

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Ecología y epidemiología de las salmonellas en las aguas
polucionadas del canal del Jarama : nueva metodología de
detección**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Ángel de Miguel Arenal

DIRECTOR:

José Cabo Ramón

Madrid, 2015



ANGEL DE MIGUEL ARENAL

ECOLOGIA Y EPIDEMIOLOGIA DE LAS SALMONELLAS EN LAS AGUAS
POLUCIONADAS DEL CANAL DEL JARAMA. NUEVA METODOLOGIA DE
DETECCION.

Vº Bº

JOSE CABO RAMON



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Año 1981

R.- 20.133

INDICE

PREAMBULO.....	VIII
AGRADECIMIENTOS.....	XII
<u>I. INTRODUCCION</u>	1
1.- Salmonelosis. Clasificación de Salmonellas. Proceso patogénico.....	3
2.- Salmonelosis humana.....	8
2.1 Salmonelosis humana de huésped específico.....	8
2.1.1 Morbilidad.....	8
2.1.2 Mortalidad.....	12
2.1.3 Cloranfenicol.....	13
2.1.4 Portadores.....	13
2.1.5 Vacuna.....	14
2.1.6 Distribución por edades.....	14
2.1.7 Distribución estacional.....	14
2.2 Salmonelosis humana de huésped no específico.....	15
2.2.1 Morbilidad.....	15
2.2.2 Mortalidad.....	16
2.2.3 Portadores.....	16
2.2.4 Serotipos.....	16
2.2.5 Distribución estacional.....	17
2.2.6 Manipulaciones de alimentos.....	17
2.2.7 Frecuencia de serotipos en distintos países	17
3.- Salmonelosis animal.....	25
3.1 Salmonelosis animal de huésped específico.....	25
3.2 Salmonelosis animal de huésped no específico.....	25
3.2.1 Morbilidad.....	25
3.2.2 Portadores y serotipos.....	25
3.2.3 Distribución estacional.....	27
3.2.4 Frecuencia de serotipos en distintos países	27
4.- Papel del agua en el ciclo de transmisión de la salmonelosis.....	32
4.1 Brotes de enfermedades portadas por el agua en	

- III -

U.S.A. en el periodo 1938-1976.....	34
4.2 Brotes de Salmonelosis de reconocido origen hídrico en otros países y España.....	39
<u>II. NUEVA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE SALMONELLAS,</u>	44
1.- Revisión de los principios de aislamiento de Salmonellas.....	45
1.1 Pre-enriquecimiento en medios no selectivos.....	46
1.2 Medios selectivos de enriquecimiento.....	51
1.2.1 Medios de enriquecimiento con base de selenito.....	52
1.2.2 Medios de enriquecimiento con base de tetrationato.....	54
1.2.3 Comparación entre los dos medios de enriquecimiento.....	56
1.3 Técnica de subcultivos en medios selectivos.....	60
1.4 Temperatura de incubación.....	63
1.4.1 Ensayos simultáneos de comparación de temperatura para el aislamiento de Salmonellas	63
1.4.2 Resultados de distintos investigadores con el empleo de una temperatura de incubación.	67
1.4.2.1 Con la temperatura de 37°C.....	67
1.4.2.2 Con la temperatura de 41°C.....	68
1.4.2.3 Con la temperatura de 43°C.....	69
1.5 Tiempo de incubación.....	70
1.5.1 Ensayos simultáneos de comparación de tiempo de incubación para el aislamiento de Salmonellas.....	70
1.5.2 Resultados de distintos investigadores con el empleo de un tiempo de incubación.....	71
1.5.2.1 Con el tiempo de 24 horas.....	71
1.5.2.2 Con el tiempo de 48 horas.....	72
1.5.2.3 Con varios tiempos de incubación...	73
1.6 Medios sólidos selectivos y diferenciales de aislamiento.....	74

- IV -

1.6.1	Combinaciones de medios sólidos más recomen- dados.....	74
1.6.2	Relación de medios sólidos más empleados...	76
1.7	Otras técnicas de detección de Salmonellas.....	78
1.8	Preparación de muestras para inoculación.....	79
1.9	Conclusiones prácticas.....	82
2.-	Ensayos de laboratorio para seleccionar la metodología más adecuada en la detección de Salmonellas en aguas..	88
2.1	Efecto inhibitor de los caldos de enriquecimiento (TMK y SBG) sobre bacterias heterótrofas.....	88
2.2	Efecto inhibitor del TMK sobre bacterias heteró- trofas y bacterias intestinales en aguas contami- nadas, sospechosas de portar Salmonellas.....	89
2.3	Empleo de subcultivos para aumentar el efecto in- hibidor del caldo de enriquecimiento sobre <u>Enter</u> bacterias no pertenecientes al género Salmonella.	90
2.4	Aplicación del método de subcultivos en aguas con fuerte contaminación fecal y sospechosas de por- tar Salmonellas.....	93
2.5	Ensayo del método de subcultivos con dos caldos - de enriquecimiento (TMK y SBG) con y sin sulfas - para intentar una mayor selectividad.....	95
2.6	Propuesta y justificación de un nuevo medio de en- riquecimiento.....	97
2.6.1	Antecedentes.....	98
2.6.2	Propuesta del nuevo medio de enriquecimien- to.....	101
2.6.3	Justificación basada en las características bioquímicas diferenciales de las Salmone-- llas.....	102
2.7	Estudio in vitro de tres serotipos de Salmonellas en tres caldos de enriquecimiento.....	104
2.7.1	Valoración del método de subcultivos en <u>so</u> bitol selenito.....	108
2.8	Comparación entre un nuevo medio de enriquecimien <u>u</u>	

to, el sorbitol selenito y el selenito verde brillante.....	112
2.9 Confirmación de la eficacia del sorbitol selenito como medio de enriquecimiento.....	113
2.10 Ensayos de campo para confirmar la bondad de la metodología que se recomienda para la detección de Salmonellas en aguas.....	114
3.- Metodología que se recomienda para la detección de Salmonellas en aguas.....	116
3.1 Enriquecimiento.....	116
3.1.1 Nuevo medio de enriquecimiento, el sorbitol selenito, para el aislamiento de Salmonellas.....	116
3.1.2 Adición de un extracto de cultivo de Salmonellas inactivadas por el calor.....	117
3.1.3 Método de concentración gradual.....	117
3.2 Aislamiento.....	119
3.3 Identificación bioquímica.....	119
3.4 Identificación serológica somática.....	119
3.5 Identificación serológica flagelar.....	119
<u>III. ECOLOGIA Y EPIDEMIOLOGIA DE SALMONELLAS EN LAS AGUAS POLUCIONADAS DEL CANAL DEL JARAMA.....</u>	<u>120</u>
1.- Materiales y métodos.....	121
1.1 Toma de muestras.....	121
1.2 Análisis bacteriológicos.....	122
1.2.1 Determinación de Salmonellas.....	122
1.2.2 Determinación cuantitativa de Enterobacterias, coliformes totales y coliformes fecales.....	124
1.2.3 Determinación cuantitativa de bacterias intestinales, estreptococos fecales y clostridios-sulfito-reductores.....	125
1.2.4 Determinación de bacterias heterótrofas, aerobios.....	125
1.3 Análisis físico-químicos.....	125

- VI -

1.3.1	Determinación de temperaturas, conductividad, pH, color, materia en suspensión a 110°C y a 700°C, residuo seco a 110°C y a 700°C.....	125
1.3.2	Determinación de aniones y cationes.....	126
1.3.3	Determinación de los indicadores químicos de polución.....	126
2.-	Lugar de muestreo.....	128
2.1	Localización y entorno del Canal del Jarama.....	128
2.2	Origen y finalidad.....	128
2.3	Características técnicas del Canal del Jarama....	131
2.4	Calidad del agua que vehiculiza el Canal del Jarama y caudales de los ríos Manzanares y Jarama....	132
2.5	Puntos de muestreo; elección y justificación de los mismos.....	134
2.6	Descripción de los puntos de muestreo.....	134
2.7	Características y frecuencia de los muestreos....	135
3.-	Ecología de las Salmonellas en el agua del Canal del Jarama.....	138
3.1.	Frecuencia de detección de Salmonellas en las aguas polucionadas del Canal del Jarama.....	138
3.2	Distribución mensual de aislamiento de Salmonellas.....	146
3.3	Serotipos aislados y frecuencia.....	148
3.4	Dispersión cronológica de los serotipos.....	152
3.5	Rendimiento de los medios sólidos de aislamiento.	153
3.6	Relación Salmonellas-indicadores.....	158
3.6.1	Relación coliformes totales-Salmonellas....	161
3.6.2	Relación coliformes fecales-Salmonellas....	163
3.6.3	Relación estreptococos fecales-Salmonellas.	165
3.6.4	Relación CF/EF-aislamiento de Salmonellas..	167
3.6.5	Relación clostridios-sulfito-reductores-Salmonellas.....	169
3.6.6	Relación aerobios-Salmonellas.....	170

- VII -

3.7	Relación mensual entre bacterias indicadoras y - de aislamiento de Salmonellas.....	171
3.7.1	Relación entre las medias de los muestreos.	171
3.7.2	Relación mensual con la frecuencia de aisla miento de Salmonellas de las muestras.....	177
4.-	Las aguas del Canal del Jarama y la epidemiología de - las Salmonellas en la población que efectúa sus verti- dos en dichas aguas.....	180
4.1	Relación entre la ecología descrita y la salmone- losis observada en patología humana.....	180
4.2	Aislamiento de S. typhi.....	185
5.-	Evolución de las características bacteriológicas y fi- sico-químicas del agua del Canal del Jarama.....	192
5.1	Resultados de los análisis bacteriológicos.....	192
5.2	Resultados de los análisis físico-químicos.....	193
5.3	Estudio estadístico de los dos puntos de muestreo	202
5.4	Evolución del Canal del Jarama a lo largo del - tiempo que abarca nuestro estudio.....	205
<u>IV.</u>	<u>CONCLUSIONES.....</u>	<u>219</u>
	<u>BIBLIOGRAFIA.....</u>	<u>229</u>

PREAMBULO

La salmonelosis se refiere a una infección causada por bacterias del género *Salmonella*. Ha constituido a lo largo del tiempo y aún constituye en todos los países del mundo, en mayor o menor grado, un problema de gran importancia, con un gran impacto social y económico.

A pesar de que la salmonelosis humana de huésped específico ha disminuido fuertemente en todos los países, incluido España, todavía no se ha conseguido su erradicación como causa de infección, ya que por ejemplo solamente en España se siguen declarando anualmente alrededor de 2.500 casos; por el contrario, la salmonelosis humana de huésped no específico ha aumentado fuertemente en todo el mundo, por lo que ambos tipos de salmonelosis humana merecen una gran atención y una vigilancia intensa.

La presencia de *Salmonellas* en las aguas residuales humanas es un hecho admitido y demostrado desde hace muchos años. Muchos trabajos recientes ponen de manifiesto su gran aumento. Para Prost y Riemann, 1967, las *Salmonellas* son tan comunes en el tracto intestinal del hombre y de muchas especies de animales de sangre caliente, que probablemente se las consideraría como a los coliformes, si no fuera por su patogenicidad; en la misma línea se encuentra Leclerc, 1971, para el que las *Salmonellas* podrían ser por excelencia la bacteria test de una polución peligrosa en las aguas.

En vista de ello, nos hemos propuesto como objetivo principal de la presente Tesis Doctoral, conocer la frecuencia de detección de *Salmonellas* en las aguas polucionadas del Canal del Jarama, su distribución mensual, cuáles son los serotipos y dispersión cronológica, averiguar la relación que se da entre la frecuencia de aislamiento de *Salmonellas* y los niveles de las bacterias indicadoras de polución, estudiar la relación existente entre la ecología descrita y la salmonelosis observada en clínica humana, y observar la evolución de las características bacteriológicas y fisico-químicas del agua del Canal del Jarama a lo largo del tiempo que abarca nuestro estudio.

Las metodologías descritas hasta ahora en relación con el aislamiento de Salmonellas en las toxi-infecciones, es decir, coprocultivo, hemocultivo y análisis de alimento, han constituido la base de su investigación en el medio hídrico, pero deben ser mejoradas y adaptadas a éste habitat, el agua, sobre todo cuando su número es pequeño en comparación con el total de la flora saprofita del agua, que es un gran inconveniente, ya que compiten con éxito enmascarando la posible presencia de Salmonellas.

Por tanto, nos hemos propuesto como uno de los objetivos de la presente Tesis Doctoral, la búsqueda de una metodología apropiada para la detección y aislamiento de Salmonellas en el agua, ya que todavía no se ha encontrado una metodología que tenga una aceptación universal, aunque se han producido grandes contribuciones desde que el microorganismo fué identificado por primera vez y le fué atribuido un papel en la patogenia de la salmonelosis, con la idea de que pueda contribuir positivamente a resolver en la práctica éste gran problema.

" Ecología y Epidemiología de las Salmonellas en las aguas polucionadas del Canal del Jarama. Nueva Metodología de Detección ", consta de tres partes. La primera la forma un conjunto de datos de las Salmonellas y de la enfermedad que producen, así como se hace referencia al papel del agua en el ciclo de su transmisión. La segunda comprende una revisión de los principios de su aislamiento, los ensayos de laboratorios para seleccionar la metodología más adecuada para la detección de Salmonellas en aguas y por último la metodología que recomendamos para su aislamiento. La tercera parte la forma la ecología y epidemiología de las Salmonellas en las aguas polucionadas del Canal del Jarama.

El estudio que nos ocupa, lo creemos interesante y de gran utilidad, ya que a través de él se puede:

- vigilar la posible aparición de brotes epidémicos.
- vigilar el estado de la epidemiología de la salmonelosis.
- vigilar los serotipos que afectan a la población.

- verificar la eficacia de los tratamientos de depuración de las aguas polucionadas.
- verificar la peligrosidad del uso del agua para riego.

Esperamos que todo ello contribuya a disminuir el impacto social que hoy día causa ésta enfermedad, traducido en pérdidas económicas, morbilidad y mortalidad.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. José Cabo Ramón, director de la presente Tesis Doctoral, por su inestimable colaboración y sus valiosas aportaciones científicas y al Dr. Dimas Fernandez-Galiano por sus atinadas observaciones.

Asimismo, agradezco la ayuda prestada en la realización de los análisis bacteriológicos físico-químicos a Carmen García, Angel Rubio, Marivi Castrana y Araceli Bacas y en general a todo el personal del Centro de Investigaciones del Agua.

También a Sagrario Cruz y Maria Parrilla por el trabajo de mecanografiado de la Tesis Doctoral.

Por último, doy las gracias a mi hermano José Luis y a Marisa por su estímulo y comprensión.

I. INTRODUCCION

1. SALMONELOSIS. CLASIFICACION DE SALMONELLAS, PROCESO PATOLOGICO.

La salmonelosis es una enfermedad única que tiene una distribución mundial y que se refiere a infecciones causadas por bacterias del género *Salmonella*. El microorganismo causante es tan común en el tracto intestinal de los humanos y en muchas especies de animales que probablemente se les consideraría como a los coliformes, si no fuera por su patogenicidad (Prost y Riemann, 1967). El término salmonelosis, no diferencia entre infección asintomática y sintomática, tales como enterocolitis, bacteremia, infección localizadas, tifoidea o fiebres paratifoideas. La enfermedad se transmite de los animales al hombre o de hombre a hombre, causando infecciones que son normalmente breves, autolimitadas y benignas (Hoeprich, 1977).

Las bacterias del género *Salmonella* son bacilos, Gram negativos, aerobios, anaerobios facultativos, no capsulados, no formadores de esporas, la mayoría móviles, de tamaño de 2-3 micras por 0,6 micras, crecen rápidamente en medios de cultivo simples, fermentan la glucosa con producción de ácido o ácido y gas, no fermentan la lactosa ni la sacarosa (Edwards y Ewing, 1972; Manual Bergey, 1974).

La identificación presuntiva del género se basa en tests bioquímicos que nos permite clasificarlas en tres especies, *S. typhi*, *S. cholerae-suis* y *S. enteritidis*. La identificación definitiva se establece con tests serológicos. La clasificación serológica se realiza por medio de antígenos somáticos (O) y antígenos flagelares (H).

En 1829, Louis fué el primero en emplear el término tifoidea (Harrison, 1973; Nelson y Cols, 1975), aplicándolo a un cuadro clínico compuesto por una variada sintomatología en la que destacaba lesiones intestinales y un estado de estupor (tifo). En 1836, Willian Gerhard, de Filadelfia, un antiguo alumno de Louis, presentó la primera diferencia clara y definida entre el tifo y la tifoidea, basándose en datos clínicos y anatómicos (Nelson y cols, 1975). Entre los años 1856 y 1870, Budd, médico inglés, sugirió

que la enfermedad era contagiosa y estableció la importancia del contagio por las heces y orina de las personas infectadas. La confirmación de su hipótesis no se realizó, hasta que Pfeifer, en 1885, aisló por primera vez el germen en una muestra de materia fecal (Harrison, 1973).

Se le acredita el descubrimiento del bacilo a Eberth en 1880, cuando aisló el microorganismo en frotis de ganglios mesentéricos y del bazo. En 1885, Salmon y Smith aislaron del cerdo, *S. cholerae-suis*. En 1888, Gaertner aisló *S. enteritidis* (Edwards y Ewing, 1972; Harrison, 1973).

El aislamiento de bacterias de orígenes muy diversos y estrechamente relacionados, condujo inevitablemente a la confusión.

En 1897, Smith y Stewart establecieron que estos microorganismos pertenecían a un gran grupo o especie en virtud de la identidad de su morfología y caracteres biológicos. Los estudios de Smith y Roger en 1905 y los de Félix y Weil en 1917 acerca de los constituyentes antigénicos de alguna *Salmonella* (*typhi*, *paratyphi A* y *B*) y otras *Enterobacterias*, llegan a la conclusión de que están constituidos por antígenos somáticos y flagelares totalmente distintos. Esta afirmación describe el estado de conocimiento del género hasta que Schuetze en 1921 publicó un trabajo que dió una visión de los numerosos serotipos dentro del género y la posibilidad de distinguirlos usando antisuero absorbido. En 1925 y 1926 White, quien reconoció la necesidad de considerar la importancia de los descubrimientos concernientes a la variación antigénica, tales como los de Andrews, clasifica las *Salmonellas* atendiendo a sus componentes antigénicos. Este trabajo fué confirmado por Kauffmann, 1930-1940 y gracias a los trabajos de éste con White, no sólo se clasifican y ordenan todos los serotipos existentes en su momento, sino que sientan las bases técnicas para la identificación antigénica de las *Salmonellas* que se han descubierto después y que se seguirán descubriendo (Edwards y Ewing, 1972). En la actualidad hay más de 1800 serotipos distintos (Youmans y cols, 1975; Morse y Duncan, 1976; Mandell y cols, 1979).

La Salmonella es un caso típico de microorganismo zootécnico, debido a su variedad de huéspedes y a su patogenicidad tanto en hombre como en animales.

Atendiendo a los rasgos patológicos que presentan, la mayoría no muestran una asociación específica con un huésped dado o especie determinada.

No todas las Salmonellas son capaces de producir un mismo cuadro clínico. Según sus propiedades patológicas, las Salmonellas se pueden dividir en:

- especialmente patógenas para el hombre productoras de la fiebre tifoidea. Se incluyen *S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B*, *S. paratyphi C*, *S. cholerae-suis*, *S. sendai*, *S. panama*. Hemos incluido en éste grupo a los tres últimos serotipos, ya que producen cuadros semejantes a la tifoidea (Prost y Riemann, 1967; Baquero 1972; Alcantara, 1975; Hoeprich, 1977; Mandell y cols, 1979).
- especialmente patógenas para los animales. *S. abortus-equi*, *S. abortusovis*, *S. gallinarum-pullorum*. Este último, se incluye aquí a pesar de que ciertos autores citan que en algunas ocasiones han producido en el hombre por la ingestión de huevos contaminados un cuadro gastroenterítico que recuerda a las toxoinfecciones alimentarias, pero que por su rareza, su benignidad y por no ser etiológicamente bien encuadrada sería inadvertida. (Prost y Riemann, 1967; Hoeprich, 1977; Mandell y cols, 1979).
- de huésped no específico. Por definición podríamos incluir aquí a la mayoría de los serotipos que produce cuadros patológicos en el hombre y animales. Son de destacar *S. typhimurium* y *S. enteritidis*.

El proceso patogénico no está del todo claro. Se piensa que es debido a la acción yuxtapuesta de la célula bacteriana y endotoxina. Parece ser que en la salmonelosis de huésped específico, la patogenicidad es debida a la célula bacteriana, mientras que por el contrario en las de huésped no específico, la endotoxina sería la responsable (Prost y Riemann, 1967). Como vere

mos, además de los dos factores citados también influyen las condiciones ambientales y fisiológicas del huésped.

Como norma consideramos a la boca como la puerta de entrada y el intestino delgado es el lugar de acción. La evolución posterior no sólo va a depender del número de bacterias invasoras sino que también de las condiciones fisiológicas, de su propia flora y a la presencia de coproanticuerpos. Pueden permanecer localizadas o extenderse. Si es así penetran en los nódulos linfáticos principalmente en los mesentéricos, y de aquí se trasladarían al hígado por la vena porta. La Salmonellas pueden permanecer acantonadas por grandes periodos de tiempo en el hígado, nódulos mesentéricos y vesícula biliar. Desde ésta puede haber suelta intermitente en sujetos portadores. (Prost y Riemann, 1967; Hoeprich, 1977).

El climax de una enfermedad es la bacteremia. Una vez que los microorganismos están en la sangre éstos aumentan rápidamente en número y por vía sanguínea se difunden a todo el organismo produciendo cambios patológicos.

Entre los factores que se cree que influyen en el curso patológico están:

- los tejidos de proliferación rápida y especialmente el sistema reproductivo son altamente susceptibles a la infección. Esto es importante con respecto a los serotipos patológicos de huésped específico como abortus equi y ovis y a veces con S. gallinorum y pullorum en pollos. Sin embargo esto no ocurre con la mayoría de los serotipos.
- los individuos jóvenes son los más susceptibles debido a la baja inmunidad, a los tejidos jóvenes proliferantes y al apareamiento que facilita la transmisión de la infección.
- déficit de determinados componentes químicos del alimento como el ácido nicotínico y vitaminas.
- concomitancia de otras enfermedades que debilitan al individuo.

Teóricamente la ingestión de una célula causaría la enfermedad, pero en la práctica es bastante improbable. Experimenten-

tos con voluntarios han demostrado que la cantidad de bacterias necesarias para producir lesiones o enfermedad, es decir, la dosis infectiva mínima, varía entre cientos de miles y millones según el serotipo de Salmonella (Prost y Riemann, 1967; Jay, 1973; Baquero y cols, 1975; Hoeprich, 1977; Mandell y cols, 1979).

No todas las personas expuestas al mismo riesgo contraen la enfermedad, sino que algunas enferman y otras no. Un ejemplo lo constituye un brote de fiebre tifoidea en Croydon, U.S.A., donde solamente el 0,75% de la población contrajo la enfermedad (Taylor, 1958; Holden, 1970).

Hay autores que sostienen que células muertas son capaces de producir la enfermedad. La presencia de células viables en las heces de los enfermos habla en favor del papel de las células vivas de Salmonellas en la presentación de la enfermedad (Jay, 1973).

2. SALMONELOSIS HUMANA.

En el hombre se pueden observar diferencias en la acción patógena de las Salmonellas de huésped específico y de huésped no específico.

2.1. SALMONELOSIS HUMANA DE HUESPED ESPECIFICO.

La salmonelosis por tifoidea es característica del hombre y como tal ha sido reconocida, constituyendo una entidad patológica separada, siendo producida por *S. typhi*.

S. paratyphi A, *S. paratyphi B*, *S. paratyphi C*, *S. sendai*, *S. panama* y algún otro serotipo, producen en el hombre unos síntomas parecidos a la tifoidea (fiebres paratifoideas) (Prost-y Riemann, 1967; Baquero, 1972; Alcántara, 1975; Hoeprich, 1977; Mandell y cols, 1979).

La aparición en los animales de las Salmonellas de huésped específico humano es un fenómeno muy raro, que puede ocurrir sólo ocasionalmente como parte del tránsito de la microflora de animales. (Hoeprich, 1977).

2.1.1. Morbilidad.

El número de aislamientos de Salmonellas de huésped específico (*S. typhi*), como muestran las gráficas de las figuras 1, 2 y 3 ha disminuido fuertemente, pero a pesar de la regresión todavía se siguen declarando en España entre 2000 y 2500 casos de fiebre tifoidea al año, de entre los que mueren aproximadamente unos 30 (Prieto, 1971; Alcántara, 1978; Anuarios Estadísticos de la Sección de Epidemiología e Información Sanitaria, 1970-1979); sin embargo en 1949 el número de afectados fué de 22000 de los que 1566 murieron. (Prieto, 1971).

Fijando nuestra atención en Madrid, lugar elegido para nuestro estudio, y observando los datos, obtenidos a partir de 1945 (Prieto, 1971) año en que se consideró a la fiebre tifoidea enfermedad de declaración obligatoria, observamos un descenso muy marcado desde 1945 a 1979 (Prieto, 1971; Anuarios Estadísti-

Fig. 1 — Morbilidad de fiebre tifoidea y salmonelosis humana en U.S.A. 1946-1974
 (Recopilación de Prost y Riemann, 1967 ; Serico, 1972 ; Jay, 1973 ; Youmans y cols, 1975 ;
 Reasoner, 1976 ; Ryder y cols, 1976 ; Hoeprich, 1977)

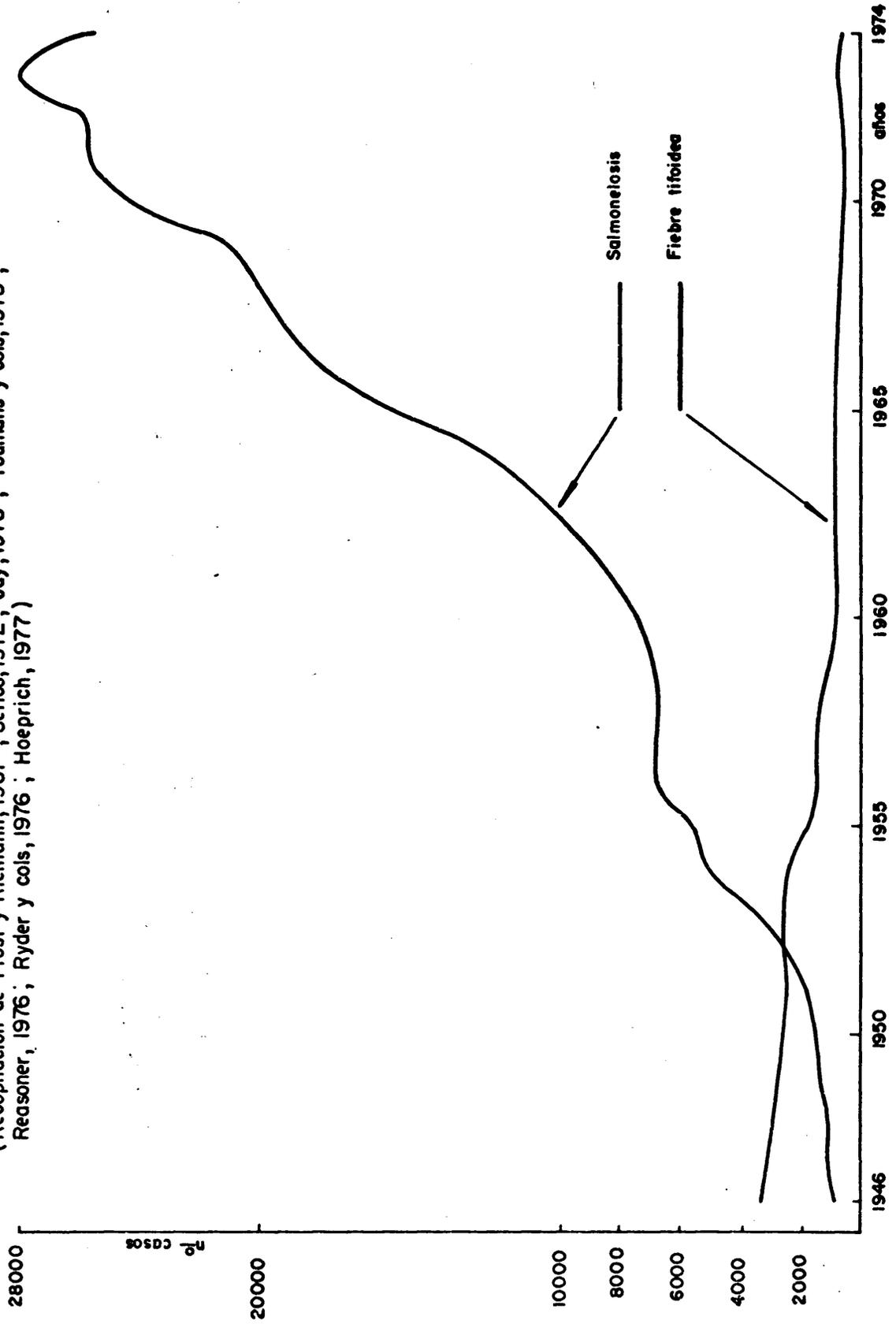


Fig. 2 — Morbilidad de fiebre tifoidea en España 1949-1979

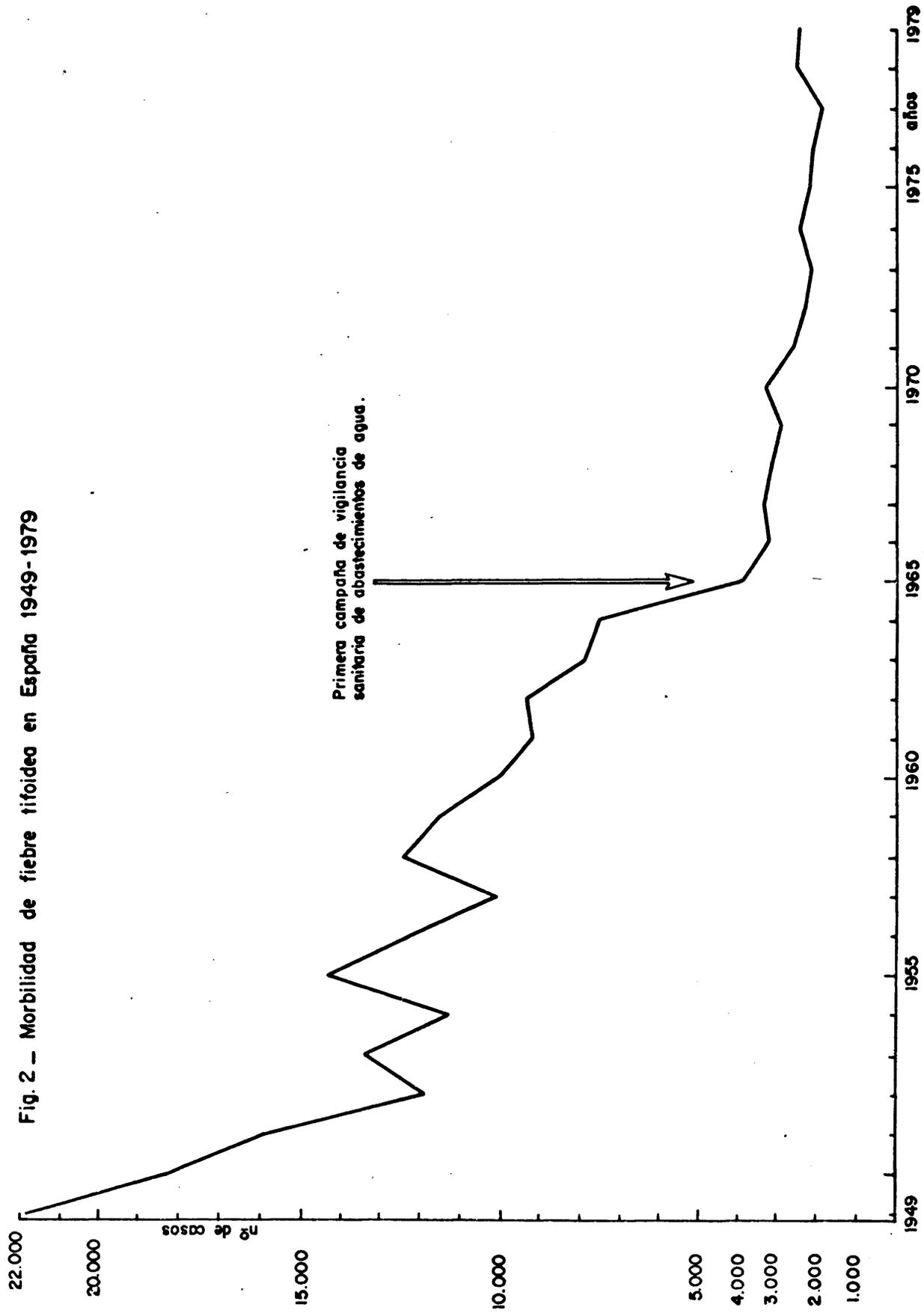
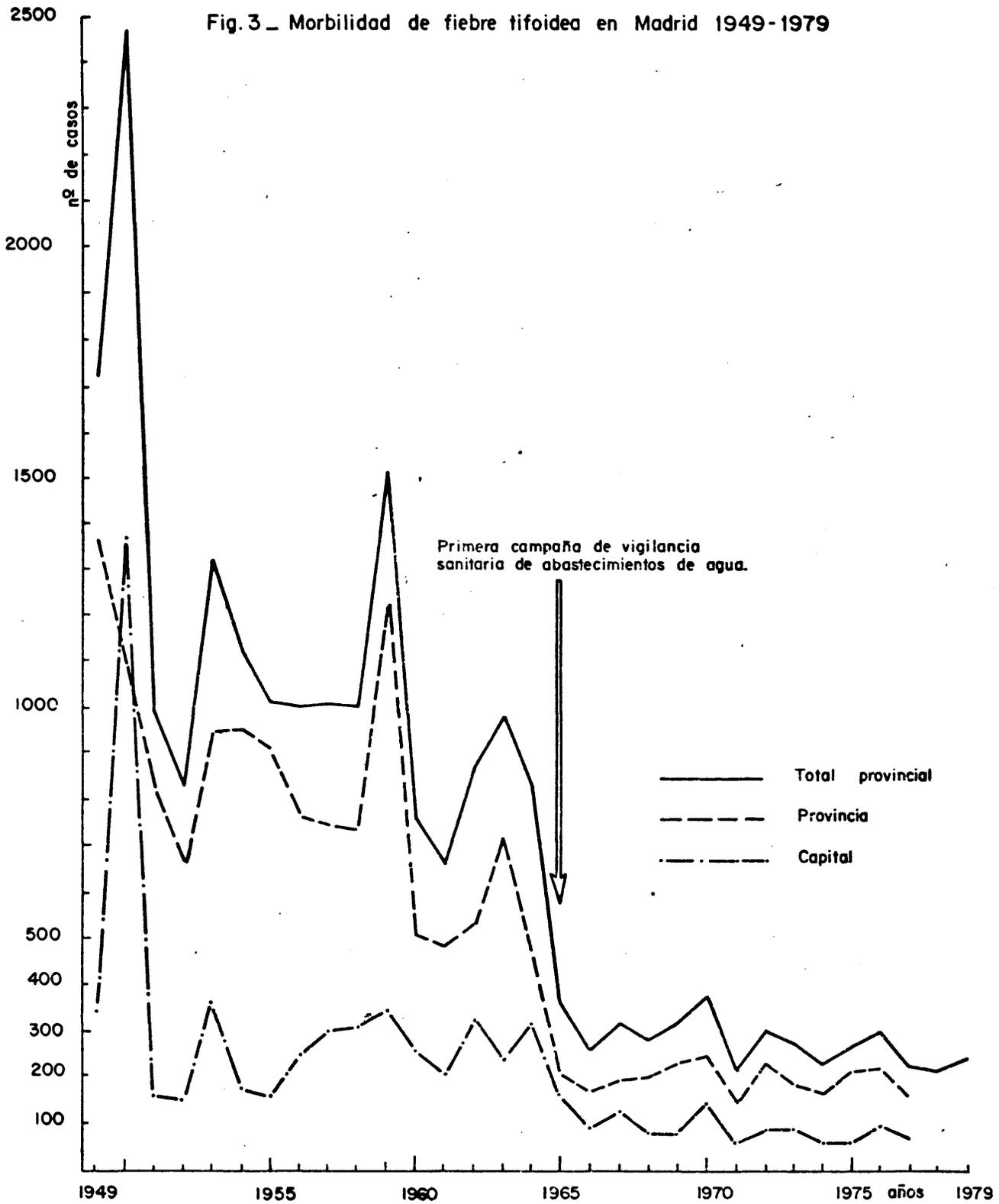


Fig.3 _ Morbilidad de fiebre tifoidea en Madrid 1949-1979



cos, 1970-1979). Esta regresión no se ha efectuado de manera uniforme sino que ha sufrido algunos altibajos. (Fig. 3).

En el periodo comprendido entre los años 1945-1964, se reduce a la mitad el número de casos declarados y se pasa de 1700 a unos 800 casos en el periodo de 15 años. En el año 1965 se redujo la cifra anterior al 50%, y desde éste a 1972, la cifra se ha reducido a unos 300 casos. A partir de éste año parece estabilizarse el número de afectados, y así en el periodo 1972-1979 el número ha oscilado entre 200-300 casos.

En España, desde el año 1949, en el que se declararon 22000 casos, se pasa a 7500 en el año 1964. En el año 1965 nos encontramos de nuevo con una gran reducción, casi del 50%, del número de casos declarados, 4000, para seguir disminuyendo hasta el año 1972, en el que se declararon unos 2200 casos. A pesar, de la tendencia descendente observada en las últimas décadas, parece estabilizarse en los últimos años, en particular a partir de 1972. De 1972 a 1979 el número de casos ha oscilado entre 2235 en 1972 y 2462 en 1979. (Anuarios Estadísticos, 1970-1979). (Ver Fig.2).

Como hemos visto la máxima reducción del número de casos declarados, tiene lugar en el año 1965, a raíz de la instauración de la primera campaña de vigilancia sanitaria de abastecimientos de agua, que en principio comprendió 25 provincias incluyendo Madrid y posteriormente se amplió hasta 40 provincias. (Prieto, 1971).

2.1.2. Mortalidad.

Se acepta que la tasa de mortalidad en la actualidad es del 2-3% de los enfermos (Prost y Riemann, 1967; Prieto, 1971; Harrison, 1973; Hoeprich, 1977); aunque algunos autores no la consideran superior al 1% gracias a la ventaja que ha supuesto el uso del cloranfenicol (Serico, 1972; Alcantara, 1975). Antes de su empleo, la mortalidad oscilaba entre el 15-25% (Prieto, 1971; Serico, 1972; Harrison, 1973; Alcantara, 1975; Hoeprich, 1977).

Ya que gracias a él se redujo tan drásticamente la mortalidad, bien merece alguna mención.

2.1.3. Cloranfenicol.

Fué descubierto en el año 1947 por Barkholder, que lo obtuvo a partir del *Streptomyces venezuelae* (Prieto, 1971; Kucers y Bennet, 1975).

Desde su comercialización, se ha producido un aumento en su empleo en todo el mundo, así en España desde 1952, fecha de su introducción, se ha pasado del consumo en ese año de 500 Kg. a 90000 Kg. en 1970 (Prieto, 1971).

Se sabe que su mecanismo de acción es interferir ó inhibir la biosíntesis de proteínas. Actúa frente a *Rickettsias*, gran cantidad de gérmenes Gram negativos, siendo también activo frente algunas cepas de gérmenes Gram positivos, como *Estafilococos*, *Streptococos* y *Neumococos* (Prieto, 1971; Kucers y Bennet, 1975).

Como punto negativo, se puede decir que debido a su gran espectro y a su gran eficacia, ha sido indiscriminadamente utilizado por los médicos, como tratamiento de síndromes infecciosos, enmascarando muchas fiebres tifoideas y otras producidas por *Salmonellas*, sin la posibilidad de conocer el agente etiológico, con lo que han pasado desapercibidas.

2.1.4. Portadores.

Hay tres tipos de portadores, los eliminadores biliares 65%, los entéricos 30% y los unrinarios 5% (Prieto, 1971; Hoeprich, 1977).

Del 3-5% de éstos enfermos se convierten en portadores crónicos, definiéndose a éstos, como aquellas personas que después de un año de haber pasado la enfermedad siguen excretando *S. typhi* en heces, orina, a diferencia de los portadores temporales que excretan el bacilo por un periodo no mayor de 4-6 meses, siendo la tasa de éstos de 2-20% (Prost y Riemann, 1967; Informe Oficial de la Asociación Panamericana de Salud Pública, 1970; Prieto, 1971; Serico, 1972; Harrison, 1973; Nelson y cols, 1975; Hoeprich, 1977).

El estado de portador crónico aumenta con la edad y es mayor en mujeres que en hombres (Prieto, 1971; Serico, 1972; Harrison, 1973; Nelson y cols, 1975; Hoeprich, 1977).

2.1.5. Vacuna.

Conviene recordar que la eficacia de la vacuna antitífico-paratífico, utilizada por primera vez en 1910 por Wright, está fuera de toda duda, reduciendo la morbilidad hasta 1/3 de los vacunados. (Taylor, 1958; Holden, 1970; Serico, 1972).

En España se utilizó mucho durante el periodo 1940-1957, a partir del cual se ha reducido su empleo y hoy día ha pasado a tener menos importancia quedándose detrás de la vigilancia del medio ambiente. (Prieto, 1971).

2.1.6. Distribución por edades.

En cuanto al grupo de edad más afectado por ésta enfermedad, es el comprendido entre los 15-30 años, el 75% de los casos de fiebre tifoidea ocurren en éste grupo, esto es, se considera - una enfermedad de niños y adultos jóvenes, con poca incidencia en la primera infancia donde la mortalidad es mucho más elevada. (Prieto, 1971; Youmans y cols, 1975; Hoeprich, 1977).

2.1.7. Distribución estacional.

La fiebre tifoidea es una enfermedad que se da a lo largo de todo el año, aunque aumentando su frecuencia durante los meses de verano y otoño, por lo que se le ha llegado a denominar - fiebre estío-otoñal. (Taylor, 1958; Holden, 1970; Prieto, 1971; Serico, 1972; Harrison, 1973; Nelson y cols, 1975; Mandell y cols, 1979).

En España la frecuencia estacional de la enfermedad es muy clara, siendo la incidencia mayor en los meses de agosto y - septiembre, sin quedar atrás los inmediatos a éstos, circunstancia nada particular, dada la condición subtropical de España y el carácter endemo-epidémico de la enfermedad. Dentro de España hay regiones como Andalucía, Levante y otras donde la incidencia es similar a lo largo de todo el año. (Prieto, 1971; Anuarios Estadísticos, 1970-1979).

Según algunos autores a medida que disminuye el número

de portadores, la frecuencia estacional de la enfermedad va disminuyendo. (Harrison, 1973).

Es una enfermedad extremadamente rara en los países nórdicos y frecuente en los países mediterráneos. (Nelson y cols, - 1973).

El descenso progresivo de la incidencia está muy relacionado con la higiene, profilaxis, control de los abastecimientos de agua potable y los nuevos métodos terapéuticos que han disminuido no sólo la mortalidad sino también la morbilidad.

2.2. SALMONELOSIS HUMANA DE HUESPED NO ESPECIFICO.

El número de aislamientos de Salmonellas de huésped no específico, por el contrario que las de huésped específico, ha aumentado en frecuencia, como muestra la gráfica de la figura 1. - Este aumento progresivo puede ser debido a múltiples factores, entre ellos :

- aumento real de la incidencia de la enfermedad
- aumento de la vigilancia por la comunidad médica
- aumento de los alimentos producidos en masa con amplia distribución mundial
- aumento de la costumbre de comer alimentos crudos o cocinados - insuficientemente
- aumento de la polución en general y en particular del agua
- disminución de la resistencia a las infecciones, como consecuencia de las mejores condiciones de higiene
- métodos más sensibles para la detección y aislamiento del microorganismo causante.

2.1.2. Morbilidad.

Los datos manejados para construir las gráficas de salmonelosis humana de huésped específico y no específico, no reflejan la incidencia real, y ésto puede ser debido a que, a veces, - los síntomas de la enfermedad pasan inadvertidos al paciente o aún

cuando éste acude al médico, se le suministra un antibiótico indiscriminadamente, sin haberles hecho antes un hemocultivo o mejor un coprocultivo, con lo que el agente etiológico queda desconocido, - habiéndose demostrado una correlación positiva entre la incidencia y el número de cultivos analizados. (Ryder y cols, 1976).

Por todo ello, solamente son reportados una parte del número total de casos. Según algunos autores sólo el 1% (Ryder y cols, 1976; Vanderpost y Bell, 1977; Mandell y cols, 1979), mientras que otros lo amplian al 10%. (Prost y Riemann, 1967).

2.2.2. Mortalidad.

A pesar de que los síntomas son leves y la mortalidad es baja, mueren anualmente 500 personas en U.S.A. de entre todos los afectados por la enfermedad que asciende a más de dos millones al año (Prost y Riemann, 1967; Jay, 1973; Wells y cols, 1974; Morse y Duncan, 1976; Hoeprich, 1977).

Las cifras de las tasas de mortalidad y de portadores crónicos y temporales son parecidas a las dadas para *S. typhi*.

Hay que hacer la salvedad de *S. cholerae-suis*, que tiene una mayor tasa de mortalidad, 21% (Prost y Riemann, 1967; Mitchell 1972; Jay, 1973).

2.2.3. Portadores.

Según Harrison, 1973, la cifra de portadores asintomáticos, se estima que es el 0'2% de la población general en U.S.A., por lo que no es de extrañar el número tan elevado de salmonelosis. Morse y Duncan, 1976; Wray y Sojka, 1977, estiman que el 1% de la población humana excreta *Salmonellas* en un tiempo dado, mientras - que Hoeprich, 1977, calcula que en U.S.A. la incidencia de portadores fecales en un 2-5/1000.

2.2.4. Serotipos.

Aunque el número de serotipos capaces de producir enfermedad en el hombre es muy elevado, más de 1800 (Youmans y cols, 1975; Morse y Duncan, 1976; Wray y Sojka, 1977; Mandell y cols, -

1979), muy pocos serotipos son los responsables de la mayoría de los casos. Según los mismos autores menos de 40 serotipos son los responsables del 95-98% de los casos.

Su frecuencia no es siempre la misma, sino que puede variar de año en año y de país en país.

2.2.5. Distribución estacional.

Al igual que la fiebre tifoidea, la salmonelosis de huésped no específico, se da a lo largo de todo el año, mostrando también una frecuencia estacional de finales de verano-otoño. (Parvery y cols, 1972; Jay, 1973; Harrison, 1973; Hoeprich, 1977; Mandell y cols, 1979). Para Ryder y cols, 1976, ésta frecuencia estacional es máxima en marzo, abril y mayo.

2.2.6. Manipuladores de alimentos.

Un peligro a tener en cuenta en la propagación de la salmonelosis son los manipuladores de alimentos. Se debería ejercer una vigilancia sanitaria constante sobre ellos. Esto comenzó a realizarse en España a partir del año 1965.

Distintos tipos de manipuladores como personal de hoteles, bares, restaurantes..., fueron analizados por la técnica de hemoaglutinación Vi. De 4911 analizados durante las cuatro primeras campañas en toda España, se encontraron 179 positivos, lo que constituye un 3'64% de presuntos portadores de Salmonellas. En Madrid se analizaron 1152, resultando 47 positivos (4%). Los serotipos más frecuentemente aislados fueron por orden de frecuencia : S. typhi, S. typhimurium, S. enteritidis. (Prieto, 1971).

2.2.7. Frecuencia de serotipos en distintos países.

En Inglaterra y Gales :

Durante el periodo 1955-1960, los siete serotipos más frecuentes fueron : S. typhimurium (15808), S. heidelberg (1013) S. enteritidis (734), S. newport (667), S. thompson (623), S. saint-paul (282), S. anatum (279). (Jay, 1973).

Durante el periodo 1969-1972, el 80% de los casos de gastroenteritis eran producidas por Salmonellas. En el periodo 1968-1973 se aislaron 137 serotipos de los 21000 casos de salmonelosis. S. typhimurium, S. dublin, S. cholerae-suis y S. abortus ovis fueron los responsables del 91% de todos los casos. (Reasoner, 1976)

Durante el periodo 1973-1975, las Salmonellas fueron la causa más común de las toxi-infecciones, 21428 casos, que representan el 74% del número total de los casos reconocidos causados por bacterias. Los 20 serotipos más frecuentemente aislados del hombre en éste periodo fueron (Vernon, 1977) :

serotipo	número aislamientos	%
S. typhimurium	8396	32
S. agona	3685	14
S. enteritidis	2602	10
S. heidelberg	1178	4
S. anatum	1009	4
S. indiana	931	4
S. newport	908	3
S. infantis	698	3
S. hadar	512	2
S. bredney	494	2
S. virchow	471	2
S. stanley	463	2
S. panama	374	1
S. saint-paul	364	1
S. derby	293	1
S. haifa	273	1
S. livingstone	215	1
S. kapemba	210	1
S. braederup	203	1
S. brandengur	<u>180</u>	<u>1</u>
SUMA	23459	88
otras Salmonellas	<u>3115</u>	<u>12</u>
TOTAL	26574	100

En Dinamarca durante el periodo 1960-1968 se aislaron 81 serotipos, siendo los 10 más importantes: S. typhimurium (2951), S. paratyphi B (126), S. enteritidis (124), S. newport (115), S. - typhi (56), S. infantis (56), S. indiana (43), S. montevideo (33), S. blokley (29), S. muenchen (27). (Grunnet y Nielsen, 1969).

En el Hospital de Angers, Francia, durante el periodo de septiembre de 1969 a octubre de 1971, se aislaron 14 serotipos por coprocultivos (Parvery y cols, 1972) :

serotipo	número aislamientos	%
S. typhimurium	28	49
S. typhi	7	12'3
S. brandenburg	5	8'8
S. newington	5	8'8
S. paratyphi B	4	7
S. panama	3	5'3
S. heidelberg	3	5'3
S. enteritidis	2	3'5
S. havana	2	3'5
S. newport	<u>1</u>	<u>1'75</u>
SUMA	60	89'45
otras Salmonellas	<u>7</u>	<u>10'55</u>
TOTAL	67	100

En Suecia en el periodo 1968-1972 se aislaron 96 serotipos siendo S. typhimurium, S. dublin, S. cholerae-suis, S. montevideo, S. thompson y S. infantis los responsables del 85% de los casos. (Reasoner, 1976).

En Estados Unidos :

Durante el periodo abril 1962 a abril 1963, los cuatro serotipos más frecuentes fueron: S. typhimurium, S. heidelberg, S. - saint-paul y S. oranienburg. (Jay, 1973).

En el año 1963, los seis serotipos más frecuentes fueron: S. typhimurium, S. derby, S. heidelberg, S. newport, S. infantis; y S. enteritidis. (Spino, 1966).

En el año 1965, los 10 serotipos más frecuentes fueron:

S. typhimurium, S. heidelberg, S. newport, S. infantis, S. enteritidis, S. saint-paul, S. typhi, S. derby, S. oranienburg y S. thompson. (Mitchell, 1972).

En el año 1970 (Alcantara, 1975):

serotipo	número aislamientos	%
S. typhimurium	5917	24'4
S. enteritidis	2504	10'3
S. newport	1700	7
S. heidelberg	1699	7
S. infantis	1214	5
S. saint-paul	1157	4'8
S. thompson	958	4
S. blokley	660	2'7
S. typhi	533	2'2
S. derby	490	2
SUMA	16832	69'5
otras Salmonellas	7386	30'5
TOTAL	24218	100

En el año 1971 (Youmans y cols, 1975):

serotipo	número aislamientos	%
S. typhimurium	8607	32
S. newport	2058	8
S. enteritidis	1462	6
S. infantis	1376	5
S. saint-paul	1198	5
S. heidelberg	1155	4
S. agona	864	3
S. typhi	680	3
S. derby	558	2
S. javiana	549	2
SUMA	18506	70
otras Salmonellas	8187	30
TOTAL	26693	100

Durante el periodo 1968-1974 (Ryder y cols, 1976) :

serotipo	número aislamientos	%
S. typhimurium	44395	26'5
S. enteritidis	13026	7'8
S. newport	12139	7'2
S. heidelberg	9844	5'9
S. infantis	8961	5'4
S. saint-paul	7307	4'4
S. thompson	5112	3
S. typhi	4065	2'4
S. derby	3497	2'1
S. javiana	3431	2
SUMA	111777	66'7
otras Salmonellas	55680	33'3
TOTAL	167457	100

Durante 1974 se declararon 21980 casos, siendo los 10 - serotipos más frecuentes: S. typhimurium, S. newport, S. enteritidis, S. infantis, S. heidelberg, S. agona, S. saint-paul, S. typhi, S. derby y S. oranienburg. (Hoeprich, 1977).

Según Mandell y cols, 1979, se declaran anualmente en - U.S.A. alrededor de 25000 casos de salmonelosis humana, siendo los 10 serotipos más importantes en el año 1976 los siguientes:

serotipo	número aislamientos	%
S. typhimurium	7847	33'7
S. heidelberg	1962	8'4
S. agona	1461	6'3
S. newport	1336	5'7
S. enteritidis	1219	5'2
S. infantis	1014	4'4
S. saint-paul	545	2'3
S. typhi	529	2'3
S. oranienburg	460	2
S. muenchen	379	1'6
SUMA	16474	71'9

	- 22 -	
otras Salmonellas	<u>6811</u>	<u>28'1</u>
TOTAL	23285	100

Durante 1974 se declararon 21980 casos, siendo los 10 serotipos más frecuentes: *S. typhimurium*, *S. newport*, *S. enteritidis*, *S. infantis*, *S. heidelberg*, *S. agona*, *S. saint-paul*, *S. typhi*, *S. derby* y *S. oranienburg*. (Hoeprich, 1977).

En España:

En el Hospital del Rey durante el periodo 30-VI-1968 al 30-IX-1976, se analizaron 5732 coprocultivos de los que 1286 (22'5%) resultaron positivos para patógenos, de los que 1007 fueron Salmonellas. (Los datos que ha continuación vamos a citar nos han sido cedidos por el D. G. Baquero).

Serotipo	número aislamientos	%
<i>S. typhimurium</i>	423	42
<i>S. typhi</i>	401	39'8
<i>S. enteritidis</i>	140	13'9
<i>S. C₁</i>	17	1'6
<i>S. paratyphi B</i>	9	0'89
<i>S. E₁</i>	8	0'79
<i>S. C₂</i>	4	0'39
<i>S. heidelberg</i>	2	0'19
<i>S. h</i>	1	0'09
<i>S. no identificada</i>	<u>1</u>	<u>0'09</u>
SUMA	1006	99'01
otras Salmonellas	<u>1</u>	<u>0'09</u>
TOTAL	1007	100

Los datos que a continuación se citan han sido facilitados por el Centro Nacional de Referencia de Enterobacterias.

Serotipo	año	1974-1979	1977	1978	1979
<i>S. typhimurium</i>	1	536 31	1 59 27'3	1 61 32	1 281 57'5
<i>S. enteritidis</i>	2	312 18	2 38 17'6	3 32 17'9	2 108 22
<i>S. paratyphi B</i>	3	276 16	7 6 2'8	5 21 11	5 12 2'5
<i>S. typhi</i>	4	213 12'4	3 33 15'3	4 24 12'7	3 33 6'8

cont. pág.23

S. paratyphi C	5	90	5'2	5	18	8'4	2	38	20	4	15	3
S. thompson	6	68	4	--	--	--	--	--	--	--	--	--
S. blockley	7	30	1'8	4	27	12'5	--	--	--	--	--	--
S. weltevreden	8	24	1'4	9	5	2'4	7	2	1	--	--	--
S. arizona	9	14	0'8	6	7	3'3	9	1	0'5	--	--	--
S. zega	10	13	0'8	8	6	2'8	--	--	--	--	--	--
S. muenchen			--	--	--	6	3	1'6	--	--	--	--
S. paris			--	--	--	--	--	9	4	0'8	--	--
S. essen			--	--	--	--	--	8	6	1'3	--	--
S. saint-paul			--	--	--	10	1	0'5	--	--	--	--
S. kentucky			10	5	2'4	--	--	--	--	--	--	--
S. schwering			--	--	--	--	--	10	3	0'6	--	--
S. budapest			--	--	--	8	2	1	--	--	--	--
S. tournay			--	--	--	--	--	6	10	2	--	--
S. dublin			--	--	--	--	--	7	7	1'5	--	--
SUMA		1576	91'2	204	94'4	185	97'4	479	97'9			
otros serotipos		151	8'8	12	5'6	5	2'6	10	2'1			
TOTAL		1727	100	216	100	190	100	489	100			

Según los datos facilitados por el Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitaria y los suministrados por el Boletín Epidemiológico Semanal número 1408, se confecciona la siguiente lista:

serotipo	España 1979		Madrid 1979	
S. typhimurium	161	38'7	101	38'6
S. enteritidis	141	33'8	95	36'3
S. typhi	43	10'3	24	9'1
S. wirchow	8	1'9	6	2'2
S. paratyphi B	7	1'6	3	1'1
S. montevideo	7	1'6	6	2'2
S. ohio	6	1'4	2	0'9
S. sintorf	5	1'2	4	1'5
S. derby	5	1'2	5	1'8
SUMA	389	93'5	249	95'4
otras Salmonellas	27	6'5	12	4'6
TOTAL	416	100	261	100

Como señalamos anteriormente, las listas nos muestran que solamente una minoría de serotipos son los causantes de la mayoría de los casos de salmonelosis identificada en un país.

También se observa que los serotipos más frecuentes en un año, en un periodo, no se mantienen constantes sino que se producen pequeñas variaciones. Al igual que si comparamos los serotipos más frecuentes en distintos países, vemos que aunque no hay una identidad total, hay una cierta correlación que hace pensar que pocos serotipos son los responsables de la mayoría de los casos de salmonelosis en el mundo entero.

S. typhimurium es el serotipo más frecuentemente aislado, cifrándose entre el 25-50% de todos los aislamientos, según el país y el año.

3. SALMONELOSIS ANIMAL.

3.1. SALMONELOSIS ANIMAL DE HUESPED ESPECIFICO.

Las Salmonellas de huésped específico animal, como S. abortus equi, S. abortus ovis y S. gallinarum-pullorum, al igual que las Salmonellas de huésped específico humano, juegan un papel comparativamente insignificante en la epizootiología y epidemiología de la salmonelosis.

3.2. SALMONELOSIS ANIMAL DE HUESPED NO ESPECIFICO.

Las Salmonellas de huésped no específico, son las que producen zoonosis típica, constituyendo un serio factor etiológico en las toxi-infecciones, produciendo pérdidas valoradas alrededor de 100 millones de dólares por año. Solamente en la industria avícola, éstas pérdidas ascienden a 10 millones de dólares por año (Prost y Riemann, 1967).

3.2.1. Morbilidad

La salmonelosis de huésped específico animal, ha disminuido en frecuencia y se atribuye a las medidas profilácticas y terapéuticas. En cambio la salmonelosis de huésped no específico ha aumentado en frecuencia, pudiendo ser debida a:

- aumento de la producción masiva de alimentos para engorde
- intercambio mundial de ganado y piensos
- engorde de animales en granjas pequeñas, que siendo desde el punto de vista económico bueno, favorecen el contagio de los animales sanos
- mataderos
- agua de lavado

3.2.2. Portadores y Serotipos.

El ganado vacuno es muy susceptible, especialmente durante las primeras semanas de vida, pudiendo llegar la morbilidad al

85% y la mortalidad al 33%. En los adultos la morbilidad disminuye fuertemente siendo entonces la salmonelosis rara. El porcentaje de animales infectados varía ligeramente, así en Estados Unidos, es el 13% y en Holanda el 14% (Prost y Riemann, 1967; Mitchell, 1972).

Se puede citar que alrededor del 45% del contenido de la panza del ganado vacuno contiene Salmonellas y el 57% en el ambiente donde se encuentra éste ganado que va a ser sacrificado (Jay, 1973).

Los serotipos más frecuentes en el ganado vacuno son *S. typhimurium*, *S. dublin*, aunque la distribución de éstos dos serotipos difiere según los países (Prost y Riemann, 1967; Vernon, 1977).

Entre el 3,5 y 15% de las ovejas y cabras son portadoras, siendo los serotipos más frecuentes *S. typhimurium*, *S. java*, *S. oranienburg* y *S. dublin*, que representan el 66% de los serotipos (Mitchell, 1972).

Los cerdos son más susceptibles, sobre todo en los individuos de menos de seis meses. La frecuencia de portadores varía de país en país, así, 22% en Bélgica, 15-20% en Holanda, 13,4 en Inglaterra, 7% en Francia, siendo los serotipos más frecuentes en todos los países *S. cholerae suis* y *S. typhimurium* (Prost y Riemann, 1967; Mitchell, 1972). Las Salmonellas pueden estar presentes en la piel del animal entre un 0,5-1,9% (Prost y Riemann, 1967).

Se cita que el 2,7% de los caballos son portadores, siendo los serotipos más frecuentes *S. typhimurium*, *S. anatum* y *S. dublin* (Prost y Riemann, 1967; Jay, 1973; Anderson y Lee, 1976).

En aves y pollos los serotipos más frecuentes son *S. gallinarum-pullorum* que puede presentar una mortalidad hasta del 100% y *S. typhimurium*. El porcentaje de portadores se cifra en 14% en Alemania, 12% en Francia (Prost y Riemann, 1967). Se estima que los canales de pollo son portadores entre el 53,4% y 69% (Jay, 1973). Los huevos y productos derivados se señala que el 2-7% están contaminados, sobre todo con *S. typhimurium* (Jay, 1973). Según Hoadley y cols, 1974, hay una gran asociación entre presencia de Salmonellas y las aguas residuales de las industrias de la polle-

ría, aunque los serotipos no sean constantes.

Se han encontrado portadores en el 2,6%-55% de patos, 35% en palomas, 5,2% en gaviotas, además de en faisanes, canarios, gansos y pavos (Prost y Riemann, 1967; Jay, 1973). Siendo los serotipos más frecuentes *S. typhimurium* y *S. essen*.

Otros animales en los que se han detectado *Salmonellas* son: tortugas, 49-70%. Se estima que el número de salmonelosis asociadas con tortugas en Estados Unidos asciende a 300.000 por año (Reasoner, 1973; Wells y cols, 1974; Bartlett y Trust, 1976; Reasoner, 1976; Bartlett y cols, 1977). Según Siebeling y cols, 1975, en Lousiana, USA, la primera industria es la venta de tortugas que asciende a 2,5 millones de dólares anualmente. Para Pagon y cols, 1974, las tortugas juegan un papel muy importante en la salmonelosis humana, sobre todo en los niños.

Caracoles, ranas, gatos, perros, ratas, ratones, conejos, elefantes, camellos y peces son portadores de *Salmonellas* (Andrews y cols, 1974; Bartlett y Trust, 1976; Andrews y cols, 1977; Bartlett y cols, 1977). Ostras, mejillones y almejas, hasta en el 50% están contaminadas, si son recogidas cerca de los colectores. (Alcantara, 1975).

3.2.3 Distribución estacional.

Al igual que la salmonelosis humana, la salmonelosis animal presenta un claro patrón estacional máximo en verano y otoño y mínimo en invierno (Youmans y cols, 1975).

Estudios epidemiológicos demuestran que las *Salmonellas* son frecuentemente aisladas de los animales, sobre todo en los que el hombre utiliza como alimento.

3.2.4. Frecuencia de serotipos en distintos países.

S. typhimurium y *S. dublin* constituyen los dos serotipos más frecuentemente aislados en el ganado vacuno, aunque la distribución de éstos dos serotipos difiere entre países así, según Wray y Sojka, 1977:

En Inglaterra y Gales durante el periodo 1958-1974 se realizaron 29294 aislamientos, de los que 27981 (85,4%) correspondieron a dos serotipos, S. dublin 74,4% y S. typhimurium 21%.

En Alemania durante el periodo 1961-1965, S. dublin constituyó el 49,3% y S. typhimurium el 36,5%.

En Suecia en el periodo 1968-1972, S. dublin constituyó el 59,7% y S. typhimurium el 30,5%.

En Holanda durante el periodo 1969-1971. S. typhimurium se aisló el 62,9%, S. dublin el 35,9% y S. panama el 2,2%.

En Estados Unidos durante el periodo 1933-1973 los tres serotipos más comunes fueron S. typhimurium 72,2%, S. newport 10,1% y S. dublin 7,5%.

En Dinamarca durante el periodo 1960-1968 los 10 serotipos más frecuentes según Grunnet y Nielsen, 1969, fueron:

serotipo	número aislamientos	%
S. enteritidis	1367	53,8
S. typhimurium	1048	41,3
S. dublin	64	2,5
S. indiana	10	0,4
S. kentucky	8	0,3
S. infantis	7	0,27
S. newport	4	0,15
S. oranienburg	4	0,15
S. chicago	3	0,11
S. derby	3	0,11
SUMA	2518	99,2
otras	20	0,8
TOTAL	2538	100

Los 10 serotipos más frecuentes en Estados Unidos durante el periodo 1966-1974 de origen no humano según Ryder y cols, 1976, fueron:

serotipo	número aislamientos	%
S. typhimurium	2330	20,7
S. heidelberg	1207	10,7
S. anatum	859	7,6
S. saint-paul	809	7,2
S. infantis	807	7,2
S. montevideo	748	6,7
S. seftenberg	625	5,6
S. thompson	561	5
S. derby	521	4,6
S. einsbuettel	480	4,6
SUMA	8947	79,6
otras	2294	20,4
TOTAL	11241	100

Según Mandell y cols, los 10 serotipos más frecuentes en Estados Unidos en el año 1976 de origen no humano fueron:

serotipo	número de aislamientos	%
S. typhimurium	1125	20,7
S. cholerae-suis	293	5,4
S. anatum	257	4,8
S. agona	223	4,1
S. heidelberg	222	4,1
S. enteritidis	167	3
S. johannesburg	157	2,9
S. saint-paul	148	2,7
S. infantis	146	2,7
S. dublin	122	2,2
SUMA	2858	52,8
otras Salmonellas	2551	47,2
TOTAL	5409	100

Dada la similitud entre los serotipos aislados de origen humano y no humano, se pone de manifiesto el papel de los animales como reservorio en la transmisión de la enfermedad a los humanos.

También es de notar que hay serotipos particulares que

tienden a ocurrir en regiones definidas.

Al igual que la salmonelosis humana, pocos serotipos son los responsables de la mayoría de los casos de salmonelosis de origen no humano.

S. typhimurium sigue a la cabeza de los aislamientos, siendo el responsable del 20% de todos los casos en un país, aunque en algunos otros como en Inglaterra y Gales el serotipo más frecuente fué S. dublin (74%) seguido por S. typhimurium (21%).

RESUMEN.

Aunque cada uno de los serotipos de Salmonellas producen cuadros clínicos similares, algunos aspectos de la infección por serotipos determinados son diferentes a los de la infección producida por otros.

Difieren epidemiológicamente en: su especificidad, Ya hemos visto que la mayoría de las Salmonellas no muestran una asociación específica con un huésped dado o especie determinada. El ejemplo clásico es el de *S. typhimurium* que tiene gran cantidad de huéspedes.

Podemos clasificarlas en:

- especialmente patógenas al hombre como *S. typhi*
- especialmente patógenas a los animales como *S. abortus equi*, *S. abortus ovis*, *S. gallinarum pullorum*, *S. dublin* parece estar especialmente adaptada al ganado vacuno, aunque no quiere decir no se aísle en otras especies de animales e incluso en el hombre.
- su habilidad para infectar al hombre. Hay serotipos bien conocidos como *S. typhimurium* que son los principales agentes causantes de la salmonelosis humana y animal. Otros serotipos raramente infectan al hombre como *S. abortus ovis*, *S. abortus equi*, *S. gallinarum pullorum* y *S. dublin*.
- distribución geográfica. Ciertos serotipos son más frecuentes en unos países que en otros, incluso dentro de un país pueden existir áreas endémicas. Puede ocurrir por ejemplo que un serotipo sea muy frecuente y otro muy escaso, pero cuando el primero esté ausente, el otro se convierte en predominante.

4. PAPEL DEL AGUA EN EL CICLO DE TRANSMISION DE LA SALMONELOSIS.

El principal reservorio de Enterobacterias y de otros agentes causantes de enfermedades infecciosas es el tracto intestinal de los vertebrados.

Para Leclerc, 1971, de todas las Enterobacterias, las Salmonellas son las más representativas, y que como hemos visto dan lugar a la salmonelosis, que es una entidad patológica que presenta una distribución mundial, cuyo microorganismo causal es tan común en el tracto intestinal del hombre y muchas especies de animales de sangre caliente, que probablemente se las consideraría como a los coliformes si no fuera por su patogenicidad. (Prost y Riemann, 1967).

En el tracto intestinal, éste patógeno invasor se multiplica rápidamente desde dónde es expulsado en heces, orina y en menor número por boca y sudor de los enfermos y portadores, pasando al ambiente, agua, suelo, comida, etc., en cantidad de millones pudiendo a partir de aquí invadir a otros huéspedes.

Los portadores, permaneciendo la mayoría de las veces en el anonimato, son los que perpetúan la enfermedad, actuando como reservorio y siendo los responsables en muchos casos.

A continuación vamos a ver los distintos eslabones de la cadena entero-hidro-entérica en la transmisión de la salmonelosis.

Primer eslabón. Lo constituye las heces y orina de los enfermos y portadores.

Segundo eslabón. Aguas que reciben éstas heces y orina. Desde aquí pueden seguir dos rutas. En una de ellas el agua es el segundo eslabón y final, a través del cual se transmite el agente etiológico. En la otra el agua actúa como agente infectante del tercer eslabón.

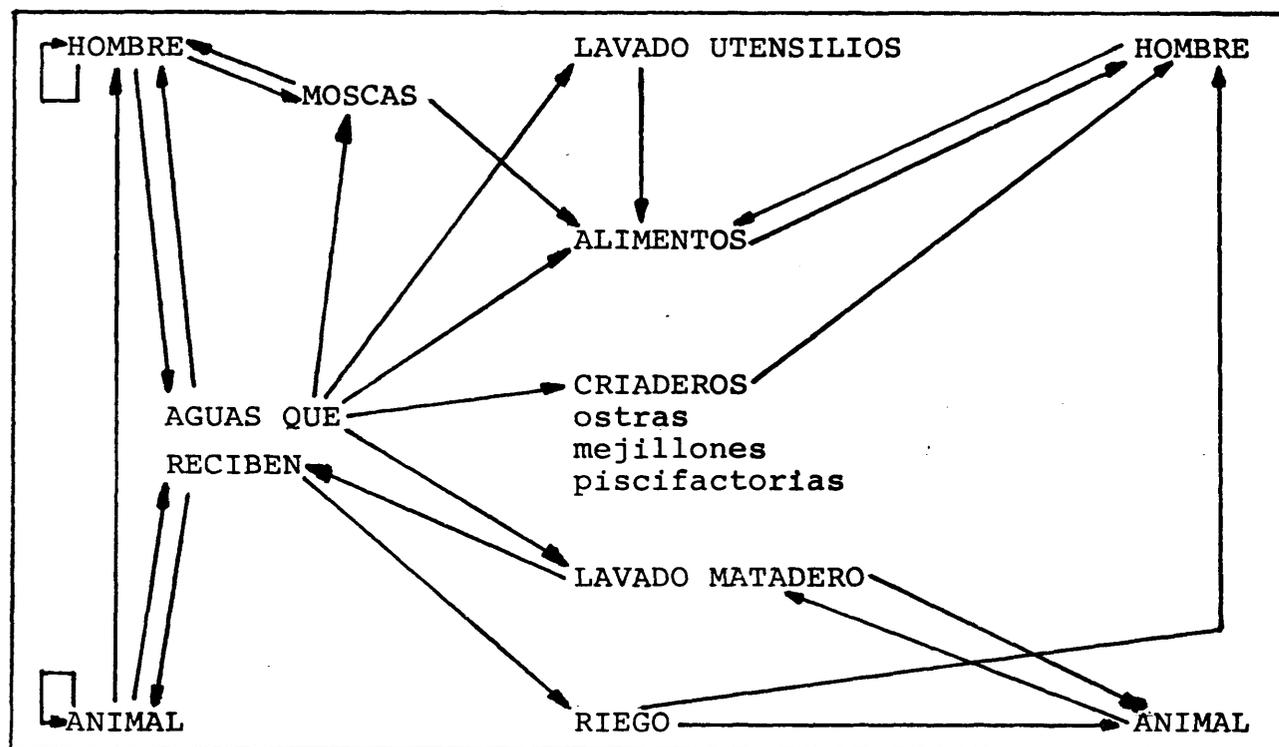
Tercer eslabón. Lo constituye el alimento humano y animal que una vez consumido por el hombre o animal susceptible puede pro-

ducirles la enfermedad.

Para erradicar la salmonelosis es necesario identificar los principales reservorios y romper las uniones en la cadena de transmisión del microorganismo al hombre y animal.

La fig.4 resume el ciclo de las Salmonellas y nos da una idea de la importancia del agua en la transmisión de la salmonelosis.

Fig. 4. Ciclo de transmisión de las Salmonellas.



El agua es un excelente medio de transporte de las Salmonellas y de otros microorganismos, al cual acceden a través de las heces del hombre y animales enfermos o portadores, pero no es un medio de multiplicación, aunque grandes cantidades de materia orgánica, pH óptimo, bajas temperaturas, falta de depredadores, etc. alargan la permanencia de éstos patógenos. (Taylor, 1958; Prost y Riemann, 1967; Holden, 1970; Prieto, 1971; Mitchell, 1972; Smith y cols, 1973). Debido a que las aguas no cumplen éstas condiciones, podemos decir que el agua es un mal habitat, por lo que pronto desaparecerán de ella éstos gérmenes patógenos.

El agua ha jugado y juega un papel muy importante en la extensión de muy variadas enfermedades. Los agentes causales productores de enfermedad que pueden ser portados por el agua, van desde sustancias químicas tóxicas a microorganismos patógenos, virus, bacterias, protozoos, hongos.

Algunas de estas enfermedades pueden ser debidas a la ausencia, deficiencia, en comunidades cerradas, o aumento excesivo de sustancias o compuestos portados por el agua.

Hay un grupo de enfermedades que se sirven de éste medio para su difusión. A éste grupo llamado "hídrico" pertenecen *Vibrio cholerae*, *Shigella disenteriae* y *Salmonella typhi*.

4.1. BROTES DE ENFERMEDADES PORTADAS POR EL AGUA EN U.S.A. EN EL PERIODO 1936-1976.

Cuando hablamos de brotes portados por el agua, hacemos referencia nada más, al agua utilizada para bebida o para uso doméstico. Se considera que ha existido un brote, cuando por lo menos dos casos de enfermedad infecciosa pueden ser citados. (Weibel y cols, 1964; Graun y McCabe, 1973; Committee Report, 1975; Graun y cols, 1976; Graun y Guun, 1979).

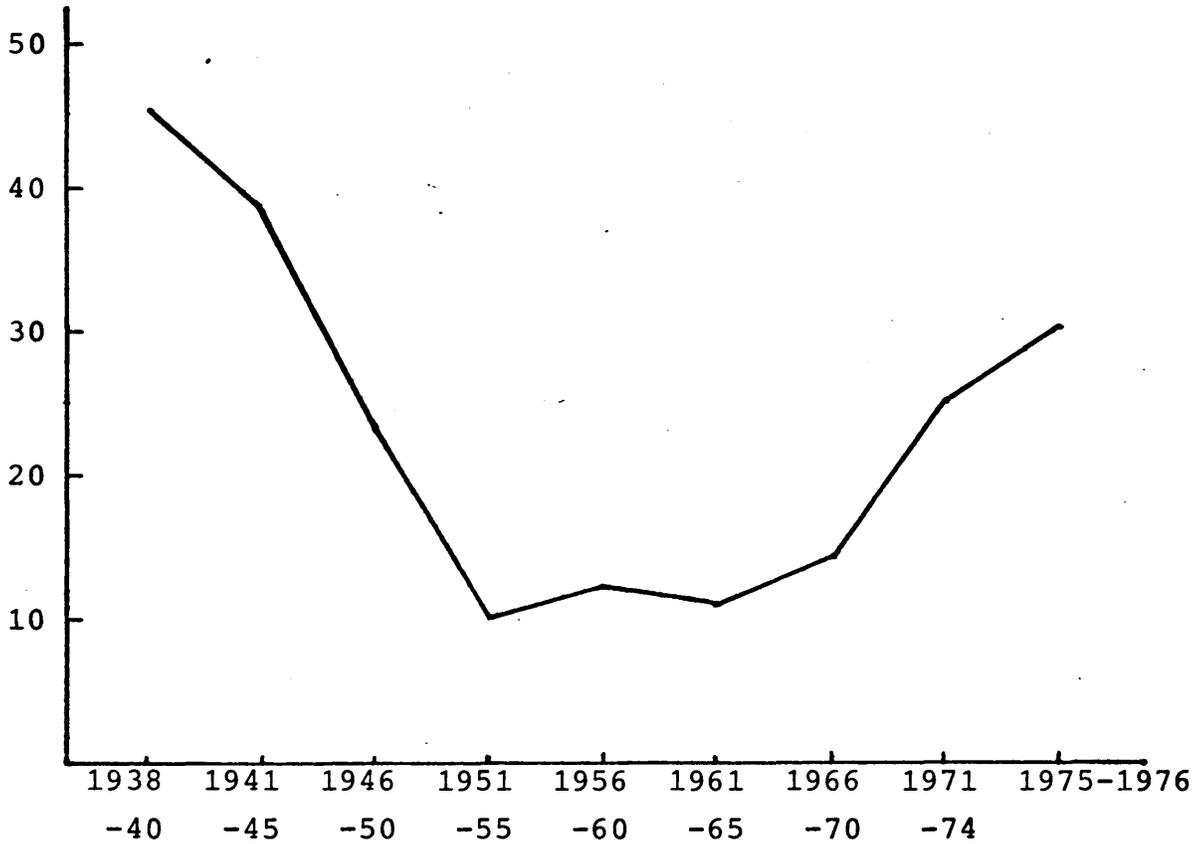
La investigación de los brotes generalmente es incompleta, llevándose a cabo un tiempo después de producirse, por lo que no se puede demostrar que la causa de ellos sea el agua, a pesar del esfuerzo puesto en ello.

Pocas veces, el agente etiológico ha sido aislado del agua. Esto puede ser debido a que el tiempo transcurrido, entre el periodo de latencia de la enfermedad, su diagnóstico y su relación con la fuente de infección, ha sido lo suficientemente grande para que las condiciones de supervivencia hayan variado, con lo que el agente causante ha podido desaparecer y/o las técnicas empleadas para su aislamiento no son lo suficientemente sensibles para poderle aislar. Muchas veces el agua estaba bacteriológicamente o químicamente polucionada.

A pesar de todo esto, la hipótesis de que el agente cau-

sante haya sido portado por el agua, es la explicación más lógica y aceptada. Es decir, el agua ha sido implicada epidemiológicamente como el vehículo de transmisión de las enfermedades. (Weibel y cols 1964; Graun y McCabe, 1973; Comitee Report, 1975; Graun y cols, - 1976; Graun y Guun, 1979).

Fig. 5. Promedio anual del número de brotes de enfermedades portadas por el agua en U.S.A. en el periodo 1938-1976. (Recopilación de Weibel y cols, 1964; Graun y McCabe, 1973; Comitee Report, 1975; Graun y cols, 1976; Graun y Guun, 1979).



Como muestra la gráfica de la Fig. 5, se observa un descenso del promedio anual de brotes en el periodo 1938-1945, haciéndose muy marcado en la década 1945-1955, pasándose de 45 brotes en 1938-1940 a 10 en 1951-1955.

Desde el periodo 1951-1955, no solo no hay nuevos descensos sino que hay un ligero aumento, que se hace más marcado en

el periodo 1971-1974 y 1974-1976, siendo el número promedio anual de 25 y 30 brotes respectivamente. Una de las razones para éste aumento puede ser debido a una mayor información.

Los brotes se han clasificado atendiendo al sistema de agua. Así se agruparon en:

- sistemas públicos. Son los sistemas de suministro de tipo municipipal, y sirven a grandes comunidades.
- sistemas privados. Incluyen a los sistemas de agua individuales como para pequeñas residencias en zonas sin sistemas municipales; a los sistemas semipúblicos, localizados en zonas sin sistemas municipales como grupos de residencias, parques, camping, indus-trias, hoteles, etc.

Tabla 1. Promedio anual de brotes en el periodo 1938-76.

AÑOS	SISTEMAS PUBLICOS	SISTEMAS PRIVADOS	TOTAL SISTEMAS
1938-45	12	26	38
1946-50	6	17	23
1951-55	3	7	10
1956-60	5	7	12
1961-65	3	8	11
1966-70	4	10	14
1971-74	8	17	25
1975-76	8	22	30
Total	49	114	163

La tabla 1 muestra que el promedio anual de brotes en el periodo 1938-1976 es mayor en los sistemas privados que en los pú-blicos. Sin embargo el número de enfermos por brote en igual periodo, tabla 2, es mayor en los sistemas públicos que en los privados (Weibel y cols, 1964; Graun y McCabe, 1973; Comitee Report, 1975; Graun y cols, 1976; Graun y Guun, 1979).

Las diferencias de cifras son lógicas, ya que los siste-mas de agua públicos están más vigilados y controlados, por lo que

Tabla 2. Enfermos por brote en el periodo 1938-1976.

AÑOS	SISTEMAS PUBLICOS	SISTEMAS PRIVADOS	TOTAL SISTEMAS
1938-45	1000	50	340
1946-50	292	43	114
1951-55	333	33	125
1956-60	207	23	103
1961-65	2603	39	680
1966-70	166	93	114
1971-74	365	82	171
1975-76	739	137	270

el número de brotes será menor, sin embargo cuando se produce un brote, éste será mayor ya que sirve a mayor número de personas. Por lo tanto, muchos de los brotes ocurren en sistemas privados, pero la mayoría de los casos de enfermedad portada por el agua ocurren en sistemas públicos.

Durante el periodo 1946-1976 se dieron 516 brotes conocidos atribuidos al agua de bebida, dando el saldo de 105255 enfermos (Weibel y cols, 1964; Werner y cols 1969; Graun y McCabe 1973; Comitee Report, 1975; Graun y cols, 1976; Graun y Guun, 1979).

En la tabla 3 se da la relación de seis enfermedades (agrupaciones etiológicas) comunes en el periodo 1946-1976, brotes y tamaño de ellos

En la tabla 4 se observa que en los sistemas públicos, tanto en el periodo 1946-1974, como en el 1975-1976, hay una relativa distribución uniforme a lo largo de los meses del año, mientras que en los sistemas privados en iguales periodos hay una clara distribución estacional, presentando su máximo en verano y otoño, es decir, las enfermedades portadas por el agua muestran una distribución estacional. (Weibel y cols, 1964; Werner y cols, - 1969; Graun y McCabe, 1973; Comitee Report, 1975; Graun y cols, - 1976; Graun y Guun, 1979). Puede ser debido a que en ésta época se produce un aumento en la contaminación en los suministros de agua o a que estando los suministros siempre contaminados, en éste

Tabla 3. Relación de seis enfermedades en el periodo 1938-76

Periodo	1946-70		1971-76		1946-76	
Enfermedad	brotos casos		brotos casos		brotos casos	
Gastroenteritis	181	45336	89	19221	270	64557
Hepatitis	53	1833	14	368	67	2201
Shigelosis	30	7319	16	4978	46	12297
Veneno químico	12	60	15	546	27	606
Typhoidea	53	610	4	222	57	832
Salmonelosis	13	16730	3	787	16	17517
Suma	342	71888	141	26115	483	98010
Otras	16	470	17	6782	33	7245
Total	358	72358	158	32897	516	105255

Tabla 4. Distribución estacional de los brotes portados por el agua en el periodo 1938-1976.

Sistemas	públicos/100		públicos	privados/100		privados/100
	1946-70	1946-74		1946-70	1946-74	
Meses	1946-70	1946-74	1975-76	1946-70	1946-74	1975-76
Enero	6	5	0	5'8	5	1
Febrero	9'1	8	1	2'9	3	1
Marzo	8'1	8	3	3'7	4	0
Abril	10'1	8	2	6'6	7	3
Mayo	9'1	8	2	7'8	8	5
Junio	6	6	1	10'7	12	12
Julio	9'1	10	2	24'3	22	8
Agosto	9'1	12	2	14'8	16	4
Septiembre	8'1	9	0	9'9	10	1
Octubre	7'1	6	1	8'2	7	2
Noviembre	7'1	9	1	2	3	1
Diciembre	11'1	10	0	3'3	3	1

periodo son usados por un mayor número de personas.

4.2. BROTES DE SALMONELOSIS DE RECONOCIDO ORIGEN HIDRICO EN OTROS PAISES Y ESPAÑA.

En el mes de octubre de 1914, se produjo en Barcelona una epidemia de origen hídrico, casi todos los casos se dieron en la zona baja de la ciudad, abastecida con agua de la mina municipal de Moncada, que había sido contaminada durante los trabajos de canalización. (Prieto, 1971).

Croydon, 1937. Un empleado de los depósitos del agua, que resultó ser un portador urinario fué el causante de la polución del agua. (Prieto, 1971).

En Glion, en 1945, el suministro de agua de una población de 800 personas resultó estar contaminada por el desague de un hotel, que había sido utilizado como campo de refugio en 1945. Se piensa que algunos de los refugiados eran portadores. (Taylor, - 1958; Holden, 1970).

En 1946, en Nenotting, el gérmen causante de la epidemia fué aislado en el suministro de agua de la ciudad. Taylor, 1958; Holden, 1970).

En Klafeld-Geisweid, 1946-47, los análisis de una planta de tratamiento de aguas residuales de una ciudad de 10000 habitantes, demostraron la presencia del gérmen causante de la epidemia. (Taylor, 1958; Holden, 1970).

En 1947 en Kolkura, la causa de la epidemia fué la leche que fué contaminada con agua polucionada de un arroyo. (Taylor, 1958; Holden, 1970).

En Montpellier en 1947, el suministro de agua de un sanatorio con capacidad para 45 personas estaba contaminado por un desague. (Taylor, 1958; Holden, 1970).

BROTOS DE FIEBRE TIFOIDEA Y PARATIFOIDEA DE ORIGEN HIDRICO EN DISTINTOS PAISES.

Nación	Año	Ciudad	n°Casos	Enfermedad
España	1914	Barcelona		S.typhi
Inglaterra	1937	Malton		S.typhi
Inglaterra	1939	Croydon	3100	S.typhi
Suiza	1945	Glion	101	S.typhi
Alemania	1945	Nenotting	415	S.paratyphi B
Alemania	1945-46	Klafeld-Geisweid	300	S.typhi
Nueva Zelanda	1947	Kaikonra	78	S.typhi
Francia	1947	Montpellier	25	S.paratyphi B
Checoslovaquia	1948		37	S.paratyphi A
Alemania	1948	Coppingen	251	S.typhi
Hungría	1950	Hajduboszormeny	44	S.typhi
Holanda	1950-51	Waalwigk	172	S.paratyphi B
Yugoslavia	1951	Podgora	21	S.paratyphi B
Sicilia	1951	Augusta	695	S.typhi
España	1951	Malaga	1349	S.typhi
Alemania	1953	Wurzburg	198	S.typhi
Sicilia	1954	Monreale	58	S.typhi
España	1959	Madrid	1563	S.typhi
Suiza	1964	Zermatt	437	S.typhi
Mejico	1972	Hidalgo y en el distrito federal	6342	S.typhi

En 1948 en Checoslovaquia, algunos de los pacientes de un hospital mental cogían agua de un arroyo. Por encima de éste punto del arroyo desembocaban los efluentes del hospital que era evidentemente la fuente de la infección. (Taylor, 1958; Holden, 1970).

En Hajduboszormeny en 1950, la causa de la infección fué un pozo artesano contaminado por un portador que vivía cerca. En los lados del pozo se aisló el germen causal. (Taylor, 1958; Holden, 1970).

En Waalwigk 1950-51, se pensó que los primeros casos no fueron portados por el agua, pero que el brote fué mantenido por

ella. Dos años más tarde se pensó que la epidemia se prolongó por la infección de la leche por el agua polucionada. (Taylor, 1958; Holden, 1970).

En Padgora, en 1951, la causa fué un pozo mal construido que permitió el acceso de la polución superficial. (Taylor, 1958; Holden, 1970).

Augusta, en 1951, las fuentes de suministro del agua de una ciudad de 25000 habitantes, fueron contaminadas por las aguas residuales de otra ciudad, situada a mayor altitud, como consecuencia de lluvias torrenciales, que sucedieron dos semanas antes. (Taylor, 1958; Holden, 1970).

Malaga, en Enero de 1951, se produjo una contaminación del suministro del agua por aguas residuales dando lugar a un brote de 1349 casos. (Pumarola y cols, 1975; Pumarola y cols, 1980).

En 1953, en Wurzburg, el brote ocurrió a partir de tres portadores de una residencia de ancianos, cuyas aguas residuales iban a una planta de tratamiento y de ahí al río, cuyas aguas se utilizaban como regadío. (Taylor, 1958; Holden, 1970).

En Monreale, 1953, el suministro de agua de una ciudad de 2000 habitantes, consistía en seis fuentes, no protegidas, que se contaminaron con las aguas residuales de un campamento. (Taylor, 1958; Holden, 1970).

Zermat, 1964, se dió un brote epidémico, cuando había 10000 turistas, para celebrar un concurso internacional de esquí. (Prieto, 1971; Pumarola y cols, 1975; Pumarola y cols, 1980).

En el estado de Hidalgo y en el distrito federal de Mexico, en el curso de un brote epidémico, se aislaron cepas de *S. typhi* resistentes al cloranfenicol. (Alcantara, 1978; Pumarola y cols, 1975; Pumarola y cols, 1980).

En España se considera que el 80-90% de los casos de fiebre tifoidea se dan en las comunidades rurales, (Prieto, 1971), donde los abastecimientos del agua se realiza por medio de pozos localizados muy cerca de los pueblos, que muchas veces escapan a un control sanitario adecuado, mientras que los grandes núcleos

cuentan con abastecimientos de agua provistos de instalaciones depuradoras, sistemas de alcantarillado, lo que va a dificultar que se origine algún brote epidémico.

Según Pumarola y cols, 1975, la situación en España era la siguiente.

BROTOS DE FIEBRE TIFOIDEA Y PARATIFOIDEA DE ORIGEN HIDRICO EN ESPAÑA

Año	Localidad(1)	número brotes	número casos
1955	AL,HU,V,B,A	85	1521
1956	AL,GR,V,A	51	1126
1957	HU,T,V,S,AL,PM	58	947
1959	M,B,A,BI	40	2300
1960	HU,GR,B,V,BI	42	475
1961	GR,HU,B,V,BI	42	977
1962	HU,SS,M,V	55	7419
1963	HU,BI,M,V	33	867
1964	M,B,MA,MU,O	5	188

(1) M=Madrid; B=Barcelona; AL=Almeria; HU=Huelva; V=Valencia; A=Alicante; GR=Granada; T=Tarragona; S=Santander; PM=Baleares; BI=Vizcaya; SS=Guipuzcoa; MA=Malaga; MU=Murcia;)=Oviedo.

La disminución de brotes de *S. typhi* y otras *Salmonellas* además de otros gérmenes portados por el agua se debe a varios factores:

- establecimiento de una red de abastecimiento de agua
- adopción de sistemas de depuración
- cloración del agua
- depósitos y conducciones de agua estrechamente vigilados
- eliminación sanitaria de las heces humanas

Mills Lawrence y Reinke en Hamburgo, comprobaron casi simultáneamente en 1893, que la filtración y depuración de las aguas de abastecimiento producen un descenso, de la mortalidad por fiebre tifoidea, y más acusado aún sobre la mortalidad general " fenómeno de Mills-Reinke ". Esto condujo a Hazen a postular el teorema

que por cada defunción que se evite por fiebre tifoidea, también se evitan de dos a tres muertes debidas a otras causas " teorema de Hanzen ". (Prieto, 1971).

La disminución del tifus en Gran Bretaña, constituye uno de los triunfos de la medicina preventiva, habiéndolo sido debido a una mejora de las condiciones de la higiene y a la disponibilidad de agua potable abundante. La fiebre tifoidea se emplea como tasa del índice de la eficacia de las medidas sanitarias de la comunidad. (Taylor, 1958; Holden, 1970).

II. NUEVA METODOLOGIA DE DETECCION DE SALMONELLAS

1. REVISIÓN DE LOS PRINCIPIOS DE AISLAMIENTO DE SALMONELLAS.

Para poder estudiar la ecología y epidemiología de las Salmonellas en las aguas polucionadas del Canal del Jarama, lo primero que hicimos fué realizar una revisión bibliográfica, acerca de los medios y metodologías existentes para el aislamiento de Salmonellas.

Al realizar la revisión, nos dimos cuenta que el aislamiento del microorganismo perteneciente al género Salmonella es muy difícil y complejo, especialmente cuando su número es relativamente pequeño en comparación al total de la población bacteriana presente en la muestra, ya que las metodologías no son ni muy fiables ni presentan una gran reproductividad; es decir, todavía no se ha encontrado la metodología lo suficientemente sensible para tener una aceptación universal.

Creemos que la recopilación que presentamos de los principios de aislamiento de Salmonellas, es interesante ya que no es fácil encontrar un estudio comparativo de ellos. En el apartado 1.9, presentamos las conclusiones prácticas más interesantes a tener en cuenta a la hora de intentar detectar Salmonellas. Son el resultado de comparar y sopesar las distintas recomendaciones dadas por los investigadores interesados en el tema.

A pesar de los grandes avances logrados, desgraciadamente todavía no se ha encontrado ni el medio ideal, ni la metodología adecuada que permitan el crecimiento de todos los serotipos de Salmonellas, en la actualidad más de 1.800 (Youmans y cols, 1975; Morse y Duncan, 1976), y que al mismo tiempo suprima el crecimiento de otros microorganismos relacionados con ellos, que suelen estar y en gran número en las muestras a analizar.

A continuación vamos a ver las condiciones, que de acuerdo con la revisión y actualización de la bibliografía sobre los temas creemos son más importantes para el aislamiento de Salmonellas, es decir, los principios que hacen que un medio de enriquecimiento, una metodología pase de ineficaz a eficaz o simplemente aumente su rendimiento y si es posible, hallar las condiciones más óptimas

que se requieren para tener éxito en la detección de Salmonellas.

Para ello, se ha recogido la información anterior al año 1966 en distintos tratados de bacteriología (Veratti y Bianchi, 1953; Buttiaux y cols, 1966; Georgola y Boothroyd, 1969; Ministère Affaires Sociales, 1969; Le Minor, 1972; Edwards y Ewing, 1972; Lennette y cols, 1974; Manual Bergey, 1974; Pharm, Acta Helvetica, 1976) y se ha actualizado la información a partir de 1966 mediante la revisión de separatas, además de haberse consultado algunas anteriores a ésta fecha por encontrarlas de interés para nuestro trabajo. Se han agrupado por factores comunes, con arreglo a un orden metodológico, generalmente seguido por los distintos investigadores interesados en el tema, que es la forma que nos proporciona la mayor fuente de información y de la manera más clara, ordenandola del siguiente modo:

- pre-enriquecimiento
- enriquecimiento
- medios de aislamiento
- identificación

1.1. PRE-ENRIQUECIMIENTO EN MEDIOS NO SELECTIVOS.

El uso de medios líquidos no selectivos para recuperar organismos que están dañados y que son incapaces de multiplicarse, si son inoculados directamente en los caldos de enriquecimiento selectivos, se debe entre otros autores a Thomson que en 1953 consiguió aislar *S. paratyphi B* a lo largo de un año, cuando se inoculaban muestras de harina contaminadas previamente, en caldo nutriente antes de sembrarla sobre el agar de MacConkey verde brillante y solamente durante cinco meses, cuando la muestra de harina se inoculaba en caldo de selenito F (Harvey y Price, 1979).

Actualmente lo que se hace es utilizar una combinación de cultivo en medio no selectivo, seguido por enriquecimiento en medio selectivo, para posterior aislamiento sobre los medios sólidos. A éste conjunto de pasos se denomina pre-enriquecimiento.

A continuación vamos a citar algunos de los investigadores que han estudiado la misma problemática.

Taylor y Sillike, 1961, analizando muestras de huevos observaron que el pre-enriquecimiento en medio no selectivo seguido por enriquecimiento en medio selectivo, se mostraba muy superiores al enriquecimiento directo en SC o TBG. Recomiendan que se use para aceptar el inóculo del pre-enriquecimiento el TBG. Comparando medios no selectivos, dulcitol, manitol, lactosa, comprobaron que el carbohidrato añadido no tiene importancia.

Taylor, 1961, estudiando muestras de huevo, comparó dos métodos para el aislamiento de Salmonellas, Los resultados muestran que el pre-enriquecimiento en caldo de manitol, seguido por enriquecimiento en medio selectivo, se muestra superior al enriquecimiento directo. Da mejores resultados el TBG que el SC como medio selectivo.

Edel y Kampelmacher, 1968, 1969, realizaron un estudio comparativo en ocho y nueve laboratorios respectivamente, para determinar si el método de pre-enriquecimiento en un medio no selectivo, seguido por enriquecimiento en medio selectivo que utilizaban algunos laboratorios, era superior al enriquecimiento directo. Para ello utilizaron tres tipos de muestras:

- heces contaminadas artificialmente
- carne contaminada artificialmente
- carne contaminada naturalmente.

Con las muestras de heces, en algunos experimentos, no se encontraban diferencias entre laboratorios, mientras que en otros el enriquecimiento directo se mostraba superior al pre-enriquecimiento.

Con las muestras de carne contaminadas artificialmente, excepto un laboratorio que utilizaba el caldo de enterobacterias como medio no selectivo, que presentó resultados similares a los que utilizaron enriquecimiento directo, en los demás el enriqueci-

miento directo era superior al pre-enriquecimiento.

Con las muestras de carne naturales, las diferencias fueron mayores entre laboratorios que cuando utilizaron las muestras contaminadas artificialmente. El método de enriquecimiento se mostró superior al pre-enriquecimiento, excepto en un laboratorio que mostró resultados similares. Este utilizaba el caldo de enterobacterias como medio selectivo.

A la vista de los resultados proponen como método standard, el enriquecimiento directo en TMK incubado a 43°C, durante 48 horas,

Leclerc y cols 1970, b, a partir de muestras de aguas residuales compararon dos metodologías:

- pre-enriquecimiento en un medio no selectivo seguido por enriquecimiento selectivo
- enriquecimiento directo en medio selectivo.

Aunque el número de muestras analizadas no es el mismo, si lo es su origen y por tanto a la vista de los resultados se puede decir:

- que el pre-enriquecimiento en caldo ordinario con novobiocina incubado a 37°C, 24 horas se muestra algo superior al enriquecimiento directo sobre selenito F o SBG incubado a 37°C, 24 horas (27%, 16% y 20% respectivamente).
- que el enriquecimiento directo con selenito F incubado a 40°C, durante 48 horas es igual de eficaz que el pre-enriquecimiento (27%).
- que el enriquecimiento directo sobre selenito F a 43°C, durante 48 horas es el método más eficaz (70%).

Edel y Kampelmacher, 1973, realizaron un estudio comparativo en el aislamiento de Salmonellas dañadas en nueve laboratorios, para determinar si el método de pre-enriquecimiento en agua de peptona incubado a 37°C, 24 horas, seguido por un enriquecimiento en TMK incubado a 43°C, 24 horas, era más eficaz que el método

de enriquecimiento directo en TMK incubado a 43°C, 24 horas.

Los resultados del análisis de las 120 muestras de carne contaminadas artificialmente, muestran que con el método de pre-enriquecimiento todos los laboratorios aislaron las Salmonellas, siendo la media del 95%, presentando pequeñas variaciones entre la laboratorios. Por el método de enriquecimiento directo, la media bajó hasta el 51,7% y aunque todos los laboratorios las aislaron las variaciones entre laboratorios fueron grandes.

Los resultados del análisis de las 150 muestras de carne contaminada naturalmente, muestran que el número de muestras positivas descendió fuertemente, siendo positivas por el método de pre enriquecimiento 33 muestras, y por el método de enriquecimiento directo 25 (16,7%).

Cuando se prolonga el tiempo de incubación del medio de enriquecimiento de 24 a 48 horas, se obtienen mejores resultados.

Como vemos el método de pre-enriquecimiento se muestra superior con las muestras contaminadas artificialmente, pero con muestras naturales la diferencia es muy pequeña.

Andrews y cols, 1974, analizando muestras de alimentos para caracoles y los propios caracoles, llegaron a las mismas conclusiones que Andrews, 1973, a partir de muestras de rana, es decir, que el pre-enriquecimiento en caldo lactosado seguido por el enriquecimiento en SC o CT era menos eficaz que el enriquecimiento directo sobre SC o CT y que ambos caldos daban resultados similares.

Sayler y cols, 1976, analizaron 131 muestras de agua y sedimento en la Bahía de Upper Chesapeake, para comparar la eficacia de tres metodologías en el aislamiento de Salmonellas:

- enriquecimiento selectivo incubado a 35°C, durante 24 horas
- enriquecimiento selectivo incubado a 41,5°C, durante 24 horas
- pre-enriquecimiento no selectivo en caldo de lactosa incubado a 25°C, durante 4 horas, seguido por una incubación a 35°C durante

24 horas que se inoculaban en caldo de SC incubándose a 41,5°C durante 24 horas.

En el primero y segundo método, los medios selectivos empleados fueron el caldo de selenito F, SC, y el tetracionato.

Las Salmonellas únicamente fueron aisladas con el tercer método, siendo el número de muestras positivas el de cuatro (3%).

Thomason y Dodd, 1976, a partir de muestras de carne observaron que el pre-enriquecimiento en caldo lactosado, no mostraba ninguna ventaja para detectar Salmonellas sobre la técnica de enriquecimiento directo o la técnica de anticuerpos fluorescentes.

Una vez determinado que el método de pre-enriquecimiento era más efectivo que el enriquecimiento directo, Kaper y cols, 1977, prosiguieron sus estudios en la Bahía de Chesapeake, comparando tres caldos de enriquecimiento no selectivos, para determinar cual era más efectivo. De las 72 muestras analizadas, 17 resultaron positivas (23,6%). Aunque el caldo de dulcitol e inositol, mostraron igual de eficacia, a partir del primero se obtuvieron más serotipos. El caldo de lactosa fué el menos eficaz y el que produjo mayor interferencias, por permitir el sobrecrecimiento de otras bacterias entéricas.

Suen y Hartemen, 1977, analizaron cinco tipos de alimentos para determinar cuál es el método más eficaz, si el pre-enriquecimiento en caldo de lactosa incubado a 35°C, durante 24 horas, seguido por enriquecimiento en SC o CT, incubados a 35°C, durante 24 horas o el método de "timed release capsule". En éste método la muestra se inocula en caldo de lactosa y a la vez se coloca la capsula de selenito o tetracionato, incubándose a 35°C, durante 24 horas. El método convencional se mostró superior al de las cápsulas y los dos caldos de enriquecimiento se comportaron por igual.

Tamminga y cols, 1978, por la técnica de pre-enriquecimiento en BPW, incubado a 37°C, 16-18 horas y enriquecimiento en TMK incubado a 42°C, durante 24-48 horas, detectaron Salmonellas en 23 de las 103 muestras de vegetales analizadas (22,3%).

Thomason y Dodd, 1978, examinando muestras de carne observaron que el pre-enriquecimiento en caldo de lactosa o en agua de peptona, seguido por enriquecimiento en CT, se mostraba menos eficaz que el enriquecimiento directo en CT.

Como se ve, los intentos de mejorar los resultados obtenidos por los medios selectivos de enriquecimiento normalmente utilizados, han dado poco fruto para alimentos contaminados naturalmente, mejorando a veces su rendimiento en los alimentos contaminados artificialmente. En cuanto a su utilización en el estudio de la contaminación de las aguas por Salmonellas, de los autores que hemos encontrado, Leclerc y cols, 1970, mejoran sus resultados por el enriquecimiento directo, Sayler y cols, 1976, así como Kaper y cols, 1977, encuentran mejores resultados con el pre-enriquecimiento. Creemos que ésta disparidad es debido a los distintos tiempos de incubación de los medios de enriquecimiento empleados.

1.2. MEDIOS SELECTIVOS DE ENRIQUECIMIENTO.

Se cita como la primera referencia de un método de enriquecimiento, el trabajo de Vicent, que en 1890 utilizó cinco gotas al 5% (W/V) de fenol en 10 ml de caldo. Este era inoculado 5-10 gotas de agua polucionada por aguas residuales, incubándose a 42°C. Si a las 8-12 horas de incubación se había producido crecimiento, se hacía un subcultivo en nuevos tubos de fenol. Estos se incubaban de nuevo a 42°C y subcultivados en caldo nutriente y en placas de agar nutriente (Harvey Price, 1979).

El uso de medios líquidos de enriquecimiento, se considera necesario para el aislamiento de Salmonellas en cualquier tipo de muestra, especialmente an aguas, donde su número es pequeño en comparación al total de la flora bacteriana presente en la misma.

De los diversos medios de enriquecimiento utilizados por diversos autores como, ruys, sulfito, rapapport, bilis los dos medios que se recomiendan en la mayoría, por no decir la totalidad de los trabajos encaminados a detectar Salmonellas en cualquier tipo de muestras, son los medios con selenito o tetracionato.

1.2.1. Medios de enriquecimiento con base de selenito.

Se atribuye a Guth en 1916, ser el primero en usar el caldo de selenito de sodio para aislar *S. typhi* (Leifson, 1936). Se basó en los trabajos de Klett que en 1910 encontró que el selenito de sodio al 0'1% tenía propiedades inhibitorias en el crecimiento bacteriano (Harvey Price, 1979). Sin embargo, no se empezó a usar de manera general, como caldo de enriquecimiento hasta que Leifson, 1936, desarrolló varios caldos que contenían diferentes concentraciones de selenito de sodio.

Desde entonces se han producido muchas modificaciones, con el intento de lograr una mayor eficacia en el aislamiento de Salmonellas, pero todas siguen manteniendo al selenito como elemento base que da nombre al medio.

A continuación vamos a citar los resultados obtenidos por los diversos autores que han usado el medio de selenito.

Harvey y Price, 1969, analizaron las aguas superficiales y residuales de un estado en el que habitaban 4.000 personas empleando el caldo de selenito F, como medio de enriquecimiento. No aislaron Salmonellas de las muestras de aguas superficiales mientras que se aislaban frecuentemente de las aguas residuales. Sus quince lugares de muestreo resultaron positivos.

Smith y Twedt, 1971, utilizaron el dulcitol selenito como medio de enriquecimiento para detectar Salmonellas en los ríos Saline y Huron, en USA. En el río Saline, analizaron 126 muestras tomadas en 10 lugares de muestreo, resultando positivos cuatro. En el río Huron, analizaron 169 muestras tomadas en 20 sitios, resultando dos positivos.

Leclerc, 1971, realizó un estudio a lo largo de los años 1966-1970, para detectar la presencia de Salmonellas en afluentes, lodos y efluentes de distintas plantas de tratamiento de aguas residuales en Francia, empleando el caldo de selenito F como medio de enriquecimiento. En el período 1966-1968, aisló Salmonellas en cuatro muestras de 27 afluentes, en 13 de 27 lodos y en cuatro de

27 efluentes. En el año 1969 las aisló en 15 de 19 afluentes, en 25 de 40 lodos y en 30 de 39 afluentes.

Pervery y cols, 1972, analizando 2.372 muestras de aguas superficiales, residuales, afluentes y efluentes de plantas de tratamiento en Francia, empleando el SBG-sulfa detectaron Salmonellas en el 5% de las muestras.

Nabbut, 1973, detectó Salmonellas en todas las muestras de aguas residuales analizadas en la ciudad de Beirut. Utilizando el mismo medio de enriquecimiento, el caldo de selenito, analizó 150 muestras de heces, de las que resultaron 12 positivas (8%).

Smith y cols, 1973, continuando los estudios de 1971 y empleando el dulcitol selenito, analizaron 226 muestras de agua del río Saline de las que resultaron positivas 28 (12%) y 226 muestras del río Huron resultando 26 positivas (11%).

Phirke, 1974, utilizando el SBG como caldo de enriquecimiento detectó Salmonellas en las 17 muestras de aguas residuales analizadas.

Coleman y cols, 1974, analizando muestras de agua de río, aislaron Salmonellas solamente en una muestra empleando el caldo de selenito como medio de enriquecimiento.

Brisou y Boudon, 1974, estudiando 69 muestras de aguas residuales de la ciudad de Toulon de 185.000 habitantes, aislaron 65 cepas de Salmonellas pertenecientes a 17 serotipos, empleando el caldo de selenito F.

Sayler y cols, 1976, analizaron 131 muestras de agua y sedimento de la Bahía de Upper Chesapeake, utilizando la técnica de pre-enriquecimiento no selectivo seguido por enriquecimiento en selenito cistina, resultando positivas cuatro muestras (3%).

Kaper y cols, 1977, con la técnica de pre-enriquecimiento en caldo no selectivo y utilizando el selenito cistina como medio de enriquecimiento, analizaron 72 muestras de las que resultaron 17 positivas.

1.2.2. Medios de enriquecimiento con base de tetracionato.

Se atribuye a Muller en 1923, el empleo del caldo de tetracionato sódico como medio de enriquecimiento. En los años 1930 y 1935 Kauffman modificó el caldo de Muller por adición de sales biliares y verde brillante para suprimir el crecimiento de especies de Proteus (Harvey y Price, 1979).

Desde entonces se han producido muchas modificaciones con el intento de lograr una mayor eficacia en el aislamiento de Salmonellas, pero todas siguen manteniendo al tetracionato como elemento base que da nombre al medio.

A continuación vamos a citar a diversos autores que usaron el medio de tetracionato.

Selijman y Reitter, 1965, utilizaron el TMK para analizar 400 muestras de agua de pozo en Israel. Solamente detectaron Salmonellas en nueve muestras (2,2%).

Grunnet y Nielsen, 1969, analizaron diversos tipos de agua en Dinamarca, empleando el caldo de tetracionato, obteniendo los siguientes resultados:

- de 263 muestras de agua de golfo de Aarhus aislaron Salmonellas en 120 (45%).
- de 28 muestras de efluentes de plantas de tratamiento, 24 resultaron positivas (85%).
- de 23 muestras de afluentes de plantas de tratamiento, 22 resultaron positivas (95%).

Kampelmacher y Noorle Jansen, 1971, utilizaron el TMK para analizar 1.176 muestras de estiércol, heces y agua, resultando positivas 514 (43%). Los peores resultados los obtuvieron al analizar las muestras de agua que presentaron Salmonellas en el 30%.

Kampelmacher y Noorle Jansen, 1973, estudiaron la incidencia de Salmonellas en dos plantas de tratamiento, empleando el TMK. En la primera planta analizaron 38 muestras de efluentes, re-

sultando positivas 22 (57%). De 13 muestras del líquido circulante en las 13 (100%) detectaron Salmonellas.

Posteriormente ampliaron sus estudios, analizando muestras de las aguas residuales de una factoría de pollería cercana a la planta, líquido circulante y el efluente. Solamente se detectaron Salmonellas en el líquido circulante y no en las aguas residuales. En la segunda planta analizaron 46 muestras del efluente, resultando positivas 12 (30%). Posteriormente analizaron las aguas residuales de una factoría de cerdos cercana a la planta, el líquido circulante y el efluente de la planta. Se detectaron Salmonellas en los tres lugares estudiados.

Luppi y cols, 1973, utilizando el caldo de tetracionato aislaron Salmonellas en 48 muestras (19'7%) de las 243 analizadas de las aguas del río Po en Italia.

Wüthe, 1973, analizó 1036 muestras de aguas dulces y saladas que presentaron distinto grado de polución, utilizando el caldo de tetracionato. Detectó Salmonellas en 491 muestras (47'5%)

Wells y cols, 1974, a partir de 50 muestras de tortugas, empleando el TBG, aislaron Salmonellas en el 72% y 98% atendiendo si era la tortuga entera o heces y órganos respectivamente.

Trichopoulos y cols, 1975, analizaron las aguas residuales de la ciudad de Atenas, Grecia, usando el TMK. De 50 muestras, 36 resultaron positivas (72%).

Dondero y cols, 1977, realizaron un estudio de las aguas superficiales de seis arroyos tributarios del lago Cayuga y del propio lago en USA, empleando el caldo de tetracionato. De 332 muestras, 129 resultaron positivas (39%).

Goyal y cols, 1977, analizaron las aguas y sedimentos de canales comunales en Texas, USA, utilizando el CTBG. Detectaron Salmonellas en una muestra de agua y en el 17% de las muestras de sedimento.

Stelzer y cols, 1977, analizaron 378 muestras del río Weissen Elster, DDR, empleando el caldo de tetracionato. Resulta-

ron positivas 146 (38'6%).

Tamminga y cols, 1978, utilizando el TMK como medio de enriquecimiento, detectaron Salmonellas en 23 de las 103 muestras vegetales analizadas (22'3%).

Thomason y Dodd, 1978, a partir de muestras de carne analizaron 208 muestras de las que 36 resultaron positivas con el caldo de tetracionato (17%).

1.2.3. Comparación entre los dos medios de enriquecimiento.

Como vamos a ver algunos autores, se han interesado en conocer qué medio era más adecuado para el aislamiento de Salmone-llas. Con tal finalidad hacían análisis simultáneos comparativos.

Taylor y Selliker, 1961, al igual que Taylor, 1961, com- parando dos caldos de enriquecimiento, SC y TBG, observaron que mientras uno era superior en un experimento, en el siguiente, el otro medio se mostraba más eficaz. Es decir no hay diferencias claras entre los dos medios, al examinar muestras de huevos.

Spino, 1966, al analizar las aguas superficiales de va- rios arroyos en USA, obtiene mayor número de colonias sospechosas de ser Salmonellas y posteriormente confirmadas cuando el inóculo procede del SBG-sulfa que desde el TBG, 60% y 40% respectivamente.

Edel y Kampelmacher, 1968, 1969, utilizando como muestras heces y carne contaminadas artificialmente, realizaron un estudio comparativo inter-laboratorios para el aislamiento de Salmonellas. De los distintos caldos de enriquecimiento empleados, tetracionato, TMK, selenito F, SC. A la vista de los resultados proponen como caldo de enriquecimiento el TMK.

Brezenski y Russomanno, 1969, analizaron 150 muestras de agua de estuario en USA, utilizando el tetracionato y el selenito, como medios de enriquecimiento resultando positivas 62 muestras (41%). Se obtuvieron mejores resultados con el tetracionato.

Leclerc y cols, 1970 a, realizaron un estudio comparati- vo sobre aguas contaminadas artificialmente, para ello utilizaron

tres medios de enriquecimiento, tetracionato, selenito F y sulfito. Los resultados muestran que los dos primeros medios se comportan iguales y superiores al sulfito.

Leclerc y cols, 1970 b, estudiando aguas contaminadas naturalmente comprobaron que el selenito F y el tetracionato se comportaban igual que cuando había un pre-enriquecimiento, 27% de muestras positivas. Con la técnica de inoculación directa el SBG se mostraba algo más eficaz que el selenito F, 20% y 16,5% respectivamente, con la temperatura de incubación de 37°C. Con la temperatura de 40°C, el número de muestras positivas con el selenito F, era el 15% y con la temperatura de 43°C, 8,7%.

Cherry y cols, 1972, comprobaron que al analizar 75 muestras de aguas superficiales de varios arroyos en USA, cuando se utilizaba el tetracionato se obtenía mayor número de muestras positivas (65,3%) que cuando se empleaba el caldo de selenito cistina (34%).

Baquero, 1972, realizó un estudio comparativo de dos caldos de enriquecimiento para determinar cual era el más eficaz en los análisis de coprocultivos de enfermos y portadores. De cada 100 coprocultivos positivos en el aislamiento de *S. typhi*, con el TBG se aisló 60 veces, mientras que con el SBG se aisló 83 veces. De cada 100 coprocultivos positivos en el aislamiento de otras *Salmonellas* distintas a *S. typhi*, el TBG las aisló 73 veces y el SBG 90 veces.

Dutka y Bell, 1973, para estudiar la incidencia de *Salmonellas* en las aguas superficiales de la Bahía de Quite y del río St. Lawrence, USA, analizaron 552 muestras tomadas de 46 lugares, de las que 165 resultaron positivas (31%). Aunque se mostró más eficaz el tetracionato que el selenito, el número de colonias sospechosas y después confirmadas, era mayor cuando la siembra procedía del selenito.

Pollock y Dahlgren, 1974, analizando 455 coprocultivos obtuvieron mejores resultados cuando utilizaron el caldo de selenito que el caldo de tetracionato, además observaron que éste medio

aumentaba el número de colonias falsas positivas, cuando desde él se sembraban los medios sólidos de aislamiento.

Kenner y Clark, 1974, realizaron un estudio sobre aguas residuales, para comparar la eficacia de varios caldos de enriquecimiento para el aislamiento de Salmonellas. Estos resultados fueron el tetracionato con o sin verde brillante, selenito F, SC, SBG con o sin sulfa y el caldo gram negativo. El medio que presentó mejores resultados fué el SBG-sulfa que de 13 muestras analizadas seis resultaron positivas (46%). Posteriormente analizaron 28 muestras de aguas residuales empleando el dulcitol selenito, resultando positivas las 28 (100%). Por lo que seleccionaron el medio de dulcitol selenito frente a todos los demás. con éste medio analizaron 183 muestras de las que resultaron positivas 114. Los resultados parciales fueron para aguas residuales 100%, ríos 75%, efluentes de lodos activados 80%, los mismos efluentes clorados 0, cisternas suburbanas 40% y agua de tormenta 50%. Como vemos el medio aumenta su rendimiento al aumentar el grado de polución.

Andrews y cols, 1974, analizaron 270 muestras de alimentos utilizando el SC y el CT como medios de enriquecimiento. El 31% de las muestras resultaron positivas, mostrándose los dos medios igual de eficaces.

Harvey y cols, 1975, realizaron un estudio comparativo de seis lotes de dos diferentes medios de enriquecimiento, el caldo de tetracionato y el selenito F, en tres tipos de materiales, aguas residuales, desperdicios de pollos y cultivos puros de Salmonellas. Los resultados muestran que con cultivos puros, los lotes de selenito se comportan por igual. Con aguas residuales, los lotes de los dos medios no se comportan por igual, presentando el CT mayores variaciones. Con desperdicios de pollo se producen menores variaciones.

Sayler y cols, 1976, utilizando tres medios de enriquecimiento el selenito F, SC y CT, no consiguieron aislar Salmonellas al analizar 131 muestras de agua y sedimento de la Bahía de Upper Chesapeake, USA.

Morse y Duncan, 1976, analizando muestras de agua, sedimento, peces y almejas de dos ríos en USA, utilizando el SC y CT aislaron 131 cepas de Salmonellas.

Andrews y cols, 1977, analizando muestras de rana y agua de acuario, comprobaron que el selenito f presentaba mejores resultados que el tetracionato.

Kafel y Bryan, 1977, a partir de muestras de carne contaminadas artificialmente, estudiaron la eficacia de tres medios de enriquecimiento, selenito F, TMK y caldo de bilis. Los resultados muestran que el selenito F y el TMK se presentaron igual de eficaces, 35% de muestras positivas y superior al caldo de bilis, 30% de muestras positivas. De los 11 serotipos estudiados, S. typhimurium fué el que más frecuentemente se aisló, pero ninguno de los medios lo detectó en más del 60%. S. abortus ovis, fué el menos frecuente.

Vanderpost y Bell, 1977, analizando 30 muestras de agua de una planta empaquetadora de carne, aislaron Salmonellas en el 19% de las muestras, no encontrando diferencias entre el CT y el CS.

Kaper y cols, 1977, al analizar 44 muestras de agua y sedimento por la técnica de pre-enriquecimiento y la técnica de enriquecimiento directo, no encontraron diferencias entre los dos medios de enriquecimiento, el CT y el SC, aunque sí entre las dos técnicas, con la primera resultaron positivas 11 muestras y con la segunda ninguna.

Estos dos medios de enriquecimiento, no se comportan por igual frente a la gran variedad de serotipos de Salmonellas, ya que uno ejerce un efecto tóxico mayor que el otro sobre algunos serotipos. Así:

Leifson, 1936, demostró propiedades tóxicas del caldo selenito F en S. cholerae-suis.

Banwart y Ayres, 1953, observaron que el tetracionato ejercía un efecto tóxico sobre S. paratyphi A, mientras que no era inhibido por selenito F.

Stokes y Osborne, 1955, comprobaron efectos tóxicos del SBG sobre *S. pullorum*.

Raj, 1966, observó un pequeño efecto tóxico del dulcitol sobre *S. montevideo*, *S. enteritidis* y *S. worthington*.

Baquero, 1972, observó que el tetrionato se mostraba menos tóxico para *S. paratyphi B* y *S. typhimurium* que para *S. typhi* y *S. enteritidis*. El caldo de SBG se mostró nada tóxico para *S. enteritidis* y sí algo para *S. typhimurium* y *S. typhi*. Aunque los dos medios presentaban algo de toxicidad para *S. typhi*, el efecto era mucho mayor con el tetrionato que con el selenito.

Nabbut, 1973, estudiando muestras de heces contaminadas artificialmente, encontró que el SBG se mostraba algo tóxico para *S. typhi*, *S. typhimurium* y *S. paratyphi B*, tanto a 37°C como a la temperatura de 41°C, si bien la toxicidad era mayor a 41°C. Con cultivos puros observó que el SBG a 41°C era inhibitorio para *S. typhimurium* y nada para *S. paratyphi A* y muy tóxico para *S. typhi*.

Kafel y Bryan, 1977, en un previo trabajo, observaron efectos tóxicos del selenito en *S. typhimurium*, *S. abortus ovis*, *S. typhi suis*, *S. newport*, *S. rostock*, *S. enteritidis* y *S. montevideo*. En el presente trabajo encontraron que el caldo de tetrionato y selenito eran tóxicos para *S. typhimurium*, *S. london*, *S. anatum* y *S. montevideo*, y muy tóxicos para *S. newport*, *S. pullorum*, *S. abortus ovis* y *S. cholerae-suis*, si bien el selenito era menos tóxico para *S. cholerae-suis* que el tetrionato.

1.3. TECNICA DE SUBCULTIVOS EN MEDIOS SELECTIVOS.

A pesar del aumento del rendimiento en el aislamiento de Salmonellas, producido sobre todo por la técnica de elevada temperatura y en menor grado por la prolongación del tiempo de incubación, no se ha conseguido los resultados apetecidos, por lo que se prosiguieron los estudios, introduciendo nuevas variantes como la técnica de subcultivos.

Taylor y Silliker, 1961, observaron que para el aislamiento de Salmonellas a partir de muestras de huevo, se mostraba

más eficaz el enriquecimiento de TBG o SC, que cuando se hacía un subcultivo en el mismo medio o en el otro. Todos los caldos se incubaron a 37°C, durante 24 horas.

Kruger, 1972, analizó 184 muestras de plantas de tratamiento de aguas residuales, lagos y playas en la zona de Berlín, para determinar si el enriquecimiento del caldo de tetrionato incubado a 37°C, 24 horas, era más eficaz en el aislamiento de Salmonellas que cuando se hacía un subcultivo del caldo de tetrionato en el caldo de selenito, incubándose a su vez a 37°C durante 24 horas. Con la combinación de los dos métodos se aislaron Salmonellas en 46 muestras, 25%, aislándose 98 cepas pertenecientes a 18 serotipos. Con el enriquecimiento directo de tetrionato, se aislaron el 50% de los serotipos y el 26% de las cepas, mientras que con el método de subcultivo en selenito se aislaron el 88'8% de los serotipos y 86'7% de las cepas.

Como vemos el método de subcultivo aumenta, no sólo el número de muestras, sino que aumenta el número de cepas y el de serotipos.

En el periodo de 1965 a 1970, Wuthe, 1973, en Alemania analizó 10.346 muestras de aguas dulces y saladas que presentaban distinto grado de polución, para comparar dos metodologías, la tradicional de incubar el caldo de tetrionato a 37°C, 24 horas (a) y la de subcultivos, a las 24 horas de incubación se hacía un pase a tetrionato que se incubaba a 37°C, 24 horas (b), volviéndose a hacer otro pase a tetrionato e incubándose a 37°C, 24 horas (c). Antes de hacer el pase se sembraba sobre los medios de aislamiento por ellos seleccionados. Se detectaron Salmonellas en 491 muestras (4'75%) por las dos metodologías. Los resultados en las distintas fases fueron:

- en a, 26% de las muestras positivas.
- en b, 45% de las muestras positivas.
- en c, 68% de las muestras positivas.

Así podemos concluir que con la técnica de subcultivos

se aumenta significativamente el rendimiento de los medios. *S. typhi* no se aisló en las muestras de agua. En ensayos de laboratorio no crece bien en caldo de tetracionato, a pesar de que no se aisló por el método de subcultivos, con la temperatura de incubación de 37°C, en las primeras fases, sí que se aisló en la última fase (c).

Trichopoulos y cols, 1975, analizaron las aguas residuales de la ciudad de Atenas, Grecia, para comparar tres métodos de enriquecimiento para el aislamiento de Salmonellas. Sumergió 50 compresas duplicadas durante dos días y después:

- las compresas eran inoculadas en TMK que se incubaba a 43°C, 24 horas
- se hace un subcultivo en caldo de rappaport desde el TMK, incubándose a 37°C, 24 horas,
- las compresas se inoculan en HI que se incubaba a 43°C, de 16 a 18 horas y se hace un subcultivo en caldo de rappaport, incubándose a 37°C, 24 horas.

Con la combinación de los tres métodos, el 96% de las compresas resultaron positivas para el aislamiento de Salmonellas. Usando el primero, fueron positivas 36 (72%), con el segundo 44 (88%) y empleando el tercero 46 resultaron positivas (92%).

Aunque con el tercer método, el número de muestras positivas era mayor, se aislaron menos serotipos que con los otros dos.

Kafel y Bryan, 1977, a partir de muestras de carne contaminadas artificialmente, realizaron un estudio comparativo para ver si el enriquecimiento directo en TMK, selenito F y en caldo de bilis, era superior a un segundo enriquecimiento o subcultivo en selenito F o en TMK. A pesar de la gran variación de los resultados obtenidos, se puede concluir que un segundo enriquecimiento sobre el mismo medio primario o sobre otro, aumenta la eficacia del aislamiento.

Stelzer y cols, 1977, analizaron las aguas del río Weissen Elster, DDR, a lo largo de seis puntos de muestreo por el método de subcultivos y el enriquecimiento directo en caldo de ra-

ppaport incubado a 37°C, 48 horas. Con el método de subcultivos, utilizando el tetracionato incubado a 37°C, a partir de él se realizaron dos subcultivos consecutivos. El total de muestras analizadas fué de 378, siendo 63 las muestras analizadas en cada lugar. Los resultados en cada punto fueron 44'4%, 22%, 57%, 19%, 38'1% y 51%.

1.4. TEMPERATURA DE INCUBACION

Muchos investigadores han comprobado que independientemente del medio de cultivo empleado, la temperatura de 37°C se presenta como la temperatura óptima de crecimiento de los diferentes serotipos de Salmonellas. También se ha comprobado que al aumentar la temperatura de incubación, se disminuye la velocidad de crecimiento y el tamaño de la población. Hay que resaltar que no todos los serotipos presentan el mismo comportamiento. Un ejemplo muy claro es el S. typhi, que es uno de los serotipos que más afectado se ve su crecimiento a partir de 37°C.

El uso de las temperaturas de incubación por encima de los 37°C para los medios líquidos se desarrolló muy pronto. En 1889, Rodet realizó un estudio para comprobar los límites superiores de temperaturas a las que podía crecer S. typhi. Describió un método de elevada temperatura para aislarla a partir de agua polucionada. Vicent en 1890, tuvo poco éxito con la técnica de Rodet, pero notó que obtenía mejores resultados, si la temperatura la descendía a 42°C y el caldo ordinario lo sustituía por el caldo de fenol. (Harvey y Price, 1979).

A pesar de algunos intentos realizados por debancar, la temperatura de 37°C, como la temperatura de incubación de elección de los medios de enriquecimiento a partir de muestras naturales, ésto no se realizó hasta muy tarde.

1.4.1. Ensayos simultáneos de comparación de temperatura para el aislamiento de Salmonellas.

El primer investigador que demostró de una manera clara

la superioridad de elevar la temperatura de incubación fué Spino, 1966, que con la técnica de las compresas sumergidas durante cinco días en las aguas superficiales de varios arroyos en USA, consiguió aislar Salmonellas, cuando los caldos de enriquecimiento, SBG-sufa y TBG, eran incubados a 41'5°C durante 24 horas, y no consiguió aislarlas cuando los dos caldos eran incubados a 37°C, 24 horas. En éste trabajo, la temperatura de 41'5°C se mostró tan esencial, que convirtió a los dos medios de enriquecimiento de ineficaces en eficaces.

A continuación vamos a citar a otros investigadores que han estudiado la misma problemática y han confirmado las ventajas de elevar la temperatura de incubación.

Edel y Kampelmacher, 1968, utilizando heces y carne como muestras, realizaron un estudio comparativo con el aislamiento de Salmonellas en ocho laboratorios. Todos los laboratorios eran capaces de aislar Salmonellas, cuándo las muestras eran contaminadas con 10 Salmonellas por muestra y había pocos microorganismos competidores. Pero tan pronto como estaban presentes gran cantidad de ellos, los resultados eran muy divergentes. La eficacia del aislamiento disminuía en todos, excepto en uno que era el único que incubaba el caldo de enriquecimiento a 43°C, mientras que los demás lo hacían a 37°C. Cuándo éstos laboratorios aumentaban la temperatura de incubación a 43°C, obtuvieron mejores resultados. Proponen el TMK como caldo de enriquecimiento incubado a 37°C durante 48 horas, como método standard.

Edel y Kampelmacher, 1969, compararon la eficacia del método standard propuesto por ellos en 1968, con el método propio de cada uno de los nueve laboratorios, que simultáneamente realizaron el estudio de aislar Salmonellas a partir de muestras de carne y heces. Los diferentes resultados, mostraron que mientras unos laboratorios con su propio método eran más capaces que con el método standard, otros por el contrario eran menos eficaces. En éstos la temperatura de incubación era de 37°C y en los primeros de 43°C.

En los dos trabajos de Edel y Kampelmacher, 1968, 1969, la elevación de la temperatura de incubación de 37°C a 43°C, se mostró esencial para el aislamiento de Salmonellas, aunque otros factores como tiempo de incubación, subcultivos y naturaleza del medio también tienen su influencia.

Leclerc y cols, 1970, a partir de muestras de agua potable poco cargadas de microorganismos y contaminadas artificialmente con Salmonellas, siguiendo la metodología clásica de enriquecimiento en un medio selectivo, obtuvieron unos resultados que les llevaron a destacar entre otras conclusiones referentes a naturaleza del medio de enriquecimiento y tiempo de incubación, que la temperatura de 43°C representa el factor de selección más riguroso.

En un trabajo posterior y análogo al anterior, Leclerc y cols, 1970, a partir de muestras de aguas residuales y lodos contaminados naturalmente, además de comparar dos metodologías, pre-enriquecimiento y enriquecimiento directo, dos caldos de enriquecimiento, comparan tres temperaturas de incubación, 37°C, 40°C y 43°C.

Al igual que en el anterior trabajo, siguen reafirmando-se en que el factor más importante para favorecer el aislamiento de Salmonellas en aguas polucionadas, es la elevación de la temperatura de incubación de 37°C a 43°C.

Cherry y cols, 1972, en sus primeros experimentos utilizaron dos temperaturas 37°C y 41'5°C, para analizar aguas superficiales. Posteriormente todas las muestras eran incubadas a 41°C, porque se obtuvieron mejores resultados con la elevación de la temperatura.

Nabbut, 1973, analizó las aguas residuales de la ciudad de Beirut, Líbano, con la técnica de las compresas sumergidas durante cinco días. Cada mitad de ellas las inoculó en caldos de selenito incubándose unos a 37°C y los otros a 41°C durante 24 horas. Analizó con el mismo método 150 muestras de heces contaminadas artificialmente y 150 contaminadas naturalmente. Con el primer grupo

de muestras, aguas residuales, con la temperatura de 37°C se aislaron Salmonellas en el 22%, mientras que con la de 41°C resultaron positivas todas las muestras, 100%. Con el segundo grupo de muestras, obtuvieron mejores resultados a 37°C que a 41°C. Con el tercer grupo, el número de muestras positivas fué superior a 41°C, 8'6% que con la de 37°C, 6'7%. Así podemos concluir, a la vista de los resultados, que la temperatura de 41°C, representa el factor de selección más riguroso, para las muestras contaminadas naturalmente que para las muestras contaminadas artificialmente y que si se trata de aguas residuales, es necesario aumentar la temperatura de incubación de 37°C a 41°C, más que cuando se trata de heces.

Tomando muestras de las aguas del río Po, Italia, Luppi y cols, 1973, compararon dos metodologías para determinar cual era la más eficaz en el aislamiento de Salmonellas. En las dos se filtró la misma cantidad de agua, a través de membranas filtrantes, inoculándolas en caldo de tetracionato. La diferencia de metodología estriba, en que la primera la temperatura de incubación es de 37°C y en la segunda de 43°C. Los resultados muestran que con la primera resultaron positivas el 3'3% de las muestras y con la segunda el 13'6%. Es decir, que al aumentar la temperatura de 37°C a 43°C, aumenta el rendimiento del mismo medio. También comprobaron que al alargar el tiempo de incubación de 24 a 48 horas, aumentaba el rendimiento del medio del 13% al 16%. Vemos que el factor de selección más riguroso es la elevación de la temperatura.

Con la técnica de las diluciones al décimo, Phirke, 1974, realizó un estudio de las aguas residuales en la India, para determinar el NMP de Salmonellas/100 ml. Para ello analizó 17 muestras, por el método convencional de incubación del SBG a 37°C durante 48 horas y por el de incubación del mismo medio a 41'5°C durante 48 horas. Aunque las 17 muestras resultaron positivas con las dos temperaturas, el procedimiento de la elevada temperatura daba mejores recuperaciones de Salmonellas, así la media geométrica del NMP/100 ml era 10 veces superior a 41'5°C que a 37°C.

Al analizar 69 muestras de las aguas residuales de Toulon, Francia, Brisou y Boudon, 1974, al comparar los resultados

obtenidos al incubar el caldo de selenito F a 43°C durante 48 horas, con los obtenidos al incubar el mismo medio a 37°C durante 48 horas, observaron no sólo que el número de muestras positivas era mayor con la temperatura de 43°C que con la de 37°C, sino que también era mayor el número de serotipos detectados.

Kenner y Clark, 1974, realizaron un estudio sobre aguas residuales, para comparar la eficacia de varios caldos de enriquecimiento a dos temperaturas 37°C y 41'5°C. Observaron que ninguno de los medios daba buenos resultados con la temperatura de 37°C, pero que al elevarla a 41'5°C aumentaban el rendimiento. Posteriormente como consecuencia de un estudio comparativo, eligieron el dulcitol selenito como medio de enriquecimiento. Una vez seleccionado el medio, quisieron comprobar, si la temperatura de incubación afectaba la selectividad del dulcitol selenito. Para ello analizaron 26 muestras de aguas residuales incubándolas a 37, 40 y 41'5°C, encontrándose que a 40°C todas las muestras fueron positivas, 100%, que a 41'5°C el 50% y a 37°C solamente dos muestras. Como vemos la temperatura de 37°C, es la que da peores resultados y que al elevarla se aumenta el rendimiento de los medios. En este trabajo la de 40°C se muestra más eficaz que la de 41'5°C.

Sayler y cols, 1976, analizaron muestras de agua y sedimento de la Bahía de Upper Chesapeake, USA, para comparar la eficacia de dos temperaturas, 35 y 41°C, comprobando que a ninguna de las dos temperaturas les permitieron detectar Salmonellas.

Kafel y Bryan, 1977, estudiaron el efecto de dos temperaturas, 37 y 43°C, sobre tres caldos de enriquecimiento, TMK, selenito F y caldo de bilis, observando que la temperatura de 43°C es la que presentó mejores resultados, ya que aumentaba el rendimiento de los dos medios.

1.4.2. Resultados de distintos investigadores con el empleo de una temperatura de incubación.

1.4.2.1. *Con la temperatura de 37°C.*

A pesar de las pruebas de las ventajas ofrecidas por la

elevación de la temperatura de incubación, todavía hay autores que siguen utilizando la temperatura de 37°C. Sus resultados son los siguientes:

Parvery y cols, 1972, analizaron 2.372 muestras de aguas residuales, afluentes y efluentes de plantas de tratamiento en Anjou, Francia, utilizando el SBG-sulfapiridina como medio de enriquecimiento incubado a 37°C, 24 horas. consiguieron aislar 109 cepas de Salmonellas pertenecientes a 21 serotipos del 5% de muestras positivas.

Kruger, 1972, analizó 184 muestras de aguas superficiales y aguas residuales en Berlín, utilizadno el caldo de tetratio-nato incubado a 37°C. Resultaron 491 muestras positivas, 4,75%.

Well y cols, 1974, analizaron muestras de ranas utilizando el TBG incubado a 37°C. Resultaron positivas el 98% de las muestras.

Andrews y cols, 1977, a partir de ranas y usando el caldo de selenito como caldos de enriquecimiento, incubado a 37°C, aislaron Salmonellas en el 13% de las muestras.

Stelzer y cols, 1977, analizaron 378 muestras, tomadas a lo largo de seis puntos del río Weissen Elster, DDR, en cada uno de ellos tomaron 63 muestras. Utilizaron el caldo de tetratio-nato incubado a 37°C. Los resultados fueron por lugar de muestreo, 19%, 44,4%, 38,1%, 22,2%, 57,1% y 50,8% de muestras positivas.

1.4.2.2. Con la temperatura de 41°C.

Grunnet y Nielsen, 1969, utilizando el caldo de tetratio-nato, incubado a 41,5°C durante 24 a 96 horas, consiguieron aislar Salmonellas en:

- 120 muestras, 45%, de las 263 del Golfo de Aarhus, Dinamarca
- 24 muestras, 95%, de las 88 de entrada de plantas de tratamiento
- 22 muestras, 95%, de las 23 de salida de plantas de tratamiento

Smith y Twedt, 1971, utilizando el caldo de dulcitol se-

lenito, incubado a $41,5^{\circ}\text{C}$, 24 a 48 horas, detectaron Salmonellas en cuatro lugares de muestreo de los 10 estudiados en el río Saline y en dos lugares de 20 en el río Huron.

Smith y cols, 1973, continuando el estudio de 1971, detectaron Salmonellas en 28, 12%, de las 226 muestras analizadas en el río Saline y en 26, 11%, de las 226 del río Huron.

Vanderpost y Bell, 1977, empleando el caldo de tetratio-nato y caldo de selenito incubado a $41,5^{\circ}\text{C}$, 24 horas, aislaron Salmonellas en 19 muestras de las 30 analizadas.

Goyal y cols, 1977, aislaron Salmonellas en el 17% de las muestras de sedimento y en una muestra de agua de los canales comunales de Texas, USA, utilizando el TBG incubado a $41,5^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas.

Dondero y cols, 1977, aislaron Salmonellas en el 39% de las 332 compresas de agua superficial de seis arroyos tributarios del lago Cayuga y del propio lago en USA. El caldo de tetratio-nato empleado fué incubado a $41,5^{\circ}\text{C}$. durante 24 horas.

1.4.2.3. Con la temperatura de 43°C .

Harvey y Price, 1969, empleando el caldo de selenito F, incubado a 43°C , durante 24 horas, no aislaron Salmonellas de las muestras de aguas superficiales, mientras que frecuentemente se aislaron de las aguas residuales.

Kampelmacher y Noorle Jansen, 1971, utilizaron el TMK in-cubado a 43°C , 24 a 48 horas, para analizar 1.176 muestras de es-tiércol, heces y agua, resultando positivas 514, 43%. Los peores resultados los obtuvieron al analizar muestras de agua que presen-taban Salmonellas en 30%.

Kampelmacher y Noorle Jansen, 1973, empleando el TMK in-cubado a 43°C , 24 a 48 horas, detectaron Salmonellas en los afluen-tes, efluentes y líquidos circulantes de varias plantas de trata-miento.

Carney y cols, 1975, no aislaron Salmonellas, ni en las

muestras de agua, ni en las 39 de sedimento del río Rhoda, USA, utilizando el caldo de selenito cisteína, incubado a 43°C, 24 horas.

Trichopoulos y cols, 1975, estudiando las aguas residuales de la ciudad de Atenas, detectaron Salmonellas en el 96% de las muestras incubándose en los medios de enriquecimiento TMK y HI a 43°C.

1.5. TIEMPO DE INCUBACION.

1.5.1. Ensayos simultáneos de comparación de tiempo de incubación para el aislamiento de Salmonellas.

Edel y Kampelmacher, 1968, 1969, del resultado del estudio comparativo entre laboratorios, proponen que el caldo de enriquecimiento, el TMK, se incuba a 43°C, durante 48 horas,

Leclerc y cols, 1970, a partir de aguas contaminadas experimentalmente, estudiaron el efecto del tiempo de incubación sobre tres caldos de enriquecimiento, obteniendo los siguientes resultados:

- con el medio de selenito, el tiempo puede ser prolongado de 24 a 48 horas, ya que aumenta su rendimiento.
- con los medios de tetracionato y sulfito, el tiempo más favorable es el de 24 horas.

Luppi y cols, 1973, tomando muestras de las aguas del río Po en Italia, compararon dos tiempos de incubación, 24 y 48 horas, para determinar cual era más eficaz para el aislamiento de Salmonellas. Utilizaron la técnica de filtración y como medio de enriquecimiento el caldo de tetracionato, incubándolo a 43°C. Los resultados muestran que a las 24 de incubación, de 80 muestras analizadas, seis resultaron positivas, 7,5%, mientras que a las 48 horas, de 80 muestras, en 13 se aislaron Salmonellas, 16%. Es decir, la prolongación del tiempo de incubación de 24 a 48 horas aumentó al doble el rendimiento del medio.

Edel y Kampelmacher, 1973, realizaron un estudio comparativo en nueve laboratorios, comprobaron que cuando el medio de enriquecimiento el TMK, incubado a 43°C, se prolonga de 24 a 49 horas el tiempo de incubación, aumenta la tasa de aislamiento.

Kafel y cols, 1977, analizando muestras contaminadas artificialmente, comprueban que con la temperatura de 37°C, los medios de TMK, selenitos F y caldo de Bilis, cuando se prolonga el tiempo de incubación de 24 a 48 horas, no se ven afectados en su rendimiento, pero que cuando los mismos medios se incuban a 43°C, se aumenta el rendimiento al alargar el tiempo de incubación de 24 a 48 horas,

Suen y Hartman, 1977, analizando muestras de alimento contaminadas artificialmente por el método de "timed release capsule", comprobaron que con la prolongación a 48 horas del tiempo de incubación, se aumenta el rendimiento.

1.5.2. Resultados de distintos investigadores con el empleo de un tiempo de incubación

1.5.2.1. *Con el tiempo de 24 horas.*

Selijman y Reitfer, 1965, utilizando el TMK, incubado a 37°C, analizaron 400 muestras de agua de pozo y aguas superficiales en Israel, de las que nueve resultaron positivas, 2,2%.

Spino, 1966, consiguió aislar Salmonellas a partir de aguas superficiales de varios ríos, cuando los caldos eran incubados a 41,5°C, durante 24 horas y no cuando eran incubados a 37°C, durante 24 horas.

Harvey y Price, 1969, analizando las aguas superficiales y aguas residuales, siendo el medio de enriquecimiento el selenito F, incubado a 43°C, no aislaron Salmonellas de las muestras de agua superficiales, mientras que sí lo hicieron de las aguas residuales.

Parvery y cols, 1972, analizaron 2.372 muestras de aguas residuales en Francia, utilizando el SBG-sulfa, incubado a 37°C,

resultando positivas el 5%.

Nabbut, 1973, utilizando el medio de selenito F, como caldo de enriquecimiento incubado a 41°C, analizaron 150 muestras de heces, resultando positivas el 8,6%. Cuando estudiaron las aguas residuales de la ciudad de Beirut, Libano, resultaron todas positivas.

Corney y cols, 1975, no consiguieron aislar Salmonellas cuando analizaron agua y sedimento del río Rhode, USA, utilizando el selenito cistina, incubado a 43°C, 24 horas.

Andrews y cols, 1977, a partir de ranas y utilizando el caldo de tetracionato y de selenito, incubados a 35°C, 24 horas, aislaron Salmonellas en el 13% de las muestras.

Dondero y cols, 1977, analizando las aguas superficiales de seis arroyos tributarios del lago Cayuga y del propio lago, USA, siendo el medio de enriquecimiento del caldo de tetratio nato incubado a 41'5°C, 24 horas, aislaron Salmonellas en el 39% de las 332 muestras.

1.5.2.2. Con el tiempo de 48 horas.

Brisou y Boudon, 1974, utilizan dos temperaturas de incubación, 37 y 43°C, para un mismo medio, el selenito F, al analizar las aguas residuales de la ciudad de Toulon, Francia, solamente empleando un tiempo de incubación, 48 horas.

Wells y cols, 1974, a partir de muestras de tortugas, empleando el TBG a 37°C, durante 48 horas, aislaron Salmonellas en el 72% y 98%, atendiendo si ésta es tortuga entera o heces, u órganos.

Coleman y cols, 1974, solamente detectaron Salmonellas en una muestra de agua de río, empleando el selenito e incubándolo a 37°C, 48 horas.

Siebeling y cols, 1975, detectaron Salmonellas a partir de muestras de tortugas empleando el TBG, a 37°C, 48 horas.

1.5.2.3. Con varios tiempos de incubación.

Otros autores por el contrario no son partidarios de utilizar solamente un tiempo de incubación, ya sea el de 24 o 48 horas, sino que lo que hacen es sembrar sobre los medios de aislamiento a las 24, 48 e incluso también a las 72 y 96 horas de incubación de los medios de enriquecimiento, para tener una mayor seguridad de detección de las Salmonellas.

A continuación vamos a citar a algunos investigadores que emplean dicho sistema. Tienen el inconveniente de no citar cuál fué el tiempo de incubación que les fué mejor, ya que dan los resultados globalmente.

Gurnnet y Nielsen, 1969, analizaron las aguas del Golfo de Aarhus, afluentes y efluentes de plantas de tratamiento en Dinamarca, utilizando como medio enriquecimiento el caldo de tetrionato, incubado a 41.5°C. A partir de las 24 horas de incubación y cada 24 horas, hasta las 96 horas, realizaban una siembra sobre el medio de aislamiento. Detectaron Salmonellas en el 45% de las 263 muestras de agua del Golfo, en el 85% de 28 muestras de afluentes y en el 95% de las 23 muestras de efluentes.

Brezenski y Russomanno, 1969, analizaron 150 muestras de aguas de estuario, en USA, empleando los caldos de TBG y selenito incubado a 37°C. A las 24, 48, 72, 96 horas, de incubación se hacían siembras sobre los medios de aislamiento. Aislaron Salmone-llas en 62 muestras, 41%.

Claudon y cols, 1971, detectaron Salmonellas en 35 muestras, 54,6%, de las 64 analizadas de las aguas del lago Mendotta, USA, empleando el caldo de tetrionato y el SBG-sulfa, incubado a 41,5°C, durante 24 a 48 horas.

Smith y Twedt, 1971m analizaron las aguas de los ríos Saline y Huron, USA, utilizando el dulcitol selenito, incubado a 41,5°C, 24 a 48 horas. Detectaron Salmonellas en cuatro lugares de muestreo de los 10 analizados en el río Saline, siendo el número de muestras total de 126, y en dos lugares de los 20 en el río Hu-

ron y siendo el número de muestras positivas, 196.

Smith y cols, 1973, continuando sus estudios de 1971, ob tuvieron los siguientes resultados:

- río Saline. Se eligieron ocho lugares de muestreo, siendo el número de muestras de 226, de las que 28 resultaron positivas, 12% pertenecientes a seis lugares.
- río Huron. Se eligieron 10 lugares, siendo analizadas 226 muestras, pertenecientes a siete lugares de muestreo, dando un 10% de positividad.

Kampelmacher y Noorle Jansen, 1973, realizaron estudios en dos plantas de tratamiento, empleando el caldo de tetrionato incubado a 43°C de 18 a 48 horas.

1.6. MEDIOS SOLIDOS SELECTIVOS Y DIFERENCIALES DE AISLAMIENTO

1.6.1. Combinaciones de medios sólidos más recomendados.

Spino, 1966, aunque empleó dos caldos de enriquecimiento, el TBG y el SBG-sulfa para analizar las aguas superficiales de varios arroyos en USA, el medio de aislamiento fué siempre el mismo, el BGA. Se obtuvieron más colonias sospechosas y posteriormente confirmadas, cuando el inóculo procedía del caldo de selenito que desde el tetrionato, 60% y 40% respectivamente.

Brenzeski y Russomanno, 1969, analizaron 150 muestras de agua de estuario en USA, empleando dos caldos de enriquecimiento, el CT y CS y tres medios de aislamiento SS, BS y BGA. Resultaron po sitivas el 41% de las muestras. La combinación que presentó mejores resultados fué CT-BS.

Edel y Kampelmacher, 1968, 1969, del estudio comparativo entre laboratorios proponen el BGA como medio de aislamiento, más aún proponen la combinación TMK-BGA.

Smith y Twedt, 1971, estudiaron cuál de los cuatro medios de aislamiento MC, SS, BGA y XLD, era el más eficaz cuando se inoculaban desde el dulcitol selenito. La combinación que presentó

mayor rendimiento fué el dulcitol selenito-XLD. Dicha combinación fué la utilizada por Smith y cols, 1973.

Cherry y cols, 1972, analizando aguas superficiales en USA, comprobaron que el BGA era más eficaz que el BS, cuando se inoculabán desde el caldo de tetrionato, mientras que eran de eficaces cuando se inoculabán desde el caldo de selenito cistina.

Baquero, 1972, realizó un estudio comparativo de cuatro medios de aislamiento BGA, SS, BS y DCLS. De cada 100 coprocultivos portadores de *S. typhi*, con el BGA se aisló 65 veces, con el SS 40, con el BS 30 y con el DCLS 50. De cada 100 coprocultivos portadores de otras *Salmonellas* que *S. typhi*, con el BGA se las aisló 76 veces, con el SS 42 y con el DCLS 50.

Dutka y Bell, 1973, analizando aguas catalogadas como moderadamente polucionadas, comprobaron que con el caldo de tetrionato era más eficaz el BGA que con el XLD, mientras que con el caldo de selenito era más eficaz el XLD que el BGA.

Edel y Kampelmacher, 1973, realizaron un estudio comparativo entre nueve laboratorios. La diferencia entre laboratorios estriba en el medio de aislamiento; éste era doble, uno obligatoriamente era el BGA y el otro se dejaba a elección de cada laboratorio. Con muestras contaminadas artificialmente se mostró el BGA que el elegido por cada laboratorio. Con muestras contaminadas naturalmente, no se encontró diferencia entre el BGA y el propuesto por cada laboratorio.

Pollock y Dahlgren, 1974, analizando coprocultivos estudiaron el efecto de dos caldos de enriquecimiento, el tetrionato y el selenito, y cuatro medios de aislamiento, SS, HE, XLD y MC. La combinación que se mostró más eficaz fué selenito-XLD.

Bartlett y cols, 1977, observaron que desde el tetrionato, el BS y SS, se presentaban igual de eficaces, mientras que desde el caldo de selenito era mayor el SS que el BS.

Andrews y cols, 1977, utilizando dos caldos de enriquecimiento, el TBG y SC, y cinco medios de aislamiento, BGA, SS, BS,

HE y XLD, comprobaron que cuando el inóculo procedía del TBG, presentaba mayor eficacia el BS, seguido de cerca por el XLD. Cuando el inóculo procedía del SC, presentaba mayor eficacia el HE, seguido muy de cerca por el XLD.

1.6.2. Relación de medios sólidos más empleados.

A continuación vamos a citar medios de aislamiento utilizados por distintos autores, que nos van a dar una idea de la dificultad que lleva la elección de los medios de aislamiento.

Cuando el inóculo procede del caldo de selenito:

Harvey y Price, 1969, emplean el MC y DCA. Sato y cols, 1974, usan nada más que el BGA.

Leclerc y cols, 1970 a y b; Leclerc, 1971, al igual que Parvery y cols, utilizan el DCL.

Smith y Twedt, 1971; Smith y cols, 1973, junto con Kenner y Clark, 1974, usan el XLD. Kaper y cols, 1977, además del XLD, emplean el BGA y SS.

Nabbut, 1973; Coleman y cols, 1974, son partidarios del SS. Phirke, 1974; Brisou y Boudon, 1974; Pagon y cols, 1974; Carney y cols, 1975, además del SS, utilizan el BGA.

Cuando el inóculo procede del caldo de tetracionato:

Selijman y Reitfer, 1965, Kampelmacher y Noorle Jansen, 1971, 1973; Goyal y cols, 1977; Dondero y cols, 1977; Tamminga y cols, 1978, emplean el BGA.

Grunnet y Nielsen, 1969, utilizan el LSBGA.

Luppi y cols, 1973, emplean el HE y WB.

Wuthe, 1976, usa el BS y el MCL.

Trichopoulos y cols, 1975, utilizan el BG-sulfapiridina-deoxicolato agar.

Stelzer y cols, 1977, el WB y el agar de Leifson.

Otros autores en sus trabajos utilizan conjuntamente y

simultáneamente, dos caldos de enriquecimiento, el tetracionato y selenito, y uno o varios medios de aislamiento, sin citar qué combinación es la más efectiva. Entre ellos, tenemos:

Claudon y cols, 1971, emplean BGA, BS y SS.

Kruger, 1977, el agar de Leifson.

Cook y cols, 1974, el BGA.

Sayler y cols, 1976, BS, SS y BGA.

Morse y Duncan, 1976, MC, EMB, BS, BGA y HE.

Vanderpost y Bell, 1977, Xilosa-lactosa-deoxicolato agar y BGA.

A pesar de la gran variedad existente de medios sólidos de aislamiento, de cuando en cuando surgen nuevos medios, o simplemente se modifican los ya existentes, con la idea de aumentar su rendimiento en la detección de Salmonellas. Así, Shanson, 1975, reportó el desarrollo de un nuevo medio de aislamiento, basado en agar de MacConkey, para la detección de otras Salmonellas que *S. typhi*. La evaluación de éste medio por Davis, 1975, indicó que el medio era más eficaz que el DCA, aunque las tasas de aislamiento de Salmonellas en ambos medios eran aproximadamente iguales. La aplicación de éste medio para la detección de Salmonellas en el agua, no ha sido procesada.

Los medios sólidos de aislamiento llevan en su composición colorantes e indicadores. En dichos medios, los colorantes como el verde brillante, violeta de cristal azul de metileno, fucsina básica, pueden actuar como agentes bacteriostáticos, como inhibidores del crecimiento o como indicadores de cambios en el grado de acidez o alcalinidad del sustrato.

El verde brillante, que forma parte de la composición del BGA, pierde propiedades inhibitorias por calentamiento (Moats y cols, 1974). Las sales biliares y el sulfito de sodio, reducen la toxicidad del verde brillante frente a las Salmonellas (Moats y Kinner, 1974).

Al igual que hay autores que añaden antibióticos a los caldos de enriquecimiento, también los hay partidarios de añadirlos a los medios sólidos de aislamiento, con la finalidad de aumentar su rendimiento. Moats y Kinner, 1974 y Restaino y cols, 1974, demostraron sobre cultivos in vitro, los primeros al añadir sulfas en el BGA y los segundos novobiocina en el XLD y HE, que se aumentaba el rendimiento de aislamiento de Salmonellas, debido al efecto inhibitorio de estos antibióticos sobre Enterobacterias no pertenecientes al género Salmonella.

1.7 OTRAS TECNICAS DE DETECCION DE SALMONELLAS.

De cuando en cuando surgen nuevas técnicas de aislamiento de Salmonellas, en un intento de mejorar los resultados.

Cherry y cols, 1972, estudiaron las aguas superficiales de varios arroyos en USA, para comparar si la técnica convencional de cultivo, es más eficaz que la técnica de anticuerpos fluorescentes. De 159 muestras analizadas, 145 resultaron positivas con la de anticuerpos, lo que da el 91%, mientras que 91 muestras, 57% lo fueron con la técnica convencional de cultivo.

Chau y Huang, 1974, proponen para detectar Salmonellas en heces un nuevo método. El procedimiento se basa, en la selectividad del movimiento retardado de Enterobacterias a través de un medio semisólido. El aislamiento de Salmonellas se aumenta en un 28%, comparándolo con el procedimiento convencional de cultivo. No se detectó S. typhi debido a su lenta migración a través del medio semisólido.

Tomason y cols, 1975, analizando muestras ambientales de todo tipo, agua, algas, musgos, raices de árboles, hierba, suelo, observaron que se obtenían más muestras positivas con la técnica de anticuerpos fluorescentes que con la convencional de cultivo. Así, de 156 muestras examinadas, 26 resultaron positivas por cultivo, 16'6%, y 48 muestras por anticuerpos fluorescentes, 31%.

Munson y cols, 1976, analizando 4.000 muestras de alimento, observaron una ligera superioridad de la técnica de cultivo, so

bre la de anticuerpos fluorescentes. Así, 619 muestras resultaron positivas por cultivo y 615 por anticuerpos. La diferencia de estas cuatro muestras, se debió a la existencia en ellas de gran cantidad de flora competitiva.

Thomason y Dodd, 1976, a partir de muestras de carne, observaron que la técnica de anticuerpos fluorescentes, no muestra ninguna ventaja sobre la de cultivos.

Para Krysinski y cols, 1977, la técnica de anticuerpos fluorescentes, es menos fiable que la técnica convencional de cultivos, ya que produce un alto porcentaje de falsos resultados positivos y negativos. Describen una nueva técnica, para detectar Salmonellas en alimentos, que consiste en el uso de enzimas marcadas por anticuerpos, ELAT. Esta técnica se mostró más sensible que la de anticuerpos fluorescentes, y reduce el tiempo de análisis respecto a la de cultivo.

Mohit, 1975, describió un nuevo método, basado en la inmunoinmovilización en placa, para detectar Salmonellas móviles en presencia de gran número de otras bacterias. El método combina movilidad en SS y posterior inmunoinmovilización con antisuero polivalente H. Se mostró experimentalmente diez veces más sensible que método de placaje sobre medios sólidos de aislamiento.

Ryan, 1972, propone que cuando se intente aislar Salmonellas de las aguas residuales, el caldo de enriquecimiento se incube en condiciones anaerobias, no siendo necesaria cuando se examinen heces. Esto se debe a dos factores: 1ª. La diferencia entre la flora bacteriana presente en las heces (Gorbach, 1975) y en las aguas residuales (Holden, 1970). 2ª. Que las Pseudomonas, presentes en mayor número en las aguas residuales, no son inhibidas, cuando dichas aguas se inoculan en caldo de tetracionato (Dundstrup, 1974) o en caldo de selenito F (Ryan, 1972).

1.8. PREPARACION DE MUESTRAS PARA INOCULAR.

En cuánto a la forma de inoculación de la muestra en los medios de enriquecimiento selectivos o no selectivos, básicamente

se realiza en dos formas:

- concentración de la muestra por medios físicos.
 - compresas
 - membranas filtrantes
- inoculación directa de un volumen determinado de la muestra.

Desde que Moore, 1948, preconizó su técnica, muchos autores han utilizado las compresas sumergidas varios días, obteniendo muy diferentes resultados: entre ellos podemos citar:

Spino, 1966; Harvey y Price, 1969, Grunnet y Nielsen, 1969; Cherry y cols, 1972; Nabbut, 1973; Cook y cols, 1974; Trichopoulos y cols, 1975; Dondero y cols, 1977; Vandeporst y Bell, 1977.

Al utilizar la técnica de compresa, no se conoce el volumen de agua de dónde se aíslan las Salmonellas. Teóricamente, las compresas absorbiendo bacterias constantemente aumentan las probabilidades de recolectar una gran variedad de serotipos; en la práctica, sin embargo, estos cambios pueden quedar negativizados por colmatación de los filtros, más rápido cuánto mayor es la carga del agua en materia orgánica, lodos, detritus y algas, que disminuyen su permeabilidad y ejercen un efecto negativo sobre el crecimiento de Salmonellas, por crecimiento de las propias algas y protozoos y por la toxicidad del agua.

La técnica de inoculación directa y de filtración presentan la ventaja, frente a la técnica de compresas, de conocer el volumen de agua de la muestra que se usa, lo que permite realizar estudios semicuantitativos, ya que nos dice si en ese volumen de agua se detectan o no Salmonellas.

Autores como Cheng y cols, 1971; Luppi y cols, 1973; Carney y cols, 1975; Sayler y cols, 1976, utilizan la técnica de filtración, mientras que Parvery y cols, 1972; Kruger, 1972; Wuthe, 1973; Coleman y cols, 1974; Goyal y cols, 1977; Stelzer y cols, 1977, entre otros usan inoculación directa.

La técnica de inoculación directa también se utiliza pa-

ra realizar análisis cuantitativos. Este tipo de estudio es muy poco utilizado, ya que no se ha encontrado ni el medio, ni la técnica, ni la metodología adecuada y sus resultados no compensan la gran cantidad de trabajo que exigen.

Esta técnica se ha utilizado por Kampelmacher y Noorle Jansen, 1973; Phirke, 1974; Brisou y Boudon, 1974; Smith y cols, 1973; Leclerc y cols, 1970; Smith y Twedt, 1971.

En los trabajos de Leclerc y cols, 1970; Phirke, 1974; Brisou y Boudon, 1974, se comprueba que la técnica de inoculación directa, presenta una problemática distinta, ya que el volumen de la muestra a inocular no favorece siempre la búsqueda de Salmone^llas; esto es interpretado como que el agua, por un lado ejerce un efecto tóxico sobre las Salmonellas y por otra parte produce una alteración de las propiedades inhibitorias del medio de enriquecimiento, mayor, cuánto mayor es el volumen de la muestra.

Para Kruger, 1972, el volumen de agua de la muestra a analizar, tiene mayor importancia en las aguas superficiales que en las aguas residuales.

A lo largo de la revisión bibliográfica, hemos encontrado pocos trabajos en los que se compare los distintos tipos de toma de muestras.

Para Brezenski y Russomanno, 1969, la técnica de filtración, es mejor que la de compresas después de dos días de inmersión, ya que aumenta el número de serotipos.

Claudon y cols, 1971, al analizar las aguas del Lago Mendotta, USA, obtienen que de las 58 compresas sumergidas de cuatro a siete días, 29 resultaron positivas, 50%. De las 16 muestras filtradas, las 16 resultaron positivas, 100%. Aunque el número de muestras no fué igual para cada técnica, concluyen que la técnica de filtración se mostró superior a la de compresas.

Dutka y Bell, 1973, realizaron un estudio de la incidencia de las Salmonellas, en las aguas superficiales no muy polucionadas de la Bahía de Quito y del río St. Lawrence, USA. Las Salmo-

ellas fueron aisladas por tres técnicas:

- compresas sumergidas de uno a ocho días
- filtración de 18,9 litros, a través de membranas filtrantes
- filtración de 189 litros, a través de membranas filtrantes.

Con la primera técnica, de 149 muestras analizadas, 48 resultaron positivas, 32%. Con la segunda, de 88 muestras, 21 resultaron positivas, 24%; posteriormente se analizaron 134, de las que 27 fueron positivas, 20%. Con la tercera, se analizaron 67 de las que 37 resultaron positivas, 40%; posteriormente se añadieron 114 muestras, resultando 32 positivas, 28%. Los resultados muestran que la técnica de compresas y filtración, se mostraron más o menos igual de eficaces, aunque al aumentar el volumen a filtrar, aumenta las probabilidades de aislar Salmonellas.

Brisou y boudon 1974; Hoadley y cols, 1974, observaron al analizar aguas residuales, que se obtenía mejores resultados, cuando se filtraban las muestras que cuando se inoculaban directamente sobre el medio de enriquecimiento. Para los primeros la técnica de compresas aumenta el número de serotipos por muestra, en comparación a cuando se hace la toma directa.

1.9. CONCLUSIONES PRACTICAS.

A lo largo de la revisión bibliográfica que hemos realizado, se ha puesto de manifiesto y de manera clara, que el aislamiento de Salmonellas con éxito, a partir de muestras contaminadas naturalmente, especialmente aguas polucionadas, es un procedimiento multifactorial y complejo. Algunos de sus factores están bien conocidos, mientras que otros son menos conocidos.

Todo ello, se ha logrado a lo largo de los años y a partir principalmente de los medios de enriquecimiento clásicos, el selenito y el tetracionato, en los que se han ido introduciendo variantes, al igual que en las condiciones de cultivo, con la finalidad de aumentar su eficacia y su reproductividad.

A pesar de la gran diversidad de resultados encontrados,

parece que hay unas líneas de tendencia, que en la práctica han dado resultados más favorables.

Trataremos de resumirlos por apartados.

1. Pre-enriquecimiento en medios no selectivos.

En los análisis de alimentos contaminados artificialmente, el método de pre-enriquecimiento se ha mostrado en algunos casos superior al método de enriquecimiento, mientras que con alimentos contaminados naturalmente, el método de enriquecimiento se ha mostrado similar al pre-enriquecimiento y en algunos casos, superior.

La diferencia de actitud puede ser debida, a que en los alimentos contaminados artificialmente, es imposible reproducir las condiciones a menudo difíciles de supervivencia, en las que se encuentran las Salmonellas en las muestras naturales.

Solamente se recomienda el pre-enriquecimiento, para recuperar lo que se ha venido llamando " Salmonellas dañadas ", desde los materiales que han sido sometidos a tratamientos físico-químicos para destrozarse patógenos, análisis de alimentos.

Respecto a su utilización en las aguas polucionadas, el empleo de medios no selectivos, como caldos peptonados, lactosados o de otros azúcares, que permiten el crecimiento de coliformes, Proteus y de otros grupos de organismos asociados a las aguas polucionadas, sobre todo en las residuales, van a producir un sobrecrecimiento de la flora saprofita, enmascarando la posible presencia de Salmonellas en las aguas. Por ello no se recomienda su empleo en éste tipo de muestras.

2. Medios selectivos de enriquecimiento.

Los medios líquidos de enriquecimiento, presentan dos grandes ventajas frente a los medios sólidos de aislamiento:

- soportan un mayor inóculo.
- son capaces de hacer que las Salmonellas crezcan más eficaz-

mente.

Se acepta que los caldos de enriquecimiento, son parte necesaria para la detección de Salmonellas, cualquiera que sea el tipo de muestra a analizar, sobre todo cuando su número es pequeño, en comparación al total de la flora bacteriana saprofita presente en la muestra.

Los medios de enriquecimiento presentan una doble finalidad:

- inhibir el crecimiento de la flora bacteriana saprofita.
- favorecer el crecimiento de Salmonellas.

A lo largo de la revisión, hemos comprobado que aunque se han introducido nuevos medios de enriquecimiento, como los caldos de sulfito, ruys, bilis, infusión de corazón, gram-negativo, enterobacterias, rappaport, todavía no han conseguido desbancar a los clásicos, que tienen como componente principal el tetratiónato y el selenito.

A la vista de la gran diversidad de resultados encontrados, la elección de un medio de enriquecimiento es bastante difícil, y nunca un medio puede ser completamente descartado en favor de otro. Lo que sí hay, es una cierta preferencia a emplear el tetratiónato para análisis de alimentos y el selenito para agua y coprocultivos, Baquero, 1972; Brisou y Boudon, 1974; Harvey y Price, 1979.

3. Subcultivos en medios selectivos.

Se ha podido ver que al realizar un subcultivo en el mismo medio de enriquecimiento o en otro distinto, se aumenta considerablemente la frecuencia de aislamiento. Esto es debido a que en el medio primario, el microorganismo en el que estamos interesados, quizás todavía no ha podido pasar a ser dominante y al efectuar un subcultivo, por el efecto renovador del segundo medio, se vuelve a producir una nueva reducción en la flora saprofita acompañante, mientras que nuestro microorganismo tiene más posibi-

lidades de hacerse dominante, con lo que aumenta la probabilidad de aislarse.

4. Temperatura de incubación.

Hemos podido comprobar, que hay un consenso en la opinión de que se eleva la temperatura de incubación de 37°C a 40 o 41'5°C, mostrándose además como el factor de selección más riguroso, para el aislamiento de Salmonellas, independientemente del medio de enriquecimiento empleado.

La temperatura de 43°C, se descarta por ser demasiado limitante, frente a las temperaturas de 40 a 41'5°C.

Una de las ventajas, más sobresalientes de la técnica de elevada temperatura, es que las Salmonellas resultan menos perjudicadas, que el resto de los microorganismos que las acompañan en las muestras polucionadas, por lo que se consigue una mayor pureza en los medios de enriquecimiento, simplificándose y acelerándose el trabajo de examinar las placas de aislamiento.

5. Tiempo de incubación.

La finalidad de incubar durante un tiempo determinado los caldos de enriquecimiento, consiste en que la muestra a analizar contiene una mezcla de microorganismos y como generalmente se suele estar interesado en uno particular, que normalmente está en minoría, se incuba durante un tiempo, el necesario para que éste pueda pasar a ser dominante, teniéndose así la seguridad de que el asa de inoculación, contiene el microorganismo, por lo que se le podrá aislar, cuando se siembre sobre los medios sólidos de aislamiento.

Clásicamente, se han incubado los medios de enriquecimiento durante 24 horas, pero como hemos visto al prolongar el tiempo de incubación a 48 horas, se aumenta considerablemente la eficacia de éstos medios.

6. Medios sólidos, selectivos y diferenciales de aislamiento.

El objetivo de sembrar sobre la superficie de los medios sólidos de aislamiento, es distribuir por toda la superficie de la placa los organismos depositados por el inóculo, de manera que las colonias estén lo más individualizadas posible, para que se desarrollen bien.

Si la fase de enriquecimiento fuera tan selectiva que sólo permitiera el crecimiento de Salmonellas, cualquier medio de aislamiento aunque no fuese selectivo, valdría; sin embargo en la práctica no es así. Por eso se emplean los medios selectivos de aislamiento, cuya finalidad es doble:

- eliminar o reducir al máximo la incidencia de falsos positivos.
- producir la mayor diferenciación posible, entre las colonias sospechosas y las no sospechosas de ser Salmonellas.

En cuanto a la elección del medio de aislamiento, es relativamente difícil decidirse por uno determinado, ya que han sido recomendados una gran gama de ellos.

Lo más aconsejable, es utilizar dos medios de aislamiento con distintos tipos de selectividad, y en el caso de que se esté interesado en detectar *S. typhi*, se recomienda que uno de ellos sea el BS, siendo el segundo medio válido para cualquier serotipo de Salmonellas, uno de los cuatro siguientes, XLD, BGA, DCL y SS.

El BGA, es uno de los medios que presenta buenos resultados cuando es inoculado desde el tetracionato y selenito, y se le prefiere cuando el medio de enriquecimiento es el tetracionato y en cambio, se prefiere el XLD cuando proviene del selenito.

7. Otras técnicas.

Ya hemos visto cómo de vez en cuando surgían en un intento de mejorar los resultados, pero todavía no han conseguido desbancar a la técnica convencional de cultivo.

8. Preparación de muestras para inoculación.

Las técnicas de inoculación directa y de filtración, pre-

senta frente a la técnica de compresas, la ventaja de conocer el volumen de agua de las muestras utilizada para detectar la posible presencia de Salmonellas. Además permiten realizar estudios semicuantitativos y cuantitativos, mientras que con las compresas se realizan solamente trabajos cualitativos.

2. ENSAYOS DE LABORATORIO PARA SELECCIONAR LA METODOLOGIA MAS ADECUADA EN LA DETECCION DE SALMONELLAS EN AGUAS.

Al mismo tiempo que se hacía la revisión bibliográfica, se comenzaron los primeros ensayos de laboratorio para valorar los distintos medios y las metodologías propuestas en la literatura. Al ser el tetratoniato de Muller-Kauffman (TMK) y el selenito verde brillante (SBG) los dos medios de enriquecimiento más empleados, se iniciaron con ellos las primeras pruebas para estudiar su comportamiento en cuanto a eliminar la flora bacteriana concurrente, presente en las muestras de agua en número mucho mayor que el de Salmonellas, que pudieran incidir en las muestras.

2.1. EFECTO INHIBIDOR DE LOS CALDOS DE ENRIQUECIMIENTO (TMK Y SBG) SOBRE BACTERIAS HETEROTROFAS.

El primer grupo de ensayos se realizó con una muestra de agua de fuente cuyas características bacteriológicas fueron las siguientes:

	número/100 ml
- bacterias heterótrofas crecidas en agar nutriente a 37°C, 24 horas	4.100.000
- bacterias indicadoras de contaminación fecal (coliformes totales, E. coli, E. fecal, C. welchi)	0

El método que se empleó fué filtración de porciones de 300 ml de agua por membranas de 0'45 micras de tamaño poro, para concentrar las bacterias presentes en la muestra, más de 12 millones.

Después de la filtración, cada membrana se sumergió en 50 ml de TMK y SBG, agitándolas para desprender las bacterias y así facilitar su crecimiento o inhibición. La temperatura de incubación de los dos medios fué de 40°C. A las 24 horas, desde los caldos se hicieron siembras sobre placas selectivas, XLD y BGA, incubándolas a 37°C, durante 24 horas, no manifestándose ningún tipo de crecimiento bacteriano. Igualmente a las 24 horas de in-

incubación desde los caldos de enriquecimiento se hizo un primer subcultivo sobre los mismos caldos y de éstos a las 24 horas de incubación se realizó otro subcultivo del mismo modo que el primero, siendo la temperatura de incubación de 40°C, resultando también negativas las siembras de 48 y 72 horas sobre los medios sólidos de aislamiento, XLD y BGA. Es de remarcar que a pesar de los dos subcultivos en medio de enriquecimiento no se manifestó ningún tipo de crecimiento bacteriano. Por tanto, se deduce que las combinaciones TMK-XLD y BGA y SBG-XLD y BGA, inhiben el crecimiento de la flora presente en el agua sin contaminación fecal.

2.2. EFECTO INHIBIDOR DEL TMK SOBRE BACTERIAS HETEROTROFAS Y BACTERIAS INTESTINALES EN AGUAS CONTAMINADAS, SOSPECHOSAS DE PORTAR SALMONELLAS.

El segundo grupo de ensayos se encaminaron a estudiar el efecto del caldo de TMK como medio de enriquecimiento y del BGA como medio sólido de aislamiento para observar su acción inhibitoria sobre bacterias heterótrofas y bacterias intestinales no pertenecientes al género Salmonella y su eficacia para detectar Salmonellas. Para ello se eligieron aguas del río Jarama y río Henares, contaminadas en distinto grado por aguas residuales urbanas y rurales. Las características bacteriológicas de las muestras fueron por milímetro:

	aerobios	coliformes totales	E. coli
- Paracuellos	25.000.000	30.000	11.000
- Puente de San Fernando	100.000.000	28.000	440
- La Poveda	20.000.000	16.000	190

Del primer punto se filtraron 300, 100 y 10 ml, de agua a través de membranas de 0,45 micras de tamaño de poro y se inocularon directamente 1 y 0,1 ml. de agua. Del segundo punto, se filtraron 50 y 10 ml. Del tercer punto se inocularon 100, 20 y 10 ml. de agua en 100, 20 y 10 ml. de TMK (2X) y 1 y 0,1 en 10 ml. de TMK. Cada membrana se sumergió en 25 ml. de TMK y los inóculos de 1 y 0,1 se pusieron en 10 ml. del mismo medio. Los caldos se incubaron

a 43°C hasta 72 horas. A las 24, 48 y 72 horas se realizaron siembras en BGA que se incubaron a 37°C, 24 horas. Todas las placas de BGA pesentaron crecimiento bacteriano, apareciendo 14, 1 y 17 colonias sospechosas de ser Salmonellas, de la primera, segunda y tercera muestra respectivamente.

En las pruebas de confirmación ninguna de las 15 colonias sospechosas de las dos primeras muestras resultó ser Salmone-llas, ya que todas eran ureasa positiva y el 100% de las Salmone-llas son ureasa negativa (Edwards y Ewing, 1972; Mauanl Bergey, 1974).

La 17 colonias procedentes de la tercera muestra se ino-cularon en TSI, 14 aunque no fermentaron la lactosa y/o sacarosa, no produjeron SH₂ y no formaron gas de la glucosa, por lo que se descartaron como Salmonellas. Una aunque no fermentó la lactosa y/o sacarosa, produjo SH₂ y gas de la glucosa, pero se descartó igualmente al ser ureasa positiva. Dos fermentaron la lactosa y/o sacarosa y además no formaron SH₂ y gas de la glucosa por lo que también se descartaron. El 92% de las cepas de Salmonellas son for-madoras de SH₂ y de gas de la glucosa, aunque S. typhi no lo produ-ce, el 94% de sus cepas son productoras de SH₂ (Edwards y Ewing, 1972; Manual Bergey, 1974).

En resumen, la combinación TMK-BGA ensayada no permitió detectar Salmonellas y sí el crecimiento de otras bacterias, proba-blemente se origen fecal como Coliformes y Proteus.

2.3. EMPLEO DE SUBCULTIVOS PARA AUMENTAR EL EFECTO INHIBIDOR DEL CALDO DE ENRIQUECIMIENTO SOBRE ENTEROBACTERIAS NO PERTENECIENTES AL GENERO SALMONELLA.

El tercer grupo de ensayos se dirigieron a observar si se mejoraba el crecimiento de las Salmonellas y aumentaba el poder inhibidor sobre otras bacterias por el uso del medio de TMK, mediante dos subcultivos sucesivos en TMK (2X) para dar una concen-tración final en el primer subcultivo de 1,5 X y en el segundo 1,77 X. Cada cultivo se incubó a 40°C, 24 horas, sembrándose al fi-nal de éste periodo de incubación en los medios de BGA y agar de

MacConkey (MC), para estudiar sus características diferenciales y selectivas.

Según se observa en la tabla 5, los resultados de la muestra de heces de gallina, al sembrar en profundidad un ml. de las diluciones más apropiadas en MC fueron las siguientes: en el cultivo directo, el número de colonias fermentadoras de lactosa fué tan abundante que impidió la observación de las colonias sospechosas de ser Salmonellas, en el primer subcultivo no aparecieron colonias fermentadoras de lactosa y sí sospechosas, en el segundo subcultivo aumenta ligeramente el número de colonias sospechosas y volvieron a aparecer algunas colonias fermentadoras de lactosa.

Tabla 5. Siembra en profundidad en MC y BGA.

medio	MC 37°C, 24 horas		BGA 37°C, 24 horas	
dilución	-2		-1	
tipo colonias	L +	L -	NS	S
cultivo directo	400	0	18000	220
primer subcultivo	0	9	40	2
segundo subcultivo	8	25	700	7

L + fermentadoras de lactosa NS no sospechosas

L - no fermentadoras de lactosa S sospechosa

Al sembrar en profundidad en BGA, los resultados como se muestran en la tabla 5, fueron los siguientes: en el cultivo directo, el número de colonias no sospechosas fué muy abundante, pero apesar de ello se observaron colonias sospechosas de ser Salmonellas, en el primer subcultivo aparecieron algunas colonias de los dos tipos, y en el segundo subcultivo aumentó el número de colonias no sospechosas manteniéndose la baja cantidad de colonias sospechosas.

Según se observa en la tabla 6, los resultados de la muestra de agua de bebedero al sembrar en profundidad en BGA, fue-

ron los siguientes: en el cultivo directo, el número de colonias fué tan abundante que no se pudieron contar, en el primer subcultivo disminuyó el número total de colonias, fundamentalmente las sospechosas, en el segundo subcultivo prácticamente desaparecieron ambos tipos de colonias.

Tabla 6. Siembra en profundidad de agua de bebedero en BGA.

medio	BGA 37°C, 24 horas bacterias/1 ml	
dilución	1 ml sin diluir	
tipo colonias	NS	S
cultivo directo	incontables	
primer subcultivo	1.300	60
segundo subcultivo	1	0

En resumen, en el cultivo directo se produce abundante crecimiento bacteriano, al realizar subcultivos, aunque disminuye intensamente el número de bacterias, aumenta la proporción de colonias sospechosas sobre las no sospechosas a lo largo de los subcultivos. En cuanto a los medios de aislamiento, el MC, cuando hay abundante crecimiento bacteriano no permite una buena diferenciación entre fermentadoras y no fermentadoras de lactosa, mientras que el BGA, sí lo permite.

A partir de los subcultivos se realizaron siembras en su superficie sobre placas de BGA que se incubaron a 37°C, 24 horas, aislándose un total de 34 colonias sospechosas de ser Salmonellas.

Se tomaron 24 colonias sospechosas de la muestra de heces, resultando ser todas ureasa positivas, descartándose como Salmonellas. De la muestra de agua de bebedero se tomaron 10 colonias sospechosas, que al realizar las diversas pruebas de indentificación, aunque presentaron ureasa negativa, al no formar SH₂ en el TSI y al dar reacciones negativas en el Rojo de Metilo se descartaron como Salmonellas.

2.4. APLICACION DEL METODO DE SUBCULTIVOS EN AGUAS CON FUERTE CONTAMINACION FECAL Y SOSPECHOSAS DE PORTAR SALMONELLAS.

En el cuarto grupo de ensayos se insiste en el TMK como caldo de enriquecimiento, que aunque inhibe a bacterias no fecales, permite el crecimiento de bacterias intestinales de modo indiscriminado, tanto de fermentadoras de lactosa y sacarosa como de no fermentadoras de lactosa y sacarosa, en sospechosa y sospechosas respectivamente de ser Salmonellas. Para corregir éste defecto se usa el método de subcultivos que aumenta la proporción de sospechosas frente al de no sospechosas.

Debido a que el BGA, aunque permite el crecimiento de colonias sospechosas, éstas al confirmarlas bioquímicamente, se descartaban como Salmonellas, por ello se amplió el número de medios sólidos de placaje. Se eligieron el XLD y el BS, el primero aumenta el número de caracteres diferenciales entre las colonias sospechosas y no sospechosas. Estos caracteres son la descarboxilación de la lisina y la formación de SH_2 , el 100% y el 98% de las cepas de Salmonellas, respectivamente utilizan la lisina y producen SH_2 (Edwards y Ewing, 1972; Manual Bergey, 1974). El BS se escogió por ser un medio recomendado para el aislamiento del bacilo tífico. Para éste ensayo se utilizó agua del río Manzanares, Vaciamadrid, que presuntivamente sospechábamos contenía Salmone-llas.

Se emplearon volúmenes de 500, 100, 10, 1, 0'1 y 0'01 ml de agua de la muestra, que se inocularon directamente en el medio de enriquecimiento, utilizándose la técnica de subcultivos como se describe en el tercer grupo de ensayos. A partir del cultivo directo y primer subcultivo se realizaron siembras en XLD y del segundo subcultivo en XLD, BGA y BS. De cada siembra se tomaron colonias aisladas para estudiar sus caracteres bioquímicos.

Del XLD se tomaron 12 colonias fermentadoras de xilosa y que descarboxilaban la lisina y 23 que además producían SH_2 . Del BGA, tres colonias lactosa y sacarosa negativas y del BS, ocho formadoras de SH_2 . En el XLD, aparecieron menos colonias y más aisladas que en el BGA.

Las 46 colonias seleccionadas presentaron las siguientes características bioquímicas:

FORMA	GRAM	OXIDACION	FERMENTACION	Red. NITRATOS	OXIDASA	CATALASA	MOVILIDAD	SH ₂ (TSI)	UREA	INDOL	R.M.	V.P.	CITRATO	COLONIAS
		-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	1
		-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	2,3,4
		-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	5
		-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	6,7
B	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	8,9,10
		-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	11
		-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	12,13
		-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	14...34
		-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	35,36,37,38
		-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	39,40
		-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	41
		-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	42,43
		-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	44
		-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	45
		-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	46

Como se ve, la combinación TMK-XLD, BS, BGA, inhibió el crecimiento de bacterias gram positivas, pero permitió el crecimiento de Enterobacterias y otras bacterias. Ninguna de ellas se pudo incluir en el género Salmonella.

2.5. ENSAYO DEL METODO DE SUBCULTIVOS CON DOS CALDOS DE ENRIQUECIMIENTO (TMK Y SBG) CON Y SIN SULFAS PARA INTENTAR UNA MAYOR SELECTIVIDAD.

Quinto grupo de ensayos que se dirigieron a aumentar la selectividad del caldo de enriquecimiento, el TMK, mediante el empleo de sulfanilamida. Simultáneamente se empleó el SBG, para ver

si con él lograbamos el aislamiento de Salmonellas. Seguimos utilizando el método de subcultivos con la temperatura de incubación de 40°C y como medios de aislamiento el XLD, BGA y BS.

Se usó una muestra de agua del río Manzanares, Vaciamadrid; se filtraron tres litros de agua a través de una membrana de 0'22 micras de tamaño poro para concentrar las bacterias presentes en la muestra. El filtro se cortó en cuatro porciones iguales y cada porción se inoculó en 50 ml del caldo de enriquecimiento, SBG con o sin sulfa al 0'1 %, TMK con y sin sulfa al 0'1 %. A partir del segundo subcultivo de las cuatro combinaciones de los caldos de enriquecimiento, se seleccionaron 26 colonias para su estudio bioquímico, procedentes de los tres medios sólidos de aislamiento.

De las 26 colonias, solamente seis procedentes del SBG sin sulfa, cuatro tomadas en el XLD y dos en el BS, permitieron seleccionarlas como posibles Salmonellas, por presentar las siguientes características, formadoras de SH₂ en el TSI, ureasa negativas, catalasa positivas, oxidasa negativa, indol negativo, rojo de metilo positivo, acetoina negativa, utilización del citrato, fenil alanina deaminasa negativa y reducir los nitratos a nitritos.

En vista de estos resultados, para su confirmación e identificación como bacterias pertenecientes al género Salmonella se realizaron estudios morfológicos y bioquímicos recomendados en Edwards y Ewing, 1972; Manual Bergey, 1974. Los resultados se muestran en la tabla 7.

Posteriormente se realizaron pruebas de aglutinación somática con suero polivalente, confirmándolas como Salmonellas pertenecientes al grupo somático B.

El único caldo de enriquecimiento que encontramos capaz de detectar Salmonellas a partir de aguas polucionadas, fué el SBG sin sulfa, mediante el método de subcultivos con la temperatura de incubación a 40°C.

Para estudiar la eficacia de la sulfanilamida, añadida

Tabla 7. Pruebas de identificación.

número colonia	10	11	12	15	18	26
forma, gram	B -	B -	B -	B -	B -	B -
tamaño (micras)	1'5-3x0'7	2x0'5	1x0'5	1'5x0'7	1'5x0'7	3-4x1
movilidad	movil	movil	movil	movil	movil	movil
catalasa	+	+	+	+	+	+
oxidasa	-	-	-	-	-	-
oxidación	+	+	+	+	+	+
fermentación	+	+	+	+	+	+
red. nitratos	+	+	+	+	+	+
urea	-	-	-	-	-	-
SH ₂ (TSI)	+	+	+	+	+	+
fenil alanina- deaminasa	-	-	-	-	-	-
manitol	+g	+g	+g	+g	+g	+g
lactosa	-	-	-	-	-	-
sacarosa	-	-	-	-	-	-
glucosa	+g	+g	+g	+g	+g	+g
maltosa	+g	+g	+g	+g	+g	+g
trehalosa	+g	+g	+g	+g	+g	+g
dulcitol	+g	+g	+g	+g	+g	+g
sorbitol	+g	+g	+g	+g	+g	+g
arabinosa	+g	+g	+g	+g	+g	+g
malonato	-	-	-	-	-	-
cittrato	+	+	+	+	+	-
rojo de metilo	+	+	+	+	+	-
acetoina	-	-	-	-	-	-
indol	-	-	-	-	-	-
decarboxilación Lys	+	+	+	+	+	+
dehidrolisis Arg	+	+	+	+	+	+
decarboxilación Orn	+	+	+	+	+	+
licuefacción gelatina	-	-	-	-	-	-
crecimiento a 44°C	regular	no	no	bien	regular	regular

para eliminar las bacterias interferentes, sin afectar el desarrollo de las Salmonellas, para ello se realizó a las 24 horas de incubación de los cultivos directos una siembra en profundidad en XLD y BGA cuyos resultados se exponen en la tabla 8. Los dos medios de aislamiento se incubaron a 37°C, 24 horas.

Tabla 8. Siembra en profundidad en XLD y BGA.

medio	SBG		SBG-S		TMK		TMK-S	
dilución	-3		-2		-3		-2	
tipo colonia	S	NS	S	NS	S	NS	S	NS
BGA	2	5200	0	5800	52	320	3	522
XLD	0	3480	0	2900	812	30	331	14

Dado que el número de bacterias presentes en la dilución es muy elevado, el margen de error en las cifras puede ser muy grande, sin embargo creemos que sirven de orientación. Como se ve en la tabla 8, la sulfa inhibe el crecimiento tanto de bacterias sospechosas como el de no sospechosas de ser Salmonellas. Estos resultados parecen corroborar que la adición de sulfa al medio de enriquecimiento, no favorece el aislamiento de Salmonellas, como se comprueba por el hecho de que el SBG sin sulfa fué capaz de detectarlas y el que contenía sulfa, no.

Como se demuestra en la tabla 7, hay que realizar muchas pruebas bioquímicas para determinar si una bacteria pertenece al género Salmonella. Por lo tanto se recomienda, pensando en el costo, trabajo y mayor rapidez, que se realicen pocas pruebas bioquímicas, para continuar con la prueba de aglutinación somática con suero polivalente.

2.6. PROPUESTA Y JUSTIFICACION DE UN NUEVO MEDIO DE ENRIQUECIMIENTO.

De la revisión bibliográfica y principalmente en los ensayos experimentales, se observó que el medio de selenito es el más eficaz para intentar el aislamiento de Salmonellas en el agua. Sin embargo, al obtenerse con el empleo de éste medio resultados

mu muy dispares en nuestros ensayos de laboratorio, realizamos un estudio de la actividad de los distintos componentes que conforman los variados medios, que contienen el selenito como componente principal y que da nombre al medio, con la finalidad de solucionar éstos inconvenientes.

2.6.1. Antecedentes.

Handle y Theodorascu observaron que E. coli era más susceptible a la toxicidad del selenito sódico que S. typhi. En 1910, Klett encontró que el selenito sódico al 0,1%, presentaba propiedades diferenciales en el crecimiento bacteriano (Harvey y Pruci, 1979).

Leifson, 1936, amplió las observaciones de Guth y elaboró un agar con selenito y un caldo de enriquecimiento para usarlo en el aislamiento de bacilos del tifus y paratifus en heces y orina.

El nuevo medio descrito por Leifson, el selenito F, tiene por fórmula por 100 ml. de agua destilada.

triptona	0,5 gr.
lactosa	0,4 gr.
fosfato disódico	1 gr.
selenito sódico	0,4 gr.

Por medio de curvas de crecimiento demostró que el medio aunque no era lo suficientemente tóxico para inhibir completamente el crecimiento de Enterococos y E. coli, produce una reducción de sus números durante las 12 primeras horas de incubación, mientras que los bacilos del tifus eran capaces de multiplicarse rápidamente desde las primeras horas de incubación, sobrepasando a los organismos competidores que interfieren en su aislamiento e identificación. El medio mostró una falta de inhibición sobre el género Proteus.

Leifson citó varios factores que afectaban a las propiedades inhibitorias de las sales de selenito, entre ellas la influencia de los fosfatos, tipo de peptona utilizado y cantidad de

materia orgánica.

Nort y Bartram 1953, comprobaron que se originaban diferencias en el crecimiento de Salmonellas usando distintos tipos de peptonas en el caldo de selenito F, producidas por diferentes casas comerciales e incluso entre los lotes de la misma casa.

- la falta de alguna sustancia nutritiva en la peptona
- la deficiencia de algún factor por envejecimiento de la peptona

Es posible que las dos causas estén muy interrelacionadas, teniendo como efecto el aumento de la toxicidad del medio para Salmonellas.

Determinaron los niveles óptimos de fosfatos en el caldo de selenito F y reportaron que la reducción del contenido de fosfatos del medio del 1% al 0,25% aumentaba la selectividad y reproductividad del medio.

La edición de extracto de levadura al 0,01% al caldo de selenito F que contenían lotes de peptona que no soportaban el crecimiento o producían una pobre recuperación de Salmonellas, tenía como efecto la completa recuperación de las Salmonellas añadidas.

Stokes y Osborne, 1955, describieron un nuevo medio de enriquecimiento, el selenito verde brillante (SBG), que tiene como fórmula por 100 ml. de agua destilada:

peptona	0,5 gr.
extracto de levadura	0,5 gr.
manitol	0,5 gr.
selenito sódico	0,4 gr.
taurocolato sódico	0,1 gr.
tampón fosfato pH=7	0,025 molar
verde brillante	0,0005 gr.

Los niveles de fosfato en el medio son tan importantes que cuando se suprimen no se produce crecimiento, a pesar de que la peptona y el extracto de levadura llevan fosfatos como impurezas. Se ha visto que los requerimientos de fosfatos aumentan con

los ingredientes del medio, particularmente con los componentes inhibitorio^s como el selenito y el verde brillante. Concentraciones altas de fosfato, como 0,1 molar estimulan el crecimiento de Proteus, mientras que inhibe parcialmente algún serotipo de Salmonella. Adoptaron la concentración de 0,025 molar, que era la que producía mayor estímulo en el crecimiento de Salmonellas y mayor inhibición sobre Proteus.

Las propiedades inhibitorias del medio se basan en la suma de las actividades del selenito, verde brillante y taurocolato sódico.

El medio completo produce menor crecimiento de Salmonellas que el medio basal, sin los componentes inhibitorios, mientras que inhibe completamente el crecimiento de E. coli y P. vulgaris.

Osborne y Stokes, 1955, comprobaron al igual que Banwart y Ayres en 1953, que los caldos de enriquecimiento disminuían sus propiedades selectivas de inhibición, cuando se intentaba aislar Salmonellas de huevos.

Encontraron que la pérdida de selectividad del SBG por el huevo residía en la yema y muy poco en la albúmina. Encontraron que con la adición al medio de pequeñas cantidades de sulfapiridina al 0,1% se recuperaban las propiedades inhibitorias del medio, aún en presencia de huevo entero. La sulfapiridina aumenta la protección del medio contra la materia orgánica que tiende a neutralizar las propiedades del medio.

Taylor y cols, 1958, fueron incapaces de confirmar la ventaja de la sustitución del manitol por la lactosa, ya que el SBG era menos eficiente que el selenito F o una modificación, el selenito cistina descrito por North y Bartran, 1953.

H. Raj, 1966, estudió la eficacia de cinco medios de enriquecimiento, selenito F, selenito F más cistina, SBG, selenito de North y Bastran y el medio de Rappaport, sobre cinco serotipos de Salmonella y organismos competidores como Proteus, E. coli y Pseudomonas.

Sus resultados le llevaron a desarrollar un nuevo medio de cultivo que fuera muy sensible y selectivo en el aislamiento de Salmonellas. Para ello ideó distintas combinaciones que probó con cinco serotipos de Salmonellas y ocho organismos competidores. La combinación que presentó los mejores resultados tiene como fórmula por 100 ml. de agua destilada:

proteosa peptona	0'4	gr.
extracto de levadura	0'15	gr.
dulcitol	0'4	gr.
selenito de sodio	0'5	gr.
PO ₄ HNa ₂	0'125	gr.
PO ₄ H ₂ K	0'125	gr.
pH	6'9	

2.6.2. Propuesta del nuevo medio de enriquecimiento.

A lo largo de los años 1977 y 1978 estudiamos la eficacia de varios caldos de enriquecimiento, el SBG de Stokes y Osborne y el tetracionato de Muller-Kauffman, dos de los medios más frecuentemente usados en la detección de Salmonellas, sobre muestras de agua contaminadas artificial y naturalmente y en cultivos puros de tres serotipos de Salmonellas, *S. typhi*, *S. typhimurium* y *S. enteritidis*.

Como consecuencia de los resultados obtenidos en los distintos ensayos de laboratorio, comprobamos que el SBG era mucho más eficaz que el TMK, ya que mientras que con el primero se detectaron Salmonellas en las muestras contaminadas natural y artificialmente y permitía el crecimiento de los cultivos puros de Salmonellas, con el TMK no se detectaron Salmonellas y no permitía el crecimiento de los cultivos puros.

Ahora bien con el SBG obtuvimos resultados muy dispares, tanto con la muestra contaminada artificial como naturalmente y con los cultivos puros; respecto a éstos últimos, en un ensayo no permitió el crecimiento de dos serotipos de los tres estudiados, *S. typhi* y *S. typhimurium*.

Estos resultados, los cinco primeros grupos de ensayos, nos llevaron a desarrollar una nueva fórmula como medio de enriquecimiento, modificando la propuesta por Raj, 1965, en la que sustituimos el dulcitol por sorbitol como hidrato de carbono en el medio, manteniendo los demás componentes. La justificación de nuestra propuesta, basada en las características bioquímicas diferenciales del género *Salmonella* se expresa en el párrafo siguiente y la confirmación de los buenos resultados obtenidos con su empleo se determina en los grupos de ensayos sexto, séptimo, octavo y noveno. El medio se describe en el apartado 3.

2.6.3. Justificación basada en las características bioquímicas diferenciales de las Salmonellas.

Respecto a los componentes del nuevo medio podemos decir:

1.- Como hemos visto los niveles de fosfato del medio son muy importantes. North y Bartram. 1953, determinaron los niveles óptimos de los fosfatos en el caldo de selenito. La reducción del contenido de fosfato del 1% al 0,25%, que fué la concentración adoptada, estimula el crecimiento de *Salmonellas*, inhibiendo al *Proteus*, es decir, aumenta la selectividad y productividad del medio.

2.- El uso de las peptonas se remonta a 1914, y desde entonces son utilizadas no sólo en los medios de cultivos generales, sino también en estudios especiales de investigación.

Contienen nitrógeno, aproximadamente un 15%, que es utilizado fácilmente para el desarrollo de bacterias, además de los siguientes elementos: aminoácidos como triptofano, tirosina y cistina, amonio, amina, amida, azufre orgánico, azufre inorgánico hierro y una cantidad pequeña de proteasas.

3.- Hay lotes de peptona que no soportan el crecimiento de *Salmonellas*, North y Bartram, 1953, mostraron que la adición de extracto de levadura es una fuente de vitaminas del complejo B, y suministra algunas coenzimas necesarias para la utilización del sorbitol por las *Salmonellas* (Raj, 1966).

4.- Smith, 1959, estudió el mecanismo de acción del selenito. Este

reacciona con los compuestos de sulfuro, para formar los complejos seleno-sulfurosos que selectivamente actúan como agentes inhibidores del crecimiento, ya que los organismos difieren en su capacidad para utilizar las fuentes de sulfuro.

5.- Las sucesivas modificaciones de los caldos de selenito, difieren en la variación del hidrato de carbono, que es la lactosa en el selenito F, el manitol en el SBG, dulcitol en el dulcitol selenito y el sorbitol en el sorbitol selenito.

La razón para el uso del hidrato de carbono en el caldo de selenito fué claramente explicada por Leifson, quien en 1936 propuso la lactosa. La lactosa en el medio sirve para mantener un pH uniforme. Cuando el selenito es reducido por el crecimiento de las bacterias se produce un álcali que incrementa el pH, disminuyendo la toxicidad del selenito, lo que produce un sobrecrecimiento de organismos competidores. El ácido producido por la fermentación de la lactosa, por enterococos, coliformes, etc, sirve para neutralizar o disminuir ligeramente el pH del medio.

Se fué en busca del hidrato de carbono que fuera sólo fermentado por las Salmonellas, ya que serviría para favorecer el crecimiento solamente de ellas, y además ayudaría a mantener el pH. Sin embargo, no se encontró un hidrato de carbono con tales propiedades. Se rechazó la lactosa porque sólo es fermentada por el 0,8% de las cepas de Salmonellas.

Stokes y Osborne, 1955, seleccionaron el manitol porque es fermentado por prácticamente por todas las cepas de Salmonellas (99,7%) y aunque es fermentado por la mayoría de cepas de Escherichia (96,8%), solamente es fermentado por una especie de Proteus, P. rettgeri (88,5%).

Raj, 1966, propuso la sustitución del manitol por el dulcitol, ya que es fermentado por el 86% de las cepas de Salmonellas, aunque muy lentamente por S. typhi y S. cholerae suis. No es fermentado por ninguna especie de proteus y por el 50% de las cepas de Escherichia.

Nosotros proponemos el empleo del sorbitol como hidrato

Nosotros proponemos el empleo del sorbitol como hidrato de carbonò, ya que es fermentado rápidamente por el 94,1% de las cepas de Salmonellas, incluida *S. typhi* y aunque es fermentado por el 93% de las cepas de *Escherichia*, solamente es fermentado por el 1,2% de cepas de *P. rettgeri*.

Como se puede observar el sorbitol se asemeja al manitol en el tanto por ciento de cepas de Salmonellas que lo fermentan pero tiene la ventaja que sólo es fermentado por el 1,2% de las cepas de *P. rettgeri* frente al 88,5% de las cepas por el manitol.

El sorbitol es superior al dulcitol, ya que es fermentado rápidamente por el 8,1% más de cepas de Salmonellas incluida *S. typhi* y los dos se pueden considerar que no son fermentados por *Proteus*.

Los datos de tanto por ciento de cepas fermentadoras han sido sacados del libro "Identificación de Enterobacterias" (Edwards y Ewing, 1972).

2.7. ESTUDIO IN VITRO DE TRES SEROTIPOS DE SALMONELLAS EN TRES CALDOS DE ENRIQUECIMIENTO.

Sexto grupo de ensayos. En vista de los resultados obtenidos en los ensayos anteriormente realizados y al creer que los medios de selenito pueden ser más útiles para el aislamiento de *Salmonellas* en aguas polucionadas, probamos uno de los medios más empleados, el SBG, y para evitar los efectos inhibitorios de algunos de los componentes de éste medio, eliminamos el verde brillante, que también forma parte del TMK con tan malos resultados, poniendo como único inhibidor de otras bacterias no pertenecientes al género *Salmonella*, el selenito de sodio, para observar su efecto individual y poniendo como hidrato de carbono el sorbitol.

Para determinar la sensibilidad de cada medio y la eficacia del método de subcultivos, se ensayaron aguas contaminadas artificialmente con tres serotipos de Salmonellas (*S. typhi*, *S. typhurium* y *S. enteritidis*), estudiando su crecimiento in vitro en tres caldos de enriquecimiento (TMK, SBG y sorbitol selenito).

Por razones de planificación del trabajo. los inóculos de Salmonella debían permanecer 72 horas en nevera. Por tanto, se debió comprobar si se producía aumento o disminución del número de células viables en las diluciones mantenidas a 4-5°C, en nevera. Para ello, se cultivaron en tubos de caldo nutriente cada uno de los tres serotipos, incubándose a 37°C, 18 horas. Para obtener pequeños números de Salmonellas por milímetro se hicieron diluciones al décimo en solución Ringer al cuarto, determinándose su número mediante siembras en dos placas de agar nutriente por cada dilución, que se incubaron a 37°C, 24 horas. Para comprobar la permanencia de un pequeño número de Salmonellas en el agua de dilución conservada a 4-5°C, se determina el número de Salmonellas/ml cada 24 horas de permanencia en la nevera, por siembra en dos placas de agar nutriente que se incubaba a 37°C, 24 horas.

En los dos ensayos que se exponen en las tablas 9 y 10, se observa que el número de células viables de los tubos de dilución permanece constante. Es decir, no hay evidencia de muerte o multiplicación después de permanecer los tubos de dilución en nevera 24, 48 y 72 horas.

Tabla 9. Primer ensayo de supervivencia de Salmonellas en solución Ringer a 4-5°C.

SEROTIPO	Cel/ml	HORAS EN NEVERA		
		24	48	72
		Cel/ml	Cel/ml	Cel/ml
S. typhi	7	3	7	4
S. typhimurium	28	27	30	29
S. enteritidis	19	24	24	23

En las pruebas de enriquecimiento y aislamiento de Salmonellas, se usó como inóculo una porción de la suspensión deluida en solución Ringer al cuarto, para dar aproximadamente el número de células viables que nos interesaba, comprobándose el número real de Salmonellas en el inóculo por siembra de dos placas de agar nutrien

te incubadas a 37°C, 24 horas.

Tabla 10. Segundo ensayo de supervivencia de Salmonellas en solución Ringer a 4-5°C.

SEROTIPO	Cel/ml	HORAS EN NEVERA		
		24	48	72
		Cel/ml	Cel/ml	Cel/ml
S. typhi	26	31	24	27
S. typhimurium	17	24	24	20
S. enteritidis	16	13	11	11

La marcha analítica que se siguió con los tres caldos y los tres serotipos fué la siguiente:

Primer día. Un número conocido de cédulas de cada serotipo de Salmonellas, se inoculó en tubos para cada medio de enriquecimiento por duplicado, incubándose a 4°C, 24 horas. El volumen de cada medio era de 5 ml. (2X), al que se añadía 1 ml. de la dilución de Salmonellas y 4 ml. de agua destilada estéril resultando una concentración final de cada uno de los medios de enriquecimiento de X, con un volumen de 10 ml.

Segundo día. A las 24 horas de incubación del cero pase, se determinó el número de Salmonellas por milímetro de cada tubo del medio de enriquecimiento haciendo diluciones al décimo, inoculándose cada una de ellas en placas de agar nutriente, incubándose a 37°C, 24 horas. A continuación se inocularon 5 ml. de cada caldo en 5 ml. (2X) de caldo recién preparado (primer pase), incubándose en las mismas condiciones que el día anterior.

Tercer día. A las 24 horas de incubación del primer pase, se determinó el número de Salmonellas por milímetro de cada tubo del medio de enriquecimiento, haciéndose diluciones al décimo, incubándose cada una en placas de agar nutriente e incubándose a 37°C, 24 horas. A continuación se inocularon 5 ml. de cada caldo en 5

ml. (2X) de medio recién preparado (segundo pase) incubándose en las mismas condiciones que en los días anteriores.

Cuarto día. A las 24 horas de incubación del segundo pase se determinó el número de Salmonellas por milímetro de cada tubo de caldo de enriquecimiento, haciéndose diluciones al décimo e inoculándose cada dilución en placas de agar nutriente incubándose a 37°C, 24 horas.

Los resultados de las pruebas realizadas se muestran en la tabla 11. En ella se ve que:

- de los tres caldos de enriquecimiento estudiados, el TMK fué tan inhibitorio que no permitió el crecimiento de los tres serotipos de Salmonellas en ninguno de los dos ensayos. El SBG inhibió completamente a dos serotipos de los tres en un ensayo, mientras que el sorbitol selenito permitió el crecimiento de los tres serotipos en los dos ensayos.
- el comportamiento de S. typhi fué distinto con cada inóculo. Así, cuando éste fué de 10 células por tubo, el SBG inhibió su crecimiento, mientras que el sorbitol selenito lo permitió. En éste medio, en el primer pase se produjo un aumento para reducirse ligeramente en el segundo pase, aunque sigue siendo el número más elevado que en cero pase.

Cuando se usó como inóculo 21 células por tubo, el crecimiento fué similar en los dos medios en el cero pase. En el primer pase se produce una reducción siendo ésta mayor en el SBG que en el sorbitol selenito. En el segundo pase, mientras que en el SBG sufre una ligera reducción, llegándose a obtener la cifra más baja de los tres pases, en el sorbitol selenito se produce un aumento, siendo el número de células doble que en el primer pase y superior al cero pase. Aunque el número de células por milímetro, en el segundo pase es pequeño ($2 \cdot 10^6$ /ml.) es suficiente para tener la oportunidad de aislarse cuando se siembre un asa de cultivo sobre los medios sólidos de aislamiento.

- el serotipo S. typhimurium se inhibió en un ensayo por el SBG y

no por el sorbitol selenito. En un segundo ensayo presentó un comportamiento similar en los dos medios e igual al primer ensayo en el sorbitol selenito, así, el número de células por mililitro sufre una gran reducción en el primer pase, mientras que en el segundo pase se incrementa de manera muy notoria para llegar a la cifra más alta de todos los pases.

- el serotipo S. enteritidis presentó un comportamiento similar en los dos medios, teniendo un aumento progresivo y continuado en cada pase, si bien el SBG permitió un mayor crecimiento en todos los pases que el sorbitol selenito.
- el método de subcultivos con la temperatura de 40°C, no sólo no reduce el número de células/ml, sino que lo aumenta de manera significativa. Al ser mayor el número de Salmonellas/ml en el caldo de enriquecimiento, aumenta la probabilidad de detectarlas, cuando se siembra un asa del caldo en los medios sólidos de aislamiento.

Resumiendo, 1.- A la vista de los resultados in vitro y en los primeros ensayos de laboratorio descartamos el TMK como caldo de enriquecimiento. 2.- El sorbitol selenito, se mostró como el medio más y el de mayor reproductividad. 3.- Con el método de subcultivos empleado por nosotros, con la temperatura de 40°C, se aumenta de manera significativa el número de células/ml.

2.7.1. Valoración del método de subcultivos en sorbitol selenito.

En cuanto a la valoración del método de subcultivos en sorbitol selenito, como se muestra en la tabla 11 se ve que respecto a S. typhi se observan diferencias con los dos inóculos, con el de 10 cél/tubo, que equivale a 1 cél/ml, a las 24 horas de incubación se obtienen 1000 cél/ml, mientras que con el de 21 cél/ml, equivalente a 2 cél/ml, se llega a 1.400.000 cél/ml. Al realizar el primer subcultivo nos encontramos que en el primer caso se produce una multiplicación y en el segundo una pequeña reducción para llegar a $3 \cdot 10^6$ cél/ml y $1 \cdot 10^6$ cél/ml, respectivamente. Al realizar un segundo subcultivo se observa un proceso inverso, peque-

Tabla 11.- Crecimiento in vitro de tres serotipos de Salmonella en tres caldos . de enriquecimiento.

Medio	Serotipo	Nº inicial/ tubo. Cel/10 ml.	0 Pase	1 ^{er.} Pase	2º Pase
			Cel/1 ml.	Cel/1 ml.	Cel/1 ml.
Tetracionato de Muller - Kauffmann	S. typhi	10	0	0	0
		21	0	0	0
	S. typhi- murium.	11	0	0	0
16		0	0	0	
S. ente- ritidis.	15	0	0	0	
	17	0	0	0	
Selenito Verde Brillante	S. Thipy	10	0	0	0
		21	2.000.000	900.000	800.000
	S. thipy- murium.	11	100.000.000	30.000.000	240.000.000
16		0	0	0	
S. ente- ritidis.	15	51.000.000	180.000.000	400.000.000	
	17	80.000.000	160.000.000	340.000.000	
Sorbitol Selenito	S. thipy	10	1.000	3.000.000	2.000.000
		21	1.400.000	1.000.000	2.000.000
	S. thipy- murium.	11	170.000.000	70.000.000	380.000.000
16		120.000.000	60.000.000	320.000.000	
S. ente- ritidis	15	13.000.000	70.000.000	320.000.000	
	17	15.000.000	50.000.000	280.000.000	

na reducción y multiplicación respectivamente, para en los dos casos alcanzar la cifra de 2.10^6 cél/ml. Es decir, se pasa de 1.000 y 1.400.000 cél/ml a las 24 horas de incubación a 2.10^6 cél/ml al realizar los dos subcultivos.

El serotipo *S. typhimurium* presentó un comportamiento similar con los dos inóculos (11 y 16 cél/tubo, lo que equivale en los dos casos a menos de 2 cél/ml). Al ser las cifras similares en todos los pases, tomando la media aritmética de los dos ensayos en cada pase como la cifra representativa, se tiene que a las 24 horas de incubación, el número de cél/ml, es de 145.10^6 . En el primer subcultivo se produce una gran reducción para llegar a 65.10^6 cél/ml (los números aparecen divididos por 2'2). En el segundo subcultivo se produce un gran aumento para situarse en 350.10^6 cél/ml (los números aparecen divididos por 5'4). Es decir, los números de *S. typhimurium* al realizar dos subcultivos aparecen multiplicados por 2'4; así se pasa de 145.10^6 a 350.10^6 cél/ml.

El serotipo *S. enteritidis* presentó un comportamiento similar con los dos inóculos (15 y 17 cél/tubo, lo que equivale a menos de 2 cél/ml). Al ser las cifras similares en todos los pases, usaremos la media aritmética de los dos ensayos en cada pase como la cifra más representativa. Así, se tiene que a las 24 horas de incubación, el número de cél/ml es de 15.10^6 . En el primer subcultivo se produce un aumento; los números aparecen multiplicados por cuatro y en el segundo subcultivo se vuelve a producir un aumento, los números se multiplican por cinco. Es decir, los números de *S. enteritidis* al realizar dos subcultivos aparecen multiplicados por 20, así se pasa de 15.10^6 a 300.10^6 cél/ml.

Respecto a las proporciones entre los tres serotipos, tenemos que a las 24 horas de incubación, con el inóculo de 10 células de *S. typhi* por tubo, los números de *S. typhimurium* y *S. enteritidis*/ml respecto a los de *S. typhi*/ml, son de 145000 y 15.000 veces mayores respectivamente. Con el inóculo de 21 células de *S. typhi* por tubo, los números son 103 y 10^7 veces mayo-

res. Los números de *S. typhimurium*/ml, a las 24 horas de incubación son 9'6 veces superiores a los de *S. enteritidis*/ml. En el primer subcultivo, al ser los números de *S. typhimurium* y *S. enteritidis*/ml del mismo orden, tenemos que con el inóculo de 10 células de *S. typhi*/ml, los números de *S. typhimurium* y *S. enteritidis*/ml, son 20 veces mayores que los de *S. typhi*/ml, mientras que con el inóculo de 21 células de *S. typhi* por tubo los números son 60 veces superiores.

En el segundo subcultivo, los números de *S. typhimurium* y *S. enteritidis*/ml, vuelven a ser del mismo orden y al no existir diferencias entre los dos inóculos de *S. typhi*, los números de los dos serotipos/ml, son 150 veces superiores a los *S. typhi*/ml.

Podemos decir, por tanto, que el método de subcultivo en sorbitol selenito:

- aumenta de manera significativa el número de cél/ml.
- que, si bien, a las 24 horas de incubación, la proporción de *S. typhimurium* es 9'6 veces superior a la de *S. enteritidis*, en el primer subcultivo, prácticamente llegan a aproximarse, manteniéndose dicha proporción en el segundo subcultivo, si bien los números de los dos serotipos en dicho pase, son cinco veces superiores a las del primer subcultivo.
- que las proporciones de *S. typhi* con los dos inóculos frente a los dos serotipos son menores en el primer subcultivo, por lo que puede merecer la pena a partir de éste subcultivo realizar una siembra sobre los medios sólidos de aislamiento para intentar detectar dicho serotipo.

La característica del método de subcultivo efectuado por nosotros es que cada subcultivo se realiza sobre caldo doblemente concentrado (2X), por lo que se tiende a lo largo de los subcultivos a que el medio se vaya concentrando gradualmente. Por dicha razón, a éste método de subcultivo lo llamamos método de concentración gradual.

2.8. COMPARACION ENTRE UN NUEVO MEDIO DE ENRIQUECIMIENTO, EL SORBITOL SELENITO Y EL SELENITO VERDE BRILLANTE.

Séptimo grupo de ensayos. Se prosiguieron los estudios comparando el SBG y el sorbitol selenito con el método de concentración gradual con la temperatura de incubación de 40°C, para la detección de Salmonellas e inhibición de otras bacterias, a partir de agua del río Manzanares y río Jarama sin inocular e inoculadas artificialmente. Se utilizó como medio sólido de aislamiento el XLD.

De una muestra de cada río se tomaron tres porciones de 10 ml, haciéndose las siguientes operaciones con cada una de ellas.

- la primera porción, se inculó con 1 ml de una dilución en solución Ringer que contenía 15 células viables de *S. enteritidis* (grupo somático D).
- la segunda porción, se inculó con 1 ml de una dilución en solución Ringer que contenía 18 células viables de *S. typhimurium* (grupo somático B) y con 1 ml de una dilución en solución Ringer que contenía 21 células viables de *S. typhi* (grupo somático D).
- la tercera porción, se utilizó sin inocular.

El tiempo de contacto de cada inóculo con la porción de agua fué de 12 minutos. Cada porción se sembró en caldo de enriquecimiento (2X) para dar una concentración final de (X). Al caldo de sorbitol selenito se le añadió un cultivo de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *S. enteritidis* (10% en volúmen) en sorbitol selenito incubado a 37°C, 18 horas y matadas por calentamiento a 88°C, durante 10 minutos según Kenner y Clark, 1974.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- en la primera porción de las muestras de agua del río Manzanares y río Jarama inoculadas con *S. enteritidis* (grupo somático D), tanto con el método de SBG como el de sorbitol selenito, no permitieron el aislamiento de Salmonellas grupo somático D, pero sí del grupo somático B, que no habían sido inoculadas.

- en la segunda porción de las muestras de agua de los dos ríos, inoculadas con *S. typhi* (grupo somático D) y *S. typhimurium* (grupo somático B), con el método de sorbitol selenito se aislaron, en la muestra del río Manzanares Salmonellas del grupo somático B y D (*S. typhi*) y en la muestra del río Jarama solamente del grupo B. Con el método de SBG se aislaron Salmonellas del grupo somático B de los dos ríos, hay que resaltar que no permitió detectar *S. typhi*.
- en la tercera porción de las muestras de agua de los dos ríos, no inoculadas, se aislaron Salmonellas del grupo somático B, con los dos métodos.

Resumiendo, si bien con los dos métodos se detectaron Salmonellas grupo somático B de las muestras de agua de los ríos inoculadas, también fueron capaces de detectarlas en las muestras de los dos ríos sin inocular.

El método de sorbitol selenito se mostró más eficaz que el SBG, ya que con el se recuperó *S. typhi* en la muestra de agua del río Manzanares que había sido inoculada con éste serotipo y no se recuperó con el método de SBG.

2.9. CONFIRMACION DE LA EFICACIA DEL SORBITOL SELENITO COMO MEDIO DE ENRIQUECIMIENTO.

Octavo grupo de ensayos. A partir de otra muestra del río Manzanares se realizó otro ensayo utilizándose los mismos medios de enriquecimiento, la misma técnica y la misma metodología que se usó en el séptimo grupo de ensayos.

Se tomaron dos porciones de 10 ml de la muestra del río Manzanares, con las que se realizaron las siguientes operaciones:

- la primera porción, se inoculó con 20 células viables de *S. enteritidis*, 21 células viables de *S. typhi* y 26 células viables de *S. typhimurium*.
- la segunda porción, se utilizó sin inocular.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- en la primera porción de la muestra inoculada previamente se aislaron Salmonellas grupo somático B pero no del grupo D, con los dos métodos.
- en la segunda porción de la muestra de agua sin inocular no se aislaron Salmonellas cuando se empleó el método de SBG, pero sí se aislaron cuando se utilizó el método de sorbitol selenito, siendo éstas del grupo somático B.

Resumiendo, el sorbitol selenito a partir de agua del río Manzanares sin inocular, fué capaz de detectar Salmonellas del grupo somático B, sin embargo en la muestra de agua natural que ya contenía Salmonellas grupo somático B, inoculadas con Salmonellas del grupo somático B y D, permitió detectar Salmonellas del grupo B pero no del grupo D, presumiblemente entre otras razones por ser mayor el número inicial de Salmonellas del grupo B en el agua del río Manzanares ensayada.

El SBG fué capaz de detectar Salmonellas del grupo somático B en la muestra de agua que había sido inoculada previamente con éste serotipo, pero no en la muestra sin inocular.

2.10. ENSAYOS DE CAMPO PARA CONFIRMAR LA BONDAD DE LA METODOLOGIA QUE SE RECOMIENDA PARA LA DETECCION DE SALMONELLAS EN AGUAS.

Si consideramos como noveno grupo de ensayos la determinación de Salmonellas en el agua del Canal del Jarama, que nos sirvió de base para su estudio ecológico y epidemiológico. Se confirmó la eficacia del método de concentración gradual con la temperatura de incubación de 40°C, empleando como medio de enriquecimiento el sorbitol selenito.

De las 69 muestras de agua polucionada del Canal del Jarama, analizadas entre Abril y Octubre de 1978, 57 resultaron positivas (82'6%), aislándose un total de 266 cepas de Salmonellas, pertenecientes a cinco serotipos, distribuyéndose de la siguiente forma:

Cepas	Serotipos
234	S. typhimurium
13	S. enteritidis
5	S. essen
3	S. typhi
1	S. paratyphi B
10	S. sin identificar

En 44 muestras solamente se aisló un serotipo, en 11 se detectaron dos, y en dos muestras hasta tres serotipos conjuntamente (para mayor detalle ver ecología y epidemiología de Salmonellas en las aguas polucionadas del Canal del Jarama).

Resumiendo, la metodología seguida por nosotros nos permitió:

- detectar Salmonellas muy frecuentemente (82'6%).
- aislar más de un serotipo conjuntamente en la misma muestra, incluso hasta tres.
- detectar tres cepas de S. typhi.

En el apartado siguiente expondremos detalladamente la metodología que recomendamos para la detección de Salmonellas en aguas.

3. METODOLOGIA QUE SE RECOMIENDA PARA LA DETECCION DE SALMONELLAS EN AGUAS.

Como consecuencia de los ensayos de laboratorio realizados por nosotros, creemos que la metodología más adecuada para detectar Salmonellas es la que propugnamos a continuación.

3.1. ENRIQUECIMIENTO.

3.1.1. Nuevo medio de enriquecimiento, el sorbitol selenito, para el aislamiento de Salmonellas.

La composición del nuevo medio, el sorbitol selenito, es la siguiente:

peptona	0,4	gr.
extracto de levadura	0,15	gr.
sorbitol	0,4	gr.
selenito sódico	0,5	gr.
fosfato disódico	0,125	gr.
fosfato monopotásico	0,125	gr.
agua destilada	100	ml.

El medio se prepara disolviendo todos los ingredientes en agua destilada con un pequeño calentamiento y posteriormente aumentándose la temperatura a unos 90°C, manteniéndola durante 10 minutos. Se debe evitar el calentamiento excesivo y no se debe esterilizar en el autoclave. La racción final del medio será de un pH de 6,9 a 7. Se distribuye en tubos de cultivos estériles y se guardan en nevera hasta su empleo. Una hora antes de su uso se sacan de la nevera y meten en la estufa a 40°C.

3.1.2. Adición de un extracto de cultivo de Salmonellas inactivadas por el calor.

Para incrementar el rendimiento del medio de enriquecimiento, antes de inocular el agua o el filtro a analizar, se añade a los tubos, un cultivo de *S. typhimurium*, *S. enteritidis* y *S. typhi*, al 10% en volumen inoculadas previamente en caldo de sorbitol selenito incubado a 37°C, 18 horas y matadas por calentamiento a

88°C, durante 10 minutos.

3.1.3. Método de concentración gradual.

El método de concentración gradual incluye fundamentalmente tres pasos. Como éstos coinciden en su realización con días para una mayor asequibilidad, los expondremos día a día.

En el caso de presencia de números bajos de Salmonella, el tamaño de la muestra será como mínimo de 60 ml. recomendándose su concentración mediante el empleo de membranas filtrantes de 47-50 mm. de diámetro y 0,45 micras de tamaño de poro. Cuando la presencia de Salmonellas se prevee detectar en volúmenes del orden de 10 ml. o menores, se recomienda la inoculación directa al caldo de enriquecimiento.

Según se emplee un tipo de inóculo u otra, la marcha a seguir es la siguiente (ver Fig. 6):

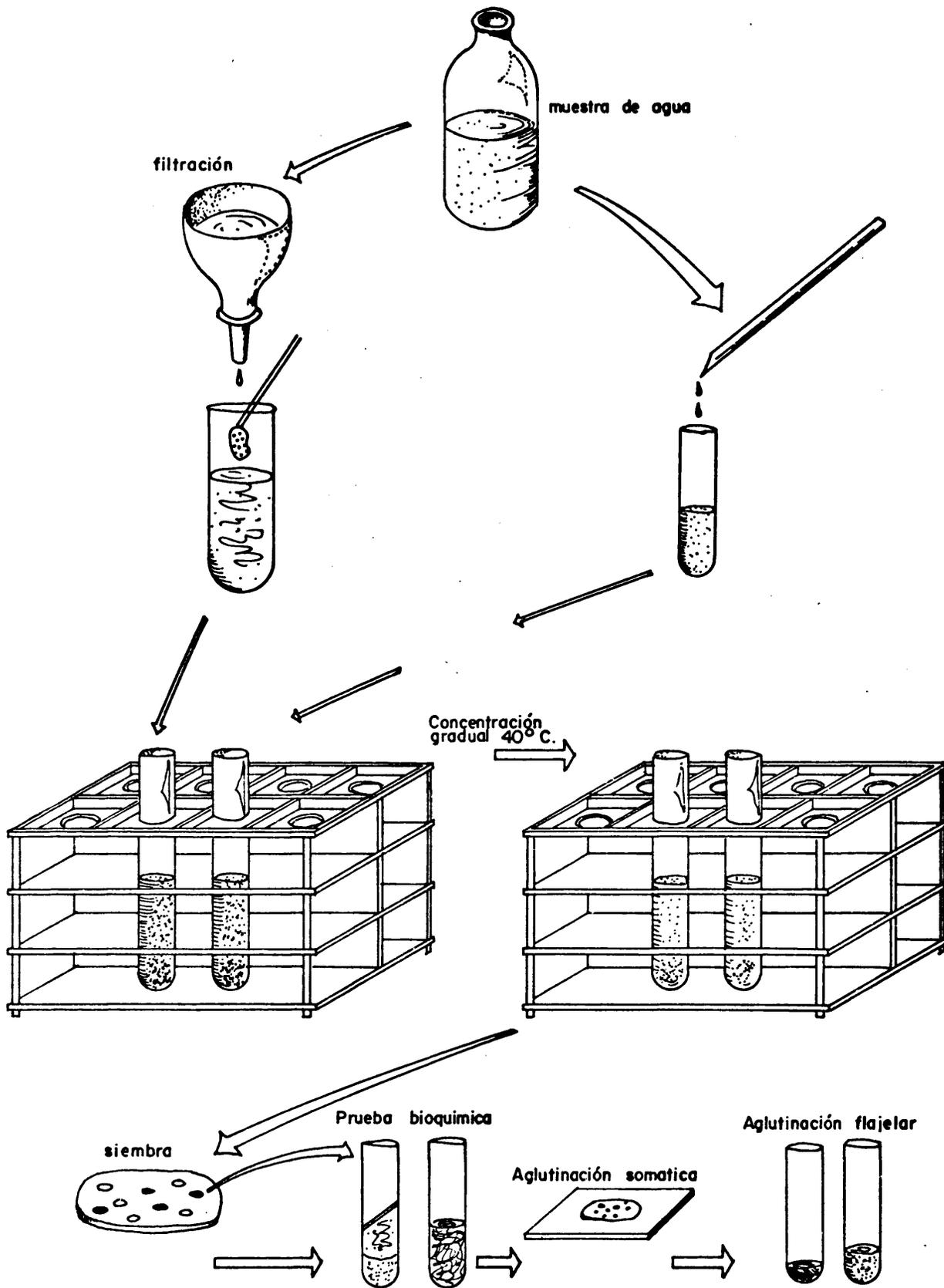
Primer día. Cuando se usa filtración, el filtro se inocula en 50 ml. (X) del medio de enriquecimiento para, por una parte, cubrir la membrana y poder agitarla, y por otra, para salvar los efectos de competencia por el alimento de la flora intercurrente. Cuando se usan volúmenes de un ml. éstos se inoculan en 10 ml. (X) del medio de enriquecimiento; si se trata de volúmenes de 10 ml., éstos se añaden a 10 ml. (X) del caldo de enriquecimiento.

Todos los caldos inoculados se incuban a 40°C, 1°C, durante 24 horas.

Los pasos a realizar en los siguientes días son comunes cualquiera que sea el tipo de inóculo.

Segundo día. A las 24 horas de incubación del cero pase, cinco ml, de caldo de enriquecimiento se inocula en cinco ml (2X) del nuevo medio, primer pase, que se incuban a 40 1°C, 24 horas.

Tercer día. A las 24 horas de incubación del primer pase, cinco ml del caldo se inoculan en cinco ml (2X) del nuevo medio, segundo pase, que se incuban a 40 1°C, 24 horas.



3.2. AISLAMIENTO.

Cuarto día. A las 24 horas de incubación del segundo pase, se siembran los medios sólidos de aislamiento, XLD y BS, una o dos placas cada uno, que se incuban a 37°C, 24 horas.

3.3 IDENTIFICACION BIOQUIMICA.

Quinto día. Después de la incubación, las colonias sospechosas de ser Salmonellas crecidas sobre los medios sólidos de aislamiento se confirman en primer lugar mediante pruebas bioquímicas, TSI y urea.

3.4. IDENTIFICACION SEROLOGICA SOMATICA.

Las colonias confirmadas se enfrentan con un pool de suero polivalente para observar si se produce aglutinación somática.

3.5. IDENTIFICACION SEROLOGICA FLAGELAR.

En caso de estar interesados en estudios ecológicos y epidemiológicos, se debe realizar una identificación a nivel de serotipo. Esta identificación se recomienda que se realice en centros de referencia, como el Centro Nacional de Referencia de Enterobacterias.

III. ECOLOGIA Y EPIDEMIOLOGIA DE LAS SALMONELLAS EN LAS AGUAS
POLUCIONADAS DEL CANAL DEL JARAMA.

1. MATERIALES Y METODOS.

Aquí hacemos referencia a todo lo concerniente al material y métodos empleados para la determinación de Salmonellas, así como los utilizados para la cuantificación de:

- los parámetros bacteriológicos
- los parámetros físico-químicos

Estos se seleccionaron en función de las características implicadas en el planteamiento de la presente Tesis Doctoral.

También se trataron aquellos aspectos referentes a las características del Canal del Jarama y a los puntos de muestreo.

1.1. TOMA DE MUESTRAS

Las muestras de agua fueron cogidas en los puntos seleccionados del Canal del Jarama y toma contra corriente, previo enjuague de los recipientes en el agua a muestrear. Véase 2.6.

En el punto A, la toma de las muestras para análisis bacteriológicos, gases, grasas, detergentes y fosfatos, se efectuó a un metro del borde izquierdo del Canal, mientras que para los restantes análisis se efectuó más cerca del borde.

En los puntos B y C, las tomas se efectuaron en mitad del cauce del Canal.

Las muestras destinadas para análisis químicos se tomaron en botellas de plástico y de vidrio, lavadas con agua y detergentes, enjuagadas posteriormente y antes con una mezcla de ácido clorhídrico y metanol en una proporción de 1:3 y en segundo término con abundante agua destilada.

Para los análisis de gases se emplearon recipientes de vidrio de 250 ml de capacidad, para el análisis de amonio, la capacidad era de 50 ml, mientras que para grasas, detergentes y fosfatos el recipiente de vidrio contenía un litro.

Los restantes análisis químicos se efectuaron a partir

de la muestra tomada con el recipiente de plástico de cinco litros.

Las muestras destinadas para los análisis bacteriológicos, se efectuaron con botellas de vidrio de 0'5 litros de capacidad convenientemente esterilizadas, con las que se llenaba una botella de un litro, igualmente esterilizada. El número de veces necesario para llenar la botella era de tres veces.

Todas las muestras se transportaron en los mismos recipientes de toma a temperatura ambiente, ya que el tiempo transcurrido desde la toma hasta su análisis posterior en el laboratorio era desde el punto A de muestreo, dos horas y desde el punto B ó C, alrededor de una hora.

Algunos de los parámetros se midieron en el mismo lugar de muestreo como temperatura del agua, del aire, color, mientras que otros se fijaron como oxígeno, sulfuro de hidrógeno, el resto se analizaron en el laboratorio.

En el mismo día de toma se realizaron los siguientes análisis para evitar su evolución, D.Q.O., D.B.O₅, nitritos, amonio, gases y los bacterianos, el resto se analizaron en días sucesivos.

1.2. ANALISIS BACTERIOLOGICOS.

1.2.1. Determinación de Salmonellas.

Para el aislamiento de Salmonellas, se utilizaron dos procedimientos:

- el de filtración a través de membranas filtrantes Millipore de 47 mm de diámetro y 0'45 micras de tamaño de poro.
- el de inoculación directa de un determinado volumen de la muestra en el caldo de enriquecimiento seleccionado.

En ambos procedimientos se siguió el método de concentración gradual, (apartado 3).

Primer día.

- filtración. El volumen de agua filtrada fué en las cuatro primeras muestras de 100 ml, mientras que en las 24 muestras siguientes se filtró 70 ml.
- inoculación directa. El volumen de agua inoculada fué de 10 ml en 34 muestras y de un ml en siete muestras.

Las membranas se inocularon en 50 ml del caldo de enriquecimiento (X), mientras que la inoculación de 10 ml del agua polucionada se efectuó sobre 10 ml del caldo de enriquecimiento (2X) y la de un ml sobre 10 ml del caldo (X).

Siempre se utilizó el sorbitol selenito como caldo de enriquecimiento al que se le añadía un cultivo de *S. typhi*, *S. typhimurium* y *S. enteritidis*, en un 10% de volumen, inoculadas en caldo de sorbitol selenito incubado a 37°C, durante 18 horas y matadas por calentamiento a 88°C, durante 10 minutos.

Todos los caldos inoculados se incubaron a 40±1°C durante 24 horas.

Segundo día.

A las 24 horas de incubación del cero pase, cinco ml del caldo se inocula en cinco ml de sorbitol selenito (2X). Esto constituye el primer pase que se incuba a 40°C, durante 24 horas.

Tercer día.

A las 24 horas de incubación del primer pase, cinco ml del caldo se inocula en cinco ml de sorbitol selenito (2X). Esto constituye el segundo pase, que se incuba a 40°C, durante 24 horas.

Cuarto día.

A las 24 horas de incubación del segundo pase, se siembran los dos medios sólidos de aislamiento seleccionados, XLD y

BS que se incuban a 37°C, durante 24 horas.

Quinto día.

Después de la incubación, las colonias sospechosas de ser Salmonellas crecidas sobre los medios sólidos de aislamiento se inoculan en TSI. A las que presentan un aspecto característico del género Salmonellas, se las determina la actividad de la ureasa.

Las colonias ureasa negativas eran inoculadas en tubos de manitol, lisina decarboxilasa, indol, que se incubaban a 37°C, 24 horas.

Los cultivos que mostraron reacciones típicas del género Salmonella, como se describe en " Identificación de Enterobacterias " de Edward y Ewing, 1972, se confirman serológicamente mediante la prueba de aglutinación somática con antisuero polivalente O.

Los cultivos que presentan reacciones positivas se testan con antígenos flagelares H, por un test de múltiple aglutinación usando 0'5 ml de solución de formalina y BHI y 0'5 ml de dilución 1:200 de los antisueros H.

Las reacciones antígeno-anticuerpo se incubaron una hora a 50°C, al baño María.

Cultivos representativos se enviaron al Centro Nacional de Referencia de Enterobacterias para su confirmación.

1.2.2. Determinación cuantitativa de Enterobacterias, coliformes totales (CT), y coliformes fecales (CF).

Tal como se recomienda en las normas internacionales para el agua potable (OMS, 1964, 1972 y Estandar Metodos, 1975), se utilizó la técnica de membranas filtrantes. Los filtros empleados fueron Millipore de 47 mm de diámetro y 0'45 micras de tamaño de poro.

A partir de las muestras de agua se realizaron diluciones al décimo en solución Ringer estéril, siendo las diluciones seleccionadas las que se filtraron.

Las membranas se colocaron sobre compresas previamente impregnadas con el medio de m-Endo broth M.F., para determinar el número de coliformes totales, incubándose a 37°C, 24 horas y en m-F.C. broth, para los coliformes fecales que se incubaron a 44'5°C, durante 20-22 horas.

1.2.3. Determinación cuantitativa de bacterias intestinales, estreptococos fecales (EF) y clostridios sulfito reductores (CSR).

Un mililitro de las diluciones seleccionadas se sembraron sobre 15 ml del medio de m-Enterococcus agar por el sistema de los aerobios.

Para los clostridios, un ml de la dilución se ponía en un vaso sobre el que se añadía 15 ml del medio de Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS). Las condiciones de anaerobiosis se crean al añadir parafina líquida hasta formar un espesor de un centímetro (según Laboratorio Centro Investigación del Agua).

1.2.4. Determinación de bacterias heterótrofas (aerobios).

Las diluciones seleccionadas se inoculan en placas Petri sobre las que se añadía 15 ml del medio agar nutriente, incubándose a 37°C, durante 24 horas, según Standard Methods, 1975.

1.3. ANALISIS FISICO-QUIMICOS.

1.3.1. Determinación de temperatura, conductividad, pH, color, materia en suspensión a 110°C, materia en suspensión a 700°C, residuo seco a 110°C, residuo seco a 700°C.

Temperatura del agua y aire. Se utilizó un termómetro de mercurio.

Conductividad. Cálculo a partir de la resistividad medida por el Puente de Wheatstone.

pH. Método potenciométrico.

Color. " De visu ".

Materia en suspensión a 110°C. Filtración y determinación gravimétrica.

Materia en suspensión a 700°C. Por calcinación de la materia en suspensión a 110°C y determinación gravimétrica.

Residuo a 110°C. Filtración y en el filtrado evaporación al baño María y determinación gravimétrica del residuo.

Residuo a 700°C. Calcinación del residuo a 110°C y determinación gravimétrica.

1.3.2. Determinación de aniones y cationes.

Aniones.

Cloruros. Método volumétrico de Mohr.

Sulfatos. Método colorimétrico con cromato de bario.

Carbonatos y bicarbonatos. Acidimetría con ClH.

Nitratos. Colorimetría con el método del ácido fenol disulfónico.

Sílice. Colorimetría con molibdato amónico.

Cationes.

Calcio y magnesio. Complexometría con EDTA.

Sodio y potasio. Fotometría de llama.

1.3.3. Determinación de los indicadores químicos de polución.

Oxidabilidad al permanganato. Método de 10 minutos a ebullición con exceso de reactivo y valoración al retroceso del permanganato consumido.

D.Q.O. Método del dicromato de 2 horas de ebullición a reflujo.

D.B.O₅. Método de dilución, incubación y determinación del oxígeno por Winkler.

Nitrógeno Kjeldahl. Digestión ácida y destilación.

Amoniaco. Método de Nesslerización directa.

Nitritos. Colorimetría con griess A y B.

Grasas y aceites. Extracción con eter de petróleo y gravimetría.

Detergentes aniónicos. Formación del complejo con azul de metileno, extracción con cloroformo y colorimetría.

Fosfatos. Colorimetría con molibdato y ácido ascórbico.

CO₂. Volumetría con NaOH.

Sulfuro de hidrógeno (SH₂). Colorimetría con para amino dimetil anilina y con hierro férrico.

Oxígeno. Método de Winkler.

Las técnicas utilizadas para los análisis fisico-químicos son los descritos en Standard Methods, 1975 y Rodier, 1971.

2. LUGAR DE MUESTREO.

2.1. LOCALIZACION Y ENTORNO DEL CANAL DEL JARAMA.

La boca del Canal del Jarama está situada en la finca denominada "El Porcal", perteneciente al término Municipal de Arganda del Rey, provincia de Madrid. Dista ocho Km. de Arganda y 23 de Madrid.

Las coordenadas geográficas del Canal, referidas a su boca son Longitud 3^a 32' 10" 6 y Latitud 40^a 18' 10" 8. Altura sobre el nivel del mar 570 m.

El embalse está situado en la cuenca del río Jarama, de cuyas aguas se nutre únicamente, ver Fig. 7 y 8.

2.2. ORIGEN Y FINALIDAD.

Según datos facilitados por la Confederación Hidrográfica del Tajo (M.O.P.U.), Felipe II en el año 1578, dió al arquitecto Herrera la orden de ejecución, siendo su finalidad solamente la de llevar agua a unas caballerizas que tenía en esos lugares. Entonces sólo constaba de cinco Km. el recorrido. En años posteriores se fué ampliando, así como su cometido, ya que se le usó para regadío.

En el año 1740, bajo el reinado de Felipe V, se dotó del primer reglamento para regadío, al ir adquiriendo mayor importancia.

En sucesivas ampliaciones, se ha llegado hasta la longitud actual de 71 Km.

Desde el año 1910, se le comienza a revestir de hormigón pero siempre respetando el cauce primitivo.

Aunque nació simplemente con la finalidad de llevar agua a las caballerizas, pronto se vió la posibilidad de utilizar sus aguas como regadío, siendo actualmente éste su único cometido, es decir, conducir las aguas que se emplean para regar parte del Va-

Fig. 7 — Croquis de la localización del CANAL DEL JARAMA.

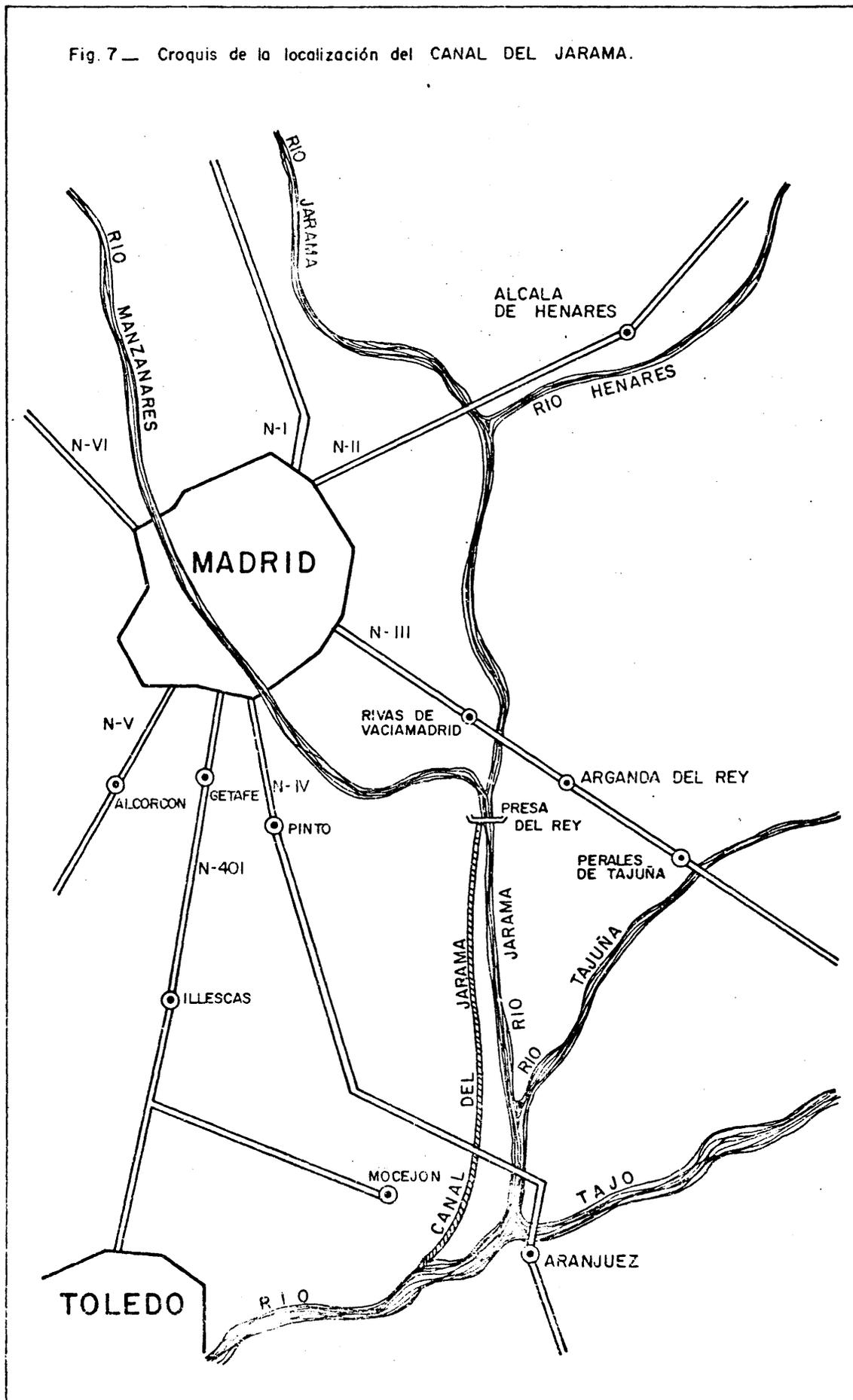
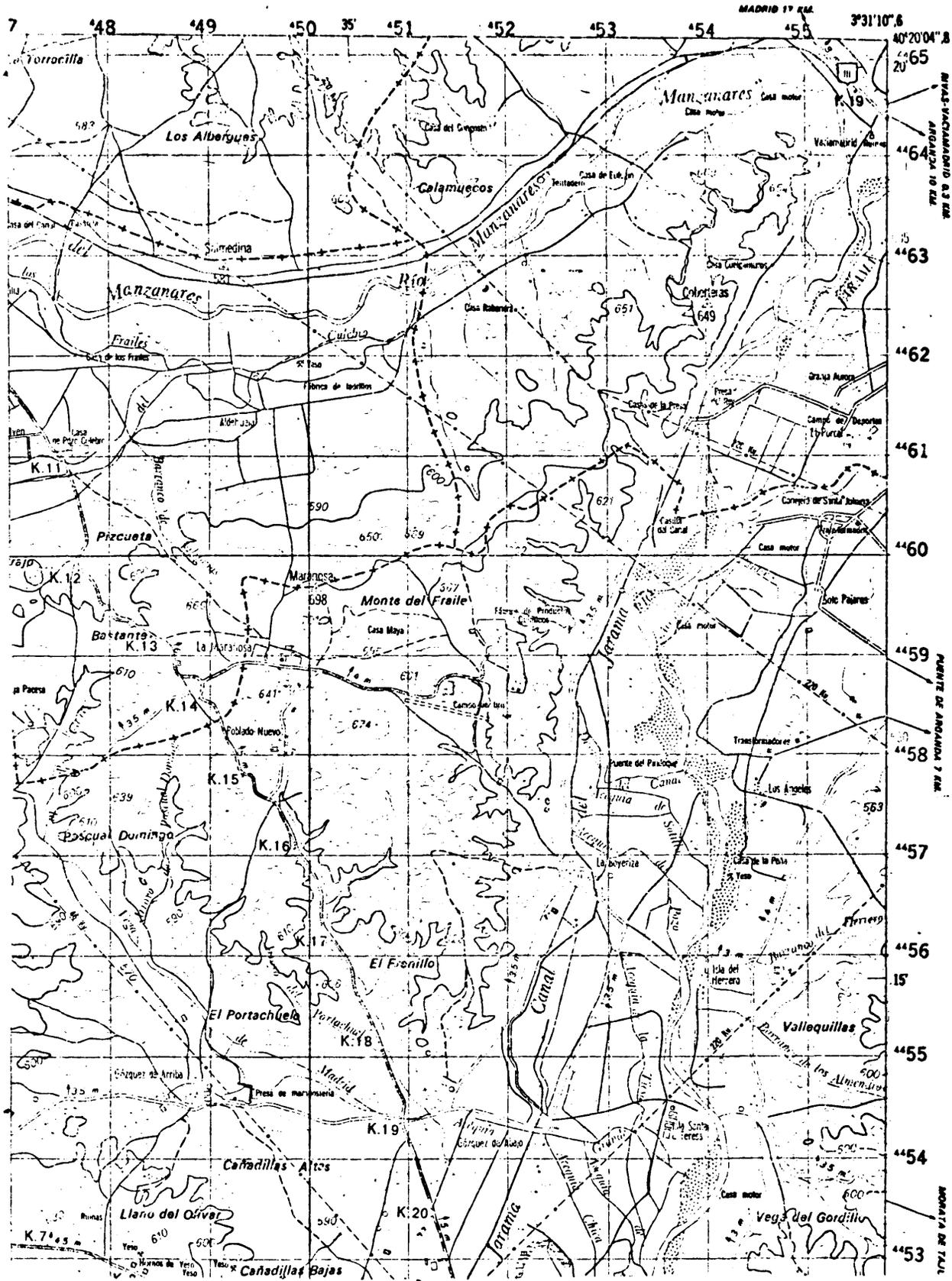


Fig. 8.- MAPA DE LA LOCALIZACION DEL CANAL DEL JARAMA.



lle del Jarama y Vega de Aranjuez.

Está diseñado para poder regar 12000 hectáreas de terreno, siendo hoy día 10000 las hectáreas de terreno que riega.

El tipo de cultivo a los que va destinada el agua son: patatas, remolacha, tomates, pimientos, espárragos, alcachofas, coliflor, judías verdes, repollo, maíz, trigo, cebada y alfalfa.

La campaña oficial de riego comienza el 1 de abril y finaliza el 31 de octubre, siendo la dotación del riego de 1 l/seg. por hectárea.

2.3. CARACTERISTICAS TECNICAS DEL CANAL DEL JARAMA.

El Canal del Jarama tiene su origen en la Presa del Rey, presa de derivación, construida en 1977 y situada en la cuenca del Río Jarama.

Presenta en su origen las siguientes características:

- anchura cauce superficial	4,80 m.
- anchura cauce profundidad	3,80 m.
- altura cauce	2,50 m.
- caudal	9 m ³ /seg.
- pendiente	3.10 ⁻⁴
- velocidad del agua	0,88-1 m/seg.

A lo largo de los 71 Km, de recorrido, va aumentando la anchura de la superficie y disminuyendo la anchura de profundidad y altura y manteniendo la pendiente.

Desemboca en el río Tajo en el término Municipal de Mocejón, encontrándose la desembocadura a 4 Km del pueblo y 15 Km de Toledo.

Presenta en su final las siguientes características:

- anchura cauce superficial	6'10 m
- anchura cauce profundidad	2'10 m

- altura cauce	2 m
- caudal	3'5 m ³ / seg
- pendiente	3'10 ⁻⁴
- velocidad del agua	0'88-1 m/ seg

2.4. CALIDAD DEL AGUA QUE VEHICULIZA EL CANAL DEL JARAMA Y CAUDALES DE LOS RIOS MANZANARES Y JARAMA.

A unos 20 Km de Madrid, en la dirección sur-este, tiene lugar la confluencia del río Manzanares con el río Jarama, vertiendo las aguas del primero en el segundo.

Aproximadamente a 250 metros de dicha confluencia, aguas abajo y en el curso del río Jarama se encuentra la Presa del Rey, que es una presa de derivación, situada en la finca " El Porcal ", perteneciente al término Municipal de Arganda del Rey. A 10 metros de la cabecera de la presa y en su margen derecha, surge el Canal del Jarama.

Río Manzanares. Presenta un caudal de 2'5 m³/ seg. a la entrada de Madrid. A su paso por la ciudad recoge las aguas residuales de todo tipo producidas por la población (4.10⁶ habitantes) que se cifran en unos 16 m³/seg, con lo que nos encontramos que es el agua del río Manzanares la que se diluye en las aguas residuales de Madrid, siendo la relación de 2'5/16.

Podemos considerar que el río Manzanares a la salida de Madrid presenta un caudal constante a lo largo del año, siendo tomado como río urbano.

Río Jarama. Es un río que a lo largo de su curso atraviesa zonas rurales, semi rurales y alguna zona industrial, estando sometido su caudal a grandes fluctuaciones, épocas secas, épocas de lluvias. Por todo ello el agua que vehiculiza el Canal del Jarama podrá presentar calidades distintas, según sea el caudal del río Jarama con relación al del río Manzanares.

A causa de la distancia tan corta a la que se encuentra el Canal del Jarama, no ha dado tiempo a que se mezclen de una manera total los dos tipos de agua.

Así podemos decir que el Canal del Jarama transporta principalmente las aguas residuales de la población de Madrid, algo diluidas por las aguas del río Jarama, menos polucionadas.

Estas aguas han comenzado el proceso de putrefacción, que en el Canal sufrirán un aumento, manifestándose ya al principio por el olor característico de las aguas residuales en putrefacción. Su color va a depender del grado de dilución de las aguas del Manzanares, por las del Jarama, presentando tonalidades que van desde el gris al negro.

Particularidades de los caudales de los ríos Manzanares y Jarama. Según datos facilitados por el Servicio de Aforos de la Comisaría de Aguas del Tajo (M.O.P.U.). No se dispone de los caudales correspondientes al mes de Octubre.

Fecha de Muestreo	Manzanares Parque-Sindical m ³ /seg	Manzanares Vacía-Madrid m ³ /seg	Jarama Mejorada del Campo m ³ /seg	Jarama El Porcal m ³ /seg
22-V-78	1'55	13	27'4	40'4
29-V-78	1'34	100	36	136
5-VI-78	1'19	15'4	30	45'4
12-VI-78	1'12	15'4	37'8	53'2
19-VI-78	1'19	15'8	30	45'8
26-VI-78	1'12	13	30	43
3-VII-78	1'70	16'2	49'2	65'4
10-VII-78	1'70	14'2	37'8	52
17-VII-78	2'10	13	39'5	52'5
5-IX-78	1'70	13'8	22'5	36'3
12-IX-78	1'55	13	35	48
18-IX-78	1'41	14'2	7'4	21'6
25-IX-78	1'41	13	15	28

2.5. PUNTOS DE MUESTREO; ELECCION Y JUSTIFICACION DE LOS MISMÓS.

La elección de los puntos de muestreo se realizó de acuerdo a los aspectos que consideramos de interés destacar en la presente Tesis Doctoral.

Dicho interés radica principalmente en poner de manifiesto la presencia de Salmonellas, así como su posible correlación con:

- enterobacterias, bacterias intestinales, bacterias heterótrofas
- salmonelosis observada en patología humana

Esto tiene su importancia en un curso de agua cuya finalidad es de servir como regadío a parte del Valle del Jarama y Vega de Aranjuez.

Se escogieron como lugares de muestreo dos puntos del Canal del Jarama, que guardan entre sí cierta distancia, por reunir las siguientes características:

- recoger las aguas residuales de todo tipo producidas por la población de Madrid, con lo que existe la posibilidad de vehiculizar patógenos como Salmonellas.
- no tener aportes laterales entre los dos puntos de muestreo que alterarían las poblaciones bacterianas y las condiciones físico-químicas del agua en los dos puntos.
- posible incidencia de éste tipo de agua en la epidemiología de las Salmonellas.

2.6. DESCRIPCION DE LOS PUNTOS DE MUESTREO.

De acuerdo con los objetivos que nos fijamos, los puntos de muestreo los situamos en los lugares que nos pudiesen dar una mayor información sobre el problema planteado.

Primer punto de toma. El primer punto de toma de muestras denominado por nosotros punto A, se encuentra en la boca del Canal del Jarama. En éste punto como vimos en el apartado 2.4, nos

encontramos con calidades de agua distintas según sea el caudal del río Jarama con relación al del río Manzanares.

Segundo punto de toma. Aunque éste segundo punto de toma no fué constante en todas las muestras, ya que los dos primeros se realizaron en el punto que nosotros denominamos como punto B, que se encuentra a 1800 m de distancia del punto A, los restantes se realizaron en el punto denominado como C, que se encuentra a 3400 m del punto A. Los hemos englobado bajo el término de segundo punto de muestreo por ser el segundo lugar de toma en cada fecha de muestreo.

2.7. CARACTERISTICAS Y FRECUENCIA DE LOS MUESTREOS.

Ya que no había aportes laterales sobre el Canal del Jarama, que pudieran alterar las poblaciones bacterianas y las condiciones físico-químicas del agua que fluye entre los dos puntos de muestreo, nos propusimos analizar " la misma masa de agua " en los dos lugares de muestreo.

Para ello la toma de todas las muestras se realizaron en los dos puntos en las siguientes condiciones:

Toma en el primer punto.

- se lanzaban al agua cuatro botes de plástico vacío con un intervalo entre ellos de un minuto.
- inmediatamente se procedía a la toma de muestras.
- una vez terminada ésta, se lanzaban de nuevo dos botes con un intervalo de un minuto.

Toma en el segundo punto.

- se esperaba la llegada del primer lote de botes, que seguían manteniendo los mismos intervalos de tiempo que al ser lanzados. Los tiempos que tardaban en hacer el recorrido se muestra en la tabla 12.
- inmediatamente se procedía a la toma de muestras.

Tabla 12 - Características y frecuencia de los muestreos.

Muestreo	fecha	día	hora	tiempo invertido en el recorrido	muestreo	fecha	día	hora
1	22-V-78	lunes	10 h.	24'	18	22-V-78	lunes	11 h.
2	29-V-78	lunes	9 h. 35'	24'	19	22-V-78	lunes	9 h. 57'
3	5-VI-78	lunes	9 h. 11'	41'	20	5-VI-78	lunes	10 h. 55'
4	12-VI-78	lunes	11 h. 25'	30'	21	12-VI-78	lunes	11 h. 55'
5	19-VI-78	lunes	10 h. 7'	37'	22	19-VI-78	lunes	10 h. 44'
6	26-VI-78	lunes	9 h. 55'	42'	23	26-VI-78	lunes	10 h. 39'
7	3-VII-78	lunes	9 h. 39'	44'	24	3-VII-78	lunes	10 h. 21'
8	10-VII-78	lunes	9 h. 42'	41'	25	10-VII-78	lunes	10 h. 23'
9	17-VII-78	lunes	10 h. 5'	42'	26	17-VII-78	lunes	10 h. 44'
10	5-IX-78	martes	9 h. 53'	43'	27	5-IX-78	martes	10 h. 33'
11	12-IX-78	martes	10 h. 25'	42'	28	12-IX-78	martes	11 h. 7'
12	18-IX-78	lunes	10 h. 25'	40'	29	18-IX-78	lunes	11 h. 4'
13	25-IX-78	lunes	10 h. 27'	41'	30	25-IX-78	lunes	11 h. 8'
14	2-X-78	lunes	9 h. 4'	41'	31	2-X-78	lunes	9 h. 44'
15	17-X-78	martes	9 h. 3'	42'	32	17-X-78	lunes	9 h. 46'
16	17-X-78	martes	13 h.	42'	33	17-X-78	lunes	13 h. 43'
17	17-X-78	martes	17 h.	42'	34	17-X-78	lunes	17 h. 43'

- se recogía el segundo lote de botes que se comportaba igual que el primer lote.

En el quinto muestreo, para comprobar si la velocidad superficial del agua medida con los botes, se alejaba de la velocidad media de la masa de agua que vehiculiza el Canal, simultáneamente al lanzamiento de los botes, introdujimos en el agua, con un intervalo de un minuto, dos tubos de plástico huecos, de 128 y 118 cm de longitud, que fueron lastrados previamente con arena para conseguir que el extremo del tubo fuera arrastrado por la zona de máxima velocidad, quedando aproximadamente verticales al plano del agua. Los tubos sobresalían del agua entre 10 y 20 cm.

Como el tiempo que tardaron en realizar el recorrido fué prácticamente idéntico al de los botes, decidimos emplear el sistema de los botes solamente por comodidad.

Frecuencia de muestreo. La toma de muestra en los dos puntos se realizó semanalmente durante los meses de Abril, Mayo, Junio, Julio, Septiembre y Octubre.

La fecha, día de la semana y hora del muestreo figuran en la tabla 12.

Las muestras del primer punto figuran con los números del 1 al 17 y las del segundo punto del 18 al 34.

3. ECOLOGIA DE LAS SALMONELLAS EN EL AGUA DEL CANAL DEL JARAMA.

3.1. FRECUENCIA DE DETECCION DE SALMONELLAS EN LAS AGUAS POLUCIONADAS DEL CANAL DEL JARAMA.

Bajo una panorámica general podemos ver que en las 34 muestras efectuadas entre Mayo y Octubre de 1978, se tomaron una, dos ó tres volúmenes de las muestras originales, analizándose cada una por una técnica distinta (materiales y métodos).

Los resultados aparecen en la tabla 13, como se puede apreciar, en las 28 primeras muestras originales fuimos capaces de detectar Salmonellas bien desde una porción, de las dos e incluso desde las tres porciones, comprobándose de éste modo la presencia de Salmonellas en las 28 muestras, lo que constituye un 100 % de resultados positivos.

En las seis muestras correspondientes a los seis últimos muestreos, efectuados durante el mes de Octubre, que no se subdividieron en porciones, se aislaron Salmonellas en cuatro de ellas, lo que resulta un 66'6 % de aislamientos.

Resumiendo, de las 34 muestras efectuadas se detectaron Salmonellas en 32, con lo que resulta en conjunto un 94'2 % de aislamientos positivos de Salmonellas.

Agrupando las muestras originales por meses, como se puede apreciar en la tabla 14, durante los meses de Mayo, Junio, Julio y Septiembre se detectaron Salmonellas en todas las muestras, lo que constituye un 100 % de resultados positivos. Durante el mes de Octubre de ocho muestras originales, seis fueron positivas, lo que resulta un 75 % de aislamientos positivos.

Como se observa en la tabla 15, al menos en una muestra de las efectuadas en el mismo mes se aislaron dos serotipos.

Mientras que en los meses de Mayo, Junio y Octubre solamente se llegaron a detectar dos serotipos en una misma muestra,

Tabla 13.- Volumen de muestra y serotipos de Salmonellas aislados.

MUES- TREG	VOLUMEN/ ml.	COLONIAS SOSPECHOSAS	COLONIAS CONFIRMADAS	SEROTIPOS IDENTIFICADOS	AISLA- MIENTO
1	100 10	6 5	3 4	3 S. typhimurium 4 S. typhimurium	+
2	100 10	6 5	3 2	3 S. typhimurium 2 S. typhimurium	+
3	70 10	6 5	6 5	5 S. typhimurium & S. no identificada 5 S. typhimurium	+
4	70 10	6 7	6 5	6 S. typhimurium 2 S. typhimurium 2 S. typhi & S. no identificada	+
5	70 10	6 7	6 0	6 S. typhimurium —	+
6	70 10	6 7	3 0	3 S. typhimurium —	+
7	70 10	6 7	4 5	3 S. typhimurium & S. no identificada 3 S. typhimurium & S. enteritidis & S. casei	+
8	70 10 1	6 7 7	3 0 7	2 S. typhimurium & S. typhi — 7 S. typhimurium	+
9	70 10 1	6 7 7	0 4 7	— 4 S. typhimurium 7 S. typhimurium	+
10	70 10 1	6 7 7	4 5 2	4 S. typhimurium 4 S. typhimurium & S. no identificada 2 S. typhimurium	+
11	70 10 1	6 7 7	6 4 6	5 S. typhimurium & S. no identificada 4 S. typhimurium 6 S. typhimurium	+
12	70 10 1	6 7 7	0 5 6	— 3 S. typhimurium 2 S. enteritidis 6 S. typhimurium	+
13	70 10 1	6 7 7	0 5 6	— 5 S. typhimurium 5 S. typhimurium & S. no identificada	+
14	70 10 1	6 7 7	4 6 0	4 S. typhimurium 4 S. typhimurium 2 S. enteritidis —	+
15	10	7	0	—	-
16	10	7	3	3 S. typhimurium	+
17	10	7	4	4 S. typhimurium	+

Tabla 13 (cont.).- Volumen de muestra y serotipos de salmonelas aislados.

MUES- TREG.	VOLUMEN/ ml.	COLONIAS SOSPECHOSAS	COLONIAS CONFIRMADAS	SEROTIPOS IDENTIFICADOS	AISLA- MIENTO.
18	100 10	6 5	2 5	2 S. typhimurium 3 S. typhimurium 2 S. enteritidis	+
19	100 10	6 5	5 4	4 S. typhimurium 1 S. no identificada 4 S. typhimurium	+
20	70 10	6 5	4 5	4 S. typhimurium 5 S. typhimurium	+
21	70 10	6 7	0 7	■ 7 S. typhimurium	+
22	70 10	6 7	4 5	3 S. typhimurium 1 S. no identificada 3 S. typhimurium 2 S. enteritidis	+
23	70 10	6 7	0 4	5 S. typhimurium 3 S. typhimurium 1 S. enteritidis	+
24	70 10	6 7	2 6	2 S. typhimurium 6 S. typhimurium	+
25	70 10	6 7	4 7	4 S. typhimurium 7 S. typhimurium	+
26	70 10	6 7	3 0	2 S. typhimurium 1 S. no identificada ■	+
27	70 10	6 7	0 7	■ 6 S. typhimurium 1 S. essea	+
28	70 10	6 7	5 5	5 S. typhimurium 4 S. typhimurium 1 S. no identificada	+
29	70 10	6 7	4 6	3 S. typhimurium 1 S. essea 5 S. typhimurium 1 S. enteritidis	+
30	70 10	6 7	4 7	4 S. typhimurium 4 S. typhimurium 2 S. enteritidis 1 S. para B	+
31	70 10	6 7	4 6	4 S. typhimurium 6 S. typhimurium	+
32	10	7	6	4 S. typhimurium 2 S. essea	+
33	10	7	0	■	-
34	10	7	1	1 S. typhimurium	+

durante los meses de Julio y Septiembre no sólo se detectaron dos serotipos, sino que se llegaron a aislar hasta tres serotipos simultáneamente.

Tabla 14. Frecuencia de aislamiento de Salmonellas en las muestras originales.

MES	n°muestras analizadas	n°muestras positivas	%
Mayo	4	4	100
Junio	8	8	100
Julio	6	6	100
Septiembre	8	8	100
Octubre	8	6	75
Total	34	32	94'2

Tabla 15. Serotipos por muestra.

MES	1 serotipo	2 serotipos	3 serotipos	n°muestras analizadas
Mayo	3	1	-	4
Junio	5	3	-	8
Julio	4	1	1	6
Septiembre	4	2	2	8
Octubre	4	2	-	8
Total	20	9	3	34

Los aislamientos fueron :

- en Mayo: 3 muestras: S. typhimurium
1 muestra: S. typhimurium-S. enteritidis.
- en Junio: 5 muestras: S. typhimurium
2 muestras: S. typhimurium-S. enteritidis
1 muestra: S. typhimurium-S. typhi
- en Julio: 4 muestras: S. typhimurium

1 muestra: S. typhimurium-S. typhi

1 muestra: S. typhimurium-S. enteritidis-

S. essen

- en Septiembre: 4 muestras: S. typhimurium

2 muestras: S. typhimurium-S. enteritidis

1 muestra: S. typhimurium-S. enteritidis-

S. essen

1 muestra: S. typhimurium-S. enteritidis-

S. paratyphi B

- en Octubre: 4 muestras: S. typhimurium

1 muestra: S. typhimurium-S. enteritidis

1 muestra: S. typhimurium-S. essen

Así, de los 32 muestreos que resultaron positivos para el aislamiento de Salmonellas, en 20 se detectaron un serotipo, en nueve dos serotipos y en tres se llegaron a aislar hasta tres serotipos.

Ampliando y estudiando en profundidad la metodología seguida, vemos como se observa en la tabla 13, que las muestras originales de agua tomadas en cada punto del Canal del Jarama, una vez que llegaban al laboratorio, se agitaban y se dividían en porciones que se analizaron como si se trataran de muestras independientes para el aislamiento de Salmonellas. Como la muestra original se subdividía en más de una porción, cada una de ellas se sometió a una técnica distinta. Así, veintiuna (21) muestras se subdividieron en dos porciones, que se analizaron por dos técnicas en paralelo: Filtración e inoculación de 10 ml.

Siete (7) muestras originales se subdividieron en tres porciones y se analizaron por tres técnicas en paralelo: Filtración, inoculación de 10 ml é inoculación de un ml.

Seis (6) muestras originales que no se subdividieron, fueron analizadas únicamente por la técnica de inoculación de un ml.

Por todo ello podemos decir que se analizaron 69 muestras, o porciones, para el aislamiento de Salmonellas por tres técnicas

en paralelo:

- filtración de 70 a 100 ml.
- inoculación de 10 ml.
- inoculación de un ml.

Aunque el número de muestras no es el mismo utilizado en cada técnica, sí se pueden comparar, ya que tienen en común:

- su origen. Se trata de aguas polucionadas sin tratar.
- cada porción procede de la misma muestra original.
- en todas las técnicas, el caldo de enriquecimiento empleado es el sorbitol selenito.
- en todas se siguió el método de concentración gradual.
- la temperatura y el tiempo de incubación de los caldos de enriquecimiento fueron los mismos.
- los medios de aislamiento empleados fueron el XLD y el BS.

Como se observa, en los resultados expresados en la tabla 16, del total de 69 porciones de las muestras analizadas, 57 resultaron positivas para el aislamiento de Salmonellas, lo que equivale al 82'6 %.

Tabla 16. Frecuencia de aislamiento de Salmonellas.

Técnica	Filtración	Inoculación 10 ml	Inoculación 1 ml	Total
n°muestras analizadas	28	34	7	69
n°muestras positivas	23	28	6	57
%	82'1	82'5	85'7	82'6

En cuánto a los resultados obtenidos por las diversas técnicas:

- de las 28 muestras analizadas por la técnica de filtración, 23 fueron positivas (82'1 %).

- de las 34 analizadas por la técnica de inoculación de 10 ml, 28 resultaron positivas (82'5 %).
- de las 7 analizadas por la técnica de inoculación de un ml, 6 fueron positivas (85'7 %).

A simple vista, la técnica de inoculación de un ml, es la que presentó mejores resultados, mientras que las otras dos presentaron resultados idénticos.

Aunque la detección de Salmonellas, en el presente trabajo se ha realizado por un método cuantitativo, ya que analizamos volúmenes de agua con una relación de un décimo aproximadamente, no nos ha sido posible establecer una cuantificación por dicho método, a causa de:

- se detectaron Salmonellas en la mayoría de las porciones de un ml, que corresponden a los volúmenes más pequeños de agua analizados.
- la frecuencia media de detección no está en proporción inversa a la relación de los volúmenes analizados, sino que la frecuencia de aislamiento se puede considerar del mismo orden en los tres volúmenes.
- al igual que Leclerc y cols, 1970 b, hemos tenido la ocasión de constatar la presencia de Salmonellas en pequeñas cantidades de la muestra original y su ausencia en volúmenes mayores.

Así en el muestreo número ocho no aislamos Salmonellas cuando analizamos 10 ml de la muestra y sí en cambio las detectamos cuando analizamos uno y 70 ml de la muestra.

En los muestreos 9, 12 y 13 no aislamos Salmonellas cuando analizamos 70 ml de la muestra y sí en cambio las detectamos cuando analizamos 10 y un ml de la muestra.

En los muestreos 21 y 27 no aislamos Salmonellas cuando analizamos 70 ml y sí cuando lo hicimos con 10 ml.

¿ A qué se debe que en los muestreos 9, 12 y 13, 21 y 27 detectamos Salmonellas cuando analizamos 10 ml y no 70 ml ?.

Como sabemos con el volúmen de 70 ml se empleó la técnica de filtración y con el volúmen de 10 ml, la técnica de inoculación directa. Esto se puede interpretar lógicamente como producto del efecto negativo que producen las sustancias en suspensión retenidas en la membrana, mucho más marcado con volúmenes mayores, descartándose el posible efecto de las sustancias en estado disuelto que pasan a través de la membrana.

Este efecto negativo se origina al alterar y modificar los caldos de enriquecimiento, dando lugar a una pérdida de sus propiedades selectivas inhibitorias. Esto puede explicar una parte de los aislamientos negativos; otros se pueden haber producido como consecuencia del sobrecrecimiento en los medios de enriquecimiento de bacterias saprofitas presentes en el agua, cuyo efecto es el enmascaramiento de la probable presencia de las Salmonellas en los medios sólidos selectivos y diferenciales de aislamientos por las bacterias saprofitas presentes en los medios de enriquecimiento.

Otras causas por las que se detectaron Salmonellas con un volúmen determinado y no con otro, puede ser:

- una distribución no uniforme de las Salmonellas en las muestras.
- una distribución no uniforme de las Salmonellas en los caldos de enriquecimiento.

Por todo ésto, el volúmen de la muestra de agua a analizar para el posible aislamiento de Salmonellas, no favorece su búsqueda.

Si el fenómeno del hallazgo de las Salmonellas independientemente del volúmen elegido es frecuente o sistemático, como sugieren Leclerc y cols, 1970 b, habría que ser cuidadosos con los análisis cuantitativos ya que N.M.P. de Salmonellas no tendría ni significado ni valor.

Aún así, intentaremos valorar la detección de Salmone-llas desde un punto de vista semicuantitativo, estableciendo para ello, la relación entre el número de aislamientos positivos y el número de muestras analizadas expresadas en tanto por ciento.

3.2. DISTRIBUCION MENSUAL DE AISLAMIENTO DE SALMONELLAS.

Los análisis de las 69 muestras para el aislamiento de Salmonellas se repartieron en la forma expresada en la tabla 17 y fig. 9. Como se puede ver, el mes en el que se obtuvo mayores resultados positivos fué Mayo (100 %), a partir del cual se produce una lenta y progresiva disminución durante los meses de Junio (81'2 %) y Julio (78'5 %). Durante el mes de Septiembre se produce un incremento considerable, (85 %), para volver a descender en Octubre hasta el nivel más bajo de los meses muestreados (72'7 %).

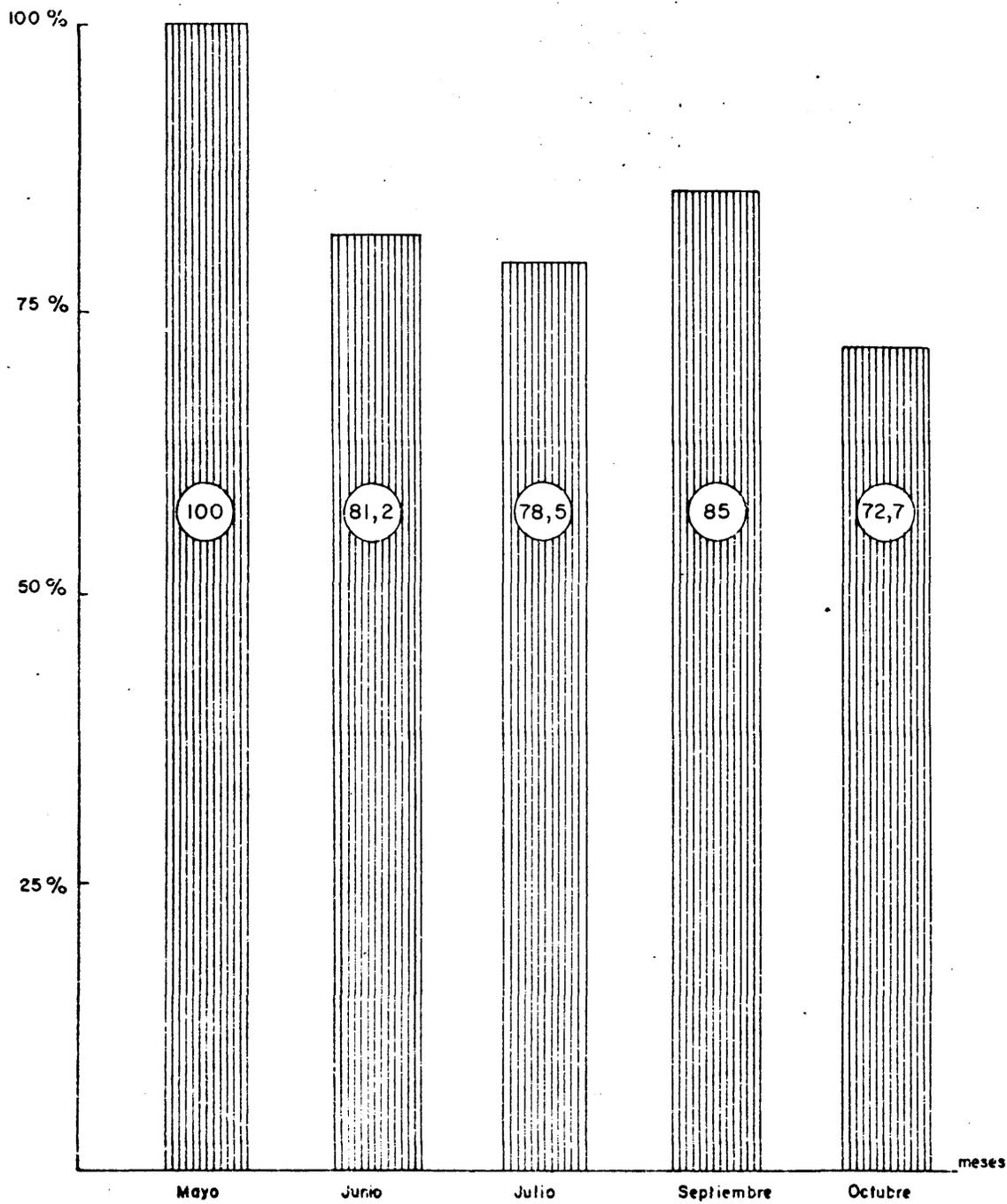
Tabla 17. Frecuencia mensual de aislamiento.

MES	n°muestras analizadas	n°muestras positivas	%
Mayo	8	8	100
Junio	16	13	81'2
Julio	14	11	78'5
Septiembre	20	17	85
Octubre	11	8	72'7

Como sabemos, aunque la salmonelosis se da a lo largo de todo el año, la máxima incidencia se da a finales del verano y otoño, mientras que en las muestras de agua analizada, la máxima incidencia que nosotros hemos obtenido se da en Mayo y en segundo lugar en Septiembre.

El desfase de meses entre la máxima incidencia de Salmonellas humanas y la máxima frecuencia de aislamiento de Salmonellas en el agua, nos hace sugerir al igual que a Parvey y cols, 1972, que el aumento de la frecuencia de aislamiento de Salmonellas en las aguas precede en meses al aumento de la frecuencia de la salmonelosis humana en clínica. Como se puede comprobar al comparar el tanto por ciento de aislamiento en la tabla 17 y la incidencia mensual de salmonelosis humana en España expuesta en el apartado 2.1 y 2.2 de la Introducción.

Fig.9 _ Distribución mensual de aislamiento de Salmonellas.



3.3. SEROTIPOS AISLADOS Y FRECUENCIA.

Como se observa en la tabla 18, se aislaron 266 cepas de Samonellas de las 57 muestras positivas pertenecientes a cinco serotipos distintos.

Las 266 cepas se repartieron de la siguiente forma:

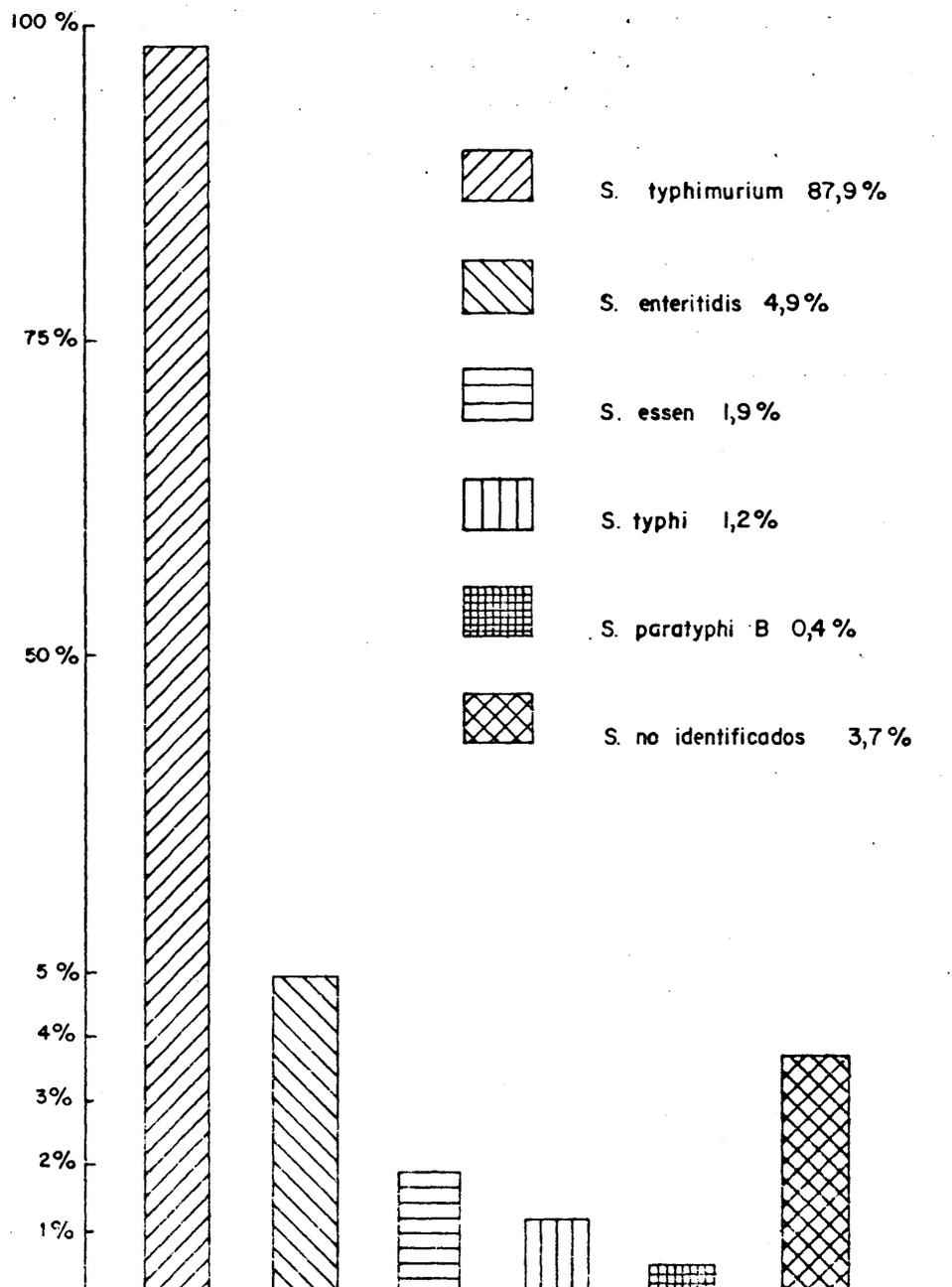
- de 94 cepas, 88 identificadas pertenecen a tres serotipos. Se aislaron en las 23 muestras positivas de las 28 analizadas por la técnica de filtración (82'1 %).
- de 138 cepas, 135 identificadas pertenecientes a cinco serotipos. Se aislaron en las 28 muestras positivas de las 34 analizadas por la técnica de inoculación de 10 ml (82'5 %).
- de 34 cepas, 33 identificadas pertenecen a un serotipo. Se aislaron en las seis muestras positivas de las siete analizadas por la técnica de inoculación de un ml (85'7 %).

Tabla 18. Serotipos aislados y frecuencia.

SEROTIPOS	filtración		inoculación 10 ml		inoculación 1 ml		total cepas	
	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%
S. typhimurium	86	91'4	115	83'3	33	97	234	87'9
S. enteritidis	-	-	13	9'4	-	-	13	4'9
S. essen	1	1	4	2'8	-	-	5	1'9
S. typhi	1	1	2	1'4	-	-	3	1'2
S. paratyphi B	-	-	1	0'7	-	-	1	0'4
S. no identi- ficadas	6	6'4	3	2'1	1	3	10	3'7
S. identifi- cadas	88	93'6	135	97'9	33	97	256	96'3
Total	94	100	138	100	34	100	266	100

En la tabla 18 y fig. 10, presentamos la frecuencia de aislamiento de los diferentes serotipos. En cada columna de la tabla 18 ponemos las cepas aisladas en número absoluto y el porcentaje en relación al conjunto de cepas encontradas por cada técnica.

Fig. 10 — Serotipos aislados y frecuencia.



I. Con la técnica de filtración aislamos tres serotipos de *Salmonellas* de las 23 muestras positivas.

- en 21 muestras solamente aislamos un serotipo, *S. typhimurium*.
- en dos muestras aislamos simultáneamente dos serotipos. En una la combinación fué *S. typhimurium-S. typhi* y en la otra *S. typhimurium-S. essen*.

Es decir en el 91'4 % de las muestras que resultaron positivas, se detectó un serotipo y en el 8'6 % dos serotipos conjuntamente. El serotipo común en las 23 muestras fué *S. typhimurium* que representa el 91'4 % de todas las cepas. *S. typhi* y *S. essen* representa el 1 % cada una. Las cepas no identificadas representan el 6'4 %.

II. Con la técnica de inoculación de 10 ml aislamos cinco serotipos de *Salmonellas* de las 28 muestras positivas.

- en 17 muestras aislamos solamente un serotipo, *S. typhimurium*.
- en nueve muestras aislamos simultáneamente dos serotipos.
 - seis con la combinación *S. typhimurium-S. enteritidis*.
 - una con la combinación *S. typhimurium-S. typhi*.
 - dos con la combinación *S. typhimurium-S. essen*.
- en dos muestras llegamos a aislar simultáneamente tres serotipos.
 - una con la combinación *S. typhimurium-S. enteritidis-S. essen*.
 - una con la combinación *S. typhimurium-S. enteritidis-S. para B*.

Es decir, en el 60'8 % de las muestras que resultaron positivas, se detectó un serotipo. En el 32'1 %, dos serotipos y en el 7'1 % se detectaron tres serotipos conjuntamente.

El serotipo común en las 28 muestras fué *S. typhimurium*, que representa el 83'3 % de todas las cepas. En segundo lugar se encuentra *S. enteritidis* (9'4 %), en tercero *S. essen* (2'8 %), en cuarto lugar *S. typhi* (1'4 %) y por último *S. paratyphi B* que no llega al 1 %. Las cepas no identificadas representan aproximadamente el 2 %.

III. Con la técnica de inoculación de un ml, aislamos solamente un serotipo en seis muestras positivas. *S. typhimurium* representa el 97 % de todas las cepas. La cepa no identificada representa el 3 %.

IV. Resumiendo de las 266 cepas de *Salmonella* aisladas por las tres técnicas, en 256 se llegó a determinar el serotipo, mientras que las restantes 10 cepas no se pudo pasar de género.

Las 256 cepas, que equivalen al 96'3 % del total de cepas, se repartieron en número y frecuencia de la siguiente forma:

234	pertenecen a <i>S. typhimurium</i>	que representan el 87'9 %
13	" <i>S. enteritidis</i>	" 4'9
5	" <i>S. essen</i>	" 1'9
3	" <i>S. typhi</i>	" 1'2
1	" <i>S. paratyphi B</i>	" 0'4
10	" <i>S. no identificadas</i>	" 3'7

Respecto al número de muestras positivas para el aislamiento de *Salmonellas*, en cuatro se detectó un serotipo, *S. typhimurium*, en 11 se detectó simultáneamente dos serotipos siendo en:

- seis muestras, la combinación *S. typhimurium-S. enteritidis*.
- en tres la combinación *S. typhimurium-S. essen*.
- en dos la combinación *S. typhimurium-S. typhi*.

En dos muestras se llegó a detectar conjuntamente hasta tres serotipos formando las siguientes combinaciones:

S. typhimurium-S. enteritidis-S. essen.

S. typhimurium-S. enteritidis-S. paratyphi B.

A la vista de los resultados es de señalar no sólo que con la técnica de inoculación de 10 ml hemos sido capaces de detectar más serotipos que con la técnica de filtración, cinco frente a tres, sino que en la misma muestra hemos sido capaces de aislar frecuente y simultáneamente, dos y hasta tres serotipos diferentes, 32'1 % y 7'7 % de las muestras positivas frente al 8'6 % y 0 % respectivamente.

3.4. DISPERSION CRONOLOGICA DE LOS SEROTIPOS.

Como se puede comprobar en la tabla 19, se detectaron cinco serotipos de Salmonella, que se repartieron de la siguiente forma:

- en Mayo se aislaron dos serotipos, S. typhimurium-S. enteritidis.
- en Junio se aislaron tres serotipos, S. typhimurium-S. enteritidis-S. typhi.
- en Julio se aislaron cuatro serotipos, S. typhimurium-S. enteritidis-S. essen-S. typhi.
- en Septiembre se aislaron cuatro serotipos, S. typhimurium-S. enteritidis-S. paratyphi B.
- en Octubre se aislaron tres serotipos, S. typhimurium-S. enteritidis-S. essen.

Tabla 19. Cronología de los serotipos.

SEROTIPOS	Mayo	Junio	Julio	Sept.	Octubre	total	cepas
S. typhimurium	25	57	48	75	30	234	87'9%
S. enteritidis	2	3	1	5	2	13	4'9%
S. essen	-	-	1	2	2	5	1'9%
S. typhi	-	2	1	-	-	3	1'2%
S. paratyphi B	-	-	-	1	-	1	0'4%
S. no identificadas	1	3	2	4	-	10	3'7%

Aunque en ninguno de los meses estudiados se detectaron los cinco serotipos, en todos ellos, se aislaron conjuntamente dos serotipos, S. typhimurium-S. enteritidis..

Julio y Septiembre fueron los meses en los que se detectaron mayor número de serotipos, cuatro, tres comunes y uno desigual.

S. typhimurium: ocupa el primer lugar entre los serotipos detectados por nosotros y representa el 87'9 % de las cepas identificadas. Se aisló en todos los meses muestreados, más aún en to-

das las muestras en que se detectaron Salmonellas, con cualquiera de las tres técnicas empleadas.

S. enteritidis: es el segundo serotipo más frecuentemente detectado y representa el 4'9 % de las cepas identificadas. Se aisló en todos los meses estudiados, aunque solamente en ocho muestras, repartidas de la siguiente forma: una en Mayo, una en Junio, tres en Septiembre y una en Octubre.

Se le detectó únicamente con la técnica de inoculación de 10 ml.

S. essen: ocupa el tercer lugar entre los serotipos detectados y representa el 1'9 % de las cepas identificadas. Se aisló durante los meses de Julio, Septiembre y Octubre, procedentes de cuatro muestras, repartidas de la siguiente forma: una en Julio, dos en Septiembre y una en Octubre.

Se le detectó una vez por la técnica de filtración, Septiembre, y tres veces con la técnica de inoculación, Julio, Septiembre y Octubre.

S. typhi: es el cuarto serotipo, representando el 1'2 % de las cepas identificadas. Se aisló en Junio y Julio, procedente de dos muestras.

Se le detectó una vez con la técnica de inoculación de 10 ml, Junio, y en Julio con la técnica de filtración.

S. paratyphi B: ocupa el quinto lugar de los serotipos detectados.

Fué detectado una sólo vez en una muestra recogida durante el mes de Septiembre y utilizando la técnica de inoculación de 10 ml.

3.5. RENDIMIENTO DE LOS MEDIOS SOLIDOS DE AISLAMIENTO.

Como sabemos, la finalidad de sembrar un inóculo de los caldos de enriquecimiento sobre la superficie de los medios sólidos de aislamiento, es distribuir los microorganismos depositados

en el inóculo por toda la superficie de la placa; con ello se intenta individualizar las bacterias, que al multiplicarse obtendremos colonias bien desarrolladas y separadas unas de otras.

Esta fase es muy importante, ya que nos va a permitir diferenciar las colonias sospechosas de ser Salmonellas de las no sospechosas.

Los dos medios de aislamiento utilizados fueron el XLD y BS. El número de colonias sospechosas seleccionadas por cada medio, que se tomó para su confirmación é identificación posterior fué:

- con la técnica de filtración, tres colonias de cada medio.
- con las técnicas de inoculación de 10 y un ml, fueron cinco colonias del medio XLD y dos del BS.

Según las técnicas empleadas, los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Filtración: Se analizaron 28 muestras, que una vez sembradas en los dos medios de aislamiento, se obtuvieron colonias sospechosas en todas, lo que nos permitió seleccionar como se observa en la tabla 20, 84 colonias sospechosas de cada medio de aislamiento.

De las 84 colonias tomadas del XLD, 42 se confirmaron posteriormente como Salmonellas (50 %).

De las 84 colonias procedentes del BS, 52 se confirmaron posteriormente como Salmonellas (61'9 %).

Tabla 20. Colonias aisladas con la técnica de filtración.

Aislamiento Salmonellas	XLD	BS	total
colonias sospechosas	84	84	168
colonias confirmadas	42	52	94
%	50	61'9	55'9

En cuánto al número de muestras positivas, de las 28 ana-

lizadas, 23 resultaron positivas con los dos medios (82'1 %), si bien con el XLD, 19 resultaron positivas (67'8 %) y con el BS, 22 (78'5 %).

Respecto al número de serotipos obtenidos en cada medio, es de resaltar que el XLD nos permitió aislar dos serotipos, S. typhimurium y S. essen, y el BS otros dos, S. typhimurium y S. typhi. El XLD nos permitió detectar dos serotipos de la misma placa y el BS no.

Como vemos, el rendimiento del BS no sólo fué superior que el XLD respecto al número de muestras positivas (10 % más) y al número de colonias sospechosas confirmadas (12 % más) sino que nos permitió aislar S. typhi.

Inoculación de 10 ml. Se analizaron 34 muestras, una vez sembradas en los medios de aislamientos se obtuvieron colonias sospechosas en todas las sembradas en XLD y en sólo 28 de las sembradas en BS, lo que nos permitió seleccionar 170 colonias en XLD y 56 en BS como se ve en la tabla 21.

De las 170 colonias del XLD, 104 fueron confirmadas posteriormente como Salmonellas (61'1 %).

De las 56 colonias seleccionadas en BS, 34 fueron confirmadas posteriormente como Salmonellas (60'7 %).

Tabla 21. Colonias aisladas con la técnica de inoculación de 10 ml.

Aislamiento Salmonellas	XLD	BS	total
colonias sospechosas	170	56	226
colonias confirmadas	104	34	138
%	61'1	60'7	61

En cuánto al número de muestras positivas, de las 34 muestras analizadas, 28 lo fueron con los dos medios (82'5 %), si bien con el XLD, 27 resultaron positivas (79'4 %) y con el BS, 21 de las 28 muestras analizadas (75 %).

Frente al número de serotipos obtenidos por cada medio, es de señalar que el XLD nos permitió aislar cuatro serotipos, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. essen* y *S. paratyphi B*, y en el BS tres serotipos, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, y *S. typhi*. Destaquemos que el XLD nos permitió aislar ocho veces dos serotipos y dos veces tres serotipos en la misma placa, mientras que el BS solamente una vez permitió aislar dos serotipos.

Como vemos, el rendimiento del XLD fué ligeramente superior al BS con respecto al número de muestras positivas (4'4 % más) número de colonias confirmadas (0'4 % más) y número de serotipos, así como número de serotipos por placa

Hay que resaltar que el BS nos permitió aislar *S. typhi* y no el XLD. Sin embargo, con *S. paratyphi B* nos ocurrió a la inversa.

Inoculación de un ml. Se analizaron siete muestras que una vez sembradas en los dos medios de aislamiento, se obtuvieron colonias sospechosas en todas las muestras, lo que nos permitió recoger 35 colonias sospechosas en XLD y 14 en BS, tabla 22.

De las 35 colonias procedentes del XLD, 26 se confirmaron posteriormente como *Salmonellas* (74'2 %).

De las 14 colonias seleccionadas en BS, ocho se confirmaron posteriormente como *Salmonellas* (57'1 %).

Tabla 22. Colonias aisladas con la técnica de inoculación de un ml.

Aislamiento <i>Salmonellas</i>	XLD	BS	Total
colonias sospechosas	35	14	49
colonias confirmadas	26	8	34
%	74'2	57'1	69'3

En cuánto al número de muestras positivas, de las siete analizadas, seis resultaron positivas con los dos medios (85'7 %), si bien con el XLD, seis resultaron positivas (85'7 %), y con el

BS, cinco (71' 4 %).

Frente al número de serotipos los dos medios se comportaron igual, permitiendo solamente aislar un serotipo, S. typhimurium.

Resumiendo de las 443 colonias sospechosas aisladas por las tres técnicas, 266 fueron posteriormente confirmadas como Salmonellas (60 %). Del total, 289 se tomaron del XLD, resultando ser Salmonellas 172 (59'5 %) y 154 del BS, confirmándose 94 (61 %), tabla 23.

Tabla 23. Colonias aisladas en los dos medios sólidos de aislamiento.

Aislamiento de Salmonellas	XLD	BS	total
colonias sospechosas	289	154	443
colonias confirmadas	172	94	266
%	59'5	61	60

Aunque globalmente el número de colonias confirmadas es ligeramente mayor, 1'5 %, en el BS que en el XLD, hemos visto que con las técnicas de inoculación el rendimiento es superior en el XLD, 17'5 % superior para inóculos de un ml y 0'4 % para 10 ml, mientras que con la técnica de filtración que utiliza volúmenes de 70-100 ml, el rendimiento es más alto, 11'9 %, en el BS que en XLD. Lo que parece indicar que la selectividad es mayor en el BS a medida que aumenta los volúmenes de agua ensayadas y disminuye con el XLD.

Atendiendo al número de serotipos, de los cinco detectados, tres se aíslan en las muestras de 10 ml en el BS y cuatro en el XLD. En los dos medios selectivos es común el aislamiento de S. typhimurium en todos los volúmenes de muestra y S. enteritidis en los volúmenes de 10 ml. S. essen y S. paratyphi B solamente se detectaron en el XLD en las muestras de 10 ml. Hay que resaltar que gracias al BS pudimos aislar tres colonias de S. typhi en dos placas, procedentes de dos muestras distintas.

Además hay que destacar que el XLD nos permitió aislar más de un serotipo de la misma placa; así en ocho placas detectamos dos serotipos y en dos placas tres serotipos diferentes, mientras que el BS solamente nos permitió aislar en una ocasión dos serotipos distintos.

Por último, refiriéndonos al número de muestras positivas, de las 69 analizadas, en 57 se detectaron Salmonellas, 82'6 %. Si bien de las 69 en las que se utilizó el XLD en 52 se aislaron Salmonellas, 75'3 %, mientras que de las 63 muestras en que se empleó el BS, 48 resultaron positivas, 74'6 %.

3.6. RELACION SALMONELLAS-INDICADORES.

La polución de máxima importancia, desde el punto de vista de salud pública, es la de los animales de sangre caliente, principalmente la humana y después la de los animales, ya que pueden contener en cualquier momento microorganismos productores de enfermedad, especialmente bacterias del grupo entérico. La polución de los animales de sangre fría representa una menor incidencia.

Al depender normalmente las infecciones portadas por el agua de la polución excremental, la detección de tal contaminación es el primer objetivo de su examen bacteriológico (Taylor, 1958; Holden, 1970).

El uso de la presencia de bacterias como un indicador de la calidad sanitaria del agua, comienza en 1.880 con la descripción de Klebsiella, K. pneumonia y K. rhinoscleromatis, por Von Frist, como un microorganismo característico de la contaminación fecal humana (Clark y Kables, 1964; Ptark y cols, 1973; Dufour y Cabelli, 1976).

Se ha elegido un indicador de polución bacteriana, porque intentar aislar cada patógeno específico, no es práctico por el gran número de ellos y porque los métodos son lentos y muy costosos.

Se propuso el test de coliformes fecales (CF), como el mejor medio de evaluar la polución fecal y el significado bacteriológico de las aguas sin tratar, porque son muy abundantes en el

tracto intestinal humano y en el de los animales de sangre caliente, es decir, están siempre presentes y en número elevado en la fuente de polución (Geldreich, 1970; Viraragharon, 1973; Katzenlson y Kedmi, 1979) y han mostrado tener una resistencia similar a la mayoría de los patógenos y porque el test es rápido y económico (Geldreich, 1972; Tate y Trussell, 1977; Dockins y Mcfeters, 1978; Berg y cols, 1978). Así el encontrarnos con un elevado de coliformes fecales se atribuye a una polución continua y/o reciente.

Los coliformes totales (CT), estreptococos fecales (EF) y clostridios sulfito reductores (CSR) también son usados como indicadores de contaminación fecal, ya que se encuentran en gran número en heces humanas y de animales (Clark y Kables, 1964; Geldreich, 1970, 1972; Viraragharon, 1973; Tate y Trussell, 1977; Berg y cols, 1978; Katzenlson y Kedmi, 1979).

Al ser capaces los coliformes totales (CT) de sobrevivir y multiplicarse fuera del cuerpo animal, por ello no son considerados en igual extensión que los coliformes fecales como organismos indicadores de polución fecal.

Los estreptococos fecales y los clostridios sulfito reductores, debido a sus características de supervivencia, mayor que la de los coliformes fecales y de la mayoría de los patógenos entéricos, se recomienda que se usen como tests cuando interese detectar la polución lejana en el tiempo y en el espacio.

Los niveles de estreptococos fecales y clostridios sulfito reductores son mayores en animales que en humanos, por eso se emplea la relación CF/EF, para indicar la probable fuente de contaminación (Geldreich y Kenner, 1969). Podemos por tanto decir:

- si CF/EF es mayor o igual que cuatro, estamos en presencia de heces humanas o aguas polucionadas con éstas heces.
- si CF/EF es menor o igual que 0'7, estamos en presencia de heces animales o aguas polucionadas con éstas heces.

Muchos autores han tratado de buscar una relación entre aislamiento cualitativo de Salmonellas y correspondientes niveles

de indicadores, principalmente de coliformes fecales.

Este apartado lo vamos a dedicar a estudiar posible relación entre aislamiento de Salmonellas y otras bacterias (tabla 13 y apartado 5.1.) como:

- Enterobacterias (coliformes fecales y coliformes totales).
- bacterias intestinales (estreptococos fecales, clostridios sulfito reductores).
- bacterias heterótrofas (aerobios).

A continuación de ésto, vamos a intentar ver si existe:

- una relación entre presencia de Salmonellas y niveles de las bacterias seleccionadas.
- una densidad por encima de la cual la probabilidad de aislar Salmonellas sería del 100 %.
- una densidad por encima de la cual no se podría aislar Salmonellas.

Hay que destacar que la presencia de Salmonellas en el agua es muy variable, estando muy relacionada con la incidencia de salmonelosis humana y animal y la existencia de portadores sanos en esa zona ya que la eliminación por éstos de las Salmonellas no es constante sino intermitente.

Por lo tanto, el tipo de relaciones que tengamos nosotros y otros autores no se ha de tomar como una ley para predecir la presencia de Salmonellas en un momento dado y en un agua determinada, ya que si ésta no porta Salmonellas o la metodología seguida para su aislamiento es inadecuada, la relación no será valorable.

Esto último, en nuestro caso no nos concierne, ya que de las 69 muestras analizadas detectamos la presencia de Salmonellas en 57 (82'6 %).

Para determinar el tipo de relación, simultáneamente a los análisis para la detección de Salmonellas, se realizaron los análisis cuantitativos de las bacterias indicadoras de contamina-

ción. Los resultados de las 69 muestras se tabularon de acuerdo a unos intervalos que nosotros establecimos.

3.6.1 Relación coliformes totales-Salmonellas.

El grupo de bacterias incluidas en el término de coliformes totales (CT), están muy distribuidas en la naturaleza y pueden tener acceso al agua procedentes de fuentes no contaminadas por materiales de origen fecal. Solamente una fracción de ellas están normalmente presentes en las heces humanas y animales. Son capaces de sobrevivir y multiplicarse fuera del cuerpo animal, por todo ello no son considerados en igual extensión que los coliformes fecales como organismos indicadores de polución fecal. Por eso su presencia en el agua puede tener poco significado epidemiológico.

Tabla 24. Relación coliformes totales-Salmonellas.

CT/ml	20000 50000	50001 -	100001 -	200001 -	300001 -	400001 800000	total
n°muestras	7	10	31	7	4	3	62
n°muestras +	7	9	25	6	2	2	51
%	100	90	80'6	85'7	50	66'6	82'2

Los resultados de las 62 muestras computadas se distribuyeron en seis intervalos. La tabla 24 nos muestra que en ningún caso hubo una densidad menor de 20.000 CT/ml.

Observamos que en el primer intervalo la probabilidad de aislar Salmonellas es del 100 % y a partir del nivel de 50000 CT/ml se produce una disminución. Esta disminución no es constante sino que sufre altibajos y a pesar de ello en el último intervalo, con tan elevadas densidades la probabilidad es del 66'6 %.

Pocos autores, entre ellos Smith y Twedt, 1971, Dutka y Bell, 1973, Carney y cols, 1975, Stelzer y cols, 1977, se han interesado en estudiar el tipo de relación existente entre los niveles de CT-aislamiento de Salmonellas. Ya que no todos los CT proceden de fuentes contaminadas por materiales de origen fecal, el tipo de relación que se pueda obtener será muy variable, depen-

diendo de la proporción entre los CT de origen fecal y otras fuentes, y por tanto no muy valorable, ni fiable.

Si comparamos nuestros resultados con los obtenidos por Dutka y Bell, 1973, observamos que mientras ellos obtienen una relación rectilínea constante entre niveles de CT-aislamiento de Salmonellas, nosotros obtuvimos globalmente una relación inversa.

En principio se podrá pensar que la diferencia de resultados se debe a que si bien existe una relación rectilínea, a partir de ciertos niveles de CT, la probabilidad de aislar Salmone-llas disminuye, y que ésta disminución es producto entre otros factores de la competencia de la microflora saprofita presente en el agua, recordemos que nuestras densidades no sólo son mucho mayores que las de Dutka y Bell, 1973, sino que nuestra menor densidad es superior a la más alta de ellos.

Profundizando más, aunque hemos dicho que había una reducción rectilínea inversa en nuestros resultados, en realidad no es así, ya que se dan altibajos, tabla 24.

Por ejemplo, observamos que en el intervalo cuarto, que presenta mayores densidades que el tercero, la frecuencia de aislamiento también es mayor e igualmente ocurre en el intervalo sexto frente al quinto. Estos resultados son similares a los obtenidos por Stelzar y cols, 1977.

Lógicamente se puede pensar que la diferencia de probabilidades en los distintos intervalos no se debe achacar directamente a los niveles de CT, sino que la diferencia es producto de los diferentes tantos por cientos de CT de origen fecal que presentan las distintas muestras.

Así, si aumentan los niveles de CT, pero éste aumento no procede de contaminación de origen fecal, no es de extrañar que la frecuencia de aislamiento no aumente paralelamente.

Esto último ha podido ocurrir en nuestro caso, y en los que el aumento de las densidades de CT no era debido a un aumento de contaminación de origen fecal en la misma proporción, por lo que es lógico que la frecuencia de aislamiento de Salmonellas sea

incluso menor.

3.6.2 Relación coliformes fecales-Salmonellas.

La presencia de un gran número de coliformes fecales (CF) en las aguas se atribuye a una polución reciente y/o continua, ya que las aguas que no están en contacto directo o indirecto con polución humana o animal se encuentran libres de coliformes fecales.

Los números pueden ser considerados como un justo índice de la extensión de tal polución.

Tabla 25. Relación coliformes fecales-Salmonellas.

CF/ml	900-1000	1001	10001	20001	30001	40001	50000 80000	total
n°muestras	2	13	20	13	9	7	5	69
n°muestras +	2	12	18	4	7	6	3	57
%	100	92'3	90	69'2	77'2	85'7	60	82'6

Los resultados de las 69 muestras se distribuyeron en siete intervalos. La tabla 25 nos muestra que en ningún caso hubo una densidad menor de 900 CF/ml.

La probabilidad de aislamiento de Salmonellas en los diferentes intervalos no fué siempre la misma, así en el primero, la frecuencia es del 100 %. Del segundo al cuarto, la probabilidad va disminuyendo, mientras que en el segundo y tercero es ligera, la reducción en el cuarto es fuerte, 69 %. Del cuarto al sexto, la frecuencia de aislamiento vuelve a aumentar para llegar en el sexto al 85'7 %. Durante el séptimo y último se produce una fuerte reducción para alcanzar la probabilidad más baja de todas ellas, el 60 %.

Muchos autores han tratado de estudiar la relación existente entre niveles de CF-aislamiento de Salmonellas cualitativo. Si nuestros resultados los comparamos con los de Grunnet y Nielsen, 1969, Brezenski y Russamanno, 1969, Geldreich, 1970, Dutka y Bell, 1973, y Luppi y cols, 1973, observamos que los cuatro primeros ob-

tuvieron una relación rectilínea clara y constante entre los niveles de CF y aislamiento de Salmonellas.

Luppi y cols, 1973, por su parte observaron el mismo fenómeno hasta el intervalo de 2.000 CF/100 ml, pero a partir de éste la frecuencia de aislamiento disminuía hasta hacerse cero, achacando éste proceder a la competencia de la microflora saprofita presente en el agua y/o a las limitaciones de su metodología.

Nosotros obtuvimos una variante nueva, si bien del intervalo primero al cuarto la frecuencia de aislamiento disminuía, del cuarto al sexto aumentaba de manera significativa, para volver a decaer en el séptimo intervalo.

La primera parte de nuestra relación, descenso, se podría explicar de manera análoga a como lo hicieron Luppi y cols, 1973, pero como explicar entonces la segunda parte de nuestra relación, aumento de la frecuencia de aislamiento con densidades mayores de CF. Tenemos que tener en cuenta que los volúmenes utilizados como inóculos eran del orden de un litro para Luppi y cols, 1973, y a los nuestros de 10 y 70 ml.

A la vista de los resultados descartamos como causa de las diferencias de frecuencia en los distintos intervalos, las limitaciones de nuestra metodología, ya que si fuera así la disminución sería constante, es decir, a medida que aumenta los niveles de contaminación fecal, disminuirá la probabilidad y no es así, como hemos visto, sino que a partir del cuarto intervalo vuelve a aumentar.

Achacamos las diferencias de frecuencia en los distintos intervalos a:

- a la diferencia de niveles de Salmonellas en agua, ya que los niveles de éstos microorganismos patógenos no es constante, sino que su presencia, sufre fluctuaciones, estando muy relacionado con la incidencia de salmonelosis humana y animal y la existencia de portadores, siendo la eliminación por éstos no constante sino intermitente.

- a la distribución no uniforme de las Salmonellas en el agua, que se acentúa en los volúmenes pequeños.

Nuestros resultados no suponen una contradicción a la admitida relación rectilínea existente entre niveles de CF-aislamiento de Salmonellas. Si recordamos los trabajos de Grunnet y Nielsen, 1969, Brezenski y Russomanno, 1969, Geldreich, 1970, Smith y cols, 1973 y Dutka y Bell, 1973, donde la relación era clara, los niveles de CF de sus muestras eran muy pequeños. El intervalo de mayor densidad era de 20.000 CF/100 ml en Brezenski y Russomanno, 1969, siendo la probabilidad de aislamiento en dicho intervalo del 61'5 %; le seguía el intervalo de 10.000 CF/ 100 ml en Grunnet y Nielsen, 1969, siendo la frecuencia del 72 %. Los demás trabajos no superaban el nivel de 2.000 CF/100 ml.

Como se ve, los niveles son extremadamente pequeños en comparación a los nuestros, ya que todas las muestras superaban la cifra de 900 CF/ml y aún así detectamos Salmonellas en el 82'6 % de las muestras.

Es de resaltar también algunas de las coincidencias con otros autores encontrados cuando se hizo la revisión bibliográfica de los trabajos en los que se plantea éste tipo de estudio, como:

- el aislamiento de Salmonellas en conjunción con el grupo CF y el aislamiento de éste grupo solamente resalta la importancia y validez del test de CF como indicador de polución peligrosa para la salud, ya que la ausencia de aislamiento de Salmonellas no excluye la probable presencia de otros patógenos.
- que no hay nivel de CF por encima del cual la probabilidad de aislar Salmonellas sería del 100 %.

3.6.3 Relación estreptococos fecales-Salmonellas.

Debido a sus características de supervivencia, mayor que la de los coliformes fecales y de la mayoría de los patógenos entéricos se recomienda que se use el test de estreptococos fecales (EF), cuando no se realicen frecuentes análisis para determinar

o estudiar la calidad sanitaria del agua.

Tabla 26. Relación estreptococos fecales-Salmonellas.

EF/ml	1500 3000	3001 -	4501 -	6001 -	7501 -	9001 -	10501 13000	total
n°muestras	18	10	18	4	8	3	8	69
n°muestras +	17	9	14	3	6	2	6	57
%	94'4	90	77'7	75	75	66'6	75	82'6

Los resultados de las 69 muestras se distribuyeron en siete intervalos. En ningún caso hubo una densidad menor de 1500 EF/ml como nos muestra la tabla 26.

En el primer intervalo la probabilidad de aislar Salmonellas es del 94'4 %, a partir de éste intervalo y hasta el cuarto se produce una disminución. Del cuarto al séptimo podemos considerar que la probabilidad se mantiene constante en el 75 %.

Pocos autores, entre ellos Smith y Twedt, 1971, Dutka y Bell, 1971, y Stelzer y cols, 1977, se han interesado en estudiar el tipo de relación existente entre los niveles de EF-aislamiento de Salmonellas; otros autores lo más que han hecho es citar el nivel de EF de las muestras de agua en las que se detectó Salmonellas.

Smith y Twedt, 1971, intentaron relacionar medias aritméticas con aislamiento de Salmonellas, mientras que en el río Saline obtienen una relación rectilínea, a medida que aumentan los niveles de EF, aumentan las probabilidades de aislamiento. En el río Huron, sin embargo no obtienen ninguna relación; la frecuencia de aislamiento tan pronto aumenta como se hace cero.

Dutka y Bell, 1973, analizaron 169 muestras. Los resultados los distribuyeron en cinco intervalos, observaron que la frecuencia de aislamiento aumentaba del primero al tercero, manteniéndose dicha frecuencia en el cuarto. En el quinto y último intervalo que solamente incluía una muestra, resultó ser positiva para el aislamiento de Salmonellas.

Stelzer y cols, 1977, tomaron seis puntos de muestreo a lo largo de un río; en cada punto analizaron el mismo número de muestras, asignando a cada punto el valor de los niveles de las muestras analizadas, ordenándose en orden creciente. Sus resultados no permiten dar ningún tipo de relación; tan pronto aumenta como disminuye la frecuencia de aislamiento a medida que aumentan los niveles de EF/ml.

Comparando nuestros resultados con los anteriores, podemos decir que el trabajo que muestra resultados similares es el de Dutka y Bell, 1973. Mientras que en éste la probabilidad de aislamiento se mantiene constante en el 50 %, en el nuestro la frecuencia se mantiene en el 75%.

A la vista de nuestros resultados podemos concluir que no hemos encontrado una estrecha relación entre los niveles de EF y la probabilidad de aislar Salmonellas.

3.6.4. Relación CF/EF-aislamiento de Salmonellas.

Los números de estreptococos fecales son mayores en heces animales que en las humanas, por eso se usa la relación CF/EF para indicar la probable fuente de contaminación (Geldreich y Kenner, 1969).

Tabla 27. Relación CF/EF-aislamiento de Salmonellas.

CF/EF	$\leq 0'7$	$>0'7$ y ≤ 4	>4	total
n°muestras	4	29	36	69
n°muestras +	4	25	28	57
%	100	85'2	77'7	82'6

Los resultados de las 69 muestras se distribuyeron de la forma en que se observa en la tabla 27. Como se ve, 36 muestras, más de la mitad de las analizadas, presentaron relaciones CF/EF mayores de cuatro, características de la polución de origen humano, detectándose Salmonellas en 28 muestras (77'7 %).

29 muestras exhibían relaciones CF/EF entre 0'7 y cuatro

características de una mezcla de polución de origen humano y animal, y principalmente del primer tipo, ya que la mayoría de las relaciones eran muy altas, cercanas al valor de cuatro. Se aislaron Salmonellas en 25 muestras (85,2 %).

Solamente cuatro muestras presentaron relaciones CF/EF menores de 0'7, características de la polución de origen animal. Se detectaron Salmonellas en las cuatro muestras (100 %).

Por todo ésto, podemos afirmar que a medida que aumenta el valor de la relación CF/EF disminuye la probabilidad de detectar Salmonellas. Así se pasa del 100 % cuando la relación es menor de 0'7 al 77'7 % cuando es mayor de cuatro.

Nos hace pensar que pueda ser debido a la diferencia de los niveles o componentes de los compuestos químicos que acompañan a los dos tipos de polución, que enmascaran en distinto grado la probable presencia de Salmonellas.

En cuánto a los serotipos detectados podemos decir:

- que en las cuatro muestras cuya relación CF/EF era menor de 0'7 solamente se aisló un serotipo, S. typhimurium.
- en las 25 muestras se presentaron valores entre cuatro y 0'7 en la relación CF/EF se detectaron tres serotipos, S. typhimurium, S. enteritidis y S. typhi.
- en las 28 muestras que exhibían valores superiores a cuatro en la relación CF/EF, se aislaron cinco serotipos, S. typhimurium, S. enteritidis, S. typhi, S. paratyphi B y S. essen.

S. typhimurium, es el serotipo que se encuentra a la cabeza en la salmonelosis humana y animal, por eso es normal que se detecte en las aguas polucionadas de origen animal y humano y en la mezcla de ambas.

S. typhi y S. paratyphi B, son serotipos que se encuentran entre los 10 más frecuentemente aislados en la salmonelosis humana y no se encuentran en los animales, ya que son serotipos de huésped humano específico; por eso sólo se detectan en las aguas

en cuya polución intervienen los residuos de la actividad humana.

S. enteritidis, se encuentra entre los 10 serotipos más frecuentemente aislados en clínica humana y menos frecuentemente, aunque en una proporción alta, en los animales. El encontrarlo en las aguas polucionadas de origen humano y en la mezcla, nos hace pensar que procede de fuente humana.

S. essen, según Le Minor, 1972, se encuentra entre los 65 serotipos más frecuentemente aislados en Francia, pero sin citar fuente de origen. En España es un serotipo raro y según nuestros resultados sólo se encuentra en las muestras de agua que presentan un valor mayor de cuatro en la relación CF/EF, o sea, de origen humano.

De las 57 muestras en las que se detectó Salmonellas:

- en 44 se aisló un serotipo.
- en 11 se aislaron dos serotipos.
- en dos se aislaron hasta tres serotipos simultáneamente.

Las dos muestras en las que se detectó tres serotipos presentaron un valor de CF/EF superior a cuatro.

De las 11 en las que se detectaron dos serotipos, cuatro presentaron un valor intermedio entre 0'7 y cuatro, y en las siete restantes el valor era superior a cuatro.

Por todo ello, podemos deducir que cuando el valor de la relación es superior a cuatro, hay más posibilidad de aislar más de un serotipo simultáneamente en las misma muestra.

3.6.5 Relación clostridios sulfito reductores-Salmonellas.

Debido a sus características de supervivencia, mayor que las del resto de bacterias entéricas y a su presencia en la naturaleza, es usado como indicador de polución fecal con muchas limitaciones. Se sigue utilizando en situaciones en que interesa detectar la polución fecal remota y en los análisis de aguas cloradas.

Los resultados de las 69 muestras como se observa en la

tabla 28, se distribuyeron en seis intervalos.

Tabla 28. Relación clostridios sulfito reductores Salmonellas.

CSR/ml	100 <	101 -	351 -	601 -	851 -	1101 1700	total
n°muestras	4	22	16	14	9	4	69
n°muestras +	4	20	14	11	6	2	57
%	100	90'9	87'5	78'5	66'6	50	82'6

Como se ve en la tabla 28, en el primer intervalo la probabilidad de aislar Salmonellas es del 100 %. A partir de éste intervalo se da una disminución progresiva y constante, hasta llegar al último intervalo, en el que la probabilidad es del 50 %.

En la literatura revisada no hemos encontrado ningún trabajo en el que se estudie la posible relación, entre los niveles de CSR-aislamiento de Salmonellas. Por tanto no podemos comparar nuestros resultados y nos limitamos a exponer que el tipo de relación obtenida, es una relación rectilínea inversa, que no es de extrañar teniendo en cuenta que hay una gran diferencia entre los tiempos de supervivencia de los CSR y las Salmonellas.

3.6.6 Relación aerobios-Salmonellas.

Los resultados de las 69 muestras como se observa en la tabla 29, se distribuyeron en seis intervalos. En ningún caso hubo una densidad menor de 300.000 aerobios/ml.

La tabla 29, muestra que la probabilidad de aislamiento en el primer y segundo intervalo es cercana al 90 %, en el tercero se produce una gran disminución para volver a aumentar en el cuarto, decaer en el quinto y volver a aumentar en el sexto, hasta el 75%.

Si nuestros resultados los comparamos con los de Dutka y Bell, 1973, Luppi y cols, 1973, y Stelzer y cols, 1977, que también se plantearon estudiar el tipo de relación existente entre niveles de aerobios y aislamientos de Salmonellas, nos sería fácil

Tabla 29. Relación aerobios-Salmonellas

aerobios/ml	300000 1000000	1000001 -	2000001 -	3000001 -	4000001 -	5000001 6300000	total
n°muestras	21	19	11	7	3	8	69
n°muestras +	19	17	7	6	2	6	57
%	90,4	89'4	63'6	85'7	66'6	75	82'6

Observar que ambos dos, tanto Dutka y Bell, 1973, como Luppi y cols, 1973, obtuvieron relaciones similares; así durante los primeros intervalos la relación es rectilínea, a medida que aumentan los niveles, aumentan las probabilidades de aislamiento, pero a partir del intervalo central, la relación rectilínea se hace inversa, a medida que aumentan los niveles disminuyen las probabilidades de aislamiento e incluso llega a hacerse cero, como en el caso de Luppi y cols, 1973. Achacan el descenso de las probabilidades a la competencia que ejerce la microflora presente en el agua, cuyo efecto es reducir las propiedades selectivas de los medios de enriquecimiento, originando una pérdida de su selectividad, que lleva consigo un sobrecrecimiento de las bacterias saprofitas y un enmascaramiento de la posible presencia de Salmonellas.

Nuestros resultados son similares a los de Stelzer y cols, 1977, y al igual que ellos no permiten dar ningún tipo de relación, ya que tan pronto aumenta como disminuye la frecuencia de aislamiento.

Las diferencias de probabilidades en los distintos intervalos no es de extrañar, teniendo en cuenta que los aerobios proceden en su mayoría de fuentes de origen no fecal, estando su presencia y números relacionados con las cantidades de materia orgánica degradable.

3.7. RELACION MENSUAL ENTRE BACTERIAS INDICADORAS Y FRECUENCIA DE AISLAMIENTO DE SALMONELLAS.

3.7.1 Relación entre las medias de los muestreos.

En éste apartado vamos a estudiar la relación existente

entre las medias aritméticas mensuales del contenido de bacterias indicadoras de los muestreos y la probabilidad de aislar Salmonellas.

Relación coliformes totales-Salmonellas. La media de los 31 muestreos es de 210.000 CT/ml, presentando oscilaciones entre 21.000 CT/ml en el segundo muestreo y 800.000 CT/ml en el 32º.

Tabla 30. Relación entre media mensual CT-Salmonellas.

Mes	n° muestreos	n° muestreos+	%	nivel CT/ml
Mayo	4	4	100	65250
Junio	8	8	100	157375
Julio	6	6	100	188333
Septiembre	5	5	100	109166
Octubre	8	6	75	412500

Los niveles de los muestreos 10, 27 y 28 no los consideramos aquí por representar números mínimos y no reales.

La tabla 30, nos muestra que se produce un aumento de Mayo a Julio, reducción en Septiembre y gran aumento en el mes de Octubre.

Mientras que durante los cuatro primeros meses, se detectaron Salmonellas en todos los muestreos, 100 %, incluidos los tres que no están representados en la tabla 30 y que se efectuaron en Septiembre. En el mes de Octubre la cifra descendió al 75 %.

Los dos muestreos de dónde no se aislaron Salmonellas presentaron 670.000 CT/ml en el 15 y 370.000 CT/ml en el 33. En el primero, el nivel fué superior a la media general y media mensual. En el segundo, era superior a la media general pero no a la del mes del muestreo.

Relación coliformes fecales-Salmonellas. Los niveles de los 34 muestreos, oscilaron entre 970 CF/ml en el número 28 y 76.000 CF/ml en el 15, siendo la media de ellos de 24.022 CF/ml.

Tabla 31. Relación entre media mensual CF- Salmonellas.

Mes	n° muestreos	n° muestreos+	%	nivel CF/ml
Mayo	4	4	100	7050
Junio	8	8	100	14100
Julio	6	6	100	24166
Septiembre	8	8	100	26096
Octubre	8	6	75	40250

La tabla 31, nos muestra que hay un aumento continuo y progresivo de los niveles de CF/ml de Mayo a Octubre, y que mientras que en los cuatro primeros meses se detectaron Salmonellas, en todos los muestreos, 100 %, durante el mes de Octubre la cifra descendió al 75 % de muestreos.

Los dos muestreos de dónde no se aislaron Salmonellas presentaron 76.000 CF/ml en el número 15 y 23.000 CF/ml en el 33. En el primero, el nivel era superior a la media general y media del mes del muestreo y en el segundo era inferior a las dos medias.

Se estima que las densidades de CF/ml en las aguas residuales varían en el orden de 100.000-1.000.000 CF/ml (Holden, 1970). Comparando la media de todos los muestreos y las de cada mes, con las cifras estimadas para aguas residuales, es de remarcar que todas las medias están por debajo del límite inferior del intervalo. Más, aún, podemos afirmar que en ningún muestreo se alcanzó el límite inferior, lo que sería debido por el tiempo transcurrido desde el vertido de las aguas residuales y por la dilución de las aguas del Manzanares con las del Jarama.

Relación estreptococos fecales-Salmonellas. Los niveles de los 34 muestreos, oscilaron entre 1.800 CF/ml en el número 27 y 12.700 EF/ml en el número 15, siendo la media de ellos de 6.102 EF/ml.

La tabla 32, nos muestra que que hay un aumento progresivo de Mayo a Julio, con ligera disminución en Septiembre para volver a aumentar en Octubre hasta el nivel más alto. Mientras

que en los cuatro primeros meses se aislaron Salmonellas en todos los muestreos, 100 %, en el mes de Octubre la cifra descendió al 75 %.

Tabla 32. Relación entre media mensual EF-Salmonellas.

Mes	n° muestreos	n° muestreos+	%	nivel EF/ml
Mayo	4	4	100	3400
Junio	8	8	100	4550
Julio	6	6	100	5712
Septiembre	8	8	100	5412
Octubre	8	6	75	9975

Los dos muestreos de dónde no se aislaron Salmonellas, presentaron 12.700 EF/ml y 10.200 EF/ml, niveles superiores a la media general y media mensual.

Se estima que las densidades de EF/ml en las aguas residuales varían en el orden de 1.000-100000 EF/ml (Holden, 1970). Si comparamos la media general y las medias de cada mes, con las cifras estimadas para aguas residuales, es de notar que todas las medias están dentro del intervalo, cerca del límite inferior.

Relación CF/EF-Salmonellas. De los 34 muestreos efectuados, dos exhiben el valor menor de 0'7 en la relación CF/EF, valor característico de la polución fecal de origen animal. En 15, la relación tomó un valor entre 0'7 y 4, lo que nos indica que la polución fecal es una mezcla de animal y humana. En 17, la relación es superior a 4, valor característico de la polución de origen humano.

El valor mínimo y máximo de la relación CF/EF fué de 0'4 en el muestreo 28 y de 7'08 en el número 25, siendo la media de los 34 muestreos de 3'7.

La tabla 33, nos muestra que hay un aumento progresivo de los valores medios de la relación CF/EF de Mayo a Julio, manteniéndose dicho valor en Septiembre y disminuyendo ligeramente durante Octubre. Mientras que las medias de las relaciones de Mayo

a Junio nos indica que la polución es una mezcla de animal y humana, durante los meses de Julio, Septiembre y Octubre la polución es de origen humano. Exceptuando Octubre en el que se detectó Salmonellas en el 75 % de los muestreos, en los demás de los meses se aislaron en todos los muestreos.

Tabla 33. Relación entre media mensual CF/EF-Salmonellas.

Mes	n° muestreos	n° muestreos+	%	valor CF/EF
Mayo	4	4	100	2'12
Junio	8	8	100	2'97
Julio	6	6	100	4'6
Septiembre	8	8	100	4'6
Octubre	8	6	75	4'14

Los dos muestreos de dónde no se aislaron Salmonellas presentaron como relaciones CF/EF 5'98 y 2'12. Mientras que la primera es superior a la media general y media mensual, la segunda es inferior a las dos.

Desde el punto de vista de la relación CF/EF, al ser la media de los 34 muestreos de 3'7, podemos decir que el Canal del Jarama vehiculiza aguas polucionadas fundamentalmente de origen humano.

Relación clostridios sulfito reductores-Salmonellas.

Los niveles de CSR de los 34 muestreos, oscilaron entre 10 CSR/ml en el número 18 y 17.000 CSR/ml en el número 14, siendo la media de 545 CSR/ml.

La tabla 34, nos muestra que hay un aumento continuo y progresivo de los niveles de CSR/ml de Mayo a Octubre. Mientras que en los cuatro primeros meses se aislaron Salmonellas en todos los muestreos, 100 %, en el mes de Octubre la cifra descendió al 75 %.

Los dos muestreos de dónde no se detectaron Salmonellas presentaron 1.000 CSR/ml y 1.200 CSR/ml, niveles superiores a la media general y media mensual.

Tabla 34. Relación entre media mensual CSR-Salmonellas.

Mes	n°muestreos	n° muestreos+	%	nivel CSR/ml
Mayo	4	4	100	207
Junio	8	8	100	360
Julio	6	6	100	563
Septiembre	8	8	100	566
Octubre	8	6	75	862

Se estima que las densidades de CSR/ml en las aguas residuales varían en el orden de 100-10.000 CSR/ml (Holden, 1970). Si comparamos la media general y la de cada mes con la cifra estimada, es de notar que todas las medias están dentro del intervalo, cerca del límite inferior.

Relación aerobios-Salmonellas. Los niveles de los 34 muestreos, oscilaron entre 300.000/ml en el número 10 y en el número 34 de 6.300.000/ml, siendo la media de 2.539.705/ml.

Tabla 35. Relación entre media mensual aerobios-Salmonellas.

Mes	n° muestreos	n° muestreos+	%	aerobios/ml
Mayo	4	4	100	1045000
Junio	8	8	100	2252500
Julio	6	6	100	2800000
Septiembre	8	8	100	942500
Octubre	8	6	75	4487500

La tabla 35, nos muestra que hay un aumento de Mayo a Julio, una fuerte reducción en Septiembre y un gran aumento en Octubre. Mientras que en los cuatro primeros meses se aislaron Salmonellas en todos los muestreos, 100 %, en el mes de Octubre la cifra descendió al 75 %.

Los dos muestreos de dónde no se aislaron Salmonellas presentaron 5.200.000/ml y 4.800.000/ml, niveles superiores a la media general y media mensual.

3.7.2 Relacion mensual con la frecuencia de aislamiento de Salmonellas.

En éste apartado trataremos de averiguar la relación existente entre las medias mensuales del contenido de bacterias indicadoras de las muestras usadas, para la detección de Salmonellas y la frecuencia de aislamiento expresado en tanto por ciento.

Los resultados expresados en la tabla 36, a simple vista parecen indicar que existe una relación inversa entre los valores de las medias y probabilidad de aislamiento de Salmonellas, es decir, que a medida que aumenta el contenido bacteriano, disminuye la frecuencia de detección de Salmonellas.

Tabla 36. Relación medias mensuales de las muestras-Salmonellas.

Mes	CT/ml	CF/ml	EF/ml	CSR/ml	aerobios/ml	% +
Mayo	62250	7050	3400	207	1045000	100
Junio	157375	14100	4550	360	2252000	81'2
Julio	195714	24928	5821	590	3542857	78'5
Septiembre	114615	26666	5455	597	965000	85
Octubre	371818	42000	10308	954	3910000	72'7

Este fenómeno podría ser achacado:

- competencia de la microflora saprofita presente en el agua.
- competencia de los componentes químicos o a sus niveles que acompañan a las aguas.
- no distribución uniforme de las Salmonellas tanto en la muestra de agua, como en los caldos de enriquecimiento.
- aumento de la competencia con el mayor número de bacterias saprofitas en los cultivos, lo que concuerda con los resultados obtenidos en la concentración de la muestra por filtración.
- o, que simplemente resulte de otras limitaciones de la metodología empleada.

Tanto individualmente como en conjunto, el efecto es enmascarar la posible presencia de las Salmonellas.

Agrupando a las bacterias indicadoras en dos grupos, uno incluiría a los CT y aerobios, bacterias que pueden multiplicarse en las aguas residuales y tener acceso al agua procedentes de fuentes no contaminadas por materiales de origen fecal. El otro incluiría a CF, EF, bacterias de origen fecal. Los CSR se incluyen en éste último grupo por ofrecer una evolución semejante a CF y EF, a lo largo del periodo de estudio.

Tomando como referencia a los aerobios del primer grupo y fijándonos con detalle en su columna, podemos comprobar que si bien los niveles medios de Mayo y Septiembre o Julio y Octubre son prácticamente idénticos, la frecuencia de aislamiento es distinta, así en Mayo hay 100 %, en Septiembre 85 %, en Julio 78'5 % y en Octubre 72'7 %.

Tomando a los CF como el representante más cualificados del contenido bacteriano fecal, ya que presentan tiempos de supervivencia similares a las Salmonellas, podemos comprobar que si bien durante los tres primeros meses al aumento de las medias le corresponde una disminución de la probabilidad de aislamiento, en el cuarto mes con media muy superior a las anteriores le corresponde un aumento en la frecuencia de aislamiento.

Tanto los resultados del primer grupo de bacterias como del segundo, en conjunto nos hace pensar y decir que no hay una relación entre las medias mensuales de las bacterias indicadoras y la probabilidad de aislamiento de Salmonellas y que la diferencia de frecuencia que encontramos en los distintos niveles no se debe achacar a las limitaciones de la metodología empleada por nosotros, sino que está relacionada directamente con el desfase en meses entre la máxima incidencia de las Salmonellas en el agua (apartado 3.2.).

Cuando se intente estudiar la relación existente entre niveles bacterianos y probabilidad de aislamiento, conviene citar

en que mes se obtuvo, ya que la relación obtenida en un mes o periodo de meses no se puede aplicar como ley para cualquier mes o grupo de meses.

4. LAS AGUAS DEL CANAL DEL JARAMA Y LA EPIDEMIOLOGIA DE LA SALMONELOSIS EN LA POBLACION QUE EFECTUA SUS VERTIDOS EN DICHAS AGUAS.

4.1 RELACION ENTRE LA ECOLOGIA DESCRITA Y LA SALMONELOSIS OBSERVADA EN PATOLOGIA HUMANA.

Para averiguar que tipo de relación existe entre las Salmonellas aisladas por nosotros en el agua y las observadas en la clínica humana, tenemos que hacer referencia en primer lugar a cuales son los serotipos más frecuentemente encontrados en la patología humana.

Como hemos visto en la introducción, aunque se han detectado más de 1.800 serotipos de Salmonellas, sin embargo muy pocos, menos de 40 son los responsables de la mayoría de los casos, 95 %, y alrededor de 10 son los causantes de la salmonelosis humana.

Aunque su frecuencia no es siempre la misma, sino que hay ligeras variaciones de año en año, y algo mayor de país en país. Podemos citar los siguientes serotipos por orden de importancia como los más frecuentes en el mundo:

1 S. typhimurium	6 S. saint-paul
2 S. enteritidis	7 S. thompson
3 S. newport	8 S. typhi
4 S. heidelberg	9 S. paratyphi B
5 S. infantis	10 S. derby

Haciendo referencia a España, lugar de nuestro estudio, como ya vimos en la introducción se encuentran diferencias significativas, tales como:

- 10 serotipos son los responsables de más del 90 % de los casos.
- de éstos, cuatro serotipos y a veces tres, S. typhimurium, S. enteritidis y S. typhi, dependiendo del año y de la cita bibliográfica, Escuela Nacional de Sanidad (ENS), Hospital del Rey y Centro Nacional de Microbiología Virología e Inmunología Sanita-

ria (CNMVIS), son los responsables del 80 % de la salmonelosis humana en España.

- se puede considerar a *S. typhi* como el tercer serotipo más frecuentemente detectado con el 13 % en CNMVIS, 12 % en ENS y hasta el 38 % en el Hospital del Rey, mientras que en otros países si bien se cita entre los 10 más frecuentes, se cifra entre el 2-3 %.

Los 10 serotipos más frecuentes, aislados en España según información facilitada por la Escuela Nacional de Sanidad, Hospital del Rey y Centro Nacional de Microbiología Virología e Inmunología Sanitaria fueron:

Tabla 37. Serotipos más frecuentemente aislados en España.

SEROTIPO	Hospital del Rey 1968-1976		ENS 1974-79		CNMVIS 1979-80	
	N	%	N	%	N	%
<i>S. typhimurium</i>	1	42	1	31'2	1	36'8
<i>S. enteritidis</i>	3	13'9	2	18'1	2	31'7
<i>S. typhi</i>	2	39'8	4	12'3	3	13
<i>S. paratyphi B</i>	6	0'79	3	16	4	2'9
<i>S. paratyphi C</i>	4	1'6	5	5'2	-	-
<i>S. thompson</i>	-	-	6	3'9	-	-
<i>S. blockey</i>	-	-	7	1'7	-	-
<i>S. wirchow</i>	-	-	-	-	5	1'6
<i>S. ohio</i>	-	-	-	-	6	1'6
<i>S. montevideo</i>	-	-	-	-	7	1'4

Nosotros como se puede ver en el apartado 3, aislamos 266 cepas de Salmonellas pertenecientes a cinco serotipos, mostrando la siguiente frecuencia:

<i>S. typhimurium</i>	87'9 %
<i>S. enteritidis</i>	4'9 %
<i>S. essen</i>	1'9 %
<i>S. typhi</i>	1'2 %
<i>s. paratyphi B</i>	0'4 %

S. typhimurium. Es un serotipo de Salmonella de huésped no específico, cuyo reservorio es esencialmente animal. Es el serotipo más frecuentemente aislado en el hombre y animales. Al igual que en clínica humana, ocupa el primer lugar entre los aislados por nosotros, aunque con una frecuencia mucho mayor en el agua.

Fué aislado en todos los meses muestreados, más aún, en todas las muestras, 57, en que se detectaron Salmonellas con cualquiera de las tres técnicas empleadas.

S. enteritidis. Es un serotipo de Salmonella de huésped no específico, cuyo reservorio es animal. Es uno de los serotipos más frecuentemente aislados en el hombre y en menor número en los animales. Ocupa el segundo lugar, tanto en aislamientos humanos como en los obtenidos por nosotros, aunque hay menos frecuencia de aislamiento en el agua.

Fué detectado en todos los meses muestreados, pero solamente en ocho muestras. Respecto a las técnicas empleadas, fué aislado nada más que con la técnica de 10 ml.

S. essen. Es un serotipo de Salmonella de huésped no específico. Es un serotipo raro, es decir que no se cita entre los 10 que se encuentran con cierta frecuencia en el hombre y animales.

Según Le Minor, 1972, S. essen se encuentra entre los 65 serotipos más frecuentemente detectados en Francia. Ocupa el tercer lugar en los aislados en el agua, si bien no ha sido detectado en el Hospital del Rey, ni en CNMVIS, ni en el periodo 1974-78 en la ENS, ver tabla 37. En 1979, ha sido aislado seis veces identificado en la ENS, aunque cinco de ellas, han sido mandadas por nosotros para su correcta identificación.

Fué aislado durante los meses de Julio, Septiembre y Octubre con la técnica de filtración y de inoculación de 10 ml.

S. paratyphi B. Es un serotipo de Salmonella de huésped específico, cuyo reservorio es esencialmente humano. Es uno de los serotipos que se aísla con frecuencia en la clínica humana. Es el

quinto y último serotipo en nuestros aislamientos.

Fué detectado una vez en una muestra recogida durante el mes de Septiembre, utilizando la técnica de inoculación de 10 ml.

S. typhi. Al ser el hombre el único reservorio y a la importancia epidemiológica que tiene, se comentará monográficamente en el apartado siguiente 4.2, el hallazgo de éste serotipo en el agua muestreada.

Al comparar los hallazgos de los serotipos encontrados en el agua y los aislados en la patología humana, vemos que hay una gran similitud y paralelismo.

En el apartado 3.7.1, relación entre las medias de los muestreos, se observa que a lo largo del tiempo de muestreo, según el valor de la relación CF/EF, la polución pasaba de ser una mezcla de humana y animal a ser fundamentalmente humana. En vista de la similitud de serotipos aislados en la clínica y el agua, nos reafirmamos, que al igual que la polución, los serotipos de Salmonella detectados en el Canal del Jarama son esencialmente de origen humano.

El estudio bacteriológico de las aguas polucionadas, presenta un gran interés tanto en el plano epidemiológico, como en el plano de higiene general. Gracias a disponer de una técnica de detección suficientemente sensible y aunque en la actualidad no se puede obtener de modo cuantitativo, puede darnos datos muy significativos, desde el punto de vista epidemiológico de la frecuencia de distribución temporal de los distintos serotipos.

El estudio de las aguas residuales, nos va a permitir establecer el perfil de las Salmonellas endémicas en el medio urbano del que derivan. Las comparaciones entre los resultados de las Salmonellas encontradas en el agua y las observadas en clínica humana, contribuirá a esclarecer la historia natural de éstas infecciones. Multiplicando tales estudios se podrá realmente establecer el perfil de las Salmonellas.

Como ya vimos en el apartado 3.2, distribución mensual

de aislamiento de Salmonellas, encontramos un desfase de meses entre la máxima incidencia de Salmonelosis humana y la máxima frecuencia de aislamiento de Salmonellas en las aguas, que nos sugería que el aumento de frecuencia precedía en meses al aumento de Salmonellas en clínica humana.

Respecto a la cronología de los distintos serotipos, dos, *S. typhimurium* y *S. enteritidis* fueron aislados sistemáticamente a lo largo de todos los meses de muestreo.

Sin embargo, otros serotipos como *S. essen*, se aisló durante tres meses, Julio, Septiembre y Octubre, meses en especial Septiembre, de máxima incidencia de salmonelosis humana.

S. typhi se aisló en los meses de Junio y Julio. Como vemos su detección no concuerda con los meses de máxima incidencia de éste serotipo en clínica humana, finales de Agosto y Septiembre.

S. paratyphi B fué aislado solamente en Septiembre, mes que concuerda con máxima incidencia en clínica humana.

Recordemos que aunque la salmonelosis humana se da a lo largo de todo el año, muestra una frecuencia estacional, presentando la mayor incidencia a finales de verano-otoño (Informe Oficial de la Asociación Panamericana, 1970; Holden, 1970; Serico, 1972; Parvery y cols, 1972; Jay, 1973; Harrison, 1973; Nelson y cols, 1975; Hoeprich, 1977; Mandell y cols, 1979).

La fiebre tifoidea muestra una frecuencia estacional más marcada, por lo que se la denomina fiebre estio-otoñal (Holden, 1970; Prieto, 1971; Harrison, 1973; Alcantara, 1975; Nelson y cols 1975; Hoeprich, 1977; Anuarios Estadísticos, 1970-1979; Mandell y cols, 1979).

Para Prieto, la frecuencia estacional en España no tiene nada de particular dada la condición subtropical de España y el carácter endemo-epidémico de la enfermedad. Más aún, dentro de España, hay regiones como Andalucía y Levante dónde la incidencia es similar a lo largo de todo el año.

Por tanto, podemos afirmar que además de la concordancia cronológica entre los serotipos aislados en el agua en clínica humana, la aparición de un serotipo en el agua como *S. typhi*, precede en meses a la máxima incidencia de casos humanos.

La concordancia de serotipos y el ligero desfase en el tiempo de máxima incidencia en el agua y en la clínica nos permite intuir una relación de causa efecto entre la presencia de cantidades importantes de *Salmonellas* en las aguas y el recrudecimiento estacional de la salmonelosis.

4.2 AISLAMIENTO DE *S. TYPHI*

No todas las *Salmonellas* son capaces de producir un cuadro patológico en el hombre y/o animales.

Atendiendo a sus propiedades patológicas, se pueden clasificar en:

- especialmente patógenas para el hombre.
- especialmente patógenas para los animales.
- de huésped no específico.

En el hombre se pueden observar diferencias en la acción patogénica de las *Salmonellas* de huésped específico y de huésped no específico.

La salmonelosis por tifoidea es característica del hombre y como tal ha sido reconocida, constituyendo una entidad patológica separada.

A partir del año 1945 se considera a la fiebre tifoidea como enfermedad de declaración obligatoria en España. El número de afectados ha disminuido fuertemente, pero tanto en Madrid como en España entera, parece que el número de afectados se ha estabilizado de 1972-1979, declarándose entre 200-300 y 2.000-3.000 casos por año, respectivamente (Prieto, 1971; Alcantara, 1978; Anuarios Estadísticos, 1972-1979).

En cuánto a la frecuencia de aislamiento de *S. typhi* en

la clínica humana tanto en España como en otros países, USA, Dinamarca, Francia, se encuentra entre los 10 serotipos más frecuentes, dándose una gran diferencia en el porcentaje y por tanto su situación en el ranking es diferente.

En España, tabla 37, según la ENS en el periodo 1974-1979 ocupa el cuarto lugar con el 12'3 %, en el CNMVIS en el año 1979 el tercer lugar con el 10'3 % y en el Hospital del Rey en el periodo 1968-1976 el segundo lugar con el 39'8%.

En Dinamarca en el periodo 1960-1968, ocupa el quinto lugar con una frecuencia baja (Grunnet y Nielsen, 1969).

En el Hospital de Angers, Francia, en el periodo 1969-1971 ocupa el segundo lugar con el 12'3 % (Parvery y cols, 1972).

En USA, en el periodo 1968-1974 ocupa el octavo lugar con el 2'4 % (Ryder y cols, 1976).

Mientras que el aislamiento de *S. typhi* en clínica humana por hemocultivo y coprocultivo es relativamente fácil, ya que el número de gérmenes por mililitro de sangre o por gramos de heces es de cientos de millones y el número de competidores es relativamente bajo e incluso cero y como el organismo ha dejado recientemente el intestino humano debe ser fácilmente recuperado, cualquiera que sea el método empleado (el convencional de temperatura de 37°C o el de elevada temperatura) y caldo de enriquecimiento utilizado (aunque mejor el selenito que el tetracionato). Harvey y Price, 1979.

Por el contrario, en las aguas polucionadas, especialmente en las aguas residuales, es bastante difícil, ya que los números se intercambian, así el número de gérmenes competidores por mililitro de muestra pasa a ser muy elevado y el número de *S. typhi* a ser muy reducido. Esta cifra va a depender del número de excretores del bacilo tífico y de la dilución que sufran.

También hay que tener en cuenta que la capacidad de *S. typhi* y de otras *Salmonellas* para sobrevivir y multiplicarse en el ambiente, es un factor en la transmisión y esparcimiento de la enfermedad. Aunque requieren factores de crecimiento simple y pueden

multiplicarse en una variedad de medios, siempre y cuando éstos factores esten dentro de las tasas de crecimiento, normalmente no se multiplican bajo condiciones normales fuera del cuerpo humano o animal, debido a su cualidad parasitaria, lo que va en contra de su supervivencia. (Prost y Riemann, 1968; Holden, 1970; Prieto, 1971).

Los estudios de supervivencia de *S. typhi* y otras *Salmonellas* en el agua son muy escasos y los resultados de los tiempos de supervivencia, dados por los distintos investigadores son tan contradictorios y dispares, que sin duda se deben al empleo de distintos tipos de agua, serotipos, tamaño de inóculo, metodología empleada, estando además influenciados por muchos factores como temperatura, materia orgánica, pH, sales, nutrientes, luz, oxígeno y predadores bacterianos, que no actúan por separado, sino que están interrelacionados entre sí, haciendo difícil su valoración para dar una cifra sin caer en error. Al no ser las aguas polucionadas un buen habitat, durante los primeros días se reducen los números iniciales entre el 90 y 95 %. (Rudolfs y cols, 1950; Gallagher y Spino, 1968; Wray y Sojka, 1977).

Se considera poco probable que *S. typhi* y la demás *Salmonellas*, perduren más de una o dos semanas, aunque bajas temperaturas, pH óptimo, baja concentración de sales, presencia de materia orgánica, ausencia de depredadores bacterianos, pueden alargar los tiempos de supervivencia. (Andree y cols, 1967; Gallagher y Spino, 1968; Holden, 1970; Geldreich, 1973; Mitchel y Starzyk, 1975; Enzinger y Cooper, 1976; Wray y Sojka, 1977).

Sin embargo ante la cifra de una o dos semanas se puede hacer alguna objeción, como que la manera de obtener los tiempos de supervivencia, consiste en analizar sistemáticamente un volumen determinado de la muestra de agua, que ha sido previamente inoculada con grandes números de *Salmonellas*, para dar una concentración del orden de 1.000.000 Sal/ml. El volumen de agua a analizar suele ser de 100 ml o menor; si al cabo de las dos semanas no se detecta la presencia de *Salmonella*, se concluye que el tiempo de supervivencia para ese serotipo es de dos semanas. Ahora bien, si en vez

de analizar ese volúmen de agua, se aumentara a 500 o un litro, o aún volúmenes mayores, posiblemente se detectarían Salmonellas por más tiempo, con lo que se habría alargado el tiempo de supervivencia.

Por tanto se podría considerar que la cifra de una o dos semanas es una cifra mínima y sin duda menor de la real.

Ya que el número de gérmenes viables es tan pequeño y hay condiciones adversas, el aislamiento de *S. typhi* es bastante difícil. La introducción de la técnica de elevada temperatura por Spino, 1966, se mostró esencial para tener éxito en el aislamiento de Salmonellas, distintas a *S. typhi*, a partir de aguas polucionadas. Esto es consecuencia de que *S. typhi*, como otros serotipos, por encima de la temperatura de 37°C, se ven muy afectados en su tasa de crecimiento. Por eso muchos autores proponen métodos individuales de aislamiento para éste serotipo, al igual que para *S. paratyphi A*, *S. pollorum* e incluso para *S. dublin* (Harvey y Price, 1979).

Referente al caldo de enriquecimiento, se recomienda utilizar los caldos de selenito cuando se intente aislar *S. typhi* a partir de aguas polucionadas.

Prueba de la dificultad antes mencionada, es que en la revisión bibliográfica, solamente hemos encontrado un trabajo en el que se aisló *S. typhi*, al estudiar las aguas residuales de la ciudad de Toulon, Francia, (Brisou y Boudon, 1974). Observaron al analizar 69 muestras, se obtenían mejores resultados cuando se filtraba el agua que cuando se inoculaba directamente sobre el caldo de enriquecimiento, y que la técnica de compresas, aumentaba el número de serotipos frente a la técnica de toma directa. Al comparar los resultados, cuando el caldo de selenito F se incubaba a 43°C, 48 horas, se obtenían más serotipos y más muestras positivas que cuando se incuban a 37°C, 48 horas el mismo medio.

Como resultado de la investigación, recomiendan la técnica de compresas para la toma de muestra y la incubación del caldo de selenito f a 43°C, 48 horas. Sin embargo, la única cepa de *S.*

typhi que detectaron, la aislaron por la técnica de filtración de 500 ml y cuando el caldo de enriquecimiento, se incubó a 37°C, 48 horas. Aunque ellos reconocen que la región de Toulon es una zona endémica de fiebres tifoideas, achacan el aislamiento de la cepa de S. typhi al azar.

En el apartado 3.3, se vió que nosotros aislamos tres cepas de S. typhi, procedentes de dos muestras de agua del Canal del Jarama. Comparando nuestros resultados con los de Brisou y Boudon, 1974, vemos que hay ciertas similitudes:

- ambos medios de enriquecimiento tienen como base al selenito, aunque ellos emplean el caldo de selenito F y nosotros el sorbitol selenito.
- tanto en ellos como en nosotros, la detección de S. typhi se realizó sobre un medio sólido de aislamiento muy selectivo y eficaz para su recuperación, Wilson y Blair y BS respectivamente.
- en ambos, detectamos una cepa con la técnica de filtración.
- tanto Toulon como Madrid son zonas endémicas de fiebres tifoideas.

También hay diferencias:

- nosotros aislamos dos cepas con la técnica de inoculación directa y ellos no.
- nuestros volúmenes de agua utilizados como inóculos, eran muy inferiores a los empleados por ellos, 70 y 10 ml frente a 500 ml.
- la temperatura de incubación del sorbitol selenito fué de 40°C y la del selenito F de 37°C.
- nosotros realizamos dos subcultivos sobre el mismo caldo de enriquecimiento, concentración gradual, y ellos incubaron el mismo medio 48 horas.

Teniendo en cuenta los volúmenes de agua utilizados por nosotros como inóculos y el alto porcentaje de aislamiento 82'6 %, la detección de las tres cepas de S. typhi por nosotros, no lo creemos fruto del azar, sino que es debido al alto rendimiento obteni-

do por nuestro caldo de enriquecimiento, el sorbitol selenito, y la metodología empleada, concentración gradual con la temperatura de 40°C.

Fecha y características de las muestras de agua de donde aislamos S. typhi. Durante el mes de Junio efectuamos el cuarto muestreo. La muestra de agua que fué subdividida en dos porciones, 70 y 10 ml, fué analizada por dos técnicas en paralelo, filtración e inoculación respectivamente.

En el mes de Julio, efectuamos el octavo muestreo. La muestra de agua fué subdividida en tres porciones, 70, 10 y un ml, fué analizada por tres técnicas en paralelo, filtración, inoculación de 10 ml e inoculación de un ml.

Cada porción de agua se trató como si fueran muestras independientes; con cada una de ellas se siguió una técnica de inoculación distinta, a partir de la cual todas las fases fueron las mismas, es decir, en todas:

- el caldo de enriquecimiento fué el mismo, el sorbitol selenito.
- se empleó el método de concentración gradual.
- la temperatura de incubación de los caldos de enriquecimiento fué de 40°C.
- los medios sólidos de placaje fueron el XLD y el BS.

De la porción de 70 ml de la muestra de agua analizada en Junio, aislamos tanto desde el XLD como del BS, S. typhimurium, mientras que de la porción de 10 ml, detectamos desde el XLD S. typhimurium y desde el BS S. typhi.

De la porción de 70 ml de la muestra de agua analizada en Julio, aislamos desde el XLD S. typhimurium y desde el BS S. typhi. De la porción de 10 ml no detectamos ninguna cepa de Salmonella y desde la porción de un ml aislamos desde los dos medios sólidos S. typhimurium.

En la tabla 38, se presenta los niveles de indicadores bacteriológicos de contaminación, de las dos muestras de agua de

dónde se aisló *S. typhi*.

Tabla 38. Características bacteriológicas de las muestras de agua portadoras de *S. typhi*.

Fecha	aerobios/ml	CT/ml	CF/ml	EF/ml	CF/EF	CSR/ml
12-VI-78	2000000	180000	12000	4400	2'72	220
10-VII-78	5600000	200000	35000	7000	5	600

Según la relación CF/EF, el tipo de polución que portaba el Canal del Jarama en la fecha del 12-VI-78, es una mezcla de animal y humana, mientras que en el 10-VII-78, es una polución de origen fundamentalmente humano.

5. EVOLUCION DE LAS CARACTERISTICAS BACTERIOLOGICAS Y FISICO-QUIMICAS DEL AGUA DEL CANAL DEL JARAMA.

Como se dijo en el apartado 2.7, Características y Frecuencia de los Muestreos, en cada fecha de muestreo se hizo una toma en cada uno de los dos puntos de muestreo del Canal del Jarama.

Se realizaron análisis bacteriológicos, físico-químicos, para definir la calidad del agua y su grado de contaminación y observar la evolución espacio temporal de los mismos. Los datos de los análisis bacterianos y físico-químicos de todas las muestras originales se consignan en los apartados 5.1. y 5.2.

5.1. RESULTADOS DE LOS ANALISIS BACTERIOLOGICOS.

Resultados correspondientes al primer punto de muestreo.

Fecha muestreo	CT/ml	CF/ml	EF/ml	CF/EF	CSR/ml	aero/ml
22-V -78	100000	11000	2900	3'79	90	1230000
29-V -78	21000	2200	4300	0'51	310	900000
5-VI -78	140000	13000	4600	2'82	200	3600000
12-VI -78	180000	12000	4400	2'72	220	2000000
19-VI -78	100000	19000	6000	3'16	280	1900000
26-VI -78	170000	6800	4500	1'51	800	2400000
3-VII-78	190000	26000	5000	5'2	220	3200000
10-VII-78	200000	35000	7000	5	600	5600000
17-VII-78	280000	24000	5900	4'06	900	3200000
5-IX -78		12000	2000	6	700	300000
12-IX -78	50000	8800	3000	2'93	800	940000
18-IX -78	160000	38000	8800	4'31	500	1000000
25-IX -78	160000	57000	8500	6'7	900	2000000
2-X -78	320000	46000	11800	3'89	1700	2500000
17-X -78	670000	76000	12700	5'98	1000	5200000
17-X -78	410000	19000	11000	1'72	500	5100000
17-X -78	300000	32000	5000	6'4	500	6000000

A continuación se citan los resultados correspondientes al segundo punto de muestreo.

Fecha muestreo	CT/ml	CF/ml	EF/ml	CF/EF	CSR/ml	aero/ml
22-V -78	9000	12000	4000	3	10	1200000
29-V -78	50000	3000	2400	1'25	420	850000
5-VI -78	160000	6000	2800	2'14	180	2000000
12-VI -78	200000	21000	5200	4'03	300	3000000
19-VI -78	240000	28000	5000	5'6	500	2200000
26-VI -78	69000	7000	3900	1'79	400	920000
3-VII-78	130000	17000	2400	7'08	160	1400000
10-VII-78	190000	17000	8000	2'12	800	4400000
17-VII-78	140000	26000	6000	4'33	700	2600000
5-IX -78		12000	1800	6'66	700	320000
12-IX -78		970	2400	0'4	350	880000
18-IX -78	80000	33000	5900	5'59	200	700000
25-IX -78	110000	47000	11000	4'27	400	1400000
2-X -78	150000	48000	10000	4'8	200	1250000
17-X -78	800000	52000	12000	4'33	900	5600000
17-X -78	370000	23000	10200	2'25	1200	4800000
17-X -78	28000	26000	7100	3'66	900	6300000

5.2. RESULTADOS DE LOS ANALISIS FISICO-QUIMICOS.

Los resultados que a continuación se exponen en la columna 1 corresponden al primer punto de muestreo y los de la columna 2 al P segundo punto de muestreo.

Fecha Muestreo	Color		Temperatura aire °C		Temperatura agua °C	
	1	2	1	2	1	2
22-V -78	grisáceo	grisáceo	13	12	15,3	15,5
29-V -78	marrón	marrón	17,3	17,2	16,7	16,7
5-VI -78	gris negruzco	gris negruzco	21	23	20,2	20,2
12-VI -78	gris negruzco	gris negruzco	23	22	21	21
19-VI -78	gris	gris	20	18	17	17
26-VI -78	gris	gris	17	21,5	18	18,5
3-VII-78	gris negruzco	gris negruzco	20	20,5	19	19
10-VII-78	marrón negruzco	marrón negruzco	24	25,5	21	20
17-VII-78	verde negruzco	verde negruzco	29	30	21	21
18-IX -78	marrón negruzco	marrón	20,5	23,5	19	19
25- X -78	marrón	marrón	17	19,5	18	18
2- X -78	gris oscuro	gris oscuro	13	14	15	15
17- X -78	marrón grisáceo	marrón grisáceo	11,5	14	15	15
17- X -78	marrón verde	marrón verde	18,5	18,5	18	18
17- X -78	marrón	marrón	19	17,5	18	18

Fecha	Materia en suspensión a				Residuo seco a			
	110°C mg/l		700°C mg/l		110°C mg/l		700°C mg/l	
	1	2	1	2	1	2	1	2
22-V -78	77'8	59'6	47'1	39'9	480	491	276	283
29-V -78	216'6	169'2	119'8	101'8	536	420	295	286
5-VI -78	43'6	47'0	21'2	21'8	491	461	317	279
12-VI -78	60'0	148'8	42'7	114'8	514	540	336	341
19-VI -78	61'4	59'6	24'7	29'4	607	588	413	387
26-VI -78	86'2	130'0	49'0	49'6	476	482	310	291
3-VII-78	38'6	40'8	23	24	558	566	364	360
10-VII-78	44'8	50'2	23'2	19'8	622	606	468	422
17-VII-78	40'6	38'6	21'5	23'7	608	573	426	407
18-IX -78	77	100	40	49	498	496	339	316
25-X -78	75	81	28	35	586	551	389	375
2-X -78	139	116	64	39	646	684	394	395
17-X -78	106	112	41	43	637	641	397	405
17-X -78	98	83	39	40	673	700	456	475
17-X -78	131	184	88	101	536	532	243	360

Fecha	D.Q.O. MnO ₄ K mg/l O ₂		D.Q.O. Cr ₂ O ₇ K ₂ mg/l O ₂		D.B.O ₅ mg/l O ₂		Detergentes aniónicos mg/l		Grasas y aceites mg/l	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
	22-V -78	34'4	29'6	-	-	25	25	0'23	0'23	5
29-V -78	39'2	39'4	64	44	17	16	0'19	0'16	6	5
5-VI -78	29'6	41'6	32	44	22	20	2'32	2'02	6	4
12-VI -78	31'2	40'0	92	60	56	17	2'0	2'0	10	7
19-VI -78	36'8	38'4	64	80	30	35	3'3	3'1	15	10
26-VI -78	30'4	32'8	32	36	31	23	2'1	2'1	24	22
3-VII-78	35'2	39'2	52	68	37	28	3'6	3'4	50	15
10-VII-78	35'2	39'2	60	92	18	18	3'6	1'7	0	0
17-VII-78	43'2	44'8	76	88	53	58	3'6	4'2	0	20
18-IX -78	38'0	42'0	116	144	40	86	4'7	4'4	0	0
25- X -78	50'0	50'0	112	152	54	58	3'9	4'0	2	1
2- X -78	70'0	70'0	156	116	90	54	5'3	5'9	1	0
17- X -78	51	49	172	136	168	135	6'4	5'2	81	57
17- X -78	46	51	180	212	76	86	4'6	4'4	54	36
17- X -78	47	49	76	80	62	62	3'5	3'1	100	96

Fecha	Nitrógeno		Nitratos		Nitritos		Amonio		Fosfatos	
	Kjeldahl		mg/l		mg/l		mg/l		mg/l PO ₄ H ₃	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
22-V -78	34'2	34'2	2	2	0'16	0'15	8'2	8'7	6'4	6'4
29-V -78	24'0	22'0	3'8	2'2	0'10	0'11	6'7	6'6	4'5	4'5
5-VI -78	20'0	18'0	0'5	0'5	0	0	7'4	7'1	7'0	6'8
12-VI -78	25'0	27'0	0'8	1'0	0'26	0'29	8'2	9'1	6'7	9'5
19-VI -78	21'0	26'0	0'5	0'2	0	0	12'5	12'1	10'0	9'8
26-VI -78	25'0	30'0	0'8	1'8	0	0	8'3	8'2	7'0	7'2
3-VII-78	28'0	28'0	0'5	0'5	0	0	11'7	11'0	11'3	10'6
10-VII-78	26'0	30'0	1'0	0'8	0	0	12'2	11'8	10'6	11'5
17-VII-78	30'0	28'0	0'8	0'8	0	0	14'0	12'9	13'3	12'2
18-IX -78	30	22'3	0'5	0'5	0	0	25'0	25'0	12'8	13'4
25- X -78	31'3	26'8	0'5	0'5	0	0	27'0	24'5	12'8	13'4
2- X -78	25'2	34.3	0'5	0'5	0	0	14'0	14'3	13'8	13'8
17- X -78	29'8	34'3	1	1	0	0	19'3	14'8	13'8	13'8
17- X -78	29'8	28'3	1	1	0	0	16'5	15'8	10'4	13'8
17- X -78	28'3	26'8	1	1	0	0	19'8	21'0	9'3	9'5

Fecha Muestreo	Oxigeno mg/l		SH ₂ mg/l		CO ₂ libre mg/l		Carbonatos mg/l	
	1	2	1	2	1	2	1	2
	22-V -78	0,5	0,4	0,23	0,23	-	-	0
29-V -78	1,5	1,0	0,13	0,13	13,51	13,81	0	0
5-VI -78	0	0	0,69	0,13	116,85	18,40	0	0
12-VI -78	0,5	0,2	0,15	0,13	11,82	11,45	0	0
19-VI -78	0	0	0,76	0,58	11,62	9,20	0	0
26-VI -78	0	0	0,36	0,17	17,10	12,20	0	0
3-VII-78	0	0	1,06	1,16	19,50	16,50	0	0
10-VII-78	0	0	1,69	1,69	21,1	22,3	0	0
17-VII-78	0	0	0,85	0,95	22,9	19,8	0	0
18-IX-78	0	0	1,69	1,59	24,0	18,0	0	0
25-IX-78	0	0	2,12	2,54	16,7	21,0	0	0
2-X -78	0	0	2,12	2,01	20,6	17,6	0	0
17-X -78	0	0	2,96	3,07	27,47	29,75	0	0
17,X -78	0	0	2,65	2,86	32,76	23,95	0	0
17-X -78	0	0,4	1,16	1,06	31,94	17,83	0	0

Fecha Muestreo	Bicarbonatos		Conducti- vidad micromhos/cm		PH		Cloruros mg/l	
	1	2	1	2	1	2	1	2
25-V -78	191,4	185,6	680	704	7,2	7,3	51,8	51,1
29-V -78	168,2	162,4	704	649	7,6	7,7	88,2	47,6
5-VI -78	197,2	103,0	680	694	7,2	7,2	48,3	49,0
12-VI -78	208,8	208,8	826	826	7,1	7,2	53,2	53,2
19-VI -78	232,0	237,8	970	870	7,0	7,1	67,2	66,5
26-VI -78	226,2	220,4	758	758	7,1	7,2	57,4	56,7
3-VII-78	238,0	238,0	1020	1010	7,1	7,2	64,	64
10-VII-78	237,8	237,8	1111	1063	7,1	7,2	67,2	67,2
17-VII-78	214,6	214,6	800	806	7,6	7,5	62,3	63,7
18-IX -78	203,0	217,0	730	735	7,0	7,2	55	53
25-IX -78	238	280	813	820	7,1	7,1	65	62
2-X -78	231	196	901	901	6,9	6,9	88	104
17-X -78	262	232	901	893	7,1	6,8	72	94
17-X -78	287	287	935	935	7,2	7,3	76	74
17-X -78	238	220	794	794	7,4	7,2	55	57

Fecha Muestreo	Sulfatos mg/l		Sílice mg/l		Calcio mg/l		Magnesio mg/l	
	1	2	1	2	1	2	1	2
22-V -78	114	118	7,7	8	75,2	75,2	24,3	21,3
29-V -78	88	88	9,7	9,7	86,4	64,0	19,4	23,3
5-VI -78	120	106	7	7	75,2	72,0	22,4	25,2
12-VI -78	151	146	10	10	83,2	81,6	24,3	26,2
19-VI -78	178	166	9,7	9,3	86,4	86,4	31,1	29,1
26-VI -78	127	127	9	9,1	78,4	76,8	18,5	25,3
3-VII-78	137	147	11	11	69	77	38,0	32,0
10-VII-78	151	150	12,8	12,2	81,6	80,0	33,0	27,2
17-VII-78	132	127	12,3	12,3	62,4	65,6	29,2	28,2
18-IX -78	127	132	15	14	75	75	19	19
25-IX -78	126	130	16	16	90	83	20	23
2-X -78	140	152	16	16	93	91	25	25
17-X -78	150	136	21	21	83	91	24	20
17-X -78	186	190	19	20	102	101	26	25
17-X -78	127	136	16	16	80	86	20	16

Fecha Muestreo	Dureza Total 'F'		Dureza <u>Tem</u> poral 'F'		Dureza <u>Per</u> manente 'F'		Sodio mg/l		Potasio mg/l	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
	22-V -78	28,8	27,6	15,7	15,2	13,1	12,4	41,0	42,0	8,8
29-V -78	29,6	25,6	13,8	13,3	15,8	12,3	36,5	38,5	6,9	7,6
5-VI -78	28,0	28,4	16,2	16,6	11,8	11,8	49,5	49,5	6,2	6,2
12-VI -78	30,8	31,2	17,1	17,1	13,7	14,1	47,5	48,0	7,5	8,0
19-VI -78	34,4	33,6	19,0	19,5	15,4	14,1	61,0	60,0	10,0	10,0
26-VI -78	27,2	29,6	18,5	18,1	8,7	11,5	53,5	53,5	8,4	8,6
3-VII-78	32,8	32,4	19,5	19,5	13,3	12,9	52	52	15,0	11,0
10-VII-78	34,0	31,2	19,5	19,5	14,5	11,7	57,5	57,5	11,2	11,5
17-VII-78	27,6	28,0	17,6	17,6	10,0	10,4	61,5	63,0	10,7	10,9
18-IX -78	26,4	26,4	16,7	17,8	9,7	8,6	63,0	66,0	12,0	12,0
25-IX -78	30,8	30,4	19,5	23,0	11,3	7,4	63,0	63,0	13,0	13,0
2-X -78	33,6	33,2	18,9	16,1	14,7	17,1	67,0	66,0	13,0	13,0
17-X -78	30,8	31,2	21,5	19,0	9,3	12,2	71	70	15	15
17-X -78	36,4	35,6	23,5	23,5	12,9	12,1	71	71	15	15
17-X -78	28,4	28,0	19,5	18,0	8,9	10,0	51	53	13	13

5.3 ESTUDIO ESTADISTICO DE LOS DOS PUNTOS DE MUESTREO.

Aunque de la simple observación de los apartados 5.1 y 5.2, se puede intuir una similitud entre las densidades bacterianas y de los caracteres físicos-químicos de las dos poblaciones, cada población pertenece a un punto de muestreo, para saber si las diferencias de niveles, a lo largo del tiempo de muestreo, entre las dos poblaciones son o no son significativas, se realizó un estudio estadístico.

Dicho estudio nos va a permitir conocer, si en el segundo punto de muestreo se produce un aumento o una reducción de los niveles bacterianos y caracteres físicos-químicos respecto al primer punto, o si simplemente las diferencias entre los dos puntos no son significativas estadísticamente y se deben a causas ajenas que escapan a nuestro control, con lo que las dos poblaciones serían iguales estadísticamente.

El estudio estadístico que se realizó, se basó en el test de los signos, método no-paramétrico que nos va a permitir comparar dos poblaciones (Dagnelie, 1970; Labart y Fenelou, 1973).

Test de los signos. Es relativo al caso de muestras asociadas por pares. Se basa únicamente en el estudio de los signos de las diferencias observadas entre los pares de individuos, cualesquiera que sean los valores de esas diferencias.

Cuando ciertas diferencias son nulas, los pares de observaciones correspondientes, se descartan simplemente del análisis y el valor de n se reduce en consecuencia.

H_0 : hipótesis nula: las dos poblaciones son iguales; no hay diferencias significativas entre los dos puntos de muestreo.

Se puede escribir:

$$H_0 : P (+) = P (-) = 1/2$$

Se designa por $P (+)$ la probabilidad de observar una diferencia positiva y por $P (-)$ la probabilidad de observar una diferencia negativa. Cuando la hipótesis nula es verdadera y para

n pares de observaciones, el número de diferencias positiva o de negativas es una variable binomial de parámetros $p = 1/2$ y n . El test de los signos permite comparar, gracias a ésta distribución, el número observado de signos positivos o negativos y el número esperado $n/2$.

Para muestras reducidas, como es nuestro caso, se puede calcular fácilmente la probabilidad de obtener un número de signos.

$$P (X \leq x) = (1/2)^n \sum_{i=0}^x C_n^i$$

x es el más pequeño de los dos números de signos (- o +). Se rechaza la H_0 cuando ésta probabilidad es muy pequeña, es decir, al alfa, y para un test bilateral, cuando:

$$P (X \leq x) = \alpha/2$$

Las tablas especiales permiten simplificar ésta comparación (Labart y Fenelou, 1973). La eficacia del test es del 70 %.

n es el número de muestras consideradas. Llamamos n_1 al número de signos (-), es decir, cuando las densidades son mayores en el segundo punto que en el primero en cada fecha de muestreo. Llamamos n_2 al número de signos (+), es decir, cuando las densidades son mayores en el primero que en el segundo en cada fecha de muestreo.

Estudio bacteriano.

- Coliformes totales: 15 son los muestreos comparables.

$$n = 15 \quad n_1 = 5 (-) \quad n_2 = 10 (+)$$

Mirando en las tablas, éstos valores caen dentro del intervalo, lo que nos indica que las dos poblaciones son iguales con una probabilidad del 95 %.

- Coliformes fecales: 17 son los muestreos comparables.

Como en el muestreo 10^o, la diferencia entre los dos puntos es nula, las dos observaciones las descartamos y el valor de n lo reducimos en uno.

$$n = 16 \quad n_1 = 8 \text{ (-)} \quad n_2 = 8 \text{ (+)}$$

Al mirar en las tablas, observamos que éstos valores caen dentro del intervalo, indicándonos que las dos poblaciones son iguales con una probabilidad del 95 %.

- Estreptococos fecales: 17 son los muestreos comparables.

$$n = 17 \quad n_1 = 6 \text{ (-)} \quad n_2 = 11 \text{ (+)}$$

Estos valores caen dentro del intervalo, lo que nos indica que las dos poblaciones son iguales con una probabilidad del 95 %.

- Clostridiops-sulfito-reductores: 17 son los muestreos comparables.

Como en el muestreo 10^o, no hay diferencias entre los dos puntos de muestreo, se descartan las dos observaciones y el valor de n se reduce en uno.

$$n = 16 \quad n_1 = 6 \text{ (-)} \quad n_2 = 10 \text{ (+)}$$

Estos valores caen dentro del intervalo, lo que nos indica que las dos poblaciones son iguales con una probabilidad del 95 %.

- Aerobios: 17 son los muestreos comparables.

$$n = 17 \quad n_1 = 5 \text{ (-)} \quad n_2 = 12 \text{ (+)}$$

Los valores de n_1 y n_2 coinciden con los límites del intervalo, lo que nos indica que las dos poblaciones son iguales con una probabilidad del 95 %.

Estudio físico-químico.

Se analizaron 30 muestras originales, las correspondientes a los muestreos 9^o y 10^o, efectuados los días 17-7-78 y 5-9-78 respectivamente no se efectuaron.

Aplicando el test de los signos, para las características físico-químicas, tenemos para:

- sulfuros, CO₂ libre, bicarbonatos, conductividad, cloruros, sulfatos, sílice, calcio, magnesio, dureza total, dureza temporal, du-

reza permanente, sódio, potasio, materia en suspensión a 110°C, residuo a 700°C, DQO al dicromato, DBO_5 , nitrógeno Kjeldahl, nitratos, amonio, fosfatos. Los valores de n_1 y n_2 caen dentro del intervalo, lo que nos indica que las dos poblaciones son iguales con una probabilidad del 95 %.

- pH, materia en suspensión a 700°C, DQO al permanganato, detergentes aniónicos. Los valores de n_1 y n_2 coinciden con los límites del intervalo.
- oxígeno, carbonatos, nitritos, temperatura del agua. No se puede aplicar el test de los signos, ya que los tres primeros sólo se presentaron en muestreos no superiores a cuatro y en cuanto al cuarto, exceptuando cuatro muestreos, los demás no dieron diferencias.

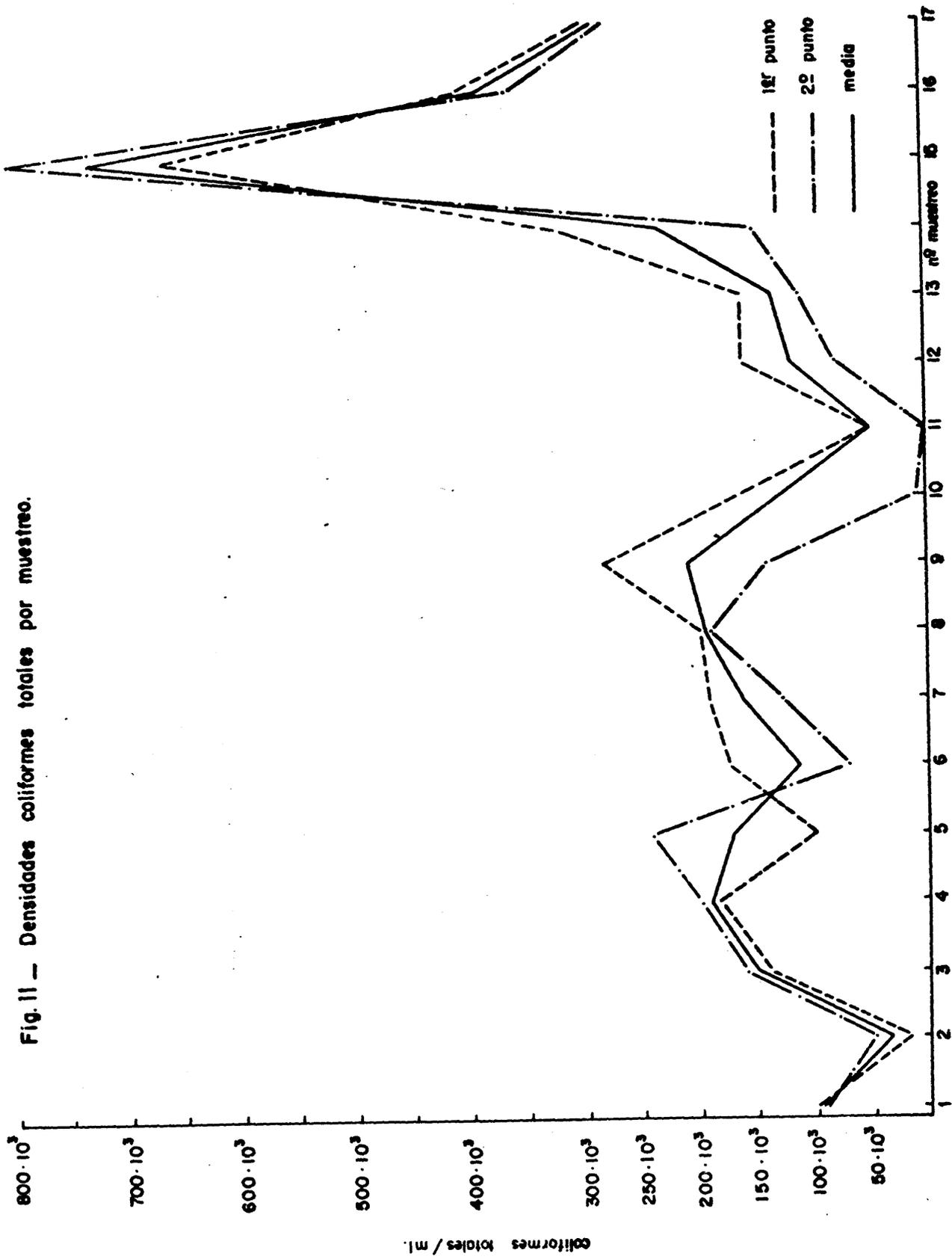
Resumiendo, el estudio estadístico nos permite afirmar, que entre las dos poblaciones, los dos puntos de muestreo, no hay diferencias significativas, tanto desde el punto de vista bacteriano, como desde el punto físico-químico, es decir, nos permite afirmar que las dos poblaciones son iguales y que las pequeñas diferencias se deben a errores muestrales que escapan a nuestro control.

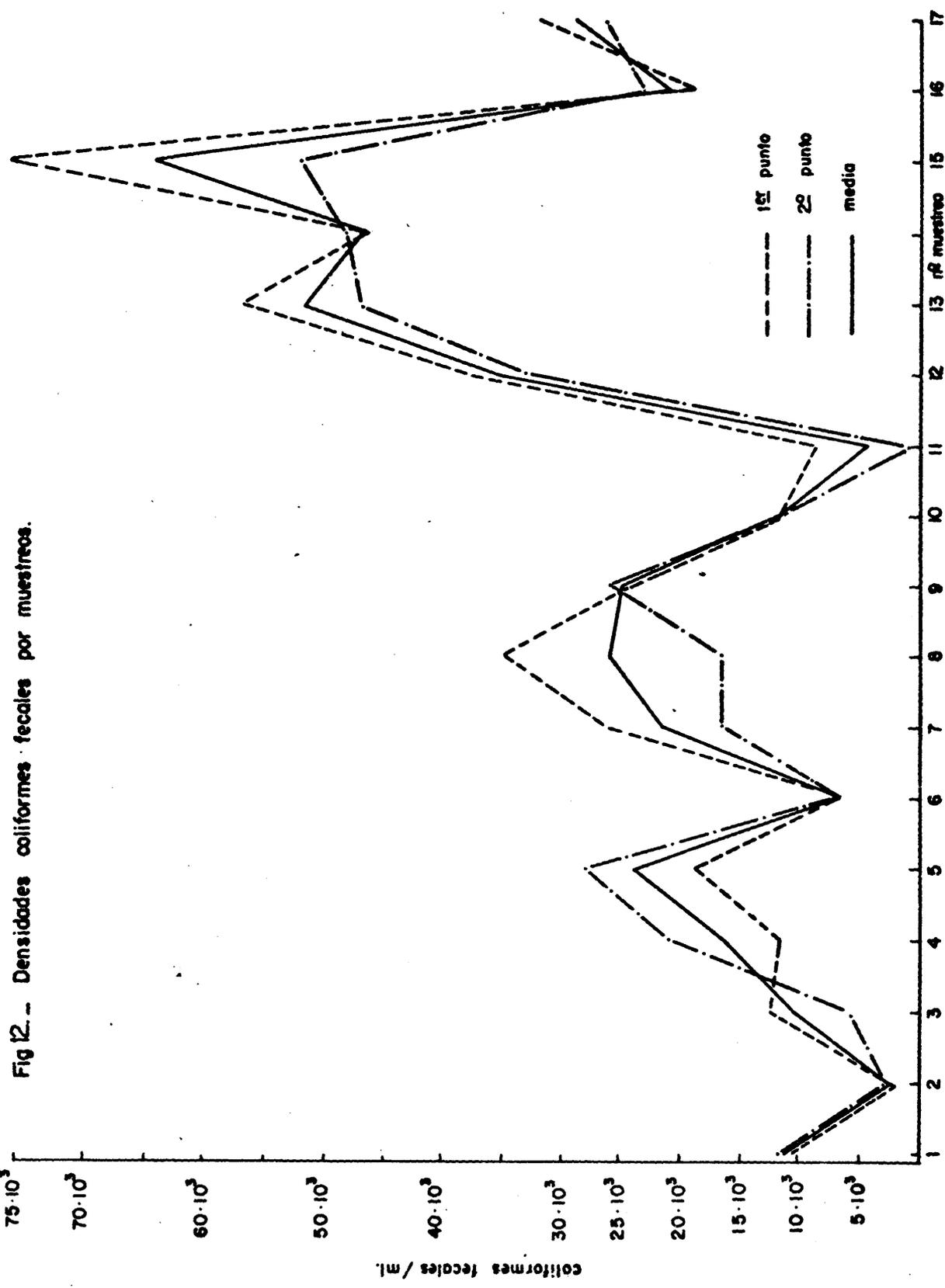
5.4 EVOLUCION DEL CANAL DEL JARAMA A LO LARGO DEL TIEMPO QUE ABARCA NUESTRO ESTUDIO.

En las gráficas de las figuras 11, 12, 13, 14 y 15 sacadas de los datos originales, se puede observar los niveles de las bacterias indicadoras en cada punto y fecha de muestreo, de acuerdo con los datos consignados en el apartado 5.1.

Al pertenecer los dos puntos de muestreo estadísticamente a dos poblaciones iguales, se puede considerar para cada fecha de toma, la media aritmética de las dos muestras como la cifra más representativa del nivel de polución de las aguas del Canal del Jarama en ese determinado día, para así poder conocer como es la marcha evolutiva del Canal del Jarama a lo largo del tiempo que abarca nuestro estudio.

Fig. 11 — Densidades coliformes totales por muestreo.





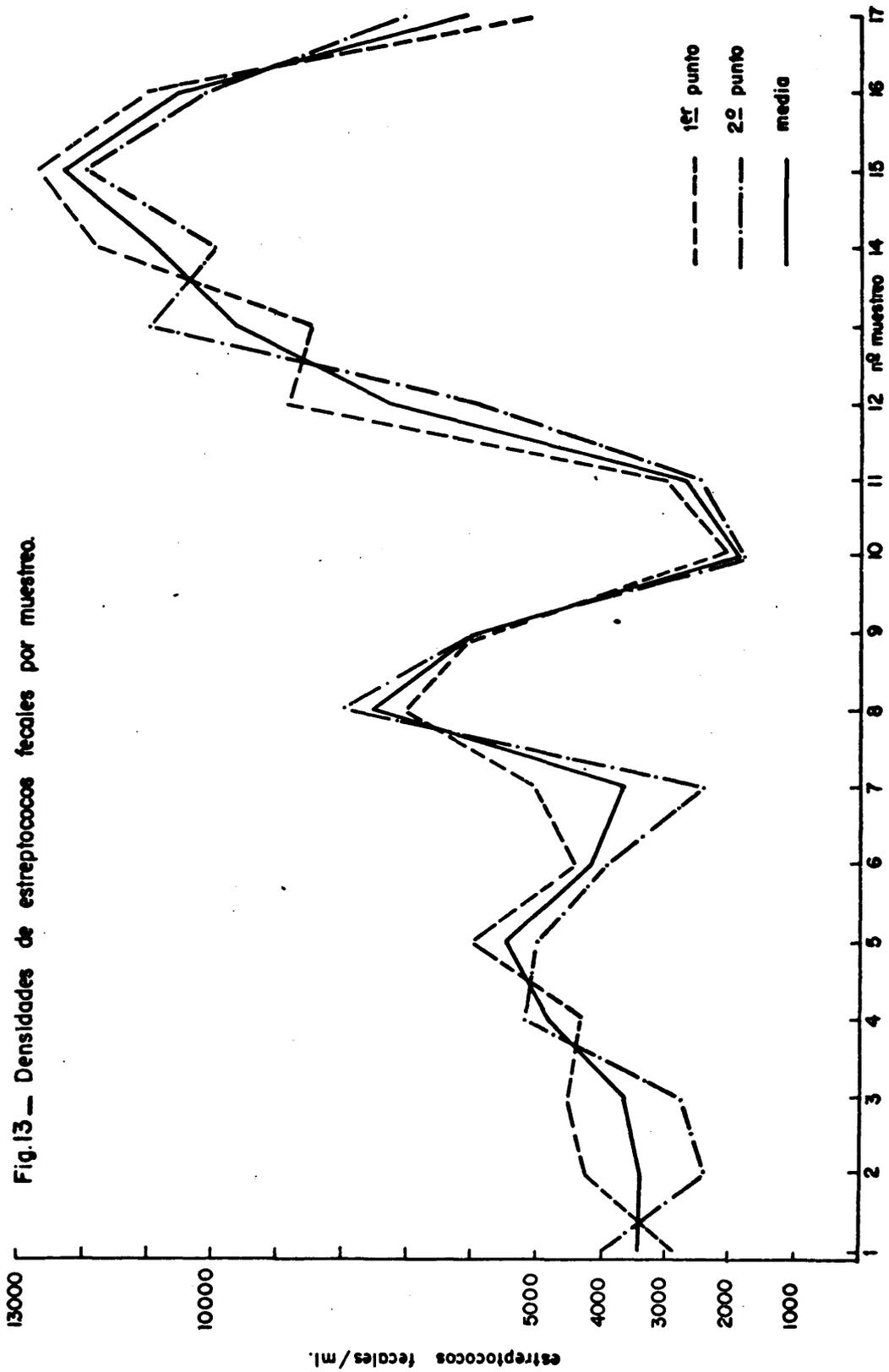


Fig. 14 — Densidades clostridios sulfito-reductores por muestreo.

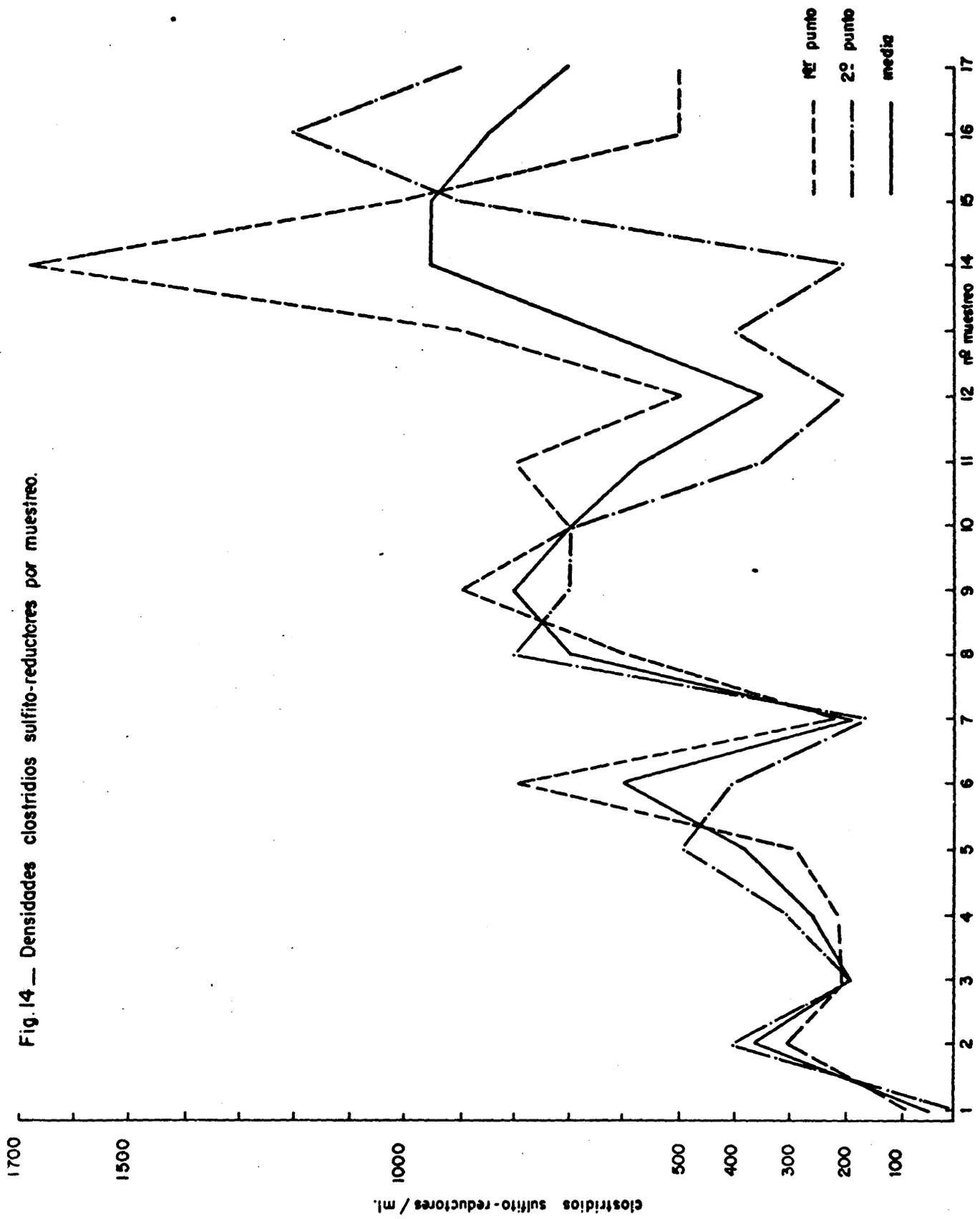
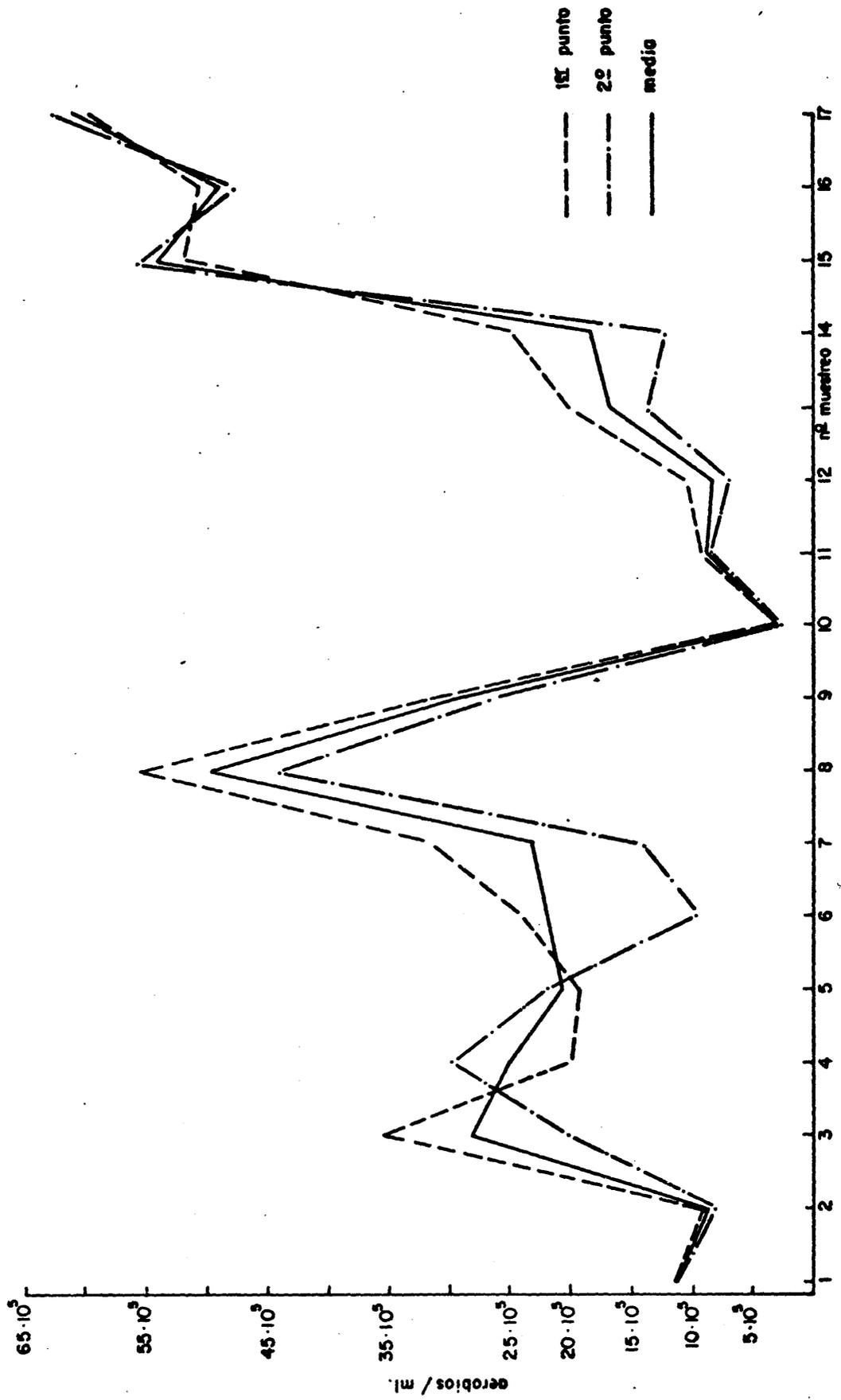


Fig. 15 — Densidades aerobias por muestreos



En las mismas gráficas, se muestran los niveles medios de las bacterias indicadoras en cada fecha de toma. A partir de los valores medios, se obtuvieron las líneas de tendencia de cada una de las bacterias, que se expresan gráficamente en las figuras 16, 17, 18, 19 y 20.

Las líneas de tendencia, resultan bastante aleccionadoras en lo que a la evolución de la polución se refiere. Por ellas, se observa el carácter ascendente de las densidades de las bacterias indicadoras a lo largo del tiempo, hay que resaltar que el aumento como se ve en las gráficas no se hizo de manera uniforme, sino con altibajos, teniendo en los muestreos 6 y 15, los representantes del máximo aumento y el 10 de descenso.

Como se sabe, por la ecuación de la recta, a mayor valor de la pendiente, le corresponde mayor inclinación, en nuestras líneas de carácter ascendente. Por medio de éste valor, se puede saber qué grupo de bacterias aumentan más sus niveles a lo largo del tiempo de estudio.

Así resulta que los aerobios ocupan el primer lugar, siguiendo en orden descendente los CT, CF, EF y CSR.

Según Holden, 1970, se estima que las densidades de CF, EF y CSR por mililitro, para aguas residuales varían en el orden de 100.000 a 1.000.000 CF/ml, de 1000 a 100.000 EF/ml, de 100 a 10.000 CSR/ml.

Como vimos en el apartado 5.1, en ningún muestreo se alcanzó la cifra más baja estimada para CF, siendo la media de los 34 muestreos de 24.000 CF/ml.

Tanto para EF como para CSR, se superó la cifra mínima, siendo la media de 6.100/ml y 545/ml respectivamente.

En el mismo apartado vimos que los valores de la relación CF/EF, aumentaban de Mayo a Octubre, siendo la media de 3'7.

Como muestran las figuras, al aumentar en mayor grado las líneas de tendencia de los CF que los de EF, se deduce no sólo que aumenta la polución de origen fecal reciente, sino que además el

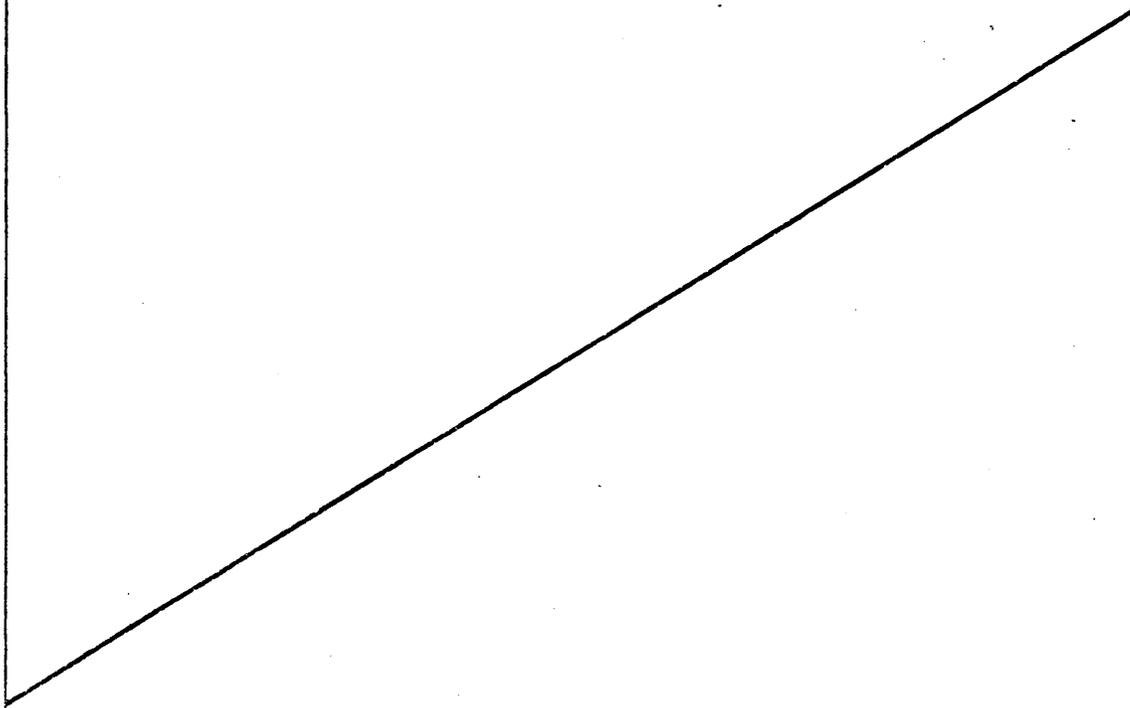
(16,75000)

Fig.16 _ Linea de tendencia de coliformes totales.

$$y = 20317,65x + 32300$$

$$r = 0,58$$

$$f = 7,18$$



(1,35000)

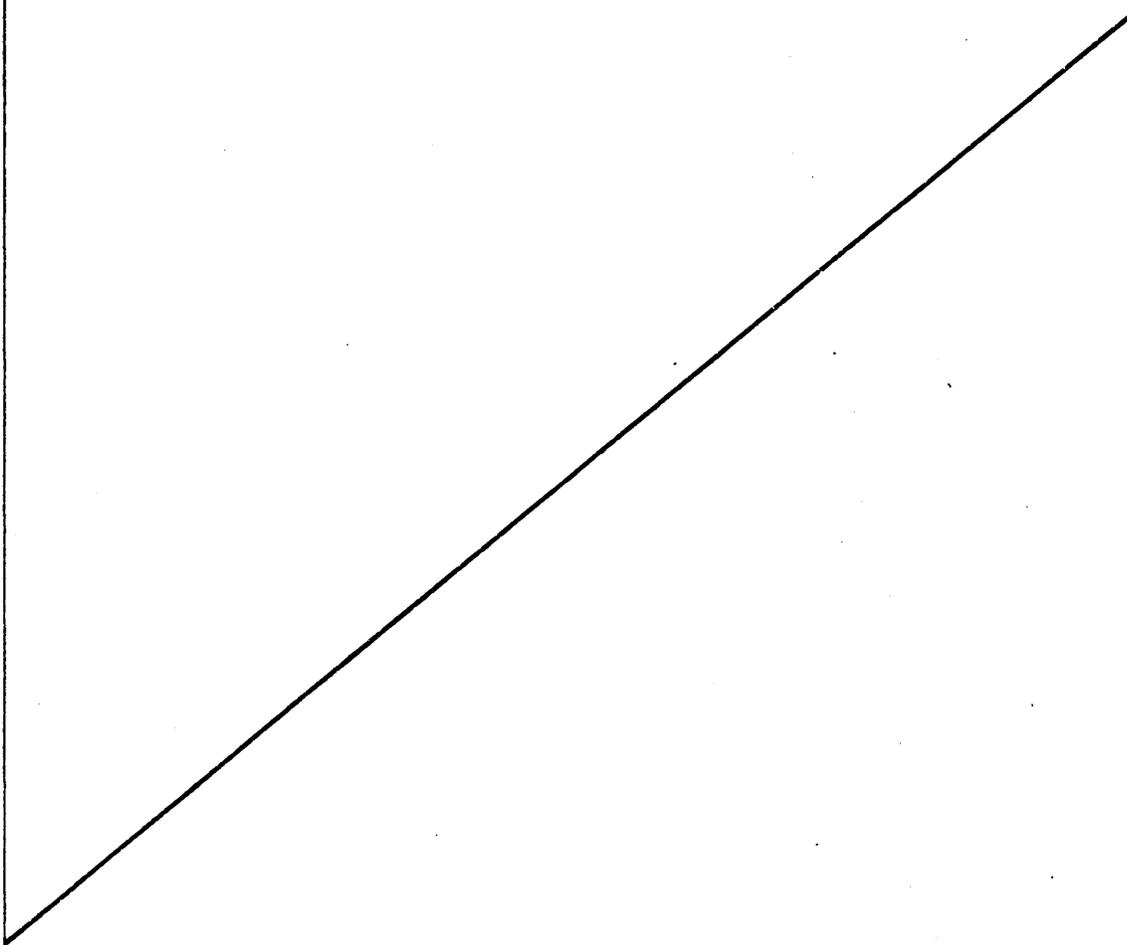
(17,64000)

Fig. 17 - Línea de tendencia de coliformes fecales.

$$y = 2208,01x + 4150,51$$

$$r = 0,65$$

$$f = 10,72$$



(1,2600)

(17,12500)

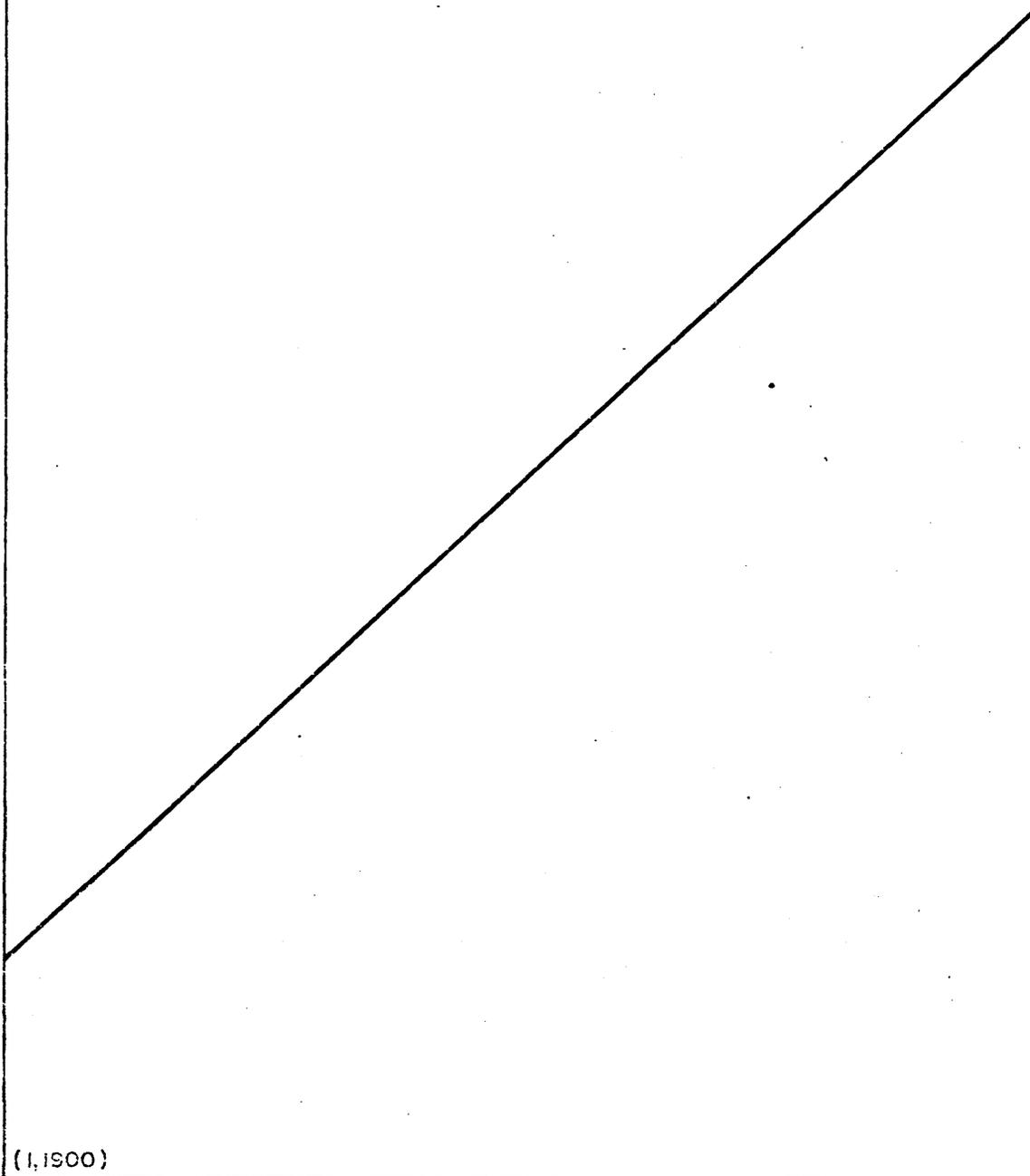
Fig. 18 _ Linea de tendencia de estreptococos fecales.

$$y = 423,53x + 2291,18$$

$$r = 0,68$$

$$f = 12,62$$

(1,1900)



(17,950)

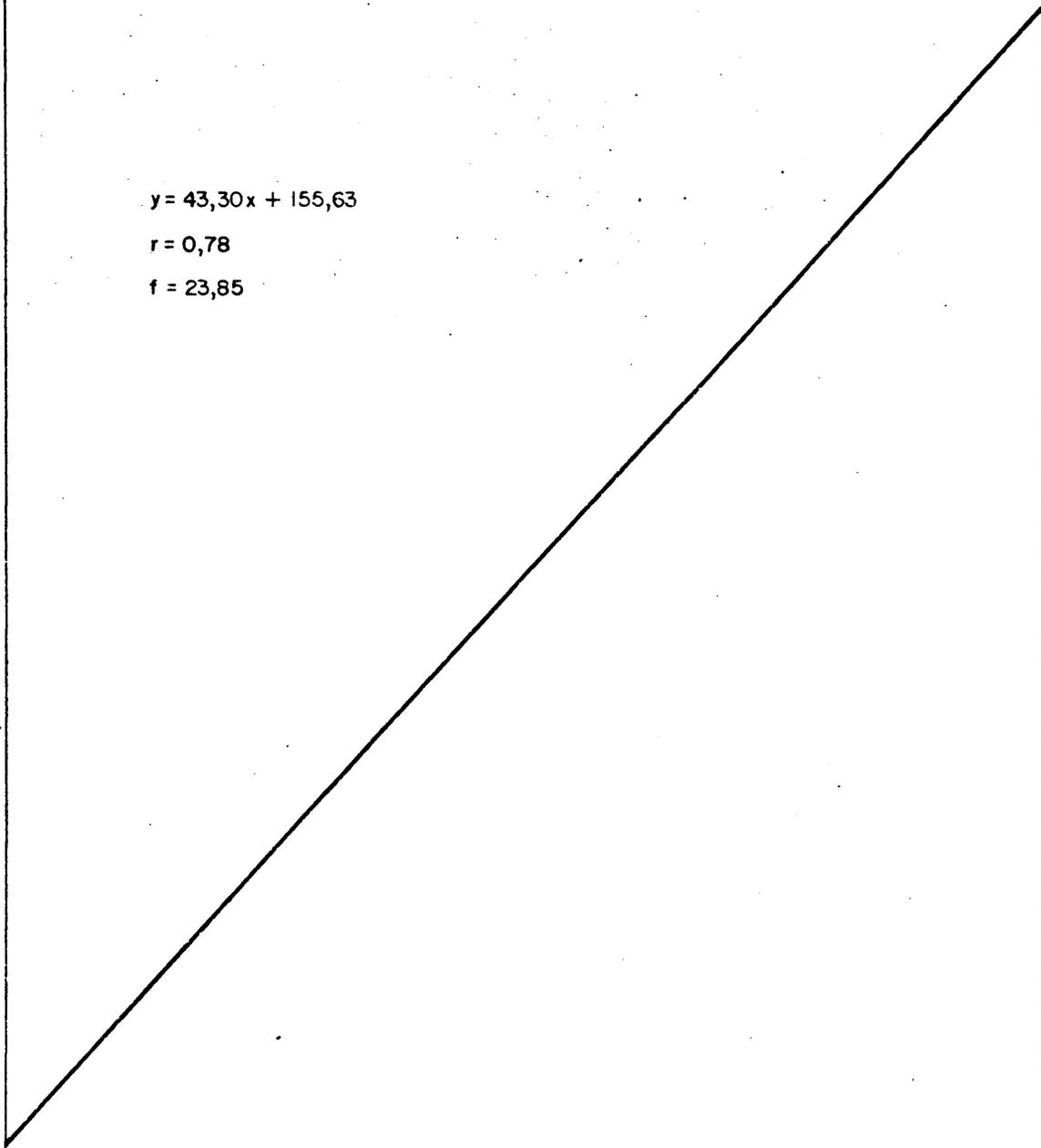
Fig. 19_ Línea de tendencia de clostridios sulfito-reductores.

$$y = 43,30x + 155,63$$

$$r = 0,78$$

$$f = 23,85$$

(1,50)



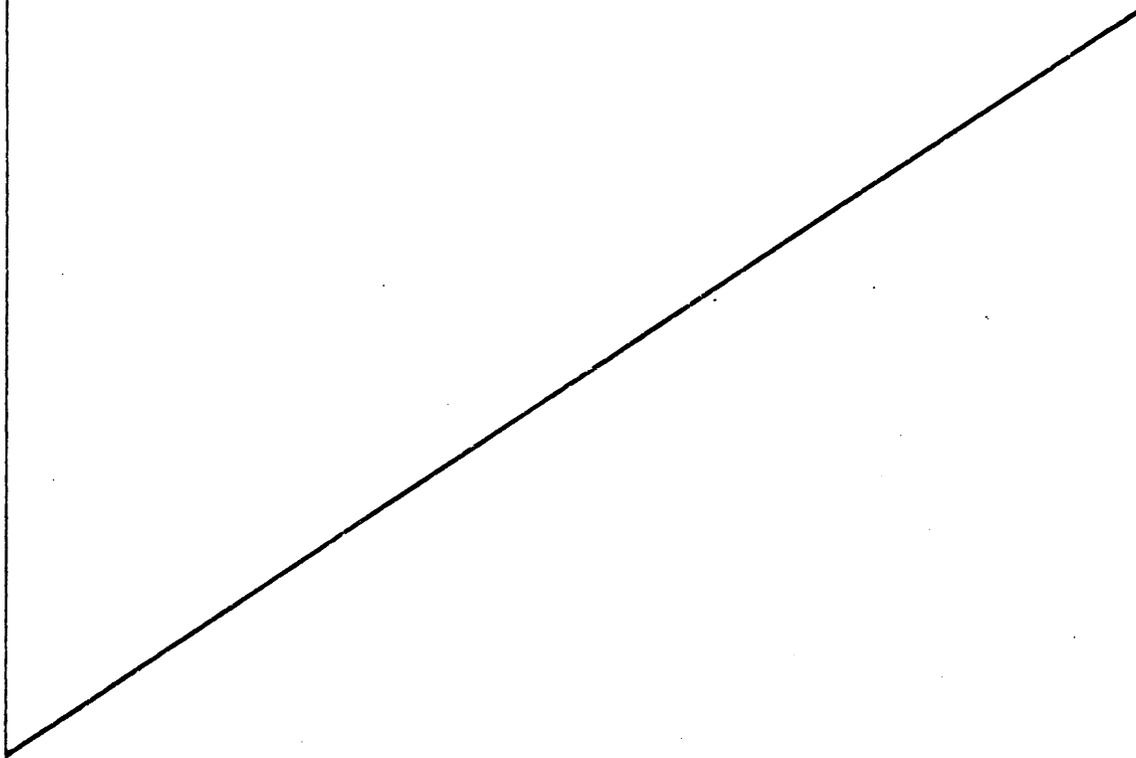
(17,6200000)

Fig.20 _ Linea de tendencia de gerobios.

$$y = 169558,82x + 1029558,82$$

$$r = 0,48$$

$$f = 4,54$$



(1,300000)

tipo de polución evoluciona de ser mezcla de animal y humana a ser de origen fundamentalmente humano.

Creemos que se debe a la influencia, que ejercen las aguas del río Jarama sobre el Canal del Jarama, ya que por una parte no se mezclan de manera total las aguas del río Manzanares con las aguas del Jarama y por otra parte, como el caudal del Manzanares es relativamente constante, por el aporte de las aguas residuales de la actividad humana de Madrid, cuando el caudal del río Jarama aumenta, predominan sus aguas, con lo que disminuye el grado de polución y el valor de la relación CF/EF indica que el tipo de polución es una mezcla de animal y humana, e inversamente, cuando disminuye el caudal del río Jarama, las aguas que porta el Canal del Jarama presentaron mayor grado de polución, fundamentalmente de origen fecal humano.

Podemos por tanto afirmar que el Canal del Jarama no sólo vehiculiza aguas, con un elevado grado de polución bacteriana de origen fecal, sino que se modifica el tipo de polución a lo largo del tiempo que abarca nuestro estudio, Mayo-Octubre, que a causa de la dilución que sufren las aguas del Manzanares por el Jarama y al tiempo transcurrido desde el vertido de las aguas residuales, las cifras de CF se encuentran de tres a 10 veces, según la fecha de muestreo, por debajo de los niveles estimados para aguas residuales brutas humanas.

Cuando se habló de los distintos eslabones de cadena entero-hidro-entérica en la transmisión de la salmonelosis, vimos que los productos tanto de la agricultura como los de la horticultura, ya sean los de consumo humano como los de consumo animal, forman parte de lo que allí llamábamos tercer eslabón.

Para muchos autores, entre ellos Wray y Sojka, 1977, éste tercer eslabón se encuentra entre los factores ambientales que con más importancia intervienen en la introducción, diseminación y extensión de la salmonelosis.

Un ejemplo lo tenemos en el trabajo de Tamminga y cols, 1978, que estudiando vegetales propios e importados en Holanda, de-

tectaron Salmonellas en 23 de las 103 muestras examinadas, aislándose *S. infantis*, *S. typhimurium* en las Holandesas y *S. montevideo*, *S. java*, *S. infantis*, *S. bredeney*, *S. californica*, *S. heidelberg* y *S. typhi*. Como sabemos la mayoría de éstos serotipos se encuentran entre los serotipos más frecuentemente aislados en clínica humana, especialmente *S. typhi*.

Tal como mencionamos en el apartado 2.2, Origen y Finalidad del Canal del Jarama, la finalidad de éste Canal, es conducir las aguas que van a servir para regar unas 10.000 hectáreas de terreno, parte del Valle del Jarama y Vega de Aranjuez, siendo la época de riego del 1 de Abril al 31 de Octubre, periodo de tiempo que prácticamente corresponde al de realización de nuestro estudio.

Teniendo en cuenta el alto grado de polución y el aumento de éste a lo largo del tiempo, unido a tan alta frecuencia de detección de Salmonellas, 82'6 %, y los serotipos aislados, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. essen*, *S. paratyphi B* y *S. typhi*, el empleo de éste agua, así de polucionada para el riego, no sólo contribuye a la contaminación de los vegetales a los que va destinada, sino que se muestra como evidencia de un riesgo, existente en la salud de la población de la cual deriva el agua, estando relacionado con el grado de endemia de las Salmonellas encontradas en esa comunidad.

Todo ello puede originar un indefinido reservorio de Salmonellas en la región.

IV. CONCLUSIONES

1.- El aislamiento de Salmonellas, a partir de muestras contaminadas naturalmente y de forma especial en aguas polucionadas, es un procedimiento multifactorial y complejo, como se pone de manifiesto y de manera clara en los ensayos de laboratorio, que confirman las apreciaciones obtenidas a lo largo de la revisión bibliográfica.

2.- De los dos caldos de enriquecimiento más empleados para el aislamiento de Salmonellas, el selenito verde brillante (SBG) se mostró más eficaz que el Tetracionato de Muller-Kauffman (TMK), ya que mientras que con el primero, se detectaron Salmonellas en las muestras contaminadas natural y artificialmente y permitió el crecimiento de cultivos puros de Salmonellas, con el TMK no se detectaron Salmonellas y no permitió el crecimiento de cultivos puros.

Sin embargo, con el SBG se obtuvieron resultados bastante dispares, tanto con las muestras contaminadas artificial como naturalmente y con los cultivos puros; respecto a éstos últimos, en un ensayo "in vitro" de tres serotipos de Salmonellas, no permitió el crecimiento de dos de los tres estudiados, S. typhi y S. typhimurium.

3.- Los resultados desfavorables de los primeros cinco grupos de ensayos de laboratorio, nos llevaron a desarrollar una nueva fórmula como medio de enriquecimiento, el sorbitol selenito. La composición de éste nuevo caldo que se propone para el aislamiento de Salmone-llas es la siguiente:

peptona	0'4	gr.
extracto de levadura	0'15	gr.
sorbitol	0'4	gr.
selenito sódico	0'5	gr.
fosfato disódico	0'125	gr.
fosfato monopotásico	0'125	gr.
agua destilada	100	ml.

La confirmación de los buenos resultados obtenidos con su empleo, se determina en los grupos de ensayos sexto, séptimo, octavo y noveno.

4.- El sorbitol selenito, se mostró como el medio más sensible y el de mayor reproductividad de los tres caldos estudiados, ya que el medio es capaz de detectar y recuperar al menos de una a dos células de Salmonellas por mililitro. Como resultado de los estudios comparativos "in vitro. de tres serotipos de Salmonellas, S. typhi, S. typhimurium y S. enteritidis, en tres caldos de enriquecimiento SBG, TMK y sorbitol selenito, se observó que:

- el TMK se mostró tan inhibitorio, que no permitió el crecimiento de los tres serotipos de Salmonellas en ninguno de los dos ensayos.
- el SBG inhibió completamente a dos serotipos, S. typhi y S. typhimurium, de los tres en un ensayo.
- el sorbitol selenito permitió el crecimiento de los tres serotipos en los dos ensayos.

5.- La temperatura de 40°C, aplicada como temperatura de incubación del sorbitol selenito, se ha mostrado muy eficaz en nuestros ensayos de laboratorio.

En la revisión bibliográfica se ha podido comprobar, que hay un consenso en la opinión de que se eleve la temperatura de incubación de 37°C a 40° ó 41°C, mostrándose además como el factor de selección más riguroso para el aislamiento de Salmonellas, independientemente del medio de enriquecimiento empleado. La temperatura de 43°C, se descarta por ser demasiado limitante para el crecimiento de Salmonellas frente a las temperaturas de 40° ó 41°C.

6.- Estudiando el crecimiento "in vitro" de tres serotipos de Salmonellas, S. typhi, S. typhimurium y S. enteritidis por la técnica de concentración gradual en sorbitol selenito con la temperatura de 40°C, se ve que:

- aumenta de manera significativa el número de células de Salmonellas por mililitro a lo largo de los subcultivos.
- se aproximan las proporciones de los distintos serotipos. Así tenemos que si bien a las 24 horas de incubación, la proporción de S. typhimurium es 9'6 veces superior a la de S. enteritidis, en

el primer subcultivo, prácticamente llega a aproximarse la proporción, manteniéndose en el segundo subcultivo, aunque si bien los números de los dos serotipos en dicho pase, son cinco veces superiores a los del primer subcultivo.

7.- El empleo de los dos medios sólidos de aislamiento XLD y BS, permite confirmar como Salmonellas la mayoría de las colonias sospechosas aisladas sobre ellos. De 443, 266 se confirmaron, lo que equivale al 60 %.

En cuanto al número de cepas aisladas y confirmadas, globalmente no se encuentran diferencias entre los dos medios, ya que se confirmaron solamente un 1'5 % más de colonias sospechosas en el BS que en el XLD. De 289 tomadas del XLD y 172 del BS, se confirmaron como Salmonellas 172 (59'5 %) y 94 (61 %) colonias respectivamente.

8.- La selectividad y diferenciación, es mayor en el XLD para volúmenes de 1 ml y se igualan en volúmenes de 10 ml, siendo superior el BS para muestras concentradas por filtración.

Así se tiene que con las técnicas de inoculación el rendimiento es superior en el XLD, 17'1 % más de colonias sospechosas para inóculos de 1 ml y 0'4 % para 10 ml, mientras que con la técnica de filtración, que utiliza los microorganismos retenidos a partir de volúmenes de 70-100 ml, el rendimiento es más alto en el BS que en el XLD, 11'9 %.

9.- De las 69 muestras analizadas en las que se utilizó el XLD, en 52 se aislaron Salmonellas (75'3 %), mientras que de las 63 muestras en que las que se empleó el BS, resultaron positivas 48 (74'6 %).

Empleando los dos medios simultaneamente se aislaron Salmonellas en 57 muestras de las 69 analizadas (82'6 %).

10.- Para el aislamiento de *S. typhi* se requiere el empleo de BS, mientras que para la detección de *S. paratyphi B* y *S. enteritidis* el XLD.

Atendiendo al número de serotipos, de los cinco detectados, tres se aislaron de las muestras de 10 ml en el BS y cuatro en el XLD. En los dos medios sólidos fué común el aislamiento de *S. typhimurium* en todos los volúmenes de muestras y *S. enteritidis* en los volúmenes de 10 ml. Los serotipos *S. essen* y *S. paratyphi B* se detectaron solamente en el XLD en las muestras de 10 ml. Hay que resaltar que gracias al BS pudimos aislar tres colonias de *S. typhi* en dos placas, procedentes de dos muestras distintas de agua.

El XLD nos permitió aislar más de un serotipo de la misma placa; así en ocho placas detectamos dos serotipos y en dos placas tres serotipos conjuntamente, mientras que en el BS únicamente nos permitió en una ocasión aislar simultáneamente dos serotipos distintos.

11.- El aumento del volumen de la muestra de agua a analizar para el posible aislamiento de Salmonellas, no favorece siempre su búsqueda.

Al no ser muy dependiente el hallazgo de Salmonellas del volumen de agua elegido, la técnica de NMP referido a 100 ml, para cuantificar el número de Salmonellas presentes en el agua, podría no tener ni significado ni valor.

Con la técnica de inoculación de 10 ml, se detectaron más serotipos que con la técnica de filtración, que utiliza los microorganismos contenidos en los volúmenes de 70-100 ml, tanto en el conjunto del muestreo como en la misma muestra, en la que se aislan frecuente y simultáneamente dos y tres serotipos.

12.- La identificación presuntiva del género *Salmonella* por pruebas bioquímicas TSI, urea, lisina descarboxilasa, indol, manitol, coincidió en todas las cepas aisladas con la prueba de aglutinación somática realizada con suero polivalente.

Nuestros resultados nos hace seleccionar dos pruebas bioquímicas TSI y urea, para continuar con la prueba de aglutinación somática con suero polivalente. Esto presenta dos grandes ventajas, menor costo y trabajo y una mayor rapidez en la identifi-

cación de las bacterias pertenecientes al género Salmonella.

La identificación de Salmonellas a nivel de serotipo que se realiza por pruebas de aglutinación flagelar, debido a su complejidad, costo y trabajo se recomienda que se lleve a cabo en Centros de Referencia.

13.- La metodología que se recomienda para la detección de Salmonellas en agua, es la que se propugna a continuación:

- enriquecimiento.
 - medio de sorbitol selenito.
 - adicción de un extracto de cultivo de Salmonellas inactivadas por el calor.
 - método de concentración gradual con la temperatura de 40°C.
- aislamiento.
 - XLD, 37°C, 24 horas.
 - BS, 37°C, 24 horas.
- identificación bioquímica.
 - TSI.
 - urea.
- identificación serológica somática.
 - pool de suero polivalente.
- identificación serológica flagelar.
 - Se recomienda que se realice en Centros de Referencia

14.- En el agua del Canal del Jarama se aislaron Salmonellas en el 82'6 % de las muestras analizadas; es decir en 57 de las 69 estudiadas. Aislandose 266 cepas de Salmonellas, agrupándose en cinco serotipos distintos, S. typhi, S. typhimurium, S. paratyphi B, S. enteritidis y S. essen.

15.- Hay una gran similitud y paralelismo entre los serotipos encontrados en el agua del Canal del Jarama y los aislados en patolo-

gía humana, como resulta al comparar los hallazgos en Hospital del Rey, Centro Nacional de Referencia de Enterobacterias, Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitaria y agua del Canal del Jarama mostrados a continuación:

lugar año	H. Rey		C.N.Referencia				C.N.M.V.I.S.				Agua	
	1968-76		1974-79		1979		1979		1979		1978	
	n ²	%										
S. typhimurium	1	42	1	31	1	57	1	39	1	39	1	87,9
S. enteritidis	3	14	2	18	2	22	2	34	2	36	2	4,9
S. typhi	2	40	4	12	3	7	3	10	3	9	4	1,2
S. paratyphi B	5	1	3	16	5	3	5	2	8	1	5	0,3
S. essen	-	-	-	-	8	1	-	-	-	-	3	1,9

16.- el aumento de la frecuencia de aislamiento de Salmonellas en el agua, procede en meses a la frecuencia de su detección en clínica humana. Recordemos que tienen su máximo en los meses de Mayo en la primera y Septiembre en la segunda.

17.- Además de la concordancia cronológica entre los serotipos aislados en el agua y en clínica humana, la aparición de un serotipo en el agua como S. typhi, en los meses de Junio y Julio, precede en meses a su máxima incidencia de casos humanos, Septiembre.

18.- Se puede afirmar que los serotipos detectados en el Canal del Jarama, son fundamentalmente de origen humano. Esto es avalado de una parte por el hecho de aislarse los serotipos S. typhi y S. paratyphi B (Salmonellas humanas de huéspedes específico) y de otra por la similitud y paralelismo de los serotipos detectados en el agua con los de patología humana, ratificándose además por los valores de las relaciones CF/EF, que nos indican que la contaminación del agua es fundamentalmente de origen humano.

19.- Se obtiene globalmente una relación inversa entre los niveles de coliformes totales y aislamiento de Salmonellas, es decir, a medida que aumenta los niveles de CT/ml, disminuye la probabilidad de detectar la presencia de Salmonellas. Así, se pasa del 100% en el primer intervalo, 20.000-50.000 CT/ml, al 66% en el séptimo y últi-

mo intervalo, 400.001-800.000 CF/ml.

20.- A partir del primer intervalo de 900-1.000 CF/ml al séptimo con 50.000-80.000 CF/ml, no se obtiene una relación rectilínea entre las densidades de coliformes fecales y la probabilidad de detectar Salmonellas; se obtiene globalmente una relación inversa, si bien con grandes altibajos entre niveles de CF/ml y frecuencia de aislamiento de Salmonellas:

- no hay una densidad por encima de la cual la probabilidad de aislar Salmonellas sería del 100%.
- en contraposición a las afirmaciones de ciertos autores que creen que por encima de ciertas densidades de CF/ml, no se podría aislar Salmonellas, nosotros decimos, que no hay densidad por encima de la cual no se puede detectar Salmonellas. En el intervalo de 50.000-80.000 CF/ml se obtuvo una frecuencia de aislamiento del 60%.
- el aislamiento de Salmonellas en conjunción con el grupo de CF y el aislamiento de éste grupo solamente, resalta la importancia y validez del test de CF como indicador de polución peligrosa para la salud, ya que la ausencia de aislamiento de Salmonellas no excluye la probable presencia de otros patógenos.

21.- No se ha encontrado una estrecha relación entre las densidades de estreptococos fecales y la probabilidad de aislar Salmonellas. Si bien en los primeros intervalos, del primero con 1.500-3.000 EF/ml al cuarto con 6.001-7.500 EF/ml, la relación es inversa entre las densidades de EF/ml y frecuencia de aislamiento de Salmonellas, del cuarto al séptimo con 10.501-13.000 EF/ml, no hay ni una relación rectilínea directa ni inversa, sino que se puede considerar que la probabilidad de aislamiento de Salmonellas se mantiene constante en un 75%, aunque aumenten los niveles de EF/ml. Es decir no se ha encontrado una estrecha relación entre las densidades de EF y probabilidad de aislar Salmonellas.

22.- A medida que aumenta el valor del cociente de la relación CF/EF (indicador del origen de la polución), disminuye la probabilidad de detectar Salmonellas, expresada en % sería:

		- 227 -			
CF/EF	0,7	0,7	y	4	4
8	100			85,2	77,7

Cuando el valor de la relación es superior a 4, hay más probabilidades de aislar más de un serotipo simultáneamente en la misma muestra.

23.- La relación que se obtiene entre niveles de clostridios-sulfito reductores por milímetro y probabilidad de aislar Salmonellas, es una relación rectilínea inversa.

24.- No se obtiene ningún tipo de relación entre niveles de aerobios por milímetro y probabilidad de aislar Salmonellas, ya que tan pronto aumenta como disminuye la frecuencia de aislamiento.

25.- Tanto los resultados del grupo de bacterias, CT y aerobios, como del grupo, CF, EF y CSR, en conjunto nos hace pensar y decir que no hay una relación clara entre las medias mensuales de bacterias indicadoras y probabilidad de aislamiento de Salmonellas y que la diferencia de frecuencia de detección que encontramos en los distintos intervalos, no solo se debe achacar a las limitaciones de la metodología empleada por nosotros, sino que también que está relacionada directamente con la incidencia de Salmonelosis en la población humana, teniendo en cuenta el desfase en meses, entre la máxima incidencia de Salmonelosis humana y la frecuencia de aislamiento de las Salmonellas en el agua.

Por tanto cuando se intente estudiar la relación que existe entre niveles bacterianos y probabilidad de aislamiento de Salmonellas, en un mismo curso de agua, conviene citar en que mes se obtuvo, ya que la relación existente en un mes o periodo de meses, no se puede aplicar como ley para cualquier mes o grupo de meses.

26.- El estudio estadístico, basado en el test de los signos, nos permite afirmar que entre los dos puntos de muestreo, no hay diferencias significativas, tanto desde el punto de vista bacteriano como desde el punto fisico-químico y que las pequeñas diferencias se deben a errores muestrales que escapan a nuestro control.

27.- Las líneas de tendencia, resultan bastante aleccionadoras en lo que a la evolución de la polución se refiere. Por ellas se observa el carácter ascendente de las densidades de las bacterias indicadoras, a lo largo del tiempo que abarca nuestro estudio (primavera-otoño).

Al aumentar en mayor grado las líneas de tendencia de CF que la de EF, se deduce no sólo que aumenta la polución de origen fecal reciente en el Canal del Jarama, sino que además el tipo de polución evoluciona de ser mezcla de animal y humana, a ser de origen fundamentalmente humano; que a causa de la dilución que sufren las aguas del Manzanares por el Jarama y al tiempo transcurrido desde el vertido de las aguas residuales, las cifras de CF se encuentran de 3 a 10 veces, según la fecha de muestreo, por debajo de los niveles estimados para aguas residuales brutas humanas.

28.- Teniendo en cuenta el alto grado de polución y el aumento de densidades de las bacterias indicadoras a lo largo del tiempo, unido a tan alta frecuencia de detección de Salmonellas (82,6%) y los serotipos aislados, S. typhi, S. paratyphi B, S. typhimurium, S. enteritidis y S. essen, el empleo de éste agua para riego, no sólo contribuye a la contaminación de los vegetales a los que va destinada, sino que se muestra como evidencia del grado de incidencia de las Salmonellas encontradas en la comunidad de la cual deriva el agua.

Todo ello puede originar un indefinido reservatorio de Salmonellas en la región.

29.- Se recomienda la aplicación de la metodología de aislamiento de Salmonellas a:

- verificar la peligrosidad del uso del agua para riego, lavado de utensilios para bebida.
- vigilancia global del estado de la epidemiología de la salmonelosis.
- vigilancia periódica de los serotipos que afectan a la población y detección de la aparición de algún nuevo serotipo.

BIBLIOGRAFIA

- ALCANTARA, F. C. (1975). Salmonelosis gastroenteríticas y tifo^uparasíticas. *Medicine, (serie I)*, 10, 901-913.
- ALCANTARA, F. C. (1978). Tratamiento actual de la fiebre tifoidea. *Medicine, (serie II)*, 16, 1019-1024.
- ANDERSON, G. D. and LEE, D. R. (1976). Salmonella in horses: a source of contamination of horse meat in a packing plant under Federal inspection. *Appl. Enviro. Microbiology*, 31, 5, 661-663.
- ANDREE, D. A., WEISER, H. H. and MALANEY, G. W. (1967) Survival of bacterial enteric pathogens in farm pond water. *J. Am. Water Works Ass.*, 59, 4, 503-508.
- ANDREWS, W. H., WILSON, C. R., ROMERO, A. and POELMA, P. L. (1974). The moroccan food snail, *Helix aspera*, as a source of Salmonella. *Appl. Microbio.*, 29, 3, 328-335.
- ANDREWS, W. H., WILSON, C. R., POELMA, P. L. and ROMERO, A. (1977). Comparison of methods for the isolation of Salmonella from imported frog legs. *Appl. Enviro. Microbiology*, 33, 1, 65-70.
- ANUARIOS ESTADISTICOS DE LA SECCION DE EPIDEMIOLOGIA E INFORMACION SANITARIA. (1970-1979). *Direccion General de Sanidad*.
- BANWART, G. J. and AYRES, J. C. (1955). Effect of various enrichment broths and selective agars upon the growth of several species of Salmonella. *App. Microbiol.*, 1, 296-301.
- BAQUERO, G. G. (1972). Control del coprocultivo en el aislamiento de enterobacterias patógenas no coliformes. *Rev. Clin. Española*. tomo 126, 4, 307-315.
- BAQUERO, G. G. (1972). Bacteriología clínica de la fiebre tifoidea y síndromes toxi-infecciosos alimenticios. *Rev. San Hig. Pub.* 46, 563-614.
- BAQUERO, F., CAÑEDO, T. y CARVAJAL, A. (1975). Papel patógeno de los microorganismos oportunistas. *Medicine, (serie I)*, 10, 943-956.

- BARLETT, K. H. and TRUST, T. J. (1976). Isolation of Salmonellae and other potential pathogens from the fresh water aquarium snail *Ampullaria*. *Appl. Enviro. Microbiology*, 31, 5. 635-639.
- BARTLETT, K. H., TRUST, T. J. and LIOR, H. (1977). Small pe aquarium as a source of Salmonella. *Appl. Enviro. Microbiology*, 33, 5, 1026-1029.
- BERG, G., DAHLING, D.R., BROWN, G. A. and BERMAN, D. (1978). Validity of fecal coliforms, total coliforms and fecal streptococci as indicators of viruses in chlorinated primary sewage effluents. *Appl. Enviro. Microbiology*, 36, 2, 880-884.
- BERGEY'S. (1974). Manual of determinative bacteriology. 8nd Ed. *The Willians and Wilking Company Baltimore.*
- BOLETIN EPIDEMIOLOGICO SEMANAL. (1979). MINISTERIO DE SANIDAD Y SE GURIDAD SOCIAL. DIRECCION GENERAL DE SALUD PUBLICA. *Epidemiología e Información Sanitaria*. Número 1408, semana 47.
- BOLETIN EPIDEMIOLOGICO SEMANAL. (1980). MINISTERIO DE SANIDAD Y SE GURIDAD SOCIAL. DIRECCION GENERAL DE SALUD PUBLICA. *Epidemiología e Información Sanitaria*. Número 1420, semana 7.
- BREZENSKI, F.T. and RUSSOMANNO, R. (1969). The detection and use of Salmonellae in studying polluted tidal estuaries. *J. Water Poll. Control Fed.*, 41, 5, 725-737.
- BRISOU, B. et Boudon, A. (1974). Essai d'inventaire des Salmone-lla au niveau du réseau d'égouts d'une commune de 185.000 habitant-
ts. *Rev. Epidém. Méd Soc. et Santé Publ.*, 22, 3, 199-213.
- BUTTIAUX, R., BEERENS, H. et TACQUET, A. (1969). Manuel de techni-ques bacteriologiques. Ed. Flammarion, Paris.
- CARNEY, J. F., CARTY, C. E. and COLWELL, R. R. (1975). Seasonal occurrence and distribution of microbial indicators and pathogens in the Rhode river of Chesapeake Bay. *Appl. Microbiol.*, 30, 5, 771
- CHAU, P. Y. and Huang, C. T. (1974). A one-day selective migration procedure for detectiong Salmonellae in faeces. *J. clin. Path.*, 27,

405-407.

CHENG, C. M., BOYLE, W. C. and GOEPFERT, J. M. (1971). Rapid quantitative method for Salmonella detection in polluted waters. *Appl. Microbiol.*, 21, 4, 662-667.

CHERRY, W. B., HANKS, J. B., THOMPSON, B. M., MURLIN, A. M., BIDDLE, J. W. and CROOM, J. M. (1972). Salmonellae as an index of pollution of surface waters. *Appl. Microbiol.*, 24, 3, 334-340.

CLAUDON, D. G., THOMPSON, D. I., CHRISTENSON, E. H., LAWTON, G. W. and DICK, E. C. (1971). Prolonged Salmonella contamination of a recreational lake by runoff waters. *Appl. Microbiol.*, 21, 5, 875-887.

CLARK, H. F. and KABLES, P. W. (1964). Reevaluation of the significance of the coliform bacteria. *J. Am. Water Works Ass.*, 56, 7, 931-936.

COLEMAN, R. N., CAMPBELL, J. N., COOK, F. D. and WESTLAKE, D.W. (1974). Urbanization and the microbial content of the north Sasl-tat Cheman river. *Appl. Microbiol.*, 27, 1, 93-97.

COMMITTEE REPORT. (1975). Status of waterborne in the United States and Canada. *J. Am. Water Works Ass.*, 67, 2, 95-98.

COOK, W. L., CHAMPION, R. A. and AHEARN, D. G. (1974). Isolation of Salmonella enteritidis serotype agona from eutrophic regions of a freshwater lake. *Appl. Microbiol.*, 28, 4, 723-725.

DAGNELIE, P. (1970). Théorie et méthodes statistiques. Ed. J. Duculot, Gembloux.

DAVIES, J. R. (1975). Assessment of a new selective medium for the isolation of Salmonellae. *Jour. Med. Microbiol.*, 8, 365-367.

DOCKINS, W. S. and MCFETERS, G. A. (1978). Fecal coliform elevated-temperature test: a physiological basis. *Appl. Enviro. Microbiology*, 36, 2, 341-348.

DONDERO, N. C., THOMAS, C. T., KHARE, M., TIMONEY, J. F. and FU KUI, G. M. (1977). Salmonella in surface waters of central New

York stat. *Appl. Enviro. Microbiology*, 33, 4, 791-801.

DUFOUR, A. P. and CABELLI, V. S. (1976). Characteristics of *Klebsiella* from textile finishing plant effluents. *J. Water Poll. Control Fed.*, 48, 5, 872-879.

DUTKA, B. J. and BELL, J. B. (1973). Isolation of *Salmonellae* from moderately polluted waters. *J. Water Poll. Control Fed.*, 45, 2, 316-324.

EDEL, W. and KAMPELMACHER, E. H. (1968). Comparative studies on *Salmonella*-isolation in eight European laboratories. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 39, 487-491.

EDEL, W. and KAMPELMACHER, E. H. (1969). *Salmonella* isolation in nine European laboratories using a standardized technique. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 41, 297-306.

EDEL, W. and KAMPELMACHER, E. H. (1973). Comparative studies on the isolation of, sublethally injured, *Salmonellae* in nine European laboratories. *Bull. Org. Mond. Santé*, 48, 167-174.

EDWARDS, P. R. and EWING, W. A. (1972). Identification of *Enterobacteriaceae*. 3rd edn. Ed. Burgess. Publishing Company. Georgia.

GALLAGHER, T. P. and SPINO, D. F. (1968). The significance of numbers of coliform bacteria as an indicators of enteric pathogens. *Water Reserch.*, 2, 169-175.

GELDREICH, E. E. and KENNER, B. A. (1969). Concepts of fecal streptococci in stream pollution. *J. Water Poll. Control Fed.*, 41, R336-339.

GELDREICH, E. E. (1970). Applying bacteriological parameters to creational water quality. *J. Am. Water Works Ass.*, 63, 8, 113-120.

GELDREICH, E. E. (1972). Microbiology of water. *J. Am. Water Works Ass.*, 44, 6, 1159-1174.

GEORGALA, D. L. and BOOTHROYD, M. (1969). Identification methods. Ed Shapton and Goulb. Academic Press.

- GORBACH, Sh, (1975). Microflora intestinal en las diarreas agudas. *Medicine, (serie I)*, 10, 879-883.
- GOYAL, S. M., GERBA, C. P. and MELNICH, J. L. (1977). Occurrence and distribution of bacterial indicators and pathogens in canal communities along the Texas coast. *Appl. Environ. Microbiology*, 34, 2, 139-149.
- GRAUN, G. F. and MCCABE, L. J. (1973). Review of the causes of waterborne-disease outbreak. *J. Am. Water Works Ass.*, 65, 1, 74-84.
- GRAUN, G. F. MCCABE, L. J. and HUGHES, J. M. (1976). Waterborne disease outbreaks in the United States 1971-1974. *J. Am. Water Works Ass.*, 68, 8, 420-424.
- GRAUN, G. F. and GUUN, R. A. (1979). Outbreaks of waterborne disease in the United States 1975-1976. *J. Am. Water Works Ass.*, 71, 8, 422-428.
- GRUNNET, K. and NIELSEN, B. B. (1969). Salmonella types isolated from the Gulf of Aarhus compared with types from infected human beings, animals, and feed products in Denmark. *Appl. Microbiol.*, 18, 6, 985-990.
- HARRISON. (1973). *Medicina interna*. Ed. La Prensa Médica Mexicana. Mexico.
- HARVEY, R. W. and PRICE, T. H. (1969). Salmonellas in sewage. A study in latent human infection. *J. Hyg. Camb.*, 67, 517-523.
- HARVEY, R. W., PRICE, T. H. and CRONE, P. B. (1975). Quality control tests of two Salmonella enrichment media using different inocula. *J. Hyg. Camb.*, 74, 3, 375-384.
- HARVEY, R. W. and PRICE, T. H. (1979), A review. Principles of Salmonella isolation, *J. of Appl. Bacteriology*, 46, 1, 27-56.
- HOADLEY, A. W., KEMP, W. M., FIRMIN, A. C. and SMITH, G. T. (1974). Salmonellae in the environment around a chicken processing plant. *Appl. Microbiol.*, 27, 5, 884-857.

- HOEPRICH, P. (1977). Infectious diseases. Ed. Harper and Row, Publishers, Inc. Hagerstown.
- HOLDEN, W. S. (1970). Water treatment and examination. Ed. J. and A. Churchill. London.
- INFORME OFICIAL DE LA ASOCIACION PANAMERICANA DE LA SALUD PUBLICA. (1970). El control de las enfermedades transmisibles en el hombre. Organización Panamericana de la Salud.
- JAY, J. M. (1973) Microbiología de los alimentos. Ed. Acribia.
- KAFEK, S. and BRYAN, F. L. (1977). Effects of enrichment media and incubation conditions on isolating Salmonellae ground. *Appl. Environ. Microbiology*, 34, 3, 285-291.
- KAMPELMACHER, E. H. and VAN NOORLE JANSEN, L. M. (1971). Reduction of Salmonella in compost in a hog-fattening farm oxidation vat. *J. Water Poll. Control Fed.*, 43, 7, 1541-1545.
- KAMPELMACHER, E. H. and VAN NOORLE JANSEN, L. M. (1973). Occurrence of Salmonella in oxidation ditches. *J. Water Poll. Control Fed.*, 45, 2, 348-352.
- KAPER, J. B., SAYLER, G. S., BALDINI, M. M. and COLWELL, R. R. (1977). Ambient-temperature primary non selective enrichment for isolation of Salmonella spp from an estuarine environment. *Appl. Environ Microbiology*, 33, 4, 829-835.
- KATZENLSON, E. and KEDMI, S. (1979). Unsuitability of polioviruses as indicators of virological quality of water. *Appl. Environ Microbiology*, 37, 2, 343-344.
- KENNER, B. A. and CLARK, H. P. (1974). Detection and enumeration of Salmonella and P. aeruginosa. *J. Water Poll. Control Fed.*, 46, 9, 2163-2171
- KRUGER, VON W. (1972). Zum problem der Salmonella-isolierung aus oberflachengewassern, dargestellt an langzeituntersuchungen im raum Berlin, Hauptstadt der DDR. *Z. Gesante Hyg. Grenzgeb*, 18, 590-593.

- KRYSINSKI, E. P. and HEIMSCH, R. C. (1977). Use of enzyme-labeled antibodies to detect Salmonella in foods. *Appl. Environ. Microbiology*, 33, 4, 947-954.
- KUCERS, A. and BENNET, N. MCK. (1975). The use of antibiotics. A comprehensive review with clinical emphasis. Ed. *William Heinemann Medical Books. Ltd London.*
- LABART, L. et FENELOU, J. P. (1973). Statistiques et informatique appliquées. Ed. *Dunod-Paris.*
- LECLERC, H., CATSARAS, M. et MIZON, F. (1970,a). Sur l'isolement des Salmonella dans les milieux fortement pollués. I-Etudes préliminaires sur des eaux contaminées expérimentalement. *Ann. Inst. Pasteur, Lille*, 21, 263-276.
- LECLERC, H., CATSARAS, M., SAWAGE, C. et EYMARD. (1970,b). Sur l'isolement des Salmonella dans les milieux fortement pollués. II-Essais sur des eaux résiduaires. *Ann. Inst. Pasteur, Lille*, 21, 277-294.
- LECLERC, H. (1971). Les microorganismes pathogènes des eaux résiduaires: évolution au cours des traitements d'épuration. *Tech. et Scie. Municipales*, 11, 389-400.
- LEIFSON, E. (1936). New selenite enrichment media for the isolation of typhoid and paratyphoid (Salmonella) bacilli. *Amer. J. Hyg.*, 24, 423-432.
- LENETTE, E. H., SPALDING, E. H. and TRUANT, J. (1974). Manual of clinical microbiology. Ed. *American Society for Microbiology. Washington.*
- LE MINOR, L. (1972). Le diagnostic de laboratoires des Entérobactéries. Ed. *de la Tourelle, St-Mandé.*
- LUPPI, A., BUCCI, G., MAINI, P., GAIANI, R. e ROSINE, C. (1973). Caratteristiche microbiologiche e Salmonelle nel fiume Po. *Ig. Mod.*, 66, 405-415.
- MANDELL, G. L., DOUGLAS, R. G. and BENNETT, J. E. (1979). Principles and practice of infectious diseases. Ed. *Wiley Medical, New*

YORK.

MISTERE DES AFAIRES SOCIALES. (1969). Recherche qualitative de Salmonellas. *Circular 10-01*.

MITCHELL, R. (1972). Water pollution microbiology. Ed. Wiley-Interscience. New York.

MITCHELL, D. O. and STARZYK, M. J. (1975). Survival of Salmonella and other indicator microorganisms. *Can. Jour Microbio.*, 21, 1421-1424.

MOATS, W. A. and KINNER, J. A. (1974). Factors affecting selectivity brilliant green fenol red agar for Salmonellae. *Appl. Microbiol.*, 27, 1, 118-121.

MOATS, W. A., KINNER, J. A. and MADDOX, S. E. (1974). Effect of heat on the antimicrobial activity of brilliant green dye. *Appl. Microbiol.*, 27, 5, 844-847

MOHIT, B., ALY, R. and BOURGEOIS, L. D. (1975). A simple single-step immunoimmobilisation method for the detection of Salmonella in the presence of large numbers of other bacteria. *Jour. Med. Microbiol.*, 8, 173-176.

MOORE, B. (1948). The detection of paratyphoid carriers in towns by means of sewage examination. *Mon. Bull, Minist. Hlth.*, 7, 241-248.

MORSE, E. V. and DUNCAN, M. A. (1976). Salmonella as monitors of fecal pollution in the aquatic environment. *J. Environ. Sci. Health.*, 11, 591-601.

MUNSON, T. E., SCHARADE, J. P., BISCIELLO, N. B., FANTASIA, L. S., HARTUNG, W. H. and O'CONNOR, J. J. (1976). Evaluation of an automated fluorescent antibody procedure for detection of Salmonella in food and feeds. *Appl. Microbiol.*, 31, 4, 514-521.

NABBUT, N. H. (1973). Elevated temperature technique for the isolation of Salmonellas from sewage and human faeces. *J. Hig. Camb.*, 71, 49-54.

- NELSON, W. E., VAUGHAN, V. C. and MCKAY, R. J. (1975). Tratado de pediatria. Ed. Salvat. Barcelona.
- NORTH, W. R. and BARTRAM, M. T. (1953). The efficiency of selenite broth of different compositions in the isolation of Salmonella. *Appl. Microbiol.*, 1, 130-134.
- OSBORNE, W. W. and STOKES, J. L. (1955). A modified selenite brilliant green medium for the isolation of Salmonella from egg products. *Appl. Microbiol.*, 3, 295-299.
- PAGON, S. W., SONNABEND, W. UND ROHDE. (1974). Untersuchungen über das Vorkommen von Salmonellen bei importierten Schildkröten Isolierung einer neuen Salmonella-Spezies (S. gallen=11:a:1,2). *Path. Microbiol.*, 40, 345-356.
- PARVERY, F., BACAUD, J. P. CHAMBREUIL, G. et CARBONELLE, B. (1972). Etude écológique de Salmonella dans les eaux en Anjou. *Rev. Epidém. Méd. Soc et Santé Publ.*, 20, 7, 603-618.
- PHARM, ACTA HELVETICA. (1976). Microbiological purity of non compulsorily sterile pharmaceutical preparations method of examination. Report on the committee of official laboratories.
- PHIRKE, P. M. (1974) Elevated temperature technique for enumeration of Salmonellae in sewage. *Indian J. Med. Res.*, 62, 6, 938-944.
- POLLOCK, H. M. and DAHLGREN, B. J. (1974). Clinical evaluation of enteric media in the primary isolation of Salmonella and Shigella. *Appl. Microbiol.*, 27, 1, 197-201.
- PRIETO, A. (1971). Fiebre tifoidea y saneamiento en España. *Gabine te de Estudios. Dirección General de Sanidad. Madrid.*
- PROST, E. and RIEMANN, H. (1967). Food-borne salmonellosis. *Ann. Rev. Microbiol.*, 21, 495-528.
- PTARK, D. J., GINSBURY, W. and WILLEY, B. F. (1973). Identification and incidence of Klebsiella in chlorinated water supplies. *J.*

Am. Water Works Ass., 65, 10, 604-610.

PUMAROLA, A., PIEDROLA, G., GONZALEZ, F., BRAVO, J., GOMEZ, R., del REY, J., DOMINGUEZ, M., PIEDROLA, G., MIRA, J., AMARO, J., TRINCADO, P., GALVEZ, R., MAROTO, M., FERNANDEZ, F. y CABALLERO, F. (1975). *Medicina preventiva y social. Higiene y sanidad ambiental. Tomo I, 5^a. Ed. Amaro. Madrid.*

PUMAROLA, A., PIEDROLA, G., GONZALEZ, F., del REY, J., DOMINGUEZ, M., MIRA, J., CALBO, P., CASAL, M., CORTINA, P., GALVEZ, R., SIERRA, A., MAROTO, M., AMARO, J., TRINCADO, P., OROMI, J., VOS, R., CRUZET, F., CABALLERO, F. y CILI, M. (1980). *Medicina preventiva y social. Higiene y sanidad ambiental. Tomo II, 6^a. ed. Ed. Amaro. Madrid.*

RAJ, H. (1966). Enrichment medium for selection of Salmonella from fish homogenates. *Appl. Microbiol.*, 14, 1, 12-20.

REASONER, D. J. (1973). Microbiology-Detection of bacterias pathogens and their occurrence. *J. Water Poll. Control Fed.*, 45, 6, 1973-1993.

REASONER, D. J. (1976). Microbiology-Detection of bacterial pathogens and their occurrence. *J. Water Poll. Control Fed.*, 48, 6, 1397-1416.

RESTAINO, L., GRAUMAN, G. S., MACCALL, W. A. and Hill, W. (1977). Effects of varying concentrations of novobiocine incorporated into two Salmonella plating media on the recovery of four Enterobacteriaceae. *Appl. Enviro Microbiology*, 33, 3, 585-589.

SHANSON, D. C. (1975). A new selective medium for the isolation of Salmonellae other than Salmonella typhi. *Jour. Med. Microbiol.*, 8, 357-364.

RODIER, J. (1971). *L'analyse chimique et phisico-chimique de l'eau. Ed. Dunod. Paris.*

RUDOLFS, W., FOLK, L. L. and RAJOTZKIE, R. A. (1950). Literature review on the occurrence and survival of enteric, pathogenic, and

relative organism in soil, water, sewage and sludges, and on vegetation. I. Bacterial and virus diseases. *Sewage Ind. Wastes*, 22, 10, 1261-1281.

RYAN, W. J. (1972). Isolation of Salmonella from sewage by anaerobic methods. *J. Med. Microbiol.*, 5, 533-539.

RYDER, R. W., MERSON, M. H., POLLARD, R. A. and GANGAROSA, E. J. (1976). Salmonellosis in the United States, 1968-1974. *J. Infec. Diseases*, 133, 4, 483-486.

SATO, G., TAKEUCHI, K. and KUME, D. (1974). Isolation of *Salmonella infantis* and *Salmonella anatum* from a gray starling (*Sturnus cineraceus*) in the city of Sapporo. *Jour. Vet. Res.*, 22, 95-99.

SAYLER, G. S., NELSON, J. D., JUSTICE, J. R. and COLWELL, R. R. (1976). Incidence of *Salmonella* spp, *Clostridium botulinum* and *Vibrio parahaemolyticus* in a estuary. *Appl. Enviro. Microbiology*, 31, 5, 723-730.

SELIJMANN, R. and REITTER, R. (1965). Enteropathogens in water with low *E. coli* titer. *J. Am. Water Works Ass.*, 57, 1572-1577.

SIEBELING, R. J., NEAL, D. M. and GRANBERRY, W. D. (1975). Treatment of *Salmonella*-Arizona infected turtle eggs with terramycin and chloromycetin by the temperature diferencial egg dip method. *Appl. Microbiol.*, 30, 5, 791-796.

SIEBELING, R. J., NEAL, D. M. and GRANBERRY, W. D. (1975) Evaluation of methods for the isolation of *Salmonella* and Arizona organisms from pet Turtles treated with antimicrobial agents. *Appl. Microbiol.*, 29, 2, 240-244.

SERICO, A. (1972). *Medicina preventiva y social. Ed Litografia Everest.*

SMITH, H. G. (1959). On the nature of the selective action of selenit broth. *J. Gen. Microbiol.*, 21, 67-71.

SMITH, R. J. and TWEDT, R. M. (1971) Natural relationships of indicator and pathogenic bacteria in stream waters. *J. Water Poll.*

Control Fed., 43, 11, 2200-2209.

SMITH, R. J., TWEDT, R. M. and FLANIGAN, L. K. (1973). Relationships of indicator and pathogenic bacteria in stream waters. *J. Water Poll. Control Fed.*, 45, 8, 1736-1745.

SPINO, D. F. (1966). Elevated-temperature technique for isolation of Salmonella from streams. *Appl. Microbiol.*, 14, 4, 591-596.

STANDARD METHODS for the Examination of Water and Wastewater. (1975). 14 th. Ed Amer. Pub. Health Assn., New York.

STELZER, W., SCHULZE, E., NAGEL, M. und ZESCH, M. (1977). Untersuchungen zur quantitativen Beziehung zwischen Indikatorbakterien und Salmonellen in Fließgewässern. *Z. Gesamte Hyg. Grenzgeb.* 23, 9, 658-661.

STOKES, J. L. and OSBORNE, W. W. (1955). A selenite brilliant green medium for the isolation of Salmonella. *Appl. Microbiol.*, 3, 217-220.

SUENM, W. H. and HARTMAN, P. A. (1977). Timed-release capsule method for the detection of Salmonellae in foods and feeds. *Appl. Environ. Microbiology*, 33, 3, 630-634.

TAMMINGA, S. K., BENNER, R. R. and KAMPELMACHER, E. H. (1978). The hygienic quality of vegetables grown in or imported into Netherlands: a tentative survey. *J. Hyg. Camb.*, 80, 143-154.

TATE, C. H. and TRUSSELL, R. (1977). Developing drinking water standards. *J. Am. Water Works Ass.*, 65, 9, 486-490.

TAYLOR, E. W. (1958). The examination of waters and water supplies. Ed Little Brown and Company-Boston.

TAYLOR, W. I., SILLIKER, J. H. and ANDREWS, H. P. (1958). Isolation of Salmonellae from food samples. I. Factors affecting the choice of media for the detection and enumeration of Salmonella. *Appl. Microbiol.*, 6, 189-193.

TAYLOR, W. I. and SILLIKER, J. H. (1961). Isolation of Salmonella from foods samples. IV. Comparison of methods of enrichment. *Appl.*

Microbiol., 9, 484-486.

TAYLOR, W. I. (1961) Isolation of Salmonella from food samples. V. Determination of the method of choice for enumeration of Salmonella. *Appl. Microbiol.*, 9, 487-490.

THOMASON, B. M., BIDDLE, J. W. and CHERRY, W. B. (1975). Detection of Salmonellae in the environment. *Appl. Microbiol.*, 30, 5, 764-767.

THOMASON, B. M. and DODD, D. J. (1976). Comparison of enrichment procedures for fluorescent antibody and cultural detection of Salmonellae in raw meat poultry. *Appl. Environ. Microbiology*, 31, 5, 787-788.

THOMASON, B. M. and DODD, D. J. (1978). Enrichment procedures for isolating Salmonellae from raw meat and poultry. *Appl. Environ. Microbiology*. 36, 4, 627-628.

TRICHOPOULOS, D., PAPADAKIS, J. A., KARALIS, D. and VASSILIADIS, P. (1978). Incubation at raised temperature of enrichment media, combined with secondary enrichment in Rappaport's medium, for the isolation of Salmonellas from sewage. *J. Hyg. Camb.*, 74, 205-213.

VANDERPOST, J. M. and BELL, J. M. (1977). Bacteriological investigation of Alberta meat-packing plant wastes with emphasis on Salmonella isolation. *Appl. Environ. Microbiology*, 33, 3, 538-545.

VERATTI, E. and BIANCHI, L. (1953). *Manuale di batteriologia pratica*. Ed. Dr. F. Vallardi, Milano.

VERNON, E. (1977). Food poisoning and Salmonella infections in England and Wales. *Publ. Hlth. Lond.*, 91, 225-235.

WEIBEL, S. R., DIXON, F. R. and WEIDNER, R. B. (1964). Waterborne-disease outbreaks 1946-1960. *J. Am. Water Works Ass.*, 56, 7, 947-951.

WELLE, J. G., CLARK, G. M. and MORRIS, G. K. (1974). Evaluation of methods for isolating Salmonella and Arizona organisms from pet Turtles. *Appl. Microbiol.*, 27, 1, 8-10.

VIRARAGHARON, T. (1973). Water quality and human health. *J. Am.*

Water Works Ass., 65, 9, 646-653.

WERNER, S. B., JONES, P. H., MCCOMAACK, W. M., AGER, E. A. and HOLM, P. T. (1969). Gastroenteritis following ingestion of sewage-polluted water: an outbreak at logging camp out the Olympia peninsula. *Amer. Jour. Epidemiology*, 29, 5, 277-281.

WRAY, C. and SOJKA, W. J. (1977). Reviews of the progress of dairy science: Bovine salmonellosis. *Jour. Dairy Research*, 44, 383-425.

YOUMANS, G. P., PATERSON, P. Y. and SOMMERS, H. M. (1975). The biologic and clinical basis of infections diseases. Ed Sanders Company, Philadelphia.