los alimentos por el contacto con agua contaminada, o a través de las manos contaminadas de personas infectadas y/o enfermas. Esta contaminación puede permanecer en los alimentos hasta su consumo; por lo que se recomienda la aplicación de normas de higiene satisfactorias en la preparación, cocción, almacenamiento y manipulación en general de los alimentos.

Entre los alimentos que poseen alto riesgo de contaminación se encuentran los que para su preparación requieren de una manipulación excesiva, entre los cuales pueden incluirse las tortillas, las que se elaboran con las manos. Los vegetales y frutas que se han lavado o regado con agua contaminada con el agente causal del cólera, constituyen también un alto riesgo.

En la preparación de alimentos a nivel del hogar, se utilizan algunos de los tratamientos que ayudan a la eliminación o reducción de contaminación microbiana; tales como la cocción, en la que la temperatura y tiempo varían de acuerdo al tipo de alimento; el lavado con agua potable de las frutas y hortalizas de consumo crudo, y el sumergido en soluciones de agentes químicos para su desinfección. Es por ello que el interés de este estudio fue evaluar la reducción o eliminación de *V. cholerae* O1, biotipo El Tor, serotipo Inaba en: masa y tortillas de maíz en donde se evaluó el efecto de la cocción y recalentado de las tortillas, además de la ebullición del refresco de masa; en el caso de las hortalizas se evaluó el efecto del lavado con agua potable y el sumergido en soluciones desinfectantes que no alteren las características sensoriales de las hortalizas. Estos datos contribuirán en la prevención de esta enfermedad.

3. ANTECEDENTES

3.1 EL COLERA

3.1.1 DEFINICION

El cólera es una enfermedad diarreica caracterizada por una enteritis aguda. El hombre contrae la infección por la ingestión de la bacteria *Vibrio cholerae* O1, productora de la toxina del cólera. Los individuos que ingieren el microorganismo pueden presentar diferentes cuadros clínicos; desde portador asintomático (personas aparentemente sanas quienes portan la bacteria en el intestino y la excretan en las heces durante períodos variables), enfermedad leve o moderada, hasta enfermedad grave o severa, la cual se caracteriza por diarrea profusa, vómitos, deshidratación, pulso débil, taquipnea y calambres musculares. El tratamiento del cólera consiste principalmente en la rehidratación por vía oral o si es necesario, por vía intravenosa. Sin tratamiento la tasa de letalidad por cólera grave puede llegar al 50%. Con tratamiento adecuado la mortalidad baja al 1%. La administración de antibióticos ayuda a reducir la duración de la diarrea y a la eliminación de los vibriones en dos a tres días, lo que disminuye la diseminación del microorganismo en el ambiente (1-6).

3.2 AGENTE CAUSAL DEL COLERA

3.2.1 CLASIFICACION

La familia *Vibrionaceae* está compuesta por los géneros *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Photobacterium*. Los miembros de esta familia se encuentran usualmente en ambientes acuáticos; son patógenos para el hombre a excepción del género *Photobacterium*, el que no está asociado a infecciones en el ser humano. El género *Vibrio* que constituye la mayor proporción de la familia *Vibrionaceae*, ha aumentado en los últimos años el número de especies, de cinco en 1974 a más de treinta en 1992. De éstas, 12 especies se reconocen como patógenas en humanos, las cuales son causantes de infecciones intestinales y/o extraintestinales. De las especies relacionadas con infecciones intestinales *Vibrio cholerae* es la más importante. En el anexo 1 se muestra la clasificación taxonómica de *V. cholerae* O1 (4,7,8).

El crédito del descubrimiento de este microorganismo fue dado por Hugh (1964) a Pacini, quien en 1854 observó un gran número de bacilos curvos en el contenido intestinal de un paciente quien había muerto por cólera. Sin conocer las observaciones de Pacini, Robert Koch, en 1883, cultivó el agente causal del cólera, dando una fuerte evidencia de su papel patológico en epidemias en Egipto e India (1,7,9-14).

La composición antigénica de *V. cholerae* es útil para su clasificación. *V. cholerae* posee un antígeno flagelar "H" común, y varios grupos de antígenos somáticos "O". Estos últimos son la base de su clasificación serológica en serogrupos, los que son bioquímicamente idénticos. De estos serogrupos solo el grupo O1 productor de toxina corresponde al agente causal del cólera. Las cepas de esta especie que no pertenecen al grupo O1 se clasifican como *cholerae* no O1 (anteriormente llamadas No aglutinables o NAG). *V. cholerae* no O1 no aglutina con el antisuero "O1", aun cuando se utilice un cultivo hervido durante 2 horas a 100°C. Se ha asociado con algunos casos individuales de diarrea similar a la del cólera y con pocos brotes.

Algunas cepas de *V. cholerae* no O1 producen una enterotoxina similar a la del cólera. Desde el punto de vista de salud pública solamente las especies de *V. cholerae* O1 productoras de la toxina del cólera son consideradas importantes por su potencial epidémico (5,10,14,15).

Existen cepas de *V. cholerae* que aglutinan en antisuero O1, pero no producen la enterotoxina característica, por lo que se les denomina *V. cholerae* O1 atípicos. Estas cepas se han aislado de agua en áreas endémicas de cólera así como en áreas en donde no existe esta enfermedad (14,16,17).

El antígeno "O" posee una proteína termolábil, una termoestable y varios polisacáridos. De acuerdo a la proteína somática termoestable, el antígeno "O" se diferencia en trece tipos (de la A a la L). *V. cholerae* O1 presenta combinación de 3 tipos de estos antígenos: A, B y C; de los que se pueden obtener tres subtipos serológicos o "serotipos": Ogawa, Inaba e Hikojima (1-5,7,9,12,18).

Vibrio cholerae O1 también existe en dos biotipos: clásico y El Tor; los cuales son diferenciados en base a características bioquímicas. Ambos biotipos aglutinan en el antisuero polivalente O1 y con los antisueros específicos Inaba u Ogawa (1,3,7,9,12,18).

La mayoría (80%) de personas infectadas por el biotipo El Tor permanecen asintomáticas; un 18% desarrollan diarrea leve o moderada y solamente el 2% desarrollan las formas severas de la enfermedad. En cambio, el biotipo clásico causa un mayor número de casos severos (10%) (1,2).

El biotipo El Tor es más resistente al medio que el clásico, sobrevive en agua por más tiempo, libre o asociado a plantas o animales acuáticos lo cual le permite diseminarse sin ser reconocido al principio y predominar sobre el biotipo clásico si éste existiera. Casos de cólera por el biotipo clásico, se encuentran focalizados en la región sur de Bangladesh, lo que sugiere que esta zona ha sido el hábitat del cólera clásico por mucho tiempo (1,3,5).

3.2.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y CULTURALES

Las especies del género *Vibrio* se describen como bacilos Gram negativo, aerobios y anaerobios facultativos, no esporoformadores, no encapsulados y poseen un solo flagelo polar. *Vibrio cholerae* usualmente posee forma curva o de coma; por ello Robert Koch lo llamó Kommabacillus. En cultivos viejos esta bacteria ya no presenta formas curvas, observándose solamente bacilos rectos, indistinguibles de otros bacilos entéricos. Konishi y colaboradores, encontraron por microscopía electrónica, que la célula de *V. cholerae* posee forma espiral. El género *Vibrio* es positivo a la prueba de indofenoloxidasas (excepto *V. metschnikovi*) y fermenta la glucosa con producción de ácido pero no de gas (1,3,4,7,9,11,12,14,19-21).

Los vibriones del cólera son bacterias de fácil crecimiento, se multiplican adecuadamente en los medios de cultivo usuales. Crecen en presencia de abundante oxígeno y la temperatura óptima de crecimiento es de 30 a 40°C. De Paola y colaboradores, informan que se obtiene una mayor recuperación a una temperatura de 42°C. *Vibrio cholerae* crece abundantemente en medios alcalinos, mientras que es extremadamente susceptible a pH ácidos (anexo 2). Los miembros del género *Vibrio* necesitan de cloruro de

sodio para su crecimiento, a excepción de *V. cholerae* y *V. mimicus*. Sin embargo, el crecimiento de estas especies se ve estimulado por la adición de 1% de cloruro de sodio. El medio alcalino llamado Agua Peptonada Alcalina con cloruro de sodio (APA) es utilizado para enriquecer el crecimiento de *V. cholerae*; ocurriendo su multiplicación luego de 5 a 8 horas a 36 °C, el período de enriquecimiento no debe exceder de 8 horas y luego se siembra una asada de la superficie del tubo de enriquecimiento. Si la incubación es mayor de 8 horas, el crecimiento de la microbiota competidora puede inhibir el crecimiento de *V. cholerae* (1-5,7,9,10-13,21-23).

3.2.3 PATOGENICIDAD

La ingesta de 100 millones de organismos del biotipo clásico y 100 mil a 1 millón de bacilos del biotipo El Tor, provocan la infección. Cuando el hombre ingiere al agente causal del cólera en las cantidades necesarias para que se produzca la enfermedad, la acidez gástrica actúa como primera línea de defensa del hospedero. Existe información de que el grupo sanguíneo O es un factor predisponente para que la persona sea más susceptible al cólera.

Las células bacterianas que sobreviven al pH del estómago llegan a colonizar el intestino delgado, donde producen la toxina del cólera. La producción de la toxina es un factor determinante para que se produzca la enfermedad, pero la colonización es un prerrequisito. La estructura flagelar bacteriana contribuye a la colonización, debido a que la movilidad aumenta el número de interacciones potenciales entre la bacteria y la capa epitelial de la mucosa. Es posible también que la estructura flagelar esté involucrada en la adherencia a la mucosa intestinal. *V. cholerae* posee además un grupo de enzimas del complejo mucinasa, las que facilitan la penetración de la bacteria a la barrera de moco (1,3,9,11,24-27).

La toxina del cólera es una proteína termolábil de 85-KDa que tiene dos subunidades funcionales, la A y la B. La subunidad B consiste en cinco péptidos idénticos que se unen a un receptor específico, el gangliósido GM1, presente en la mucosa del intestino delgado. El pequeño segmento A1, que es la parte activa de la subunidad A, penetra a la célula por el agujero formado por la subunidad B y activa la enzima Adenilato-ciclase. Esto provoca que las células intestinales aumenten el nivel de AMPc, el cual altera el transporte activo de iones, provocando una hipersecreción de líquido isotónico. Este líquido contiene baja concentración de proteínas, eritrocitos, leucocitos y mayor concentración de bicarbonato y potasio que el suero sanguíneo. El resultado neto es la excreción masiva de heces líquidas, con 10⁶ microorganismos por mililitro, lo que conlleva a una deshidratación severa y acidosis metabólica (1-4,7,28-31).

3.3 EPIDEMIOLOGIA

Durante los últimos dos siglos, han ocurrido siete pandemias de cólera. Desde entonces, esta enfermedad ha permanecido como endémica en la India, parte de Africa y Asia. El primer país de América

afectado por el cólera fue Canadá en 1829, correspondiendo a la segunda pandemia mundial. En Guatemala, la enfermedad se dio por primera vez en 1836, como una epidemia devastadora, ocurriendo también en 1857 (1,3,13,32).

La reciente epidemia de cólera en Latinoamérica es parte de la última pandemia que se inició en 1961, la que ha afectado gran cantidad de países en todo el mundo. En esta pandemia *V. cholerae* O1 biotipo El Tor se expandió de su área endémica en Célebes (Sulawesi, Indonesia), probablemente por un aumento en la población. Primero alcanzó a países del este de Asia; afectó Bangladesh a finales de 1963, India en 1964 y la Unión Soviética e Irán en 1966. Así, la séptima pandemia del cólera se ha expandido rápidamente a un vasto territorio. En enero de 1991 llegó a Perú, iniciándose una epidemia americana de gran magnitud. En el anexo 3 se observa un mapa de América que muestra su evolución (1,13,32,33).

Guatemala se ha visto afectada por el cólera desde julio de 1991; la epidemia ingresó por el suroccidente del país, extendiéndose por la costa. En noviembre del mismo año, 21 departamentos estaban ya afectados por la epidemia. El cólera luego de introducirse a un país, se va hacia su costa tomando como vehículo el agua y los alimentos marinos, luego se extiende a otras partes del continente. Esta enfermedad empieza a ser endémica en áreas donde las condiciones de saneamiento ambiental son deficientes, existe hacinamiento y falta de educación en la población. La temperatura y humedad también ayudan a su persistencia (1,4,5,7).

El cólera es exclusivamente una enfermedad del hombre y su transmisión es por vía feco-oral, a través de la ingesta de agua y/o alimentos contaminados (anexo 4). La dosis infectiva (1×10^6 vibriones del biotipo El Tor y 1×10^8) del biotipo Clásico, está influenciada por las condiciones en que se lleva a cabo la ingestión y por los mecanismos de defensa que puede presentar el hospedero (1-4,7,9,11,14).

El agua contaminada con *V. cholerae* O1 es el vehículo principal del cólera; cuando es utilizada para beber, lavado de hortalizas u otros alimentos, para higiene personal, principalmente en el lavado de manos (1-3,34-36).

Algunos factores ambientales contribuyen a que *V. cholerae* pueda permanecer viable en el agua y los alimentos, lo cual facilita la transmisión de la enfermedad. La sobrevivencia de los vibriones fuera del cuerpo humano es de gran importancia epidemiológica y depende de diversos factores, entre ellos: temperatura, pH, presión osmótica, grado de humedad, concentración de sales y carbohidratos, presencia de materia orgánica y de otras bacterias (5,34,35).

3.4 CONTAMINACION Y SOBREVIVENCIA DE *V. cholerae* EN AGUA Y ALIMENTOS

Los alimentos pueden contaminarse con *V. cholerae* O1, a través de su contacto directo con heces de pacientes o enfermos con cólera que intervienen en la manipulación y preparación de alimentos. También pueden actuar como vehículo al haber estado en contacto con agua contaminada con *V. cholerae* O1 (anexo

4). Entre los factores que aumentan la sobrevivencia y el crecimiento de *V. cholerae* O1 en alimentos se encuentran: bajas temperaturas, alto contenido orgánico, ausencia de microbiota competidora y un alto grado de humedad. Se ha observado que un pH cercano a 7 es favorable para el crecimiento de los vibriones, y que ocurre un crecimiento aún más rápido en alimentos húmedos y alcalinos a la vez (1,3,4,35,37).

Entre los alimentos considerados de alto riesgo para la transmisión del cólera se encuentran:

3.4.1 Pescado y mariscos provenientes de aguas contaminadas, principalmente cuando se consumen crudos o son cocinados insuficientemente: El aislamiento, de especies de *Vibrio spp.* en humanos, aumenta por el consumo de comida de mar, especialmente cuando ésta se come cruda o cocida insuficientemente. En 1978 se informó sobre un brote de cólera en Luisiana, EE.UU., asociado al consumo de cangrejos mal cocidos. Según estudios realizados por el Centro de Control de Enfermedades (CDC de Atlanta, Georgia EE.UU.), los cangrejos de mar, hervidos en un tiempo menor a 8 minutos o cocinados al vapor por menos de 25 minutos, pueden aún contener organismos viables. Se ha observado que almejas contaminadas y hervidas por menos de 10 minutos o cocidas al vapor por menos de 30 minutos aún poseen vibriones viables; *V. cholerae* tiene afinidad por la quitina (la cual forma parte de la cubierta de crustáceos); sintetiza la enzima quitinasa, que le permite adherirse a dicha cubierta. Esto representa un riesgo para personas que ingieren mariscos cosechados en aguas marinas contaminadas con excretas de una población con cólera, o bien en aguas en las que *V. cholerae* O1 es un organismo autóctono. En alimentos marinos refrigerados, *V. cholerae* puede sobrevivir por más de 3 semanas (anexo 5) (2,4,7,17,38-41).

3.4.2 Vegetales y frutas que se han lavado o regado con agua contaminada: Se asume que si frutas y verduras que están contaminadas se consumen crudas pueden causar brotes de cólera. Se conoce que las hortalizas se contaminan con bacterias de origen fecal cuando se usan aguas de riego contaminadas. En vegetales contaminados, entre ellos lechuga, zanahoria, coliflor, tomate y cebolla, *V. cholerae* sobrevive de 1 a 7 días, a temperatura ambiente y hasta 10 días a temperatura de refrigeración (anexo 5) (1,3,4,32,34,35).

3.4.3 Bebidas preparadas con agua contaminada: El agua puede contener vibriones viables que han llegado a ella por contaminación fecal de una población con cólera o bien, puede ser un microorganismo autóctono residente en esa porción de agua. Un ambiente marino puede actuar como reservorio de *V. cholerae* toxigénico a pesar de que existan cambios bio-físico-químicos. En el caso de agua diferente a la de mar, ésta puede contaminarse directamente por contacto con material fecal de personas enfermas o de portadores sanos (3,4,16,17,40,42,43).

V. cholerae se mantiene viable por más tiempo en agua que en alimentos. En agua, sobrevive mejor en un ambiente marino que en agua dulce, en donde existe mayor cantidad de bacterias. En agua de mar, puede sobrevivir hasta 13 días a temperatura ambiente y hasta 60 días a temperatura de refrigeración, mientras

que en agua de pozo vive solamente 18 días a temperatura de refrigeración (anexo 5) (3,4,35,38).

3.4.4 Alimentos contaminados debido a su preparación o manipulación por personas que no cumplen con condiciones de higiene adecuadas: Los alimentos de las ventas callejeras son de alto riesgo de contaminación microbiana; la posibilidad de que las personas que manipulan alimentos transmitan enfermedades depende del grado de contacto y de la aplicación de normas de higiene satisfactorias en la preparación, cocción, almacenamiento y manipulación en general de los alimentos. Esto es debido principalmente a la falta de higiene de los vendedores ambulantes, así como la carencia de agua potable, servicios sanitarios y la acumulación de basura. Así, las personas que preparan alimentos desempeñan una función importante en la tarea de preservar la inocuidad de los alimentos (1-4,35).

En Guatemala algunos alimentos de consumo popular, como son los derivados de la masa de maíz, entre ellos: tortillas y refresco de masa, se elaboran en forma artesanal y al prepararlos, se utilizan directamente las manos (anexo 6). Estudios de Capparelli y Mata demuestran la presencia de contaminación fecal en las tortillas, donde el agua utilizada en el amasado del maíz y palmeado de la masa son fuentes importantes de contaminación (44).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha publicado reglas para la preparación higiénica de los alimentos, las cuales deben ser tomadas en cuenta por las personas que se dedican a ello (anexo 7).

3.5 METODOLOGIA DE RECUPERACION, AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *V. cholerae* EN ALIMENTOS:

Para la recuperación y aislamiento de *V. cholerae* de muestras donde su concentración es baja, es necesario realizar procedimientos de enriquecimiento. El enriquecimiento se lleva a cabo en APA (pH 9.2), del cual después de 6 a 8 h de incubación a 36 °C, se transfiere un inóculo de la superficie del medio a un agar para su aislamiento. El medio Tiosulfato, Citrato, Sales biliares, Sucrosa (TCBS), es más selectivo que otros, junto con el medio de Taurocolato, Telurito, Gelatina (TTG) para el aislamiento primario de *V. cholerae*. El agar TCBS posee altas concentraciones de tiosulfato de sodio y citrato de sodio, que sirven para detectar la producción de sulfuro de hidrógeno; la sucrosa se incluye pues es un carbohidrato fermentable por el metabolismo de los Vibrios; la bilis de buey y el colato inhiben principalmente a los enterococos y por su alta alcalinidad, se inhiben considerablemente las enterobacterias. Azul de timol y azul de bromotimol están incluidos como indicadores de cambios de pH. Luego del aislamiento y observación de colonias características en el medio sólido utilizado, se efectúan pruebas bioquímicas y serológicas para la determinación de especie y serogrupo. La determinación de biotipo se efectúa con fines epidemiológicos. En las cepas de *V. cholerae* O1 aisladas de agua y alimentos es necesario determinar la presencia de toxina a través de métodos inmunológicos como ELISA y látex (1,4,7,10,12,45-47).

3.6 ALGUNOS METODOS DE REDUCCION Y ELIMINACION DEMICROORGANISMOS EN ALIMENTOS:

3.6.1 FISICOS:

3.6.1.1 TEMPERATURA:

La muerte o destrucción de microorganismos por calor es una función exponencial de primer orden que tiene lugar en forma más rápida, conforme la temperatura se eleva. El calor es capaz de producir cambios en la célula que evitan su reproducción, ya sea por efecto directo sobre su mecanismo reproductivo o bien sobre sistemas metabólicos que proveen energía e intermediarios químicos para la reproducción. Cuando la temperatura se eleva por encima de la temperatura máxima para la proliferación, los efectos letales sobre un microorganismo determinado aumentan. No todos los microorganismos son igualmente susceptibles al calor. Los microorganismos psicrófilos son más susceptibles, seguidos de los mesófilos (entre los cuales se encuentra *V. cholerae*) y los termófilos que son más resistentes; por último, se encuentran las endosporas bacterianas, las cuales resisten más que sus células vegetativas. *V. cholerae* no produce endosporas, por lo que no soporta temperaturas mayores a 60°C, Rice y colaboradores determinaron en tres cepas de *V. cholerae* O1, Inaba, El Tor que el punto térmico de muerte (TDP) en agua libre de cloro, fue de 62°C durante un tiempo establecido de 10 minutos (1-4,7,9,14,48-50).

La aplicación de un tratamiento térmico en alimentos puede eliminar una gran cantidad de bacterias, pero las sobrevivientes pueden multiplicarse rápidamente si las condiciones de almacenamiento les son favorables. Un ejemplo de esto son las tortillas, que al ser dejadas más de 24 horas a temperatura ambiente después de su cocción, los coliformes sobrevivientes se multiplican, llegando a recuentos iguales a los obtenidos antes del proceso de cocción (48).

3.6.1.2 LAVADO MECANICO:

El lavado mecánico en alimentos contaminados con *V. cholerae* O1 es efectivo si se realiza con agua potable. Según Felsenfeld la limpieza de verduras y frutas restregadas con cepillo utilizando agua potable puede dar resultados excelentes (reducción de por lo menos el 99% de los microorganismos). En estudios más recientes, al efectuar un lavado prolongado con agua corriente se ha observado que la acción mecánica del agua elimina por lo menos el 90% de los contaminantes biológicos (37,42,48).

3.6.2 DESINFECCION

Se le llama desinfección al proceso químico utilizado para la reducción de la carga microbiana en superficies de objetos inanimados o en la piel de seres humanos, por ejemplo. Para la desinfección se utilizan los germicidas. De acuerdo a su empleo, los germicidas se denominan antisépticos, los que son empleados sobre la piel y desinfectantes, que se usa generalmente en objetos inanimados. El agua potable por ejemplo, es desinfectada con cloro para reducir o eliminar microorganismos potencialmente patógenos. El uso de una desinfección efectiva es esencial para mantener altos estándares de higiene, reduciendo el riesgo de

contaminación del alimento y evitando la transmisión de infecciones. Los desinfectantes se utilizan solos o en formulaciones para lograr un mejor efecto en la desinfección (48,49).

3.6.2.1 HIPOCLORITO DE SODIO

Los hipocloritos son los más antiguos y más ampliamente usados de los compuestos de cloro en el campo de la desinfección química. Son germicidas efectivos contra un gran espectro de microorganismos; tienen la ventaja de que son fáciles de manejar y económicos. Además no son tóxicos al hombre en las concentraciones adecuadas. A la concentración utilizada para desinfectar el agua potable, carecen de toxicidad (51,52).

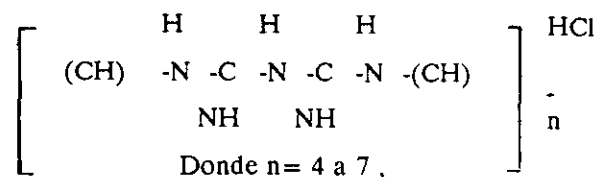
Las soluciones de hipoclorito de sodio liberan ácido hipocloroso al estar en contacto con el jugo gástrico y ácidos. Los hipocloritos ingeridos se absorben en forma de cloruros, que pasan a la circulación y son excretados por el riñón. Su ingesta en altas concentraciones causa irritación y corrosión de membranas mucosas con dolor y vómitos. El hipoclorito de sodio (NaOCl) está disponible en polvo o líquido. En solución es poco estable; su estabilidad y acción depende de factores como: concentración, presencia y concentración de catalíticos, pH, temperatura, materia orgánica y radiación ultravioleta. Con respecto a la materia orgánica en una solución de cloro, ésta consume el cloro disponible y reduce su capacidad bactericida; esto ocurre sobre todo en soluciones con bajos niveles de cloro. En soluciones con niveles altos, se cuenta con una reserva de cloro disponible lo cual mantiene en la solución su acción bactericida. La dureza del agua, que depende de los iones calcio y magnesio, no interfiere con la acción bactericida de soluciones de hipoclorito. Las soluciones de hipoclorito de sodio deben ser almacenadas en recipientes a temperaturas no mayores de 20°C y protegidas de la luz para mantener su estabilidad (49,51-53). Los hipocloritos son utilizados comúnmente disueltos en agua. Al colocar el hipoclorito de sodio en contacto con agua se forma ácido hipocloroso. El ácido hipocloroso (HOCl) es el responsable de la destrucción de los microorganismos, y su acción es doble:

3.6.2.1.1 Por combinación con proteínas bacterianas, formando cloraminas.

3.6.2.1.2 Por oxidación, el ácido hipocloroso libera oxígeno fácilmente. A la oxidación de la materia orgánica se debe también el poder desodorizante (49,52,54).

3.6.2.2 COMPUESTO: MEZCLA DE BIGUANIDA (CLORHIDRATO DE BIGUANIDA POLIMÉRICO) Y CLORURO DE BENZALCONIO (CLORURO DE LAURIL, DIMETIL, BENCIL AMONIO);

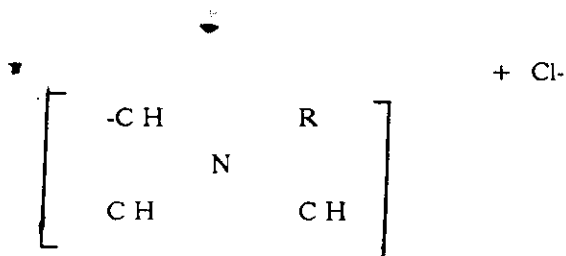
Esta mezcla es utilizada en algunos desinfectantes comerciales. El hidrocloreto polimérico de biguanida (polihexametil biguanida) es un desinfectante utilizado comúnmente, y su fórmula general es:



Es uno de los pocos polímeros sintéticos con actividad biológica; se clasifica por su modo de acción como un antibacteriano de membrana. Actúa provocando una rápida atracción y unión a la superficie bacteriana; pasa por la pared celular y se une a la membrana citoplásmica. Esto provoca un escape de componentes citoplásmicos de bajo peso molecular, seguido de macromoléculas y una precipitación del contenido celular por interacción con polímeros de fosfatos en el citoplasma (55-58).

Este compuesto presenta resultados adecuados como desinfectante y provoca mínimos efectos colaterales (58).

El Cloruro de Benzalconio (cloruro de lauril, dimetil, bencil amonio) es un compuesto cuaternario de amonio (detergentes catiónicos cuyo anión es halogenado: cloruro o bromuro), con la fórmula general:



Estos compuestos poseen una buena actividad de desinfección y baja toxicidad. El cloruro de benzalconio es un preparado clásico que sufre menor desactivación que otros compuestos de amonio cuaternario por la presencia de materia orgánica y dureza del agua. Se caracteriza por su acción surfactante; al estar en contacto con la célula bacteriana actúa sobre las proteínas, como agente desnaturizador, altera reacciones metabólicas y daña la membrana bacteriana provocando pérdida de potasio (49,58-60).

4. JUSTIFICACIONES

Dentro de los alimentos que pueden intervenir como posibles vehículos en la transmisión del cólera están los que sufren una manipulación excesiva y muchas veces sin tomar en cuenta las reglas de higiene; condiciones que pueden ocurrir en la preparación de la masa de maíz y en la elaboración de tortillas. También se encuentran las hortalizas que son consumidas crudas y que muchas veces han sido regadas o refrescadas con agua contaminada, lo cual ocurre corrientemente en Guatemala. Por lo anterior se considera importante investigar en estos alimentos de alto consumo popular en la población guatemalteca, la sobrevivencia de *V. cholera* O1 luego de tratamientos con calor (derivados de masa de maíz) o bien luego de lavado y desinfección (hortalizas) justificándolo las razones siguientes:

Las tortillas se elaboran en forma artesanal y su preparación incluye un tiempo corto de cocción y una manipulación directa. Además, los alimentos que tienen valores de pH de 7 o más, favorecen el crecimiento de *V. cholerae*, y la masa de maíz posee un pH que va de neutro a alcalino, pues en su preparación se mezcla el maíz con cal (anexo 7).

Existe también información sobre la presencia de contaminación fecal en tortillas; contribuyendo a esta contaminación el agua utilizada en la preparación de la masa y las manos de las personas que las preparan.

En el caso del refresco de masa, si ésta estuviera contaminado, se disuelve en agua fría y no se cuece.

En el caso de hortalizas se considera justificable evaluar el lavado mecánico con agua potable y el uso de soluciones desinfectantes de hipoclorito de sodio y de hidrocloreuro de biguanida más cloruro de benzalconio, que se encuentran a la venta en el mercado guatemalteco, con el fin de asegurar a los consumidores que el lavado y el sumergido en dichas soluciones permiten una alta reducción de la contaminación con el agente causal del cólera.

5. OBJETIVOS

- 5.1** Determinar el tiempo de sobrevivencia de *V. cholerae* O1 en masa y tortillas de maíz dejadas a temperatura ambiente.
- 5.2** Determinar si el tiempo y temperatura de cocción de la masa de maíz en la elaboración de tortillas, son suficientes para eliminar la contaminación por *V. cholerae* O1 biotipo El Tor, serotipo Inaba.
- 5.3** Determinar si el recalentado de tortillas por 1 minuto de cada lado (en un comal de barro), elimina la contaminación con *V. cholerae* O1, que podría darse debido a la manipulación después de la cocción.
- 5.4** Determinar si la ebullición de refresco de masa durante un minuto elimina la contaminación con el agente causal del cólera.
- 5.5** Comparar el efecto en la eliminación o reducción del agente causal del cólera en lechuga, apio y perejil, con los tratamientos siguientes:
 - 5.5.1** Lavado con agua potable
 - 5.5.2** Lavado con agua potable más sumergido en soluciones desinfectantes en diferentes combinaciones de concentración y tiempo.
- 5.6** Determinar en qué combinación de concentración y tiempo de los desinfectantes utilizados, se obtiene una buena desinfección, sin alterar las características sensoriales (sabor, color y textura) de las hortalizas evaluadas.

6. HIPOTESIS

- 6.1** *Vibrio cholerae* O1 es capaz de sobrevivir en la masa y tortillas de maíz por varias horas a temperatura ambiente.
- 6.2** La temperatura y el tiempo que se aplican en el proceso de cocción de las tortillas, son suficientes para eliminar una contaminación con 10^7 - 10^8 vibriones del cólera.
- 6.3** La contaminación con el agente causal del cólera posterior a la cocción de las tortillas, debido a su manipulación, es eliminada recalentando las tortillas al menos por un minuto de cada lado en un comal de barro.
- 6.4** La ebullición del refresco de masa de maíz contaminado con *V. cholerae* O1, durante 60 segundos elimina a dicho agente.
- 6.5** La contaminación con *V. cholerae* O1 en hortalizas (lechuga, apio y perejil) se reduce en un 90% con un buen lavado con agua potable (de chorro) durante al menos 30 segundos.
- 6.6** Es posible lograr una reducción del 99% o mayor en hortalizas como lechuga, apio y perejil, contaminadas con *V. cholerae* O1, biotipo El Tor, serotipo Inaba, sin alterar sus características sensoriales, al aplicar tratamientos adecuados de lavado con agua potable más sumergido en soluciones desinfectantes de hipoclorito de sodio (cloro Magia Blanca) e hidrocioruro de biguanida más cloruro de benzalconio (Biocycle).

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 UNIVERSO DE TRABAJO

Cepa utilizada: *Vibrio cholerae* O1, serotipo Inaba, biotipo El Tor (IN-VC 0006) aislada de un paciente guatemalteco durante la epidemia actual de cólera, por el laboratorio de bacteriología de INCAP.

Con esta cepa se preparó un inóculo de 10^7 - 10^8 células por mililitro. Se evaluó su sobrevivencia en:

7.1.1 ALIMENTOS DE MASA DE MAIZ

7.1.1.1 PORCIONES DE MASA

- Dejadadas a temperatura ambiente
- Elaboración de refresco y aplicación de ebullición por 1 minuto.
- Elaboración de tortillas (palmeado de la masa más cocción de la misma en comal) (anexo 6) (61).

7.1.1.2 TORTILLAS

- Dejadadas a temperatura ambiente.
- Recalentado de tortillas (1 minuto de cada lado).

7.1.2 HORTALIZAS

7.1.2.1 LECHUGA (*Lactuca sativa*)

7.1.2.2 APIO (*Apium graveolens*)

7.1.2.3 PEREJIL (*Apium petroselinum*) (62).

En las tres hortalizas se efectuó lavado con agua de chorro y combinación de este lavado más aplicación de soluciones desinfectantes (hipoclorito de sodio y un compuesto comercial: hidrocloreuro de biguanida más cloruro de benzalconio), para determinar el porcentaje de reducción de la bacteria.

7.2 RECURSOS

7.2.1 HUMANOS

- Br. María Elena Estrada Lainfiesta (tesista)
- Licda. Floridalma Cano (asesora)
- Dr. Rafael Flores (asesor, División de Estadística INCAP)
- Dr. José Ramiro Cruz (revisor INCAP)
- Personal de Nutrición, Infección e Inmunología de INCAP.

7.2.2 INSTITUCIONALES

- Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá INCAP; División de Nutrición e Infección, Laboratorios Leonardo Mata.

7.2.3 FISICOS

7.2.3.1 MATERIALES

7.2.3.1.1 MATERIALES DE LABORATORIO

- cajas de Petri 10 x 15 mm
- asas bacteriológicas no calibradas
- asas bacteriológicas calibradas de 0.01 ml
- pipetas serológicas
- micropipetas
- hisopos
- aplicadores de madera
- bajalenguas de madera
- bolsas plásticas
- coladores
- masking tape
- papel parafilm
- papel parafinado
- papel aluminio
- papel craft
- agitador magnético
- servilletas de papel
- gradillas de metal

7.2.3.1.2 CRISTALERIA

- pipetas Pasteur de vástago largo y corto
- pipetas serológicas graduadas
- láminas portaobjetos
- tubos de ensayo 13 x 100 con tapón de rosca
- beakers de 25, 100, 250, 500 y 4000 ml
- erlenmeyer de 250, 500, 1000 y 2000 ml

7.2.3.1.3 EQUIPO

- autoclave (castle steam sterilizer)
- incubadora (Thelco 32M)
- balanza
- vortex (Curtin Scientific Co)
- estufa (Fisher Scientific Thermix Stirring Hot Plate R 10 T)
- mechero (HANAU)

- comal con diámetro de 45 cm
- comal con diámetro de 85 cm
- potenciómetro (Beckman)
- computadora
- campana bacteriológica
- contador Spencer

7.2.3.1.4 MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Muller Hinton
- Agar Tiosulfato-Citrato-Sales biliares-Sucrosa (TCBS)
- Agar TSI
- Agua Peptonada Alcalina (preparada en el laboratorio a partir de: Agua destilada, Peptona 1%, Cloruro de sodio - Caldo MRVP

7.2.3.1.5 REACTIVOS

- Agua destilada
- N'N'N'N'- Tetrametil fenilendiamina
- Desoxicolato de Sodio
- Taurocolato de Sodio
- Antisuero polivalente y monovalente para *V. cholerae* O1, serotipo Inaba.
- Hidróxido de Potasio al 40%
- Alfa Naftol

7.3 PROCEDIMIENTOS:

7.3.1 PREPARACION DEL INOCULO DE CONTAMINACION:

Para todos los experimentos se utilizó la cepa de *V. cholerae* O1, serotipo Inaba, biotipo El Tor: INCAP VC-0006, la cual fue aislada por este laboratorio de un paciente guatemalteco afectado por cólera durante la epidemia actual. La cepa se sembró en agar Muller Hinton (MH) y se incubó a 36°C durante la noche. Del cultivo se realizaron suspensiones en Agua Peptonada Alcalina (APA, pH 9.2), de la que se hicieron diluciones decimales (1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000) y se inocularon uniformemente sobre agar Tiosulfato, Citrato, Sales Biliares, Sucrosa (TCBS) en volúmenes de 0.01 ml, con asa calibrada. Luego de incubar a 36°C por 24 horas se determinó el número de colonias crecidas y se multiplicó por el factor de dilución. Se escogió la dilución en la cual se obtuvo un conteo entre 30 y 300 colonias de *V. cholerae* O1. Se midió en la suspensión inicial el porcentaje de transmitancia (espectrofotómetro Coleman 295) a una longitud de onda de 650 nanómetros (nm) (63). Se utilizó como base la transmitancia del 80%, que correspondió a una suspensión con 10^7 - 10^8 Unidades formadoras de colonias (UFC) de *V. cholerae* O1.

7.3.2 SOBREVIVENCIA DE *V. cholerae* O1 EN MASA DE MAIZ (anexo 8):

7.3.2.1 MASA DE MAIZ DEJADA A TEMPERATURA AMBIENTE:

La masa se obtuvo en dos puestos de venta y elaboración de tortillas. Catorce porciones de cada puesto de venta de 50 g cada una, fueron contaminadas con 1 ml del inóculo estandarizado. Las porciones se dejaron a temperatura ambiente (24-25 °C) por 0, 2, 6, 8, 12, 18 y 24 horas, tiempos en los que se fueron sacando porciones para medir el pH y cuantificar la presencia del agente contaminante como se indica en el inciso 7.3.5.

7.3.2.2 ELABORACION DE REFRESCO DE MASA:

Nueve porciones de 50 g de masa de maíz contaminadas cada una con 1 ml de la suspensión base de *V. cholerae* O1 se disolvieron en 300 ml de agua de pozo en un beaker de 500 ml. Las suspensiones (refresco de masa) se llevaron a ebullición durante 1 min, se esperó que se encontraran a temperatura ambiente y luego se realizó análisis microbiológico para determinar si aún estaba presente la bacteria inoculada (inciso 7.3.4). Como control de la viabilidad de *V. cholerae*, para cada tres porciones se contaminó una porción extra de masa, cuyo refresco elaborado no fue llevado a ebullición.

7.3.2.3 ELABORACION DE TORTILLAS:

Cincuenta porciones de 50 g de masa de maíz cada una, se contaminaron con 1 ml de la misma suspensión patrón de *V. cholerae*. Después de 10 min de contacto se elaboraron tortillas utilizando guantes, en un comal de 85 cm de diámetro colocado sobre leña. Al encontrarse cocidas las tortillas, se levantaron del comal y se les midió la temperatura alcanzada, doblándolas y colocando un termómetro en el centro de las tortillas. Cuando la temperatura disminuyó hasta 25 °C se realizó análisis microbiológico para comprobar la viabilidad del agente contaminante. Se trabajó con controles positivos que consistieron en porciones de masa contaminada sin cocer.

7.3.3 SOBREVIVENCIA DE *V. cholerae* O1 EN TORTILLAS DE MASA DE MAIZ (anexo 8):

7.3.3.1 TORTILLAS DEJADAS A TEMPERATURA AMBIENTE:

Las tortillas se obtuvieron en un puesto de venta de tortillas. 14 tortillas fueron contaminadas con un mililitro del inóculo estandarizado. Las tortillas se incubaron a temperatura ambiente (24-25 °C) por seis días. Cada día se realizó un análisis microbiológico (inciso 7.3.4) a dos tortillas para determinar si *V. cholerae* aún estaba presente.

7.3.3.2 RECALENTADO DE TORTILLAS:

Quince tortillas ya elaboradas se contaminaron cada una con 1 ml de la suspensión bacteriana de *V. cholerae*. Después de 10 min de contacto se colocaron en un comal de 85 cm de diámetro puesto sobre leña durante 1 min de cada lado. Luego se levantaron del comal, se les midió la temperatura alcanzada de la misma manera que en la elaboración de tortillas (inciso 7.3.2.3) y se realizó análisis microbiológico como en el inciso 7.3.4, para determinar si *V. cholerae* aún estaba viable.

Se utilizaron controles positivos (tortilla contaminada, sin recalentar) para verificar la viabilidad del agente contaminante.

7.3.4 ANALISIS MICROBIOLOGICO PARA DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE *V. cholerae* O1 (anexo 9):

Se pesaron 25 g de la muestra (tortilla o masa) dentro de un frasco Mason de 300 ml, al que se adicionaron 225 ml de APA más 0.5% de tauocolato de sodio (Ts) como diluyente y medio de enriquecimiento, respectivamente. A partir del homogenizado de esta dilución inicial (1:10) se realizaron diluciones 1:100 y 1:1000 con el mismo diluyente. Las diluciones se incubaron a 36°C; después de 6 horas, de la superficie de los tubos se hizo un pasaje a agar TCBS (enriquecimiento simple) y después de 18 horas de incubación de estos mismos tubos, se efectuó otro pasaje a tubos con 10 ml de APA + Ts (doble enriquecimiento). Los nuevos tubos de doble enriquecimiento, fueron incubados a 36°C, por 6 h adicionales; luego de este tiempo se tomaron tres asadas de la superficie de dichos tubos y se sembraron en agar TCBS. Después de 24 y 48 h de incubación del TCBS, se buscaron colonias características y se realizó tinción de Gram y las pruebas bioquímicas y serológicas correspondientes (45).

7.3.5 ANALISIS MICROBIOLOGICO PARA CUANTIFICACION DE *Vibrio cholerae* O1 (anexo 10):

Se pesaron 25 g de la muestra dentro de un frasco Mason de 300 ml, al que se le adicionaron 225 ml de APA como diluyente. A partir del homogenizado de esta dilución inicial (1:10), se realizó una dilución 1:100 con el mismo diluyente. De ambas diluciones se tomaron alícuotas de 1 ml y de 0.1 ml para sembrar en agar TCBS por duplicado (dilución final: 1:1000), y de la dilución 1:100 se tomaron además, alícuotas de 0.01 ml con asa calibrada, para sembrar también en agar TCBS por duplicado (dilución final: 1:10000). Luego de 24 y 48 horas de incubación se contaron las colonias de *V. cholerae* O1 que crecieron en el agar. Para obtener el número de Unidades formadoras de colonias (UFC), se escogió la dilución en la que el conteo estuvo entre 30 y 300 colonias y el número de éstas se multiplicó por el factor de dilución correspondiente.

7.3.6 DESINFECCION DE HORTALIZAS: LECHUGA, APIO, PEREJIL:

7.3.6.1 ESTUDIO PILOTO:

El objetivo del estudio piloto fue obtener datos de base para:

- Estandarizar el procedimiento de lavado con agua potable y el sumergido en soluciones desinfectantes de hipoclorito de sodio e hidrocloreuro de biguanida más cloruro de benzalconio.
- Determinar el número de repeticiones que se necesitaban por cada tratamiento de desinfección para asegurar la validez estadística del estudio. Para ello se realizaron dos etapas. La primera consistió en un estudio cualitativo para comprobar la eliminación total de *V. cholerae* O1 al aplicar los tratamientos de lavado con agua de chorro y desinfección indicados. Como no se obtuvo una eliminación total del agente mencionado, se pasó a la

segunda etapa, en la cual se determinó el número de UFC de *V. cholerae* O1 sobrevivientes a los tratamientos de desinfección. Con estos datos se realizó un análisis de varianza y comparaciones múltiples según Tuckey, aplicando diferentes números de muestra (n= 2, 5 y 10) para determinar la variación entre el número de UFC que determinarían la diferencia significativa entre los tratamientos, según el n empleado. El estudio piloto se realizó de la siguiente manera:

7.3.6.1.1 ESTUDIO CUALITATIVO:

Se realizó solamente en lechuga y consistió en someter porciones de lechuga contaminadas en el laboratorio a tratamientos de lavado con agua de chorro y sumergido en soluciones desinfectantes. La contaminación de la hortaliza se llevó a cabo pesando porciones de 25 g en un beaker de 500 ml, en donde se les agregó 1 mililitro de la suspensión de *V. cholerae* O1 con 10^7 - 10^8 UFC/ml. Cada día de trabajo se utilizó como control positivo una porción de lechuga contaminada con *V. cholerae* O1, sin aplicación de ningún tratamiento de desinfección, para verificar la contaminación experimental efectuada; y como control negativo, una porción de lechuga sin contaminar y sin la aplicación de ningún tratamiento de desinfección, para determinar si las lechugas utilizadas se encontraban contaminadas con *V. cholerae* O1 antes de contaminarlas experimentalmente en el laboratorio.

Los tratamientos aplicados fueron los siguientes:

7.3.6.1.1.1 Lavado con agua potable (de chorro) durante 30 segundos, con la ayuda de coladores plásticos, que permitieron que el agua de lavado corriera a través de la hortaliza, mientras las hojas fueron restregadas con las manos cubiertas con guantes. El agua de lavado cayó a una bandeja plástica grande que contenía una solución al 6% de hipoclorito de sodio para eliminar riesgos de contaminación.

7.3.6.1.1.2 Proceso de sumergido: Las hojas de la lechuga fueron sumergidas en 300 mililitros de soluciones desinfectantes:

- **Hipoclorito de sodio** en concentraciones: 5, 10, 25, 50, 100, 150 y 200 partes por millón (ppm) y tiempo de sumergido: 10, 20 y 30 minutos. Las soluciones de cloro fueron valoradas por el método Yodimétrico (64).
- **Hidrocloreto de biguanida más cloruro de benzalconio** en concentraciones: dilución 1:100 (164 ppm), dilución 1:60 (273 ppm) y dilución 1:50 (328 ppm); y tiempo de sumergido: 10, 20 y 30 minutos.

Luego de la aplicación de los tratamientos de lavado y desinfección se determinó la presencia de *V. cholerae*, como se indica en el inciso 7.3.4, con la única diferencia de que se utilizó APA simple, sin la adición de taurocolato de sodio.

7.3.6.1.2 ESTUDIO CUANTITATIVO:

Las porciones de lechuga (hojas), apio (tallos) y perejil (hojas) fueron sometidas a los tratamientos

de lavado y desinfección; se trabajó con controles de igual manera que en el inciso 7.3.6.1.1 Los tratamientos se realizaron por duplicado y son los siguientes:

7.3.6.1.2.1 Lavado con agua potable durante 30 segundos (de igual manera que en el inciso 7.3.6.1.1.1)

7.3.6.1.2.2 Combinación de tratamientos:

- **Tratamiento de lavado con agua potable, más sumergido en solución de hipoclorito de sodio: 100 ppm, 30 minutos.**
- **Tratamiento de lavado con agua potable, más sumergido en solución de hidrocloreuro de biguanida más cloruro de benzalconio: 273 ppm, 30 minutos.**

7.3.6.1.3 CUANTIFICACION DE *V. cholerae* O1:

Cada una de las porciones de 25 g de hortalizas que fueron contaminadas con *V. cholerae* O1 y luego sometidas a los tratamientos caseros descritos en el inciso 7.3.6.1.2, se colocaron en un frasco Mason de 300 mililitros, al que se le adicionaron 225 mililitros de APA (pH 9.2) como diluyente. A partir del homogenizado de esta dilución inicial (1:10) se sembró 0.1 y 1 ml en placas de agar TCBS, lo cual se realizó por duplicado. Las placas se incubaron a 36°C, durante 18 a 24 horas. Luego se efectuó el recuento de unidades formadoras de colonias de *V. cholerae* presentes en las cajas. Se escogió la dilución en la que hubo un crecimiento entre 30 y 300 colonias; el número de colonias se multiplicó por el factor de dilución. A las colonias crecidas se les realizó tinción de Gram y pruebas bioquímicas y serológicas correspondientes.

7.3.6.2 ESTUDIO CONFIRMATIVO DE DESINFECCIÓN DE HORTALIZAS

En base al estudio piloto se determinó que un número de muestra de 2 por cada tratamiento es adecuado para la validez estadística del estudio.

La contaminación de las hortalizas se realizó de igual forma

que en el inciso 7.3.6.1.1. Los tratamientos aplicados fueron los siguientes:

7.3.6.2.1 Lavado con agua potable (de chorro) durante 30 segundos (de igual manera que en el inciso 7.3.6.1.1.1).

7.3.6.2.2 Lavado con agua potable (de chorro) durante 30 segundos, más sumergido en soluciones desinfectantes de: -Hipoclorito de Sodio en determinadas concentraciones y tiempos. Se trabajó con la misma concentración del estudio piloto (100ppm) y con concentraciones menores (50 y 25 ppm), en diferentes tiempos: 5, 10, 15 y 30 min. -Hidrocloreuro de biguanida más cloruro de benzalconio en la misma concentración del estudio piloto (sugerida por el fabricante), en diferentes tiempos: 5, 10, 15 y 30 min.

Luego de los tratamientos aplicados se realizó una cuantificación de *V. cholerae* O1, de igual manera que en el inciso 7.3.6.1.3.

7.3.6.3 ANALISIS SENSORIAL:

Se evaluaron las características de color, sabor y textura de las hortalizas en estudio, luego de ser sumergidas en las soluciones desinfectantes de hipoclorito de sodio en las dos concentraciones más elevadas del estudio confirmativo (50 y 100 ppm) e hidrocloreuro de biguanida más cloruro de benzalconio en su única concentración (273 ppm) y en los dos tiempos mayores de sumergido (15 y 30 minutos) para ambos desinfectantes. Porciones de 25 g de lechuga, apio y perejil sin contaminar fueron sometidas a los tratamientos caseros de desinfección mencionados en este mismo inciso; se preparó también un control negativo que consistió en la hortaliza únicamente lavada con agua de chorro durante 30 segundos. Se tuvieron entonces 6 tratamientos para cada hortaliza y un control negativo (7 porciones en total). Cada una de estas porciones tratadas sirvió para un panel de análisis sensorial que se llevó a cabo en la cocina experimental de INCAP.

7.3.6.3.1 PANEL SENSORIAL

Participaron un total de 12 panelistas que evaluaron las características sensoriales (sabor, color y textura) de las hortalizas, siguiendo el formulario diseñado (anexo 11) (65). A cada panelista se le dio una bandeja con siete muestras de hortalizas numeradas utilizando una tabla de números aleatorios (65), un vaso de agua pura y el formulario correspondiente. Entre cada porción evaluada, los panelistas tomaron agua para eliminar el sabor de la muestra anterior. Cada hortaliza se trabajó en tres días diferentes. La lechuga y el apio fueron evaluados en su forma natural, mientras que el perejil fue evaluado sobre tostadas de guacamol, pues el perejil no se acostumbra comer solo.

7.4 DISEÑO EXPERIMENTAL:

7.4.1 SOBREVIVENCIA DE *V. cholerae* O1 EN MASA Y TORTILLAS DE MAIZ:

Para la elaboración de refresco de masa, elaboración de tortillas y recalentado de tortillas, se trabajó con las siguientes hipótesis:

$$H_0: p = 0.5 \text{ (donde } p=q)$$

$$H_a: p \geq 0.5 \text{ (donde } p \geq q)$$

Se utilizó una prueba de hipótesis binomial, tomando como resultado con éxito cuando no se obtuvo crecimiento de *V. cholerae* O1 y como fracaso, cuando sí se obtuvo crecimiento de esta bacteria (crecimiento positivo). Así, la variable respuesta fue crecimiento o no de *V. cholerae* O1.

El número de muestra (n) fue el siguiente para cada caso:

- refresco de masa: 9
- elaboración de tortillas: 50
- recalentado de tortillas: 15

Las probabilidades calculadas, según tabla de hipótesis binomial, fueron las siguientes:

- $n = 9: P < 0.002$
- $n = 15: P < 0.003$
- $n = 50: P < 0.001$

Se trabajó con un nivel de significancia estadística de 0.05; lo que aseguró para los tres casos, el rechazo de la hipótesis nula, con una confianza del 95%.

7.4.2 SOBREVIVENCIA DE *V. cholerae* O1 EN HORTALIZAS:

7.4.2.1 ESTUDIO PILOTO:

El número de muestra del estudio piloto fue de 2 repeticiones para cada tratamiento. A los datos obtenidos de este estudio se les aplicó el análisis estadístico de diseño aleatorio con arreglo factorial y en base a las comparaciones según Tuckey se estimó el número de muestra para el estudio confirmativo (66). Debido a que los valores de UFC de *V. cholerae* que determinarían la diferencia significativa para $n = 2, 5$ y 10 fueron similares, se decidió trabajar con un n de 2, lo cual fue de validez estadística para el estudio.

7.4.2.2 ESTUDIO CONFIRMATIVO:

Se utilizó un número de muestra de dos (determinado en el estudio piloto). La variable respuesta en este caso fue el número de unidades formadoras de colonia (UFC) de *V. cholerae* O1 que crecieron en las porciones de hortaliza, luego de efectuados los tratamientos de desinfección casera. A los datos obtenidos se les aplicó el análisis estadístico de diseño aleatorio con arreglo factorial para determinar si existe o no diferencia significativa entre tratamientos. Como se encontró diferencia significativa, se realizaron comparaciones de contrastes según Scheffé debido a la existencia de interacciones entre hortalizas, desinfectantes y tiempos de aplicación (66). El nivel de significancia que se utilizó fue de 0.05.

7.4.2.3 ANALISIS SENSORIAL:

El número de muestra para este análisis fue de 12 (número de panelistas participantes). La variable respuesta medida fue el valor asignado por los panelistas a cada porción de hortaliza, según el formulario que se les entregó (anexo 11), por ejemplo valor = 5: hortaliza con características sensoriales no afectadas; valor = 1: hortaliza con características sensoriales completamente afectadas por los desinfectantes. Los datos obtenidos se trabajaron de igual manera que los del estudio confirmativo. Como hubo diferencias estadísticamente significativas entre hortalizas, desinfectantes y tiempos de aplicación, pero no existió interacción de ninguna clase, se realizaron comparaciones múltiples según Tuckey, para determinar el tratamiento que menos daña las propiedades sensoriales de las hortalizas evaluadas.

8. RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

8.1 SOBREVIVENCIA DE *Vibrio cholerae* O1 EN MASA Y TORTILLAS DE MAIZ:

8.1.1 MASA DEJADA A TEMPERATURA AMBIENTE:

Las porciones de masa contaminadas con *V. cholerae* O1, biotipo El Tor, serotipo Inaba (cepa IN-0006) dejadas a temperatura ambiente (23-25 °C) tuvieron un pH inicial diferente. El pH de las adquiridas en el puesto de venta A fue de 6.8 y de 8.2 el de las del puesto de venta B. Durante los diferentes tiempos a temperatura ambiente (2, 6, 8, 12 y 24 horas) el pH fue disminuyendo, hasta un valor de 4.5 a las 24 horas para las porciones de masa de ambos puestos de venta. También el número de células de *V. cholerae* O1 fue disminuyendo, de 10^7 - 10^8 vibriones por cada 50g de masa (10^5 - 10^6 vibriones por gramo) (inóculo de contaminación) hasta llegar luego de 24 horas de la contaminación a un conteo menor de 10 UFC de *V. cholerae* O1, por gramo de masa (no se obtuvo crecimiento en la dilución menor 1:10) (tabla 1). El descenso del pH en la masa se debe a que ocurre una fermentación por la acción de las bacterias presentes sobre los carbohidratos de la masa (44). Al llegar a un valor de 4.5 a las 24 horas, *V. cholerae* ya no estuvo presente, pues se sabe que este agente es lábil a pH ácido; un pH menor a 5 es desfavorable para su crecimiento (1).

8.1.2 TORTILLAS DEJADAS A TEMPERATURA AMBIENTE:

En las tortillas se observó que *V. cholerae* seguía viable después de 6 días de dejar las tortillas contaminadas a temperatura ambiente. La mayor sobrevivencia de los vibriones en las tortillas que en la masa puede ser debida a que en las tortillas existe menor humedad y la utilización de los carbohidratos es más lenta, lo que a su vez disminuye la fermentación y el pH de la tortilla no desciende tan rápidamente, manteniéndose aún un ambiente favorable para la sobrevivencia de esta bacteria.

8.1.3 ELABORACION DE TORTILLAS:

En las 50 porciones de masa contaminadas utilizadas en la preparación de tortillas se observó que luego del proceso de cocción, la bacteria contaminante no estaba presente. En las porciones de masa utilizadas como control de la viabilidad del inóculo de contaminación, sí hubo crecimiento de *V. cholerae* O1. La temperatura promedio alcanzada por las tortillas al ser retiradas del comal fue de 75.9 ± 2.83 °C ($X \pm Sd$) y el tiempo promedio de cocción fue de 3 min, 22 seg \pm 51 seg (tabla 2).

8.1.4 RECALENTADO DE TORTILLAS:

Las tortillas que fueron contaminadas con *V. cholerae* O1 y luego recalentadas en un comal de barro durante 1 minuto de cada lado, alcanzaron una temperatura promedio de 66.5 ± 1.08 °C. Luego de realizar el análisis microbiológico para determinar la presencia de los vibriones contaminantes, no se obtuvo ningún crecimiento (tabla 2).

Tanto para el proceso de elaboración de tortillas, como para el de recalentado, se demostró que *V. cholerae* es una bacteria bastante lábil al calor. Según Shultz y colaboradores, los valores del punto térmico de muerte para *V. cholerae* O1, biotipo El Tor, serotipo Inaba en agua peptonada en minutos son de 1.70 a

49°C, 1.04 a 54°C, 0.63 a 60°C y 0.36 a 63°C. Estos valores varían si se trata de un alimento sólido, en donde tanto la temperatura como el tiempo deben ser mayores, pues la estructura del alimento brinda mayor protección a la bacteria (41); por ejemplo, en el estudio del mismo autor el tiempo térmico de muerte para los vibriones en carne de cangrejo homogenizada en minutos es de 2.65 a 60°C, 1.60 a 66°C y de 0.30 a 71°C. Estos últimos datos pueden compararse con el proceso de recalentado, en el que las tortillas alcanzan 66.5°C, por un minuto de cada lado. Ahora bien, en la cocción se alcanzó una temperatura mayor (75.9°C) y por más tiempo (3 minutos, 22 segundos); dicho tiempo fue necesario para la cocción, pero debe tomarse en cuenta que *V. cholerae* O1 pudo haber muerto antes de que las tortillas estuvieran cocidas.

8.1.5 ELABORACION DE REFRESCO DE MASA:

Al refresco de masa preparado por la disolución de porciones de masa de maíz de 50 g, contaminadas con 1 ml del inóculo de *V. cholerae* O1 (cepa IN-0006), en 300 ml de agua libre de cloro y llevado a ebullición durante 1 minuto, no se obtuvo crecimiento de la bacteria contaminante (tabla 2). En el refresco de masa utilizado como control positivo, sí se recuperó *V. cholerae*. La temperatura en el momento de la ebullición fue de 94°C, la cual fue suficiente para la eliminación de los vibriones y por ser tan elevada podría ser aun menor a 1 minuto. En relación al análisis microbiológico de los estudios en masa y tortillas de maíz se realizaron dos procedimientos de enriquecimiento (simple y doble) cuando solamente se quiso determinar la presencia o ausencia de *V. cholerae* O1. Se trabajó de esta manera porque en el enriquecimiento simple se pueden recuperar vibriones de muestras en donde éstos están presentes, pero en concentraciones bajas (menores a 10 células por gramo), pues al sembrar en TCBS 1 ml directamente de la dilución menor (1:10), no se obtiene ningún crecimiento. En el procedimiento de doble enriquecimiento se pueden recuperar vibriones, si se encuentran aun en concentraciones menores. O sea que luego de efectuar estos pasos de enriquecimiento, puede asegurarse que *V. cholerae* fue eliminado por completo de la masa y tortillas de maíz al ser aplicados los procesos descritos anteriormente. Se utilizó el APA más taurocolato de sodio al 0.5% (23), ya que sin su adición, se obtenía crecimiento de bacterias contaminantes del género *Enterococcus sp.*, sobre todo en el doble enriquecimiento, pues luego de 18 h de incubación y 6 horas adicionales, estas bacterias se reproducían fácilmente, lo cual ocurría también en las porciones de masa o tortillas utilizadas como control positivo, problema que fue resuelto al añadir al medio de enriquecimiento este inhibidor.

8.2 REDUCCION DE LA CONTAMINACION CON *V. cholerae* EN HORTALIZAS: LECHUGA, APIO Y PEREJIL:

8.2.1 ESTUDIO PILOTO:

En lechuga contaminada experimentalmente, se observó que esta bacteria sobrevivió al tratamiento de lavado con agua de chorro durante 30 segundos, así como también a los tratamientos de lavado más sumergido en las soluciones desinfectantes: hipoclorito de sodio (HS) aun en la concentración y tiempo máximos evaluados e hidrocloreuro de biguanida más cloruro de benzalconio (B) también en la concentración

y tiempo máximos evaluados. Al no ser eliminado totalmente *V. cholerae* con los tratamientos anteriores, se decidió cuantificar el número de vibriones que resistían a los tratamientos, tanto en lechuga como en apio y perejil. En base a la variación del número de células que permanecieron en las hortalizas ensayadas y luego de aplicar la fórmula de comparaciones según Tuckey con distintos números de muestra (2, 5 y 10), se determinó que un n de 2 (número de repeticiones de cada tratamiento) es suficiente para darle validez estadística al estudio confirmativo de desinfección de hortalizas, pues la diferencia entre conteos fue mínima.

8.2.2 ESTUDIO CONFIRMATIVO DE DESINFECCION DE HORTALIZAS:

8.2.2.1 LAVADO CON AGUA DE CHORRO:

El lavado de las tres hortalizas con agua de chorro, durante 30 segundos, redujo más del 90% de la contaminación experimental con 10^7 - 10^8 células de *V. cholerae* O1 (tabla 3). Esto indica que un buen lavado con agua de chorro, frotando con las manos las hojas y/o tallos de las hortalizas, durante al menos 30 segundos, tiene un efecto importante en la reducción de la contaminación, lo que concuerda con resultados presentados en el documento "Consulta técnica FAO/OPS/OMS en inocuidad y comercialización de los alimentos frente a la epidemia del cólera" (37), según los cuales la acción mecánica del agua es capaz de eliminar por lo menos el 90% de los contaminantes biológicos en hortalizas. La cantidad de vibriones sobrevivientes por cada 25 gramos de hortaliza fue en promedio de 1.8×10^6 , cantidad que es similar a la dosis infectiva del cólera (10^6 células de *V. cholerae* O1 biotipo El Tor); pero si el inóculo utilizado en este estudio hubiera sido de 10^6 vibriones, en lugar de 10^7 - 10^8 por cada 25 gramos de hortaliza, el número de vibriones sobrevivientes hubiera disminuido a una cantidad menor a la dosis infectiva, lo cual es de gran importancia para prevenir la transmisión de esta enfermedad.

8.2.2.2 LAVADO CON AGUA DE CHORRO MAS SUMERGIDO EN SOLUCIONES DESINFECTANTES:

De aquí en adelante se le llamará desinfectante a cada una de las cuatro soluciones preparadas: hipoclorito de sodio (HS) 25ppm, 50ppm, 100ppm e hidrocloreuro de biguanida más cloruro de benzalconio (B) 273ppm; y se le llamará tratamiento a cada uno de los siguientes: 1. Lavado con agua de chorro por 30 segundos 2. Tratamientos combinados de lavado más sumergido en 300 ml de cada una de las cuatro soluciones desinfectantes en los cuatro tiempos de contacto (5, 10, 15 y 30 minutos) (tabla 4). La preparación de las soluciones desinfectantes de hipoclorito de sodio se hizo adicionando a un litro de agua potable las siguientes cantidades de cloro líquido comercial (Magia Blanca): 25ppm: 8 gotas; 50 ppm: 16 gotas; 100ppm: 32 gotas o media cucharadita de café (3ml). Estas soluciones fueron valoradas por el método yodimétrico para corroborar su concentración (64). La preparación de la solución Biocycle se hizo de acuerdo a las indicaciones de la etiqueta, que corresponden a 17 ml de Biocycle o 1 tapaderita del recipiente comercial por litro de agua, lo que equivale a 273ppm de hidrocloreuro de biguanida más cloruro de benzalconio. Cada uno de estos tratamientos (17 en total) se aplicó a hojas de lechuga, tallos de apio y hojas de perejil.

En la tabla 4 se presentan los conteos bacterianos obtenidos. Según el análisis de varianza realizado con estos datos (tabla 5), existe diferencia significativa entre hortalizas evaluadas, desinfectantes y tiempos de aplicación (5, 10, 15 y 30 min), con $p > 0.0001$. Existe también interacción en los tres casos.

En general, puede observarse que los tratamientos combinados dan mejores resultados que únicamente el lavado con agua de chorro; y que al ir aumentando la concentración del desinfectante empleado y el tiempo de sumergido, aumenta la reducción de la contaminación experimental con *V. cholerae* O1. El lavado más el sumergido en las soluciones desinfectantes produce mayor efecto en la reducción de la contaminación, debido a que además de utilizar un procedimiento mecánico, se aplica un segundo procedimiento: desinfección química. Ahora bien, si se toma en cuenta únicamente el porcentaje de reducción dado por el desinfectante, independientemente del lavado, tomando como el 100% el promedio de unidades formadoras de colonias (UFC) presentes después del lavado de las tres hortalizas, el que fue de 7450 UFC, entonces se observa que éste varía de 4.3 a 90.5%, dependiendo de la concentración del desinfectante y tiempo de sumergido (tabla 3). Este porcentaje de reducción por efecto del desinfectante es menor que el obtenido únicamente lavando, lo que indica que un buen lavado es más importante que el sumergido en soluciones desinfectantes, debido a su efecto de remoción mecánica. En el caso de la desinfección por sumergido, la resistencia de los microorganismos se debe a que éstos se protegen por estar alojados en pliegues hidrofóbicos de las hojas (37).

La reducción en los diferentes tratamientos combinados estuvo entre 98.22% y 99.82%, dependiendo del tratamiento aplicado. Puede observarse que no en todos los casos fue mayor al 99% como se esperaba. Ahora bien, los tratamientos que dieron un porcentaje de reducción mayor al 99%, en orden de mayor a menor efecto desinfectante, son los siguientes: biocyde (B)/30 minutos (min) = hipoclorito de sodio (HS) 100ppm/30 min, seguidos del HS 50ppm/30 min > HS 100ppm/15 min = B/15 min > HS 50ppm/15 min. De éstos, se recomiendan únicamente los siguientes tratamientos: B 10 min y HS 50ppm/15 min (ver resultados del análisis sensorial 8.2.2.3) tomando en cuenta que dan un porcentaje de reducción mayor al 99%, siendo los que menos alteran las características sensoriales de las tres hortalizas.

Existe interacción entre hortalizas, desinfectantes y tiempos de aplicación (tabla 5). Estas interacciones se deben a que en el sumergido en HS, 50 ppm, durante 10 y 30 minutos, la reducción bacteriana no se comportó como se esperaba, pues hubo mayor reducción de *V. cholerae* O1 en el apio que en la lechuga, mientras que en el resto de tratamientos existe mayor reducción de la contaminación en la lechuga que en el apio (gráfica 1). Por la existencia de estas interacciones, se realizaron comparaciones de contrastes según Scheffé.

Al evaluar solamente la acción de cada desinfectante, se obtuvieron los promedios de UFC, independientemente del tiempo de sumergido. En todos los casos se obtuvo diferencia significativa (valor crítico: 863 UFC, $\alpha = 0.05$), excepto en la comparación del HS 100ppm contra el B 273ppm, en donde el efecto desinfectante es muy similar (gráfica 2). Se determinó también el efecto individual del tiempo de sumergido, independientemente del desinfectante y su concentración empleada. El valor crítico según Scheffé

es el mismo, pues se comparó el mismo número de contrastes, con el mismo nivel de significancia. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en todos los casos, excepto en la comparación entre el lavado con agua de chorro únicamente contra el lavado más sumergido en soluciones desinfectantes durante 5 minutos (gráfica 3). Puede decirse entonces, que el sumergir las hortalizas que han sido contaminadas y luego lavadas con agua de chorro por 30 segundos, en soluciones desinfectantes únicamente por 5 minutos, no es de utilidad, pues la reducción de la contaminación empieza a observarse a partir de los 10 minutos de contacto con las soluciones desinfectantes.

En la comparación entre las tres hortalizas, se encontró también diferencias significativas, existiendo mayor reducción de la contaminación con *V. cholerae* O1 en la lechuga, seguida del apio y por último el perejil, en donde se obtuvieron conteos de UFC mayores. La diferencia en UFC se observó desde el lavado con agua de chorro por 30 segundos (tabla 6). Esto pudo deberse a que las hojas de la lechuga son más lisas que los tallos del apio, y de mayor tamaño y menos ramificadas que las hojas del perejil; por ello el lavado se dificulta sobre todo en el perejil.

8.2.2.3 ANALISIS SENSORIAL:

En la tabla 7 se muestra el análisis de varianza del estudio sensorial (sabor, color y textura) de las hortalizas. Existe diferencia significativa entre hortalizas y entre desinfectantes, no así entre tiempos de sumergido ($\alpha=0.05$). No existe interacción de ningún tipo. Las combinaciones de desinfectantes y tiempos que se evaluaron para cada hortaliza fueron: hipoclorito de sodio (HS) 50ppm y 100ppm e hidrocloreuro de biguanida más cloruro de benzalconio (B) en su única concentración (273ppm); durante 15 y 30 min, pues se pensó que las concentraciones mayores y tiempos más largos son los que más afectarían las características sensoriales de las hortalizas. Al no existir interacciones de ninguna clase en este análisis, se realizaron comparaciones múltiples según Tuckey entre los 7 tratamientos aplicados, incluyendo el control (cuatro tratamientos con HS, dos con B y un control que consistió únicamente en lavar las hortalizas con agua de chorro, sin sumergirlas en soluciones desinfectantes).

El orden de mayor a menor aceptabilidad (qué tanto los panelistas aprobaron las características sensoriales de las hortalizas según los tratamientos), fue el siguiente: control = B/ 15 min > B/30 min > HS 50ppm/15 min > HS 50ppm/30 min > HS 100ppm/ 15 min > HS 100ppm/30 min. Es decir que el control fue igualmente aceptado que el B/15 min y éstos fueron más aceptados que B/30 min, etc. En la mayoría de los casos se hallaron diferencias estadísticamente significativas, excepto en las comparaciones entre el control y el HS 50ppm/15 minutos; y entre el control y B/15 y 30 min. Puede observarse entonces que los tratamientos de B por 15 y 30 min, y el HS, 50ppm/15 minutos, no afectan las características sensoriales de las hortalizas evaluadas.

Se halló diferencia significativa en la aceptabilidad de las tres hortalizas (valor crítico 0.065, $\alpha=0.05$). El perejil fue más aceptado, seguido del apio y luego en la lechuga. Pero debe tomarse en cuenta que el perejil no fue evaluado solo, sino sobre tostadas con guacamol.

De acuerdo a algunas especificaciones sobre el cloro líquido en la desinfección de hortalizas, pueden mencionarse las dadas en el caso del etiquetado de Cloro Magia Blanca (hipoclorito de sodio), en donde recomiendan utilizar una cucharadita de cloro (una cucharadita farmacéutica equivale a 5 ml) por galón de agua (3.78 L), lo que corresponde a una concentración de 83ppm, durante 5 minutos; ahora bien, si se toma esta cucharadita como una cucharadita de café (3 ml), la concentración es de 50ppm; según el folleto "Juntos contra el cólera", publicado en julio de 1992 por la OPS (67), para lavar hortalizas, se recomienda también utilizar 1 cucharadita de cloro líquido por galón de agua, durante 10 minutos. Los resultados de este estudio indican que el sumergido en soluciones desinfectantes por un tiempo de 5 minutos (para el primer caso), no tiene diferencia significativa con únicamente el lavado con agua de chorro, es decir que no es de gran utilidad, y que soluciones de HS de concentración más elevada a 50ppm (83ppm o 50ppm, dependiendo del volumen de la cucharadita en ambos casos), alteran las características sensoriales de las hortalizas. En el documento "Consulta técnica FAO/OPS/OMS en inocuidad y comercialización de alimentos frente a la epidemia del cólera en las Américas" publicado en 1992 (37) recomiendan el uso de 100ppm, sin mencionar el tiempo de sumergido, para la desinfección de hortalizas, esta concentración se asume que altera aún más las características sensoriales de las hortalizas. Al observar los resultados del presente estudio se recomienda, como se menciona anteriormente, utilizar soluciones de 50 ppm, al menos durante 15 min para obtener porcentajes de reducción mayores al 99% al haber lavado con agua de chorro anteriormente las hortalizas.

En el caso del Bioclyde (hidrocloruro de biguanida más cloruro de benzalconio) las especificaciones de los fabricantes recomiendan que éste debe emplearse añadiendo el volumen de una tapaderita del recipiente comercial por cada litro de agua (273ppm) por 5 minutos. En este estudio se comprobó que es mejor utilizar este desinfectante en la concentración recomendada, pero por un tiempo más prolongado (de 10 a 15 min), sin tener problemas con la alteración de las características sensoriales de las hortalizas y obtener porcentajes de reducción mayores al 99%, al haber lavado las hortalizas anteriormente con agua de chorro. Debe hacerse énfasis en que antes de sumergir las hortalizas en soluciones desinfectantes, éstas deben lavarse con agua de chorro (potable), lo cual reduce grandemente (98.14%) la contaminación con *V. cholerae* O1, dando un porcentaje de reducción mayor al dado únicamente por el desinfectante (4.3 a 90%), como se mencionó anteriormente (tabla 3). Ahora bien, como no toda la población guatemalteca tiene acceso a agua potable, también es aconsejable el sumergido en las soluciones desinfectantes evaluadas en este estudio.

9. CONCLUSIONES

- 9.1 El pH de la masa de maíz para la elaboración de tortillas y refresco de masa va de neutro a alcalino, lo que depende probablemente de la cantidad de carbonato de calcio (cal) con que se elabora el nixtamal.
- 9.2 La concentración de *V. cholerae* O1 en masa de maíz dejada a temperatura ambiente, disminuyó con el tiempo, llegando a un conteo menor a 10 UFC (crecimiento negativo en la dilución menor sembrada: 1:10) luego de 24 horas. Esto se debe a que el pH de la masa también disminuyó, hasta llegar a un valor de 4.5 a las 24 horas de la contaminación, lo que fue desfavorable para el crecimiento de la bacteria contaminante.
- 9.3 *V. cholerae* O1 sobrevivió en tortillas de maíz durante los siete días que realizó el análisis microbiológico para determinar su presencia.
- 9.4 El proceso de elaboración de tortillas en un comal de barro, eliminan la contaminación con 10^7 - 10^8 vibriones por cada tortilla. Las tortillas alcanzan una temperatura promedio de 75.9°C durante un tiempo promedio de 3 min, 22 seg.
- 9.5 El recalentado de tortillas contaminadas con *V. cholerae* O1 en un comal de barro por un minuto de cada lado, elimina esta contaminación. Las tortillas al ser retiradas del comal alcanzan una temperatura promedio de $66.5 \pm 1.08^\circ\text{C}$.
- 9.6 La ebullición del refresco de masa durante un minuto elimina la contaminación con un inóculo de 10^7 - 10^8 UFC de *V. cholerae* O1 en 300 ml de refresco.
- 9.7 Un buen lavado con agua de chorro al menos por 30 segundos, frotando con las manos las porciones de hortalizas (lechuga, apio y perejil) reduce más del 90% de la contaminación experimental con *Vibrio cholerae* O1 (% de reducción del 97.4 a 98.6%), mientras que el porcentaje de reducción debido solo al sumergido en soluciones desinfectantes es menor al 90%, lo que indica que un buen lavado con agua de chorro es aún más importante que el sumergido en dichas soluciones.
- 9.8 El efecto de lavado con agua de chorro en la reducción de la contaminación con vibriones del cólera es mayor en lechuga, luego en el apio y por último en el perejil.

- 9.9 El porcentaje de reducción en el lavado con agua de chorro únicamente, es menor que el de los tratamientos donde se aplica lavado más sumergido en soluciones desinfectantes comerciales de hipoclorito de sodio (HS) (25, 50 y 100ppm) e hidrocloreuro de biguanida más cloruro de benzalconio (B) (273ppm) durante 10, 15 y 30 minutos de sumergido.
- 9.10 El sumergir hortalizas contaminadas que han sido lavadas con agua de chorro, en soluciones desinfectantes de HS o B durante 5 minutos produce un porcentaje de reducción mínimo. El efecto desinfectante de dichas soluciones se observa a partir de los 10 minutos de sumergido.
- 9.11 El porcentaje de reducción de la contaminación con *V. cholerae* en hortalizas es mayor al ir aumentando la concentración y el tiempo de aplicación de las soluciones desinfectantes.
- 9.12 Los tratamientos combinados de lavado con agua de chorro más sumergido en soluciones desinfectantes que dan un porcentaje de reducción de la contaminación con *V. cholerae* en hortalizas mayor al 99% y no dañan las características sensoriales (sabor, color y textura) son los siguientes: hidrocloreuro de biguanida más cloruro de benzalconio, 273ppm durante 10 minutos (el tapaderita del recipiente comercial por litro de agua) e hipoclorito de sodio, 50ppm durante 15 minutos (16 gotas de cloro líquido por litro de agua), por lo que son los recomendados en este estudio para la desinfección de hortalizas a nivel del hogar.

10. RECOMENDACIONES

- 10.1 El consumo de tortillas debe ser inmediatamente después de su cocción o recalentado por un minuto de cada lado para asegurarse de que no están contaminadas con el agente causal del cólera.
- 10.2 Se recomienda evaluar si el proceso de recalentado de tortillas por tiempos menores a un minuto de cada lado y en comales de otro material (como comales de lata), eliminan la contaminación con un inóculo de 10^7 - 10^8 vibriones por tortilla.
- 10.3 El refresco de masa no debe consumirse crudo; debe ser llevado a ebullición por un minuto antes de su consumo para eliminar la contaminación bacteriana existente.
- 10.4 Para reducir la contaminación con el agente causal del cólera en más del 99% en hortalizas que podrían estar contaminadas, se recomienda un buen lavado con agua de chorro, frotando con las manos las porciones de hortalizas, seguido del sumergido en soluciones desinfectantes. En este estudio se recomiendan soluciones de hidrocloruro de biguanida más cloruro de benzalconio, 275 ppm, por 10 minutos o hipoclorito de sodio, 50ppm por 15 minutos.
- 10.5 Se recomienda continuar estudios de desinfección de hortalizas contaminadas con *V. cholerae* O1, evaluando otras hortalizas y otras soluciones desinfectantes que estén accesibles a la población guatemalteca.

11. REFERENCIAS

1. Mata L. El cólera; historia, prevención y control. Costa Rica: Edit. de la Universidad de Costa Rica, 1992. XV + 366p.
2. Popovic T, et al. Cholera in the Americas: foodborne aspects. Atlanta, USA. Center of Disease Control. 1992. 50p.
3. Organización Mundial de la Salud. Principios y prácticas de la lucha contra el cólera. Ginebra. Cuadernos de salud pública, no. 40. 1970. 149 p.
4. Organización Panamericana de la Salud. Etiología y diagnóstico de laboratorio del cólera. Guatemala. Doc. Tec. No. 1, 1991. 41 p.
5. World Health Organization. Cholera; information Kit. Geneva. Programme for the Control of Diarrhoeal Disease (CDD). 1991. 19 p.
6. Banwart GJ. Basic food microbiology. Connecticut: AVI Publ. company, 1981. VII + 781p.
7. Balows A, et al. Manual of Clinical Microbiology. 5ta ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1991. XVIII + 1364 p.
8. Bryant, et al. Numerical classification of species of Vibrio and related genera. J Appl Bact. 1986;61:437-467.
9. Wilson GS, Miles A. Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. 6ta ed. Gran Bretaña: Elward Arnold, 1975. Vols 2, vol 1, XI+1247 p.
10. Elliot El, Kaysner CA, Templin ML. Bacteriological Analytical Manual. 7a. ed. USA: Food and Drug Administration, AOAC, 1992. 111-140.
11. O'Leary E. Practical Book of Microbiology. USA: CRC Press, 1990. 681p.
12. Finkelstein RA. Cholera. Crit Rev in Microb. 1973;2:553-662.
13. Herrera E, Santos J. Existe el riesgo del cólera en México? Bol Med Hosp Inf Mex. 1991;48:227-229.

14. Buchanan RE. Bergey's Manual of determinative bacteriology. 8a.ed. Baltimore: The Williams & Willins Company, 1974.1268p.
15. Back E, Ljunggren A, Smith H. Non-cholera vibrios in Sweden. Lancet 1974;7860:723-724.
16. De Paola A. *V. cholerae* in marine foods and enviromental waters. A literature review. J Food Sciencies. 1981;46: 66-68.
17. Kaper J, et al. Ecology, Serology and enterotoxin production of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay. Appl Env Microb. 1979;37:91-103.
18. Swerdlow DL, et al. Waterborne transmission of epidemic cholera in Trujillo Peru; lessons for a continent at risk. Lancet. 1992;340:28-33.
19. Riemann H. Food Borne Infections and intoxications. EEUU: Academic Press, 1969. 698p.
20. Konishi H, et al. Spiral conformation of *Vibrio cholerae* as determined by Scanning Electron Microscopy of elongated cells induced by cephalalexin treatment. J Bact. 1986; 168:1476-78.
21. Blake PA. Diseases of Human (other than cholera) caused by Vibrios. Ann Rev Microbiol. 1980;34:341-67.
22. De Paola A, Kaysner CA, Mc Phearson RM. Elevated temperature method for recovery of *Vibrio cholerae* from Oyster *Crassostrea gigas*). Appl Env Microbiol. 1987;53:1181-82.
23. Spira WM, Ahmed WS. Gauze filtration and Enrichment procedures for recovery of *Vibrio cholerae* from contaminated waters. Appl Env Microbiol. 1981;42:730-733.
24. Cash RA, et al. Response of men to infection with *Vibrio cholerae*, I. Clinical, serologic and bacteriologic responses to a known inoculum. J Infect Dis. 1974;34:341-67.
25. Clemens JD, et al. ABO Bloods groups and cholera: New observations on specificity of risk and modification of vaccine efficacy. J Infect Dis. 1989;159:770-773.
26. Richardson K. Roles of Motility and flagellar structure in pathogenicity of *Vibrio cholerae*; analysis of motility mutans in three animal models. Infect. 1991;59:2727-36.
27. Stewart-tull DE, Ollar RA, Scobie TS. Studies on the *Vibrio cholerae* mucinase complex I; enzymics activities associated with the complex. J Med Microbiol. 1986;22:325-33.

28. Van Heyningen S. The subunits of cholera toxin: structure, stoichiometry and function. *J Infect Dis*. 1976;133:5-13
29. Peterson J, Ochoa L. Role of prostaglandins and cAMP in the secretory effects of cholera toxin. *Science*. 1989;245:857-859.
30. Dizon J, et al. Studies on cholera carriers. *Bull WHO*. 1967;37:737-743.
31. Enyinnaya N. *Medical Microbiology in Tropics*. London: Oxford University Press, 1975. V + 386p.
32. Organización Panamericana de la Salud. *Boletín Epidemiológico*. Vol 12, no 1, 1991. 24p.
33. Organización Panamericana de la Salud. *Boletín Epidemiológico*. Vol 12, no 2, 1991. 16p.
34. Organización Panamericana de la Salud, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. *Riesgos de transmisión del cólera por los alimentos*. Washington: Organización Mundial de la Salud, Doc. Téc, No. 1, 1991. 66p.
35. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. *La venta de los alimentos en las calles*. Roma: FAO, Doc. Téc. no 46, 1989. 96p.
36. Swerdlow D, et al. Waterborn transmission of epidemic cholera in Trujillo, Perú: lessons for a continent at risk. *Lancet*. 1992;340:28-33.
37. Organización Panamericana de la Salud. Oficina Sanitaria Panamericana. *Consulta técnica FAO/OPS/OMS en inocuidad y comercialización de alimentos frente a la epidemia del cólera en las Américas*. Argentina: Organización Mundial de la Salud, Doc. Téc. No. 1, 1992. 36p.
38. Merson MH. Cholera on Guam; 1974. *Epidemiologic Findings and Isolation of non-toxigenic strains*. *Am J Epid*. 1977; 105:349-361.
39. Madden JM, Mc Caudell BA, Read RB. *Vibrio cholerae* in shellfish from US coastal waters. *Food Technology*. 1982;93: 93-93.
40. De Paola, et al. Non O1 *Vibrio cholerae* in shellfish sediment and waters of the US Gulf Coast. *J food prot*. 1983;46:802-866.

41. Shultz, et al. Determination so the thermal death time of *Vibrio cholerae* in blue crabs (*Callinectes sapidus*). J food prot. 1984;47:4-6.
42. Felsenfeld O. Notes on food bevarages with *Vibrio cholerae*. Bull WHO. 1965; 33:725-734.
43. Islam MS. Effect of various biophysicochemical conditions on toxigenicity of *Vibrio cholerae* O1 during survival with green alga, *Rhizodonium fontanum*, in an artificial aquatic environmente. Can J Microbiol. 36:464-68.
44. Caparelli E, Mata L. Microflora of maize prepared as tortillas. Appl Microbiol. 1975; 29:802-806.
45. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud, Centers for Disease Control, Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá. Curso de Métodos de Laboratorio en el Diagnóstico de *Vibrio cholerae*. Guatemala. 1992. 79p.
46. Morris G, et al. Comparison of four plating media for isolating *Vibrio cholerae*. J Clin Microbiol. 1979; 9:79- 83.
47. Power DA, McCuen PJ. Manual of BBL products and laboratory procedures. Cta. No. 5200. 6th edition. USA: Becton Dickinson Microbiology Systems. 1988. 389p.
48. Brock TD, Smith DW, Madigan Mt. Microbiología. 4ta ed. Recina JC, trad: Hispanoamericana, S.A. 1987. XIV+906 p.
49. Block SS. Desinfection, Sterilization and Preservation. 2 ed. USA: Lea & Febiger. 1977. pp 167-195, 325-347, 933-94.
50. Rice EW, et al. Cholera in Peru. Lancet. 1991;338:455.
51. Park DL, Rua SM, Acker RF. Direct Application of a new Hypochlorite Sanitizer for reducing bacterial contamination on foods. J Food Prot. 1991;54:960-965.
52. Litter M. Farmacología experimental y clínica. 7 ed. Argentina: Edit el Atenco, 1988. XV+1872p.
53. Reynolds EF. The Extra Pharmacopoeia. 28 edic. London: The Pharmaceutical Press. 1982. XXIX+2025p.
54. Smith DT, et al. Bacteriología de Zinsser. 9a. ed. Capella A, trad. México: Edit. Hispanoamérica. 1951. XXII + 973p.

55. Davies A, Field BS. Action of Biguanides, phenols and detergents on *E. coli* and its spheroplasts. *J Appl Bact.* 1969;32:233.
56. Broxton P, et al. Interaction of some polyhexamethylene biguanides and membrane phospholipids in *E. coli*. *J Appl Bact.* 1984;57:115-124.
57. Broxton P, Woodeock PM, Gilbert P. A study of the antibacterial activity of some polyhexamethylene biguanides toward *E. coli* ATCC 8739. *J Appl Bact.* 1983;54:345-53.
58. Imperial Chemical Industries PLC (ICI). Speciality Chemicals: Poli (hexamethylene biguanide): a review of the mechanism of antimicrobial action. England: White & Farrell Ltd, 1991. 6p.
59. Baker A. Action of synthetic detergents on the metabolism of bacteria. *J Exp Med.* 1941; 73:249-71.
60. Sharff W. Correlation of the metabolic effects of benzalconium chloride with its membrana effects in yeast. *Biochem Pharmacol.* 1960;5:79.
61. Bressani R. Chemistry, technology, and nutritive value of maize tortillas. *Food Rev Intern.* 1990;6:225-264.
62. Grimaldi A. *Agronomía*. Barcelona: Bibl. técnica Acdos, 1969. 786p.
63. Seeley HW, Van Denark PJ. *Microbes in Action; a laboratory manual of microbiology*. 3 ed. USA: WH Freeman and Company, 1981. 57p.
64. Greenberg A, et al. *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. 15 ed. Washington DC: ANN Public Health Association, Edit Board, 1980. 280-282p.
65. Watta BM, et al. *Métodos sensoriales básicos para la evaluación de alimentos*. Ofic de Trad, secret de estado, trad. Canadá: edit Centro de inv. para el desarrollo, 1992. X+170p.
66. Neter J, Warreiman E. *Applied Linear Statistical Models*. USA: Richard D Irwin, 1974. 842p.
67. Organización Panamericana de la Salud, Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. *Juntos contra el cólera*. Guatemala: Impresos y diseños Mace, Doc. Tec. No. 1, 1992. 20p.

12. ANEXOS

ANEXO 1

CLASIFICACION TAXONOMICA DE *Vibrio cholerae* O1

Familia	VIBRIONACEAE		
Género	VIBRIO		
Especie	<i>Vibrio cholerae</i>		
Serogrupo	O1		
Biotipo	Clásico	El Tor	
Serotipo	Inaba	Ogawa	Hikojima

Ref. 7

ANEXO 2

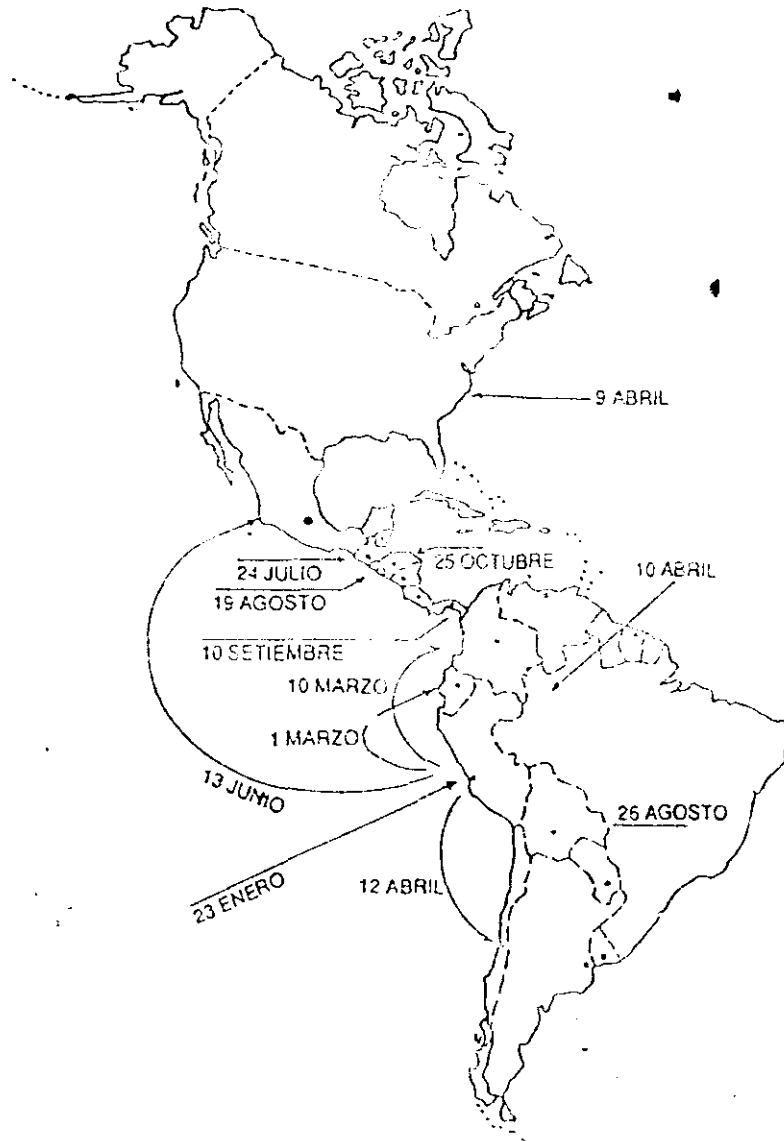
FACTORES QUE FAVORECEN EL CRECIMIENTO DE *V. cholerae* O1

-
- PH DE NEUTRO A ALCALINO (es susceptible a pH ácido, abajo de 5.0 se muere)
 - TEMPERATURA ENTRE 30 Y 40°C
 - ALTO GRADO DE HUMEDAD
 - AUSENCIA DE MICROBIOTA COMPETIDORA
 - AUSENCIA DE MATERIA ORGANICA
-

Ref.3, 35, 37

ANEXO 3

MAPA DE LAS AMERICAS QUE MUESTRA EL AVANCE DE LA EPIDEMIA DE COLERA A PARTIR DE ENERO DE 1991.



Ref. 1

ANEXO 4

RUTAS DE TRANSMISION DEL COLERA



Ref. 2

ANEXO 5

VIABILIDAD DE *V. cholerae* O1 EN LOS
ALIMENTOS Y EL AGUA

ARTICULOS	TIEMPO DE SUPERVIVENCIA (DIAS)	
	T° ambiente (30-32°C)	T° refrigeración (5-10°C)
HORTALIZAS FRESCAS:		
lechuga, apio, perejil y otros	1-7	7-10
PESCADO Y MARISCOS:		
Gambas saladas, mariscos ostras, filetes, pescado ahumado, pescado seco	2-5	7-14
VARIOS:		
Agua de cisterna o pozo	7-13	18
Agua del mar	10-13	60

Ref. 3

ANEXO 6

PROCEDIMIENTO DE ELABORACION DE TORTILLAS EN GUATEMALA

Maíz blanco o amarillo, verterlo en
olla con solución de cal (0.17-0.58%)

- o ▶ Poner al calor (94°C) 46-67 min

- ▶ Decantar el líquido y lavar 2 o 3 veces
el maíz mojado (Nixtamal) removiendo la
 cubierta del grano.

- ▶ Moler en piedra o molino

- ▶ Amasar en piedra y tomar masa para
 palmear y formar la tortilla

- o Cocer de ambos lados en una plancha de
 hierro o plato de arcilla (comal) con
 fuego directo (leña o gas)

- ▶ Retirar la tortilla del comal (manos)

o= Reducción o eliminación de contaminación por calor

▶= Puntos críticos de contaminación

Ref. 61

ANEXO 7

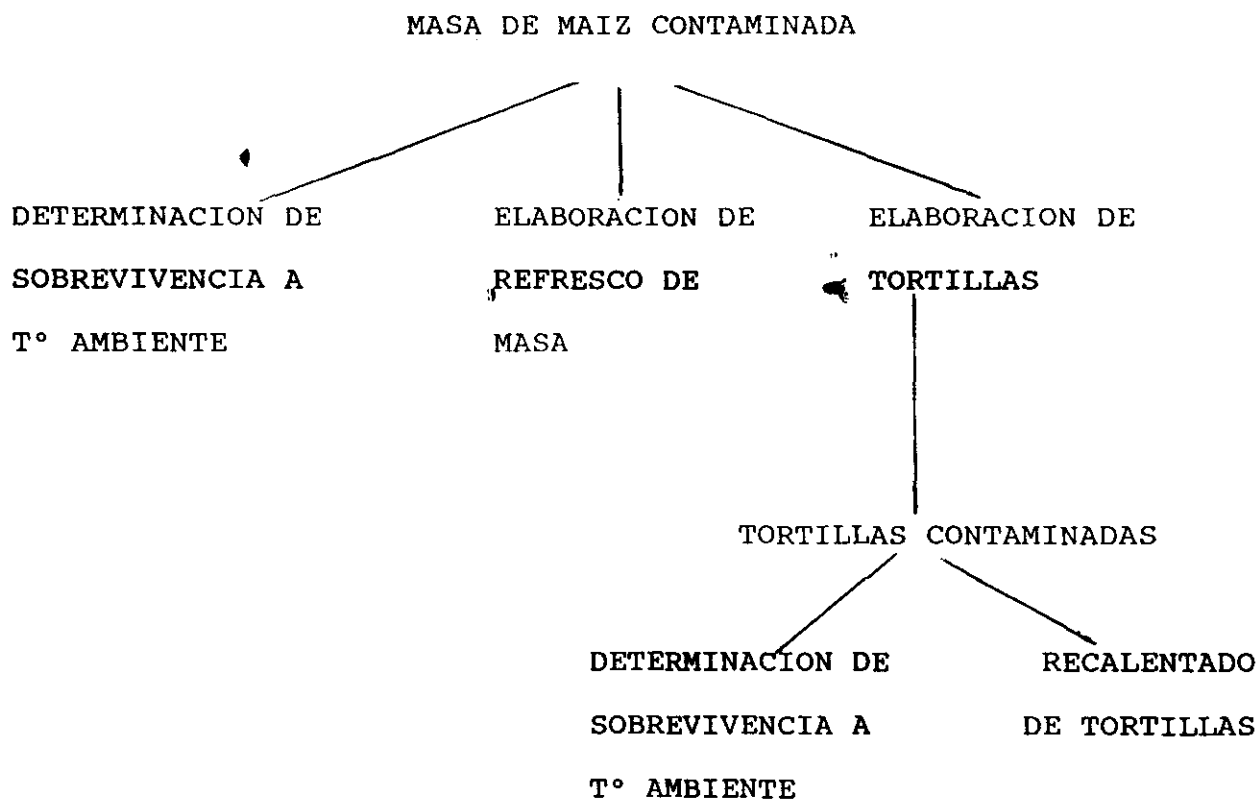
"REGLAS DE ORO" DE LA OMS PARA LA
PREPARACION HIGIENICA DE LOS ALIMENTOS

1. Elegir alimentos tratados con fines higiénicos
 2. Cocinar bien los alimentos
 3. CONSUMIR INMEDIATAMENTE los alimentos cocinados
 4. Guardar cuidadosamente los alimentos cocinados
 5. RECALENTAR bien los alimentos cocinados
 6. Evitar el contacto entre los alimentos crudos y los cocinados
 7. Lavarse las manos a menudo
 8. Mantener escrupulosamente limpias todas las superficies de la cocina
 9. Mantener los alimentos fuera del alcance de insectos, roedores y otros animales
 10. Utilizar agua pura
-

Ref. 34

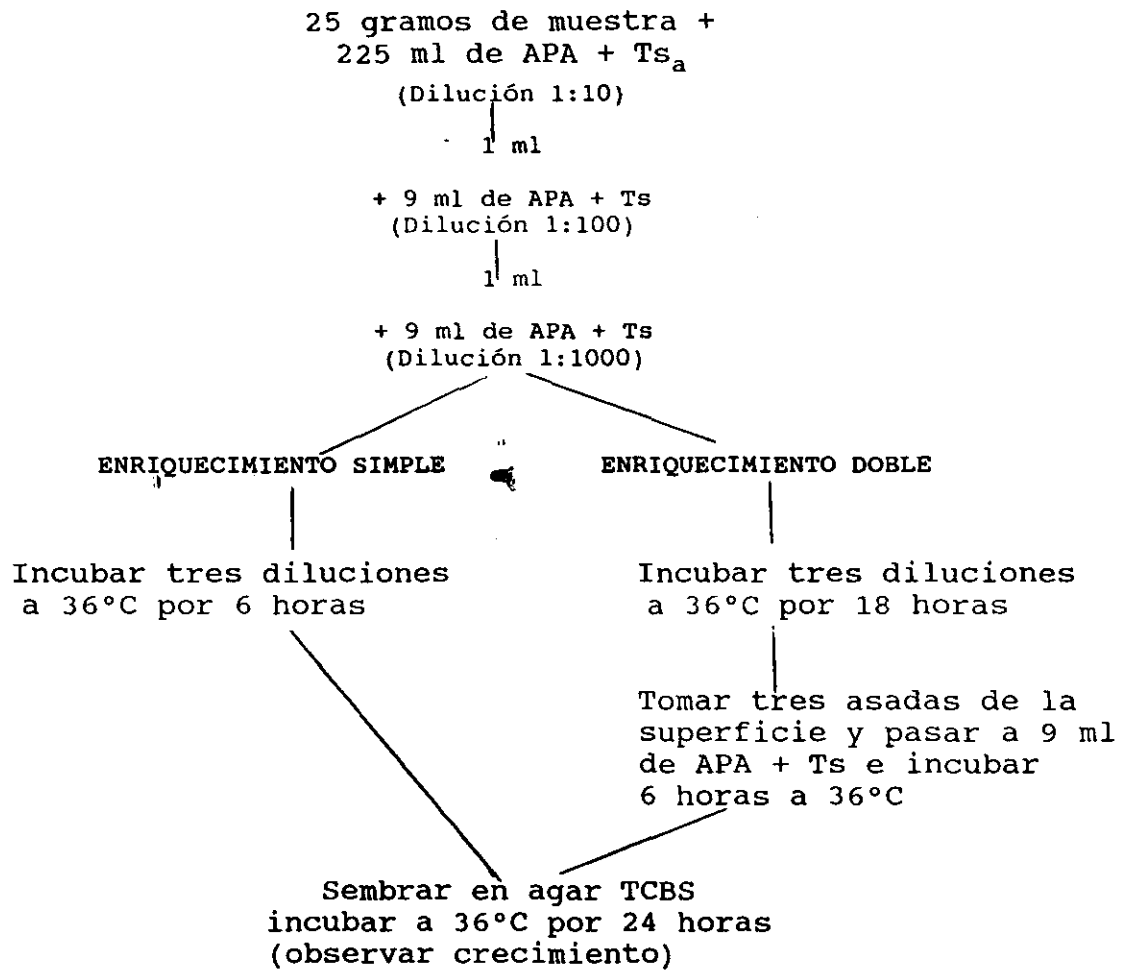
ANEXO 8

DETERMINACION DE LA SOBREVIVENCIA EN MASA
Y TORTILLAS DE MAIZ



ANEXO 9

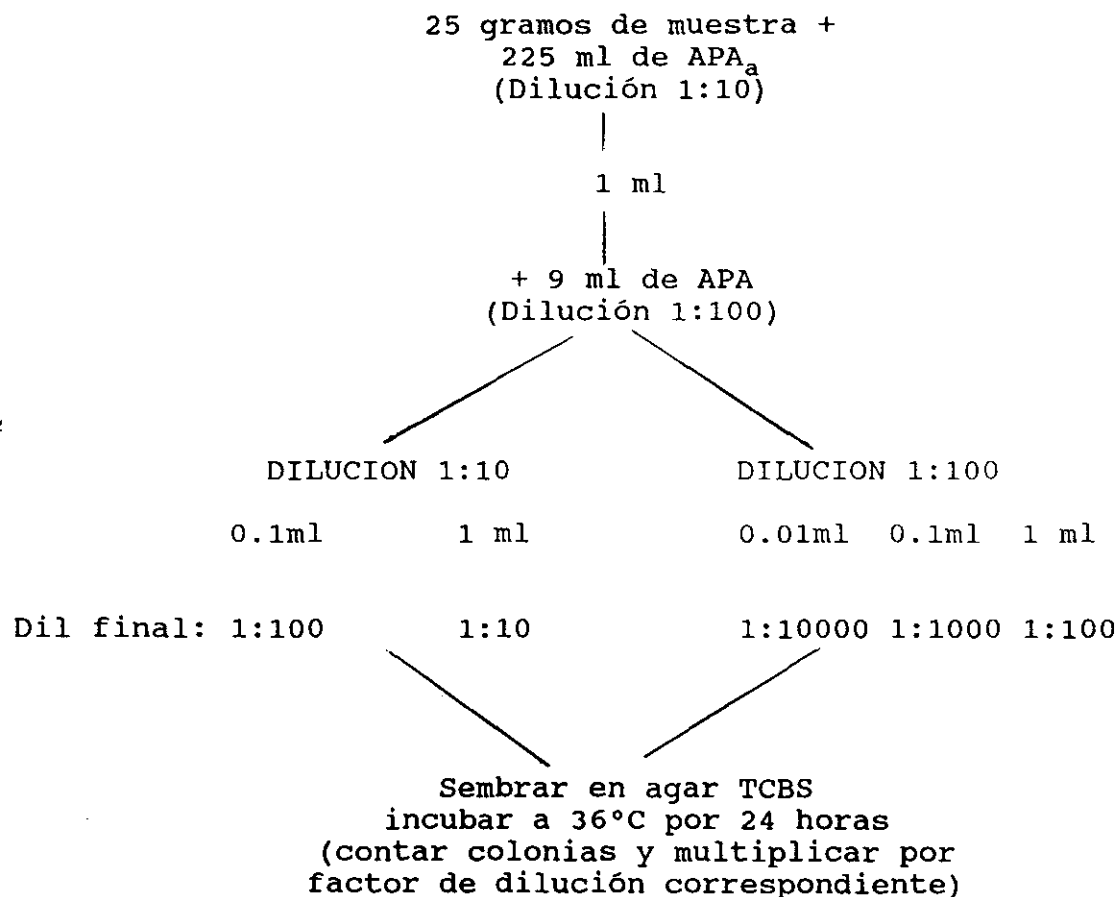
ANALISIS MICROBIOLOGICO PARA DETERMINACION
DE LA PRESENCIA DE *V. cholerae* O1



a = Agua peptonada alcalina con 0.5% de Taurocolato de sodio

ANEXO 10

ANALISIS MICROBIOLÓGICO PARA
LA CUANTIFICACION DE *V. cholerae* O1



a = Agua peptonada alcalina

ANEXO 11

FORMULARIO PARA ANALISIS SENSORIAL
DE HORTALIZAS

Nombre: _____
Hortaliza: _____

INSTRUCCIONES: Pruebe las muestras que se le presentan y califíquelas colocando una X en el punto que mejor describe su característica con respecto a alteración por desinfectantes.

CARACTERISTICAS DE CALIDAD	ALTERNATIVAS	No. DE MUESTRA
SABOR	<u>AFECTADO COMPLETAMENTE</u>	
	<u>BASTANTE AFECTADO</u>	
	<u>AFECTADO MODERADAMENTE</u>	
	<u>AFECTADO LIGERAMENTE</u>	
	<u>COMPLETAMENTE NATURAL</u>	
COLOR	<u>OBSCURO</u>	
	<u>NORMAL</u>	
	<u>PALIDO</u>	
TEXTURA	<u>DURO</u>	
	<u>NORMAL</u>	
	<u>SUAVE</u>	

MUCHAS GRACIAS

TABLA 1

SOBREVIVENCIA DE *Vibrio cholerae* O1_a EN PORCIONES DE MASA DE MAIZ
CONTAMINADA EXPERIMENTALMENTE.

	Horas a temperatura ambiente (23-25°C)	pH _b	Vibriones por gramo de masa ^a
MASA A	0	6.8	8.3 x 10 ⁵
	2	6.5	4.0 x 10 ⁵
	6	6.2	8.0 x 10 ⁵
	12	5.2	1.0 x 10 ⁵
	18	4.7	4.0 x 10 ³
	24	4.5	menos de 10
MASA B	0	8.2	9.9 x 10 ⁵
	2	7.9	8.9 x 10 ⁵
	6	6.8	8.8 x 10 ⁵
	12	5.5	4.0 x 10 ⁵
	18	5.0	2.5 x 10 ⁴
	24	4.5	menos de 10

a = biotipo El Tor, serotipo Inaba (cepa IN-0006)

b = \bar{X} de 2 determinaciones

TABLA 2

SOBREVIVENCIA DE *Vibrio cholerae* O1, EN SUBPRODUCTOS DE MASA DE MAIZ, LUEGO DE RECIBIR DETERMINADO TRATAMIENTO TERMICO

Sub producto de masa de maíz	A	B	Temperatura (°C) $\bar{X} \pm Sd_a$	Tiempo (min + seg) $\bar{X} \pm Sd$
Tortillas (cocción)	50	0	75.9 ± 2.8	3'22" ± 51"
Tortillas (recalentado)	15	0	66.5 ± 1.1	1' c/lado _c
Refresco de masa	9	0	94.0 ± 0.36	1'°

a = biotipo El Tor, serotipo Inaba (cepa In-0006)

b = \bar{X} de 2 determinaciones + desviación estándar

c = tiempo fijado con anterioridad

A = No. de veces que se realizó el experimento

B = No. de veces que hubo recuperación de *V. cholerae* O1

TABLA 3

EFFECTO DEL LAVADO CON AGUA DE CHORRO POR 30 SEG
Y LAVADO CON AGUA DE CHORRO MAS SUMERGIDO
EN SOLUCIONES DESINFECTANTES
EN HORTALIZAS CONTAMINADAS (LECHUGA, APIO Y PEREJIL)
CON *V. cholerae* O1_a

TRATAMIENTO DE REDUCCION DE CONTAMINACION	UFC _b	% REDUCCION _c	% REDUCCION DEBIDO SOLO AL DESINFECTANTE _d
Lavado por 30 seg (L)	7450	98.14	
DESINFECTANTE TIEMPO (MIN)			
L+ HS _e 25ppm			
5	7231	98.22	4.3
10	6508	98.37	12.6
15	5102	98.72	31.5
30	2808	99.30	62.3
L+ HS 50ppm			
5	7048	98.24	5.4
10	5380	98.66	27.7
15	3099	99.23	58.4
30	1252	99.69	83.2
L+ HS 100ppm			
5	6857	98.28	8.0
10	3174	99.21	57.4
15	2332	99.41	68.7
30	953	99.76	87.2
L+ HB _f 273ppm			
5	5245	98.68	29.6
10	4015	98.99	46.1
15	2578	99.36	65.4
30	705	99.82	90.5

_a = Biotipo El Tor, serotipo Inaba (cepa IN-0006). 10^7-10^8 vibriones por cada 25 g de hortaliza.

_b = Unidades formadoras de colonias/g.

_c = % de reducción total: 100% = 4×10^5 vibriones por gramo

_d = % de reducción del desinfectante: 100% = 7450 vibriones, sobrevivientes luego del lavado.

_e = Hipoclorito de sodio

_f = Hidrocloruro de biguanida más cloruro de benzalconio

TABLA 4

UFC^a EN HORTALIZAS CONTAMINADAS CON *V. cholerae* O1_b Y
LUEGO DECONTAMINADAS UTILIZANDO TRATAMIENTOS
DE LAVADO CON AGUA DE CHORRO Y DESINFECCION QUIMICA

TRATAMIENTOS	LECHUGA	HORTALIZAS APIO	PEREJIL
LAVADO (L) _c	5800	6130	10419
L+HS _d 25ppm, 5'	5292	5910	10192
10'	5041	5359	9125
15'	3972	4457	6878
30'	2149	2604	3673
L+HS 50ppm, 5'	5245	5813	10087
10'	3985	3971	8185
15'	2405	2675	4218
30'	913	895	1950
L+HS 100ppm, 5'	5181	5559	9833
10'	2272	2504	4747
15'	1591	2003	3403
30'	645	766	1449
L+HB _e 5'	4029	4511	7194
10'	3052	3453	5540
15'	1960	2252	3520
30'	479	504	1133

a = Unidades formadoras de colonias

b = Biotipo El Tor, serotipo Inaba. 4×10^5 vibriones por gramo

c = Lavado con agua de chorro por 30 segundos

d = Hipoclorito de sodio

e = Hidrocloruro de biguanida más cloruro de benzalconio

TABLA 5

TABLA DEL ANALISIS DE VARIANZA DEL ESTUDIO
 CUANTITATIVO DE DESINFECCION DE HORTALIZAS
 CONTAMINADAS CON *V. cholerae* O1

FUENTE	SC	CM	F*a	Fb	P>F
Hoja	1.61x10 ⁸	8.04x10 ⁷	1092.1	2.83	0.0001***
Des.	1.37x10 ⁸	3.42x10 ⁷	464.8	5.06	0.0001***
Tiempo	3.44x10 ⁸	1.15x10 ⁸	1556.7	5.06	0.0001***
Hoja x Des.	1.16x10 ⁷	1.45x10 ⁶	19.8	5.24	0.0001***
Hoja x tiempo	3.25x10 ⁷	5.42x10 ⁶	73.7	5.24	0.0001***
Des. x tiempo	2.21x10 ⁷	2.46x10 ⁶	33.4	5.24	0.0001***

a = F calculado

b = F crítico, alfa = 0.05

*** = Existe diferencia o interacción estadísticamente significativa

TABLA 6

PORCENTAJE DE REDUCCION DE LA CONTAMINACION
 CON *V. cholerae* O1_a EN HORTALIZAS, DESPUES DEL LAVADO_b

HORTALIZA	% REDUCCION _c
LECHUGA	98.6
APIO	98.5
PEREJIL	97.4

a = Biotipo El Tor, serotipo Inaba.

b = Lavado con agua de chorro frotando las hojas y/o tallos de las hortalizas con las manos

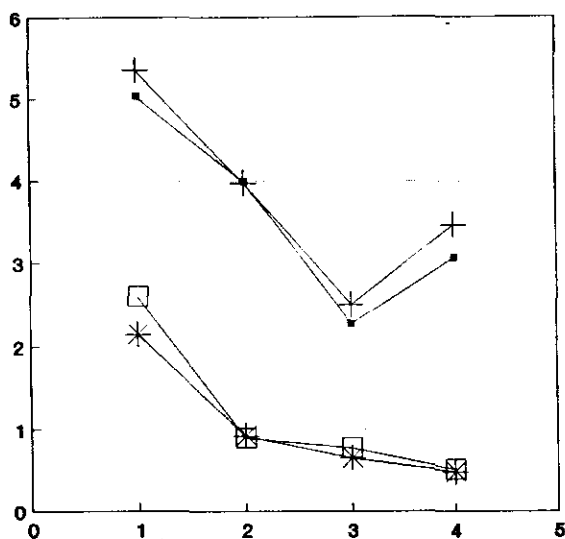
c = 100% = 10^7 vibriones por cada 25 g = 4×10^5 vibriones por g

GRAFICA 1

ESTUDIO DE REDUCCION DE LA CONTAMINACION CON
V. cholerae O1_a EN HORTALIZAS:
 PUNTOS DE INTERACCION_b

Hortaliza	tiempo _c
+ APIO	10'
■ LECHUGA	10'
□ APIO	30'
* LECHUGA	30'

UFC_d
 x 1000



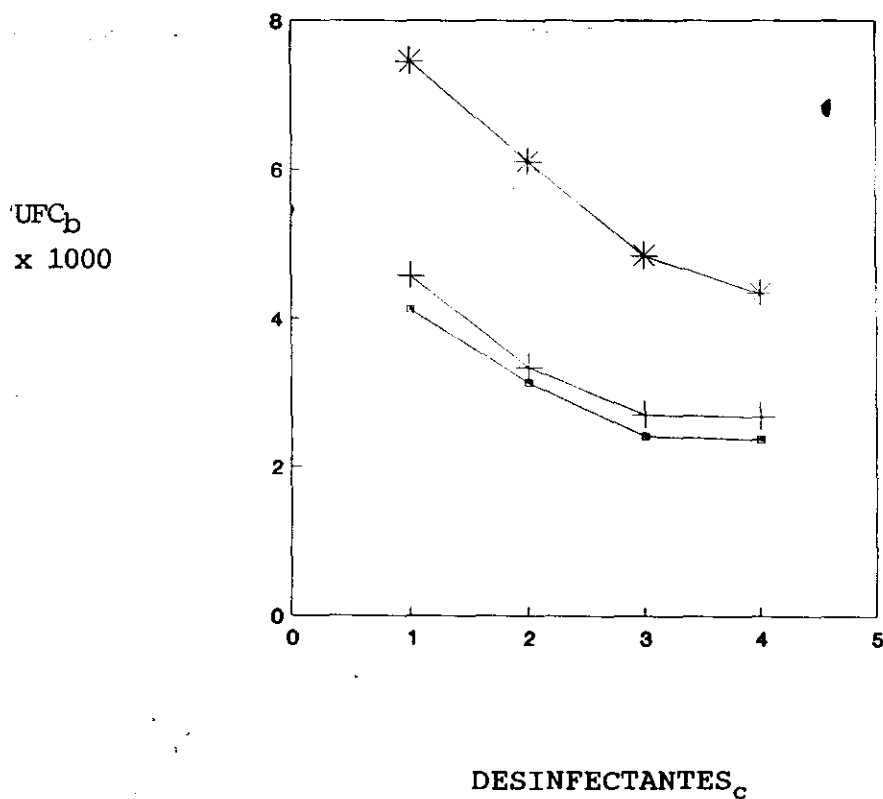
DESINFECTANTES_e

- a = 10^7 - 10^8 vibriones por cada 25 g de hortaliza
- b = Se encontró interacción solo entre lechuga y apio en los tiempos de 10 y 30 minutos.
- c = tiempo de sumergido en el desinfectante empleado
- d = Unidades formadoras de colonias de V. cholerae O1, biotipo El Tor, serotipo Inaba
- e = L: lavado con agua de chorro por 30 segundos
 - 1: L más hipoclorito de sodio 25 ppm
 - 2: L más hipoclorito de sodio 50 ppm
 - 3: L más hipoclorito de sodio 100 ppm
 - 4: L más hidrócloruro de biguanida más cloruro de benzalconio 273 ppm

GRAFICA 2

EFFECTO DEL LAVADO CON AGUA DE CHORRO MAS SUMERGIDO EN SOLUCIONES DESINFECTANTES EN LA REDUCCION DE LA CONTAMINACION DE HORTALIZAS CON V. cholerae O1_a

Hortaliza
▣ LECHUGA
+ APIO
* PEREJIL



a = 10^7 - 10^8 vibriones por cada 25 g de hortaliza

b = Unidades formadoras de colonias de V. cholerae O1, biotipo El Tor, serotipo Inaba

c = L: lavado con agua de chorro por 30 segundos

1: L más hipoclorito de sodio 25 ppm

2: L más hipoclorito de sodio 50 ppm

3: L más hipoclorito de sodio 100 ppm

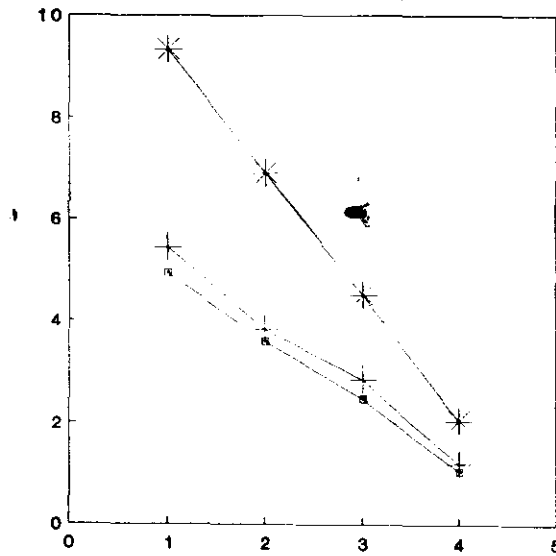
4: L más hidrocloreuro de biguanida más cloruro de benzalconio 273 ppm

GRAFICA 3

EFFECTO DEL TIEMPO DE APLICACION DE SOLUCIONES
DESINFECTANTES EN LA REDUCCION DE LA CONTAMINACION
CON V. cholerae O1_a EN HORTALIZAS

UFC_D
x 1000

Hortaliza
▣ LECHUGA
+ APIO
* PEREJIL



TIEMPO_c

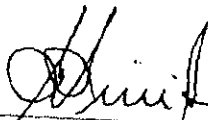
- a = 10^7 - 10^8 vibriones por cada 25 g de hortaliza
b = Unidades formadoras de colonias de V. cholerae O1, biotipo El Tor, serotipo Inaba
c = 1: 5 minutos
2: 10 minutos
3: 15 minutos
4: 30 minutos



Ma. Elena Estrada Lainfiesta
Tesisista



Lic. Florida Alma Cano
Asesora



Lic. Gustavo Sini
Director de Escuela



Lic. Clemencia G. de Avila
Decano

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE RIVERO
Biblioteca Central