

ESTUDIO DE LA CONTAMINACION CON ENTEROBACTERIACEAS EN CONCENTRADOS PARA ANIMALES

II RECUESTO Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS COLIFORMES

MANUEL J. TORRES ANGEL¹, D.M.V.Z. M.S.
HELENA CARRILLO², Lic. Micr.
VÍCTOR COTRINO³, D.M.V.
HERNÁN MORALES⁴, D.M.V.Z.

INTRODUCCION

Como complemento al trabajo de Manrique et al (12) se realizó este trabajo con cuatro objetivos principales:

1º Obtener recuentos de bacterias coliformes como índice de calidad sanitaria de concentrados para animales, utilizando técnicas standard.

2º Correlacionar estos recuentos con el aislamiento de enterobacteriáceas patógenas específicas.

3º Tipificar los géneros de bacterias coliformes que se puedan encontrar en concentrados animales.

4º Establecer el valor interpretativo de hallazgos de coliformes en alimentos para animales.

Las bacterias coliformes tradicionalmente se han utilizado como uno de los índices de calidad bacteriológica de los alimentos junto con los enterococos (1) y en algunas ocasiones los lactobacilos (8).

Se define el grupo de bacterias coliformes como todas aquellas bacterias aerobias y facultativas Gram negativas, que forman esporos y que son capaces de fermentar la lactosa con producción de ácido

y gas a 32-35°C en un lapso de 48 hr en medios líquidos y sólidos (1, 2, 3).

Bacterias tanto de origen fecal como de origen no necesariamente fecal están incluidas en este grupo y en su mayoría están incluidas en los géneros *Escherichia* y *Aerobacter* (2, 14). Además algunas pocas especies fermentadoras de lactosa de otros géneros quedan también incluidas (2, 14).

Nosotros preferimos no hablar de géneros sino de grupos y decimos que la mayoría de las bacterias del grupo coliforme están incluidas en los grupos *Escherichia-Shigella* y *Aerobacter-Klebsiella-Serratia*, grupos estos establecidos por Cowan (5) y por Ewin y Edward (7).

¹ Profesor Asociado de Microbiología (Bacteriología) y Salud Pública (Higiene de Alimentos) en la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional, Bogotá.

² Asistente de Microbiología.

³ Instructor Asistente de Microbiología (Enfermedades Infecciosas).

⁴ Profesor Asistente de Microbiología (Bacteriología).

MATERIALES Y METODOS

Se usaron las mismas muestras y el mismo código del trabajo de Manrique *et al* (12).

Los métodos para el recuento de bacterias coliformes fueron escogidos de métodos estandarizados e internacionalmente reconocidos (1, 2, 3, 14) y estudios comparativamente por Lewis y Angelotti en su estudio clásico (11). Estos métodos han sido ya exitosamente aplicados en otros estudios en Colombia (16, 17).

Para los recuentos se escogió la técnica de recuento directo en cajas de Petri para diluciones en solución tamponada y siembra en medio sólido.

Kerelub y Gunderson (9) encontraron que el uso de medio líquido en tubos múltiples daba cuentas más altas pero que la técnica del medio sólido era comparativamente mucho más sencilla y que por lo tanto esa técnica se imponía como la de elección.

Se escogió el medio agar desoxicolato lactosa (6) que junto con el agar bilis rojo violeta son los más frecuentemente usados (11). Según Huber *et al* (10), Kerelub and Gunderson (9), Silverman *et al* (15) and Nickerson *et al* (13) ambos medios pueden usarse indistintamente y con similares resultados.

El método de recuento en placa se recomienda cuando se esperan números altos de bacterias coliformes y tal fue el caso de nuestro trabajo.

Para el recuento, 11 gramos de cada muestra se pesaron asépticamente y se mezclaron con 99 ml de solución tamponada de fosfato de pH 7.2 (que se preparaba disolviendo un tubito de mezcla concentrada de sales de fosfato —Harleco, Arthur Thomas and Co.— en 3.785 litros de agua destilada). Esta dilución inicial 1:10 se usaba para obtener de ella, por

diluciones centesimales, todas las diluciones decimales requeridas (1, 2, 14).

El concentrado en esta dilución inicial se dejaba hidratar en refrigeración (3°C) por 48 hr para proceder luego a hacer las subsecuentes diluciones y siembras.

En algunos casos, cuando el homogenizado contenía partículas que no decantaban en pocos segundos después de mezclar la muestra por agitación, se procedió a filtrarlo asépticamente utilizando papel de filtro N° 0.

Para cada muestra se sembraron por lo menos tres diluciones, 1:10, 1:100 y 1:1000 y en algunos casos, cuando éstas fueron insuficientes, 1:10000. Cada dilución se sembró siempre en duplicado.

Para las siembras se utilizó la técnica del "sandwich" (18), es decir, que previa a la siembra del substrato se colocaba en la caja una muy delgada capa del medio fundido a 90°C y se dejaba solidificar. Colocando esta primera capa estéril de agar muy caliente se podía extender ésta muy fácilmente en todo el fondo de la caja aún utilizando solamente dos a tres ml de medio. A los pocos minutos de colocar el substrato sobre esta capa de medio solidificado, se agregaba la capa mayor de agar, aproximadamente 12 ml a 45°C y se hacía una mezcla muy cuidadosa del agar y el substrato por movimientos circulares de las cajas en ambas direcciones, reloj y contra-reloj. Esta cuidadosa homogenización de la muestra con el agar es crítica en las técnicas de recuento. En algunos casos cuando se tenía dificultad en obtener buena homogenización por este método, se ensayó hacer la homogenización en tubos agregando a tubos de cultivo (tapa de rosca) que contenían 12 ml de medio fundido a 45°C que después se vertían sobre la caja que ya contenía la

primera capa de agar. En general este método, que es muy dispendioso en tiempo y material, no justifica su utilización y puede introducir errores cuantitativos porque alguna parte del medio ya inoculado queda en los tubos.

Luego que la capa mayor obtenida por cualquiera de los dos métodos explicados, se había solidificado, se agregaba una tercera capa delgada de medio estéril fundido a 45°C para cubrir toda la superficie de la caja.

La primera y la tercera capas de medio ayudaban a evitar el problema de colonias "difusas" o "fantasmas" (diseminadas) en el fondo y en la superficie respectivamente. La tercera capa además hacía que las colonias que hubieran virado el medio permanecieran indefinidamente de color rojo. Antes de proceder a incubar las cajas se invertían y con la cubierta a medio remover se dejaban secar por dos horas también, para reducir la incidencia de colonias difusas en la superficie. Estas precauciones para evitar colonias difusas son de gran importancia ya que en estos trabajos la interferencia de organismos del grupo *Proteus - Providence* y la presencia de coliformes muy móviles muchas veces imposibilitan las cuentas (colonias diseminadas) haciendo perder muchas cajas que de otra manera serían contables. Las cajas se incubaban a $34 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24 hr.

En algunos casos para facilitar el crecimiento de colonias y su más fácil cuenta, la incubación se prolongó por unas horas más hasta un máximo total de 36 horas.

Los recuentos se hacían en un contador Quebec de campo oscuro, contando las colonias de color rojo oscuro y con un diámetro de más de 0.5 mm.

Es de anotar que el tamaño de las colonias está inversamente relacionado al número de colonias presentes en la caja.

Los resultados de las cuentas de los duplicados se promediaron y el promedio se expresó como recuento de bacterias coliformes por gramo.

De las cajas contables más significativas en cada muestra, se tomaron cinco colonias típicas al azar, que se sembraron individualmente para confirmación en tubos de fermentación conteniendo caldo verde brillante bilis 2% (6) y se incubaron por 48 hr a $34 \pm 1^\circ\text{C}$. Los tubos que presentaban formación de gas después de 24 a 48 hr se resembraron en agar cosina azul de metileno (6) y se incubaron 45°C para tratar de confirmar *Escherichia coli* de origen fecal. Colonias aisladas en EAM se trabajaron en medio SIM para detección de H₂S, indol y motilidad (6) medio VP + RM para las pruebas Voges-Proskauer y rojo de metilo (6), Simmons, etc, y también se subcultivaron en medio TSI, triple azúcar hierro (6), y agar urea para detección de ureasa (6).

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados de los recuentos de coliformes y de la confirmación de cinco colonias tomadas al azar de las cajas contables se muestran en la Tabla 1. Lewis y Angelotti (11) recomiendan tomar seis colonias para confirmar, pero nosotros encontramos adecuado y más fácil de manipular en los laboratorios únicamente cinco colonias. Las cajas que daban un número de colonias tal que impedían la cuenta, se reportaban como Demasiado Numerosas para Contar (DNPC).

T A B L A N U M E R O 1

Recuento y confirmación de bacterias coliformes en concentrados para animales.

Muestra N°	Colonias de coliformes / gr.				Confirmación en CBVB 2%, 48 hr. P/n **
	$\times 10^1$	$\times 10^2$	$\times 10^3$	$\times 10^4$	
10	DNPC	195			4/5
11	DNPC	125			4/5
12	139	22			0/5
14	292	24			3/5
15	138	23			2/5
16	71	95			0/5
17	DNPC	195	23		3/5
18	145	146			0/5
19	DNPC	127			4/5
20	112	13			1/5
23	30 (25)	4			0/5
31	< 1				
32	< 1				
33	< 1				
34	DNPC	DNPC	80		5/5
35	NC	NC			
45	< 1				
46	MNPC	89			0/5
47	< 1				
48	< 1	NC			
49	60	22			1/5
50	253	18			3/5
51	190	33			5/5
52	DNPC	149			2/5
53	DNPC	DNPC	248	30	1/5
55	DNPC	97			4/5
56	DNPC	DNPC	102		0/5
57	284	28			3/5
58	DNPC	201	18		0/5
59	293	35			5/5
60	DNPC	DNPC	DNPC	36	4/5
61	30	3			4/5
62	DNPC	125			2/5
63	30 (21)	4			3/5
64	30 (8)	5			3/5

* Las cuentas en cada dilución son el promedio de cajas duplicadas.

** p = número de confirmaciones positivas; n = número de colonias a confirmar.

En la Tabla 2 se muestra la distribución de la frecuencia de los recuentos por múltiplos de 10, así como la media aritmética de los recuentos en cada caso. Los datos en esta Tabla están procesados de acuerdo a las normas internacionales para el reporte oficial de este tipo de datos

(2). Como se puede observar, la mayoría de las muestras (57.1 %) dieron recuentos en el rango $> 10^3$ y $< 10^5$ coliformes por gramo. El 8.6% de las muestras dieron recuentos alrededor del 250.000 bacterias coliformes por gramo. Es decir, que más de la mitad de los concentrados es-

tudiados tenían más de 10.000 coliformes por gramo, lo que se considera como recuentos excesivamente altos para un producto alimenticio ya procesado y listo para el consumo. Un porcentaje de 11.4 de las muestras dieron alrededor de 340 coliformes por gramo y el 2.9% de las muestras dio 80 coliformes por gramo.

Un 20% de las muestras dieron < 10 coliformes por gramo debido quizá a error experimental o accidente de laboratorio. Otra posibilidad pudo haber sido el hecho de que la dilución mínima utilizada fue 1:10. El uso de diluciones más concentradas o la siembra de 10 ml en cajas de Petri de mayor capacidad que las corrientes hubiera podido suplir esta dificultad.

La Tabla 3 muestra los resultados de las pruebas bioquímicas elementales practicadas en colonias aisladas de los tubos de caldo verde brillante bilis 2% que dieron confirmación positiva. Estas colonias aisladas se obtuvieron por siembra en agar eosina azul de metileno que se incubaban a 45°C buscando identificar

coliformes de origen fecal. Todas las cepas crecieron muy abundantemente en estas condiciones pero ninguna mostró características de crecimiento de *Escherichia coli*. La mayoría de las colonias fueron de color rosáceo o púrpura y de consistencia muy "suave" (smooth), algunas de ellas mucoides y daban filamentos al tratar de tomarlas con el asa. Las pruebas bioquímicas (Tabla 3) mostraron que la gran mayoría de las cepas corresponden al grupo de enterobacteriáceas *Klebsiella* *Acrobacter*. Solamente cuatro cepas (51.1, 51.4, 55.1, 61.1) mostraron motilidad negativa y cuatro cepas (15.1, 51.1, 51.5, 55.3) dieron una reacción atípica de positividad a la producción de ureasa, siendo la reacción lenta, o sea, al cabo de 48 hr o más. Las cuatro cepas confirmadas y aisladas de la muestra 60 dieron ureasa positiva a las 24 hr. Las cepas 17.1, 30.3, 57.1 y 60.1 dieron en la superficie del medio SIM un pigmento rojizo típico del género *Serratia*. Se observó en la muestra 66 interferencias en el medio desoxicolato lactosa por levaduras que crecían dan-

T A B L A N U M E R O 2

Distribución de la frecuencia de cuentas de bacterias coliformes/g. en múltiplos de 10.

Muestra N°	Colif. × 10 ¹	Muestra N°	Colif. × 10 ¹	Muestra N°	Colif. × 10 ²	Muestra N°	Colif. × 10 ³	Muestra N°	Colif. × 10 ⁴	Muestra N°	Colif. × 10 ⁵
31	< 1	64	8.0	23	2.5	12	1.4	10	2.0	53	2.7
32	< 1			49	6.0	14	2.9	11	1.3	56	1.0
33	< 1			61	3.0	15	1.4	17	2.0	60	3.6
35	< 1			63	2.1	16	9.5	18	1.5		
45	< 1					20	1.1	19	1.3		
47	< 1					46	8.9	34	8.0		
48	< 1					50	2.5	52	1.5		
						51	2.6	58	2.0		
						55	9.7				
						57	2.8				
						59	3.2				
						62	1.3				
Frecuen.	7	1		4		12		8		3	35
%	20	2.9		11.4		34.3		22.8		8.6	100
\bar{x}	1		8.0		3.4		3.9		2.4		2.5

TABLA NUMERO 3

Comportamiento bioquímico de las cepas de bacterias coliformes confirmadas.

Muestra Nº	Cepa Nº	Crecimiento en E. A. M. a 45° C	I	M	Vi	C	Urea	Mot.
10	1	—	—	—	+	+	—	+
	2	—	—	—	+	+	—	+
	3	—	—	—	+	+	—	+
11	4	—	—	—	+	+	—	+
	1	—	—	—	+	+	—	+
	2	—	—	—	+	+	—	+
14	1	—	—	—	+	+	—	+
	2	—	—	—	+	+	—	+
	3	—	—	—	+	+	—	+
15	1	—	—	—	+	+	+(1)	+
	2	—	—	—	+	+	—	+
17	1	—	—	—	+	+	—	+
	2	—	—	—	+	+	—	+
	3	—	—	—	+	+	—	+
19	1	—	—	—	+	+	—	+
	2	—	—	—	+	+	—	+
	3	—	—	—	+	+	—	+
	4	—	—	—	+	+	—	+
20	1	—	—	—	+	+	—	+
34	1	—	—	—	+	+	—	+
	2	—	—	—	+	+	—	+
	3	—	—	—	+	+	—	+
	4	—	—	—	+	+	—	+
	5	—	—	—	+	+	—	+
37	—	—	—	—	—	—	—	—
49	1	—	—	—	+	+	—	+
50	1	—	—	—	+	+	—	+
	2	—	—	—	+	+	—	+
	3	—	—	—	+	+	—	+
51	1	—	—	—	+	+	+(1)	—
	2	—	—	—	+	+	—	+
	3	—	—	—	+	+	—	+
	4	—	—	—	+	+	—	—
	5	—	—	—	+	+	+(1)	—
52	1	—	—	—	+	+	—	+
	2	—	—	—	+	+	—	+
53	1	—	—	—	+	+	—	+
55	1	—	—	—	+	+	—	—
	2	—	—	—	+	+	—	+
	3	—	—	—	+	+	+(1)	+
	4	—	—	—	+	+	—	+
57	1	—	—	—	+	+	—	+
	2	—	—	—	+	+	—	+
	3	—	—	—	+	+	—	+
59	1	—	—	—	+	+	—	+
	2	—	—	—	+	+	—	+
	3	—	—	—	+	+	—	+
	4	—	—	—	+	+	—	+
	5	—	—	—	+	+	—	+

Muestra N°	Cepa N°	Crecimiento en E. A. M. a 45° C	I	M	Vi	C	Urca	Mot.
60	1	—	—	—	+	+	+	+
	2	—	—	—	+	+	+	+
	3	—	—	—	+	+	+	+
	4	—	—	—	+	+	+	+
61	1	—	—	—	+	+	—	—
	2	—	—	—	+	+	—	+
	3	—	—	—	+	+	—	+
	4	—	—	—	+	+	—	+
62	1	—	—	—	+	+	—	+
	2	—	—	—	+	+	—	+
	3	—	—	—	+	+	—	+
63	1	—	—	—	+	+	—	+
	2	—	—	—	+	+	—	+
64	1	—	—	—	+	+	—	+
	2	—	—	—	+	+	—	+

* (1) = lenta, — 48 horas.

do las típicas colonias rojas, inclusive con el característico precipitado de sales biliares alrededor de la colonia. Esta interferencia por levaduras fue confirmada microscópicamente y por coloración de las células levadurales. No encontramos referencia en la literatura a este tipo de interferencia que consideramos de máxima importancia.

La alta prevalencia del grupo *Klebsiella-Aerobacter* en los recuentos de coliformes practicados en concentrados y siendo este grupo muy ubicuoto en la naturaleza como Saprofito en los vegetales, dificulta a simple vista la interpretación de los recuentos de coliformes como índice de calidad bacteriológica en este tipo de alimentos. Sin embargo, se acepta hoy internacionalmente que la aplicación de bacterias coliformes como índice de calidad no tiene por objeto ni detectar específicamente alteración de origen fecal ni identificar *Escherichia coli*, sino medir en general las precauciones que se han tomado para minimizar la contaminación bacteriana (2). Por otra parte “la presencia de altos números de este tipo de microorganismos no es necesariamente indicativa de falta de prácticas higiénicas pero sí le-

vanta una bandera de peligro respecto a que las condiciones que contribuyeron a la contaminación pueden fácilmente dar lugar a daño, pérdida de calidad o crear un riesgo a la salud” (1).

Además la interesante correlación entre altísimos recuentos de bacterias coliformes y el aislamiento de enteropatógenos específicos y potenciales como consideraremos de inmediato, confirman el valor del recuento de coliformes para evaluar la calidad bacteriológica de los alimentos concentrados para animales.

La Tabla 4 muestra específicamente los resultados de recuentos, confirmaciones y pruebas bioquímicas de coliformes en aquellas muestras de las que Manrique et al (12) aislaron especies del género *Salmonella*. La muestra 37, de la que también estos autores aislaron *Salmonella*, por un accidente de laboratorio no se pudo trabajar para recuento y aislamiento de coliformes.

En esta Tabla se puede observar que las muestras tenían altos recuentos de coliformes con un mínimo de 2.600 por gramo y un máximo de 20.000 por gramo. La relación de confirmación fue siempre muy alta, con un mínimo de 80% de confir-

T A B L A N U M E R O 4

Recuento y confirmación de bacterias coliformes en las muestras de concentrados de las cuales se aisló *Salmonella*.

Muestra Nº	Colonias de Colif./gr.		Coliformes por gramo	Confirmación en CBVB 2%, 48 hr.	Cepa Nº	I	M	Vi	C	Urea	Mot.
	× 10 ¹	× 10 ²									
10	DNPC	195	20.000	4/5	1	—	—	+	+	—	+
					2	—	—	+	+	—	+
					3	—	—	+	+	—	+
					4	—	—	+	+	—	+
51	190	33	2.600	5/5	1	—	—	+	+	+(1)	—
					2	—	—	+	+	—	+
					3	—	—	+	+	—	+
					4	—	—	+	+	—	—
					5	—	—	+	+	+(1)	+
55	DNPC	97	9.700	4/5	1	—	—	+	+	—	—
					2	—	—	+	+	—	—
					3	—	—	+	+	+(1)	+
					4	—	—	+	+	+(1)	+

maciones positivas. La distribución de frecuencia de los recuentos de coliformes respecto a los aislamientos de *Salmonella* se pueden ver en la fig. 1.

Otras interesantes correlaciones entre recuento y confirmación de coliformes y aislamiento de patógenos potenciales fueron:

Muestra 33 con recuento de <1/0.1 gr *Proteus vulgaris*. Muestra 49 con recuento de 600/gr y confirmación del 20%, *Citrobacter* sp. Muestra 51 con

recuento de 2.600/gr y confirmación de 100%, además de *Salmonella Proteus morgani*, *Arizona* y *Serratia*. Muestra 52 con 15.000/gr y confirmación de 40%, *Proteus vulgaris* y *Hafnia tetragena*. Muestra 53 con 250.000/gr y confirmación de 20%, *Proteus vulgaris*. Muestra 56 con 102.000/gr y confirmación de 0.0%, *Proteus rettgeri*. Muestra 57 con 2.800/gr y confirmación de 60%, *Proteus mirabilis*. Muestra 59 con 3.500/gr y confirmación de 100%, *Escherichia coli* y *Serratia* sp.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se demuestra por este trabajo la deficiente calidad microbiológica de los alimentos concentrados en base a recuentos de bacterias coliformes y su relación con aislamiento de organismos del género *Salmonella* y otros enteropatógenos.

Se comprueba la utilidad de medir cuantitativamente las bacterias coliformes en alimentos para animales, no tanto como índice de contaminación fecal ya que la mayoría de las cepas de coliformes aisladas eran del grupo *Aerobacter-Klebsiella*, sino como índice de calidad de las materias primas y del manejo del producto ya elaborado.

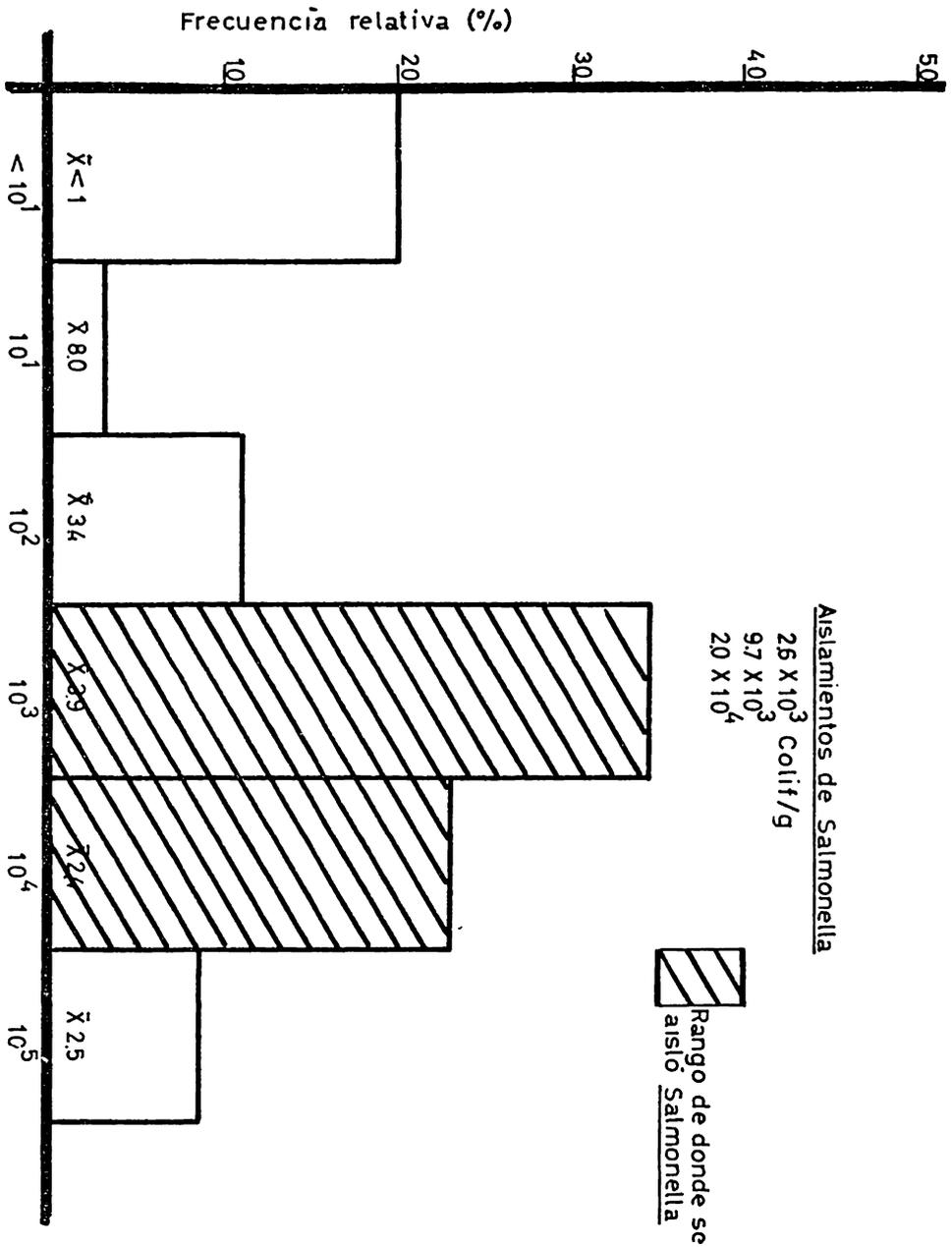
Se encuentra la interferencia de levaduras en los recuentos de coliformes pero solo en casos excepcionales.

Por el carácter de las muestras este trabajo no pretendió ser una investigación contundente sino solo un llamado a que trabajos similares se realicen. Estos futuros trabajos deberán hacerse en grupos de muestras específicas según especies de animales a que los concentrados estén dirigidos, a ingredientes usados y su proveniencia.

El control bacteriológico de los alimentos para animales y las plantas donde se elaboran es nuestra principal recomenda-

Figura No 1

RECUNTOS DE BACTERIAS COLIFORMES /G



ción a las entidades de salud pública y de control de insumos pecuarios.

Este control es esencial no solo por las implicaciones económicas que alimentos contaminados pueden tener en la po-

blación pecuaria del país, sino por el estrecho contacto que los concentrados para animales tienen con el hombre y los productos animales dirigidos a la alimentación del hombre.

R E S U M E N

Se estudiaron 35 de las muestras utilizadas en la primera parte de este trabajo para hacer recuentos de coliformes, evaluar los mismos, tipificar los grupos de coliformes presentes y correlacionar los recuentos y aislamientos con el aislamiento de enteropatógenas específicas. Se utilizaron métodos estándar internacionalmente reconocidos para las diluciones y los recuentos.

Se escogió el agar desoxicolato-lactosa para los recuentos en cajas o placas de Petri introduciendo una modificación llamada la técnica del "sandwich" Para la confirmación se subcultivaron cinco colonias de las cajas contables en caldo verde brillante bilis. Para el aislamiento y clasificación de cepas se usó el agar eosina azul de metileno con incubación a 45°C. Se practicaron pruebas bioquímicas adicionales según la forma IMViC adicionales con motilidad, producción de ureasa, confirmación de lactosa y producción de H₂S. Todos los medios usados eran estandarizados y se obtuvieron en forma deshidratada. El 57.1% de las muestras estudiadas dio recuentos en el rango $>10^3$ y $<10^5$ bacterias coliformes por gramo. En este grupo se encontraron las cuatro muestras de las cuales se había hecho aislamiento de *Salmonella*. El

8.6% de las muestras dio ~ 250.000 bacterias coliformes por gramo. El 11.4% de las muestras dio ~ 340 bacterias coliformes, el 2.9% dio 80 bacterias coliformes por gramo y el 20% dio < 10 bacterias coliformes por gramo.

El grupo *Klebsiella-Aerobacter* prevaleció en los aislamientos. Cuatro cepas dieron pigmento del tipo *Serratia*. Se observó la interferencia por levaduras en los recuentos en placa y se observó la necesidad de prevenir motilidad excesiva (colonias difusas) en los medios sólidos por la alta incidencia de contaminación por *Proteus*. Se correlacionaron también otros recuentos y su confirmación con cepas potencialmente patógenas de los grupos *Proteus*, *Providencia*, *Arizona*, *Escherichia*, *Citrobacter*.

Se estableció la importancia de los recuentos de las bacterias coliformes como índice de calidad bacteriológica en alimentos para animales y su correlación con presencia de patógenos. Se recomendó la realización de investigaciones futuras usando muestras discriminadas y el establecimiento de controles bacteriológicos para concentrados por parte de las entidades de salud pública y las encargadas de controlar los insumos pecuarios.

REFERENCIAS

1. American Public Health Association. 1966. *Recommended Methods for the Microbiological Examination of Foods*. American Public Health Association, Inc. New York.
2. American Public Health Association. 1968. *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. 12th Ed. American Public Health Association, Inc. New York.
3. American Public Health Association. 1965. *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*. 12th Ed. American Public Health Association, Inc. New York.
4. BURROWS, W. 1963. *Textbook of Microbiology*. 18th Ed. W. B. Saunders Co. Philadelphia.
5. COWAN, S. T. 1956. Taxonomic Rank of *Enterobacteriaceae* "groups". *J. Gen. Microbiol.* 15: 345-358.
6. Difco Laboratories. 1965. *Difco Manual*. 9th Ed. Digestive Ferment Company. Laboratories Incorporated. Detroit.
7. EWING, W. H. and P. R. EDWARDS, 1960. *The principal divisions and groups of Enterobacteriaceae and their differentiation*. *International Bull. Bact. Nomen. Taxon.* 10: 1-12.
8. FROBISTER, M. 1962. *Fundamentals of Microbiology*. 7th Ed. W. B. Saunders Co. Philadelphia.
9. KERELUK, K. and M. F. GUNDERSON. 1959. *Studies on the bacteriological quality of frozen meat pies II. A comparison of the methods for the enumeration of coliforms*. *J. Milk and Food Technol.* 22: 176-178.
10. HUBER, D. A., H. ZABOROWSKY and M. M. RAYMAN. 1958. *Studies on the microbial quality of precooked frozen meals*. *Food Technol.* 12: 190-194.
11. LEWIS K. H. and ROBERT ANGELOTTI. 1964. *Examination of Foods for enteropathogenic and indicator bacteria*. U.S. Pub. Health. Svc. Dept. HEW, HEW, Pub. N° 1142, 1964.
12. MANRIQUE G., H. MORALES y J. M. JIMÉNEZ. 1969. *Contaminación con enterobacteriáceas en concentrados para animales. I. Aislamiento de Salmonella y otros patógenos*. VII Congreso Nal. de Med. Vet. y Zoot. Universidad del Tolima. Ibagué.
13. NICKERSON J. T. R., G. J. SILVERMAN, M. SALBERG, D. W. DUNCAN and M. M. JOSELOW. 1962. *Microbial analysis of commercial frozen fish sticks*. *J. of Milk and Food Technol.* 25: 45-47.
14. Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud. 1963. *Normas para el examen de los productos lácteos*. Publicaciones científicas N° 84. Washington.
15. SILVERMAN, G. J., J. T. R. NICKERSON, D. W. DUNCAN, N. S. DAVIS, J. S. SCHLACHER and M. M. JOSELOW. 1961. *Microbial analysis of frozen raw and cooked shrimp*. I. General results. *Food Technol.* 15: 455-458.
16. TORRES, M. J. y H. JARAMILLO. *Aislamiento de Shigella flexneri, Proteus morgani, Providence y otras enterobacteriáceas de leches de consumo de Bogotá*. *Rev. Fac. Med. Vet. Zoot. Univ. Nal. Col.* 30 (1): 62-70.
17. TORRES, M. J., C. M. STOWE, R. H. GUIFFORD, LORELEI CHRISTL, J. PAZINSKI. 1967. *Estudio inicial de la higiene de las leches pasteurizadas en la ciudad de Bogotá*. *Rev. Fac. Med. Vet. Zoot. Univ. Nal. Col.* 30 (2): 61-70.
18. TORRES - ANJEL M. J. 1968. *Spore Removal by bacto-fugation and its effect on the ultra high sterilization of milk*. M. S. Thesis. Michigan State University, East Lansing.

