



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO

Aislamiento y detección de *Salmonella* en vegetales frescos empacados.

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Quizhpe Sarango, Mireya Noralma

DIRECTORA: Hualpa Salinas, Diana Inés, Mgtr

LOJA – ECUADOR

2017



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

Septiembre, 2017

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Magister.

Diana Inés Hualpa Salinas

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: “**Aislamiento y detección de *Salmonella* en vegetales frescos empacados**” realizado por Quizhpe Sarango Mireya Noralma, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, abril de 2017

f).....

Mgtr. Diana Inés Hualpa Salinas

Directora

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Quizhpe Sarango Mireya Noralma declaro ser autora del presente trabajo de titulación: **Aislamiento y detección de *Salmonella* en vegetales frescos empacados**, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Diana Inés Hualpa Salinas directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f:

Mireya Noralma Quizhpe Sarango

C.I. 1718539594

DEDICATORIA

Dedico especialmente este trabajo a Dios, por ser mí guía en el trayecto de vida, por brindarme las fuerzas que no me permitieron desmayar ante las dificultades que se me presentaron a lo largo de mi vida profesional, además por su infinito amor y bondad.

A mis amados padres, José Quizhpe y Sonia Sarango, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento, dándome todo lo que soy como persona, mis valores, principios y sobre todo amor. Los amo con mi vida.

A mi hermana Lourdes, por su apoyo incondicional por ser mi ejemplo a seguir, a mi hermano Jhosue por ser mi compañía y mi motivación constante.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por nunca dejarme sola, su sombra protectora me ha guiado siempre por el buen camino.

Desde lo más profundo de mi corazón agradezco a mis padres, por su sacrificio y esfuerzo, por estar apoyándome siempre para que este sueño se llevara a cabo, por enseñarme afrontar los obstáculos con alegría, que la perseverancia y el esfuerzo es el camino para lograr objetivos. Gracias por tanto amor.

A mis hermanos, por su cariño y paciencia.

A la Universidad Técnica Particular de Loja, por brindarme el espacio y la infraestructura donde desarrollar este trabajo. A mi Directora de Tesis, Mgtr. Diana Hualpa Salinas, por brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia para la concreción de este trabajo.

Y a todas las personas que de una y otra manera han estado para darme una voz de aliento en los momentos difíciles.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA	i
APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPITULO I.....	5
MARCO TEÓRICO	5
1.1. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA).....	6
1.1.1. Infección alimentaria.....	7
1.1.2. Intoxicación Alimentaria.....	7
1.1.3. Toxiinfección.....	7
1.2. Género <i>Salmonella</i>	7
1.2.1. Clasificación taxonómica.	8
1.2.2. Condiciones de supervivencia.	8
1.2.3. Reservorios y fuentes de infección.	8
1.2.4. Patogenia.	9
1.2.5. Epidemiología.....	9
1.2.6. Etapas para la detección de <i>Salmonella</i>	10
1.2.6.1. <i>Pre-enriquecimiento no selectivo</i>	10
1.2.6.2. <i>Enriquecimiento selectivo</i>	10
1.2.6.3. <i>Medios selectivos</i>	10
1.2.6.4. <i>Identificación bioquímica</i>	11
1.3. Inocuidad de Alimentos	11
CAPITULO II.....	13

MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
2.1. Materia prima.....	14
2.2. Muestreo y preparación de la muestra.....	14
2.3. Pre-enriquecimiento de las muestras.....	14
2.4. Enriquecimiento de las muestras.....	15
2.5. Aislamiento de <i>Salmonella</i>	15
2.6. Identificación preliminar de <i>Salmonella</i>	15
2.7. Identificación Bioquímica.....	16
CAPITULO III.....	17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
CONCLUSIONES.....	21
RECOMENDACIONES.....	22
BIBLIOGRAFÍA.....	23
ANEXOS.....	30
ANEXO A: Flujograma: Pesaje, pre-enriquecimiento y enriquecimiento de muestras...	31
ANEXO B: Aislamiento de <i>Salmonella</i>	33
ANEXO C: Colonias típicas aisladas en medios selectivos	34
ANEXO D: Identificación bioquímica	35
ANEXO E: Muestras presuntivas de <i>Salmonella</i> spp en pruebas bioquímicas.	36
ANEXO F: Resultados de pruebas bioquímicas	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies y subespecies del género <i>Salmonella</i>	8
Tabla 2. Muestras analizadas.....	14
Tabla 3. Morfología típica y atípica de <i>Salmonella</i> spp.	15
Tabla 4. Resultados de pruebas bioquímicas presuntivas para <i>Salmonella</i> spp.	16
Tabla 5. Muestras de vegetales empacados: Porcentaje de muestras presuntivas.	18
Tabla 6. Resultados de pruebas bioquímicas en vegetales empacados.	36
Tabla 7. Reacciones bioquímicas positivas de <i>Salmonella</i> spp.	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Agar XLD, BS y HE.....	33
Figura 2. Aislamiento de cepas típicas de <i>Salmonella</i> spp en agar BS.	34
Figura 3. Aislamiento de cepas típicas de <i>Salmonella</i> spp en agar XLD	34
Figura 4. Aislamiento de cepas típicas de <i>Salmonella</i> spp en agar HE.	34
Figura 5. Presencia presuntiva de <i>Salmonella</i> spp.....	36

ABREVIATURAS

ETA:	Enfermedades Transmitidas por Alimentos
FDA:	Agencia de Alimentos y Medicamentos
OMS:	Organización Mundial de la Salud
ACIA:	Agencia de Comité de Ciencias de Seguridad Alimentaria
BPM:	Buenas Prácticas de Manufactura
µm:	Micras
spp:	Varias especies del mismo género
UFC:	Unidades formadores de Colonias
XLD:	Agar desoxicolato xilosa lisina
BS:	Agar sulfito bismuto
HE:	Agar Hektoen entérica
uL:	Microlitros
TT:	Caldo Tetracionato
RV:	Caldo Rappaport Vassiliadis
TSI:	Agar Triple Azúcar-Hierro
LIA:	Agar Hierro-Lisina

RESUMEN

Salmonella spp es una bacteria que causa el mayor número de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) en el mundo, ha sido asociada a alimentos de origen animal, aunque en la última década también al consumo de vegetales. El objetivo de esta investigación fue detectar la presencia de cepas presuntivas de *Salmonella* aislados de vegetales frescos empacados: lechuga, espinaca, albahaca, culantro, perejil y brotes de soya que se expenden en los supermercados de la ciudad de Loja. En total se analizaron 60 muestras, cuya determinación se realizó por un método estándar de detección: pre-enriquecimiento, enriquecimiento, aislamiento e identificación bioquímica. Los resultados indican que el 18.3 % de las muestras analizadas, tuvieron presencia presuntiva de *Salmonella* spp, incumpliendo el requisito normativo para este tipo de productos y puede ser considerado un riesgo para la salud del consumidor.

PALABRAS CLAVES: *Salmonella* spp, vegetales frescos empacados, ETA.

ABSTRACT

Salmonella spp is a bacterium that causes the largest number of foodborne diseases (ATS) in the world, has been associated with food of animal, origin although in the last decade also to the consumption of vegetables. The objective of this research was to detect the presence of presumed strains of *Salmonella* isolated from fresh packaged vegetables: lettuce, spinach, basil, coriander, parsley and soybean shoots sold at supermarkets in the city of Loja. In total, 60 samples were analyzed and determined by a standard detection method: pre-enrichment, enrichment, isolation and biochemical identification. The results indicate that 18.3% of the analyzed samples had a presumed presence of *Salmonella* spp, in breach of the normative requirement for this type of products and can be considered a risk to the health of the consumer.

KEY WORDS: *Salmonella* spp, fresh packaged vegetables, ETA.

INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (2015) las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) constituyen un problema creciente a nivel mundial, nacional y local, que se genera por la ingesta de alimentos y de agua contaminada por microorganismos patógenos. La contaminación puede darse en cualquier etapa del proceso que abarca desde la producción hasta el consumo de alimentos, y puede verse afectado por el ambiente, el agua, la tierra o el aire (Olsen *et al.*, 2013). La calidad nutricional de los vegetales depende de la calidad higiénica y sanitaria a los que son sometidos; la mayoría de estos no se cultivan en medios controlados motivo por el cual las verduras pueden ser susceptibles a contaminación microbiana (Delbeke *et al.*, 2015).

Los vegetales frescos son reconocidos como fuentes potenciales de infección bacteriana debido al número de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, los patógenos que se encuentran implicados incluyen *E.coli* O157:H7, *Salmonella* ssp, *Listeria monocytogenes* y *Shigella* (Aytac *et al.*, 2010). Los brotes de enfermedades transmitidos por los alimentos están vinculados directamente con productos contaminados con agentes patógenos durante la preparación o al servirse (Denis *et al.*, 2016).

La presencia de patógenos bacterianos: *Salmonella* spp, *E.coli* O157: H7 y *Shigella* según lo indica Arthur *et al.* (2007) prevalece desde la cosecha del alimento hasta el consumo del producto, las enfermedades causadas por alimentos se ha vuelto un problema crítico y severo con frecuencia en países en vías desarrollo que está sujeto a una serie de exposiciones y operaciones que convierten al alimento en un elemento de riesgo para la salud. *Salmonella* son bacilos Gram negativos (0.7 a 1.5 x 5 µm) no fermentadores de lactosa, fermentan glucosa con producción de ácido y gas (excepto la *S. Typhi*), siendo un problema serio que ocurre anualmente en todo el mundo (Abbot, 1999). Salmonelosis es una enfermedad exclusivamente de origen alimentario, siendo la fuente más frecuente de infección los alimentos contaminados con este patógeno, como también puede ocurrir por transmisión de persona a persona (Caffer *et al.*, 2008).

El propósito de este estudio, centra su atención en el aislamiento de cepas presuntivas de *Salmonella*, en vegetales frescos empacados. El presente estudio se divide en tres capítulos: El Capítulo I, hace referencia al marco teórico enfocándose a presentar el problema en forma general, descripción de los principales temas de interés de la

investigación, en el Capítulo II, se detalla la metodología y los métodos utilizados en el muestreo y el Capítulo III, describe los resultados y la discusión generadas en el estudio.

Debido al alto número de infecciones dadas por alimentos en los últimos años, se han realizado estudios en vegetales frescos, con la finalidad de determinar crecimiento de microorganismos patógenos, motivo por el cual nos planteamos desarrollar este proyecto teniendo como objetivo determinar la presencia presuntiva de *Salmonella* en vegetales frescos empacados desarrollado por el método de detección.

Para el cual, se siguió la metodología según la FDA (Andrews *et al.*, 2014), teniendo como primer paso una etapa de pre-enriquecimiento, enriquecimiento, aislamiento en agares selectivos y diferenciales, a partir de estas muestras se realizó pruebas bioquímicas: TSI, LIA y Urea, reportando presencia presuntiva de *Salmonella* en 25 g de muestra.

Los resultados evidenciaron un 18.3 % de muestras contaminadas con presencia presuntiva de *Salmonella*, considerando estos alimentos como posibles factores de riesgos, relacionados al consumo de alimentos contaminados que pueden derivar en enfermedades transmitidas por alimentos.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)

Las ETA se producen por la ingesta de alimentos y agua contaminada con microorganismos patógenos que originan una enfermedad de origen alimentario (Mendiola, 2002). Los alimentos que consumimos pueden causar enfermedades ya que actúan como un vehículo en la transmisión de organismos patógenos, afectando la salud de quien lo consume (Berger *et al.*, 2010). Cuando dos o más personas consumen el mismo alimento y se ven afectadas por la misma enfermedad estamos hablando de un brote de ETA, los productos implicados leche, queso, huevos, carne, pescado, jugos envasados, frutas y verduras son alimentos con alto riesgo de estar contaminados (FAO/WHO, 2008).

El consumo de alimentos contaminados con patógenos tales como *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*, desencadena enfermedades de origen alimentario que habitualmente pueden ser infecciosas y tóxicas (Chakroun *et al.*, 2016). Esta transmisión depende de medidas de producción, cosecha y comercialización ya que las verduras crudas se contaminan por el agua de riego contaminada, el suelo de cultivo, los abonos de origen animal, materiales de transporte y el manejo humano si no se manipulan de manera correcta (Traoré *et al.*, 2015). Los alimentos se ven afectados por la exposición de la luz solar ya que es el ambiente ideal para la reproducción de microorganismos, dejarlos a temperatura ambiente sin una conservación adecuada favorece su multiplicación como también un inadecuado proceso de congelación, los alimentos que están contaminados con virus, bacterias, parásitos o sustancias químicas causan más de 200 enfermedades que van desde diarreas hasta cánceres (Lösch, 2010).

Según la FDA (2007), una ETA es una enfermedad a largo plazo que puede presentar diferentes síntomas dependiendo de la cantidad de alimento contaminado consumido, siendo la más frecuente diarreas y vómitos como también dolores abdominales, fiebre, dolor de cabeza y dificultades renales (Díaz *et al.*, 2012). La mayoría de las ETA va desde enfermedades pasajeras a graves que puede provocar incluso la muerte si son muy severas; siendo principalmente susceptibles: niños, ancianos, personas con defensas bajas y mujeres embarazadas (Valdez *et al.*, 2010). La concurrencia con la que se presenta las enfermedades transmitidas por alimentos está en aumento y se le debe atribuir a los alimentos listos para consumir, muy raramente son estériles por ser el ambiente idóneo para la multiplicación de diversos agentes microbianos (Murphy *et al.*, 2016).

1.1.1. Infección alimentaria.

Se debe a la ingesta de microorganismos patógenos que se encuentran en el alimento, los cuales han logrado crecer y multiplicarse en el alimento ingerido, de esta manera los microorganismos invaden el tracto intestinal como también órganos (Díaz *et al.*, 2012). Los agentes causales de estas infecciones son: *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria monocytogenes* (Mody, 2015).

1.1.2. Intoxicación Alimentaria.

Se produce por la ingesta de alimentos contaminados con toxinas de bacterias que están presentes en el alimento ingerido, que pueden multiplicarse e invadir la pared intestinal (Mody, 2015). Los microorganismos que producen toxinas son: *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* como también se pueda dar por la presencia de sustancias tóxicas que pueden estar presentes en el alimento, incorporándose de manera intencional o desde el momento de la producción hasta su consumo (Díaz *et al.*, 2012).

1.1.3. Toxiinfección.

Se da cuando se ingiere alimentos sobre el cual ha proliferado ciertos microorganismos, bacterias, parásitos, hongos, virus o directamente por toxinas que se han desarrollado y liberado en el organismo, provocando una serie de síntomas y signos de mayor a menor patogenicidad (Díaz *et al.*, 2012).

1.2. Género *Salmonella*

Salmonella es un bacilo Gram negativo, no formadores de esporas, que se mueven con flagelos peritricos (excepto *S. gallinarum*), anaerobio facultativo que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, producen ácido sulfhídrico (H₂S), fermentadores de glucosa, catalasa positiva y oxidasa negativa, pero no fermentan lactosa ni sacarosa (Leminor *et al.*, 1992; Miller *et al.*, 2000). La manifestación clínica más frecuente en el ser humano es la gastroenteritis, fiebres entéricas, y septicemia considerándose como el grupo de riesgo a niños menores de un año y ancianos (Pegues *et al.*, 2002). En la actualidad la *Salmonella* es considerada la causa más importante de enfermedades transmitidas por alimentos (Méndez *et al.*, 2006).

1.2.1. Clasificación taxonómica.

Salmonella está determinada por dos especies distintas: *Salmonella entérica* y *Salmonella bongori*, el serotipo está determinado por tres antígenos: el antígeno somático (O), el antígeno flagelar (H) y el antígeno de virulencia (Vi), la mayoría de serovariedades han sido aislados del hombre y de los animales de sangre caliente que pertenecen a la subespecie I (entérica) (Caffer *et al.*, 2008). Por lo tanto hay dos especies y 6 subespecies de *S. entérica* (Koneman, 2008):

Tabla 1. Especies y subespecies del género *Salmonella*.

Especies y subespecies	Hábitat común
1.- <i>Salmonella enterica</i>	
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	Animales de sangre caliente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	Animales de sangre fría y medio ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	Animales de sangre fría y medio ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	Animales de sangre fría y medio ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)	Animales de sangre fría y medio ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (VI)	Animales de sangre fría y medio ambiente
2.- <i>Salmonella bongori</i> (V)	Animales de sangre fría y medio ambiente

Fuente: Koneman, (2008)

1.2.2. Condiciones de supervivencia.

Salmonella spp tiene la capacidad de multiplicarse rápidamente, cuando pasa de los animales hospedadores a los alimentos (carne, huevos, leche, frutas, vegetales), puede duplicarse cada 15 a 20 min si la temperatura es elevada, siendo su temperatura óptima 30-37°C (Elika, 2013). Sobrevive períodos de tiempo largos, si son dejados en temperatura ambiente y pueden sobrevivir a la congelación durante varias semanas (Domínguez & Schaffner, 2009). Si los alimentos no se refrigeran pronto (límite de crecimiento 6°C) corren el riesgo de sufrir una contaminación con este microorganismo, por consiguiente la temperatura y el tiempo son dos factores claves en el desarrollo de *Salmonella* (Elika, 2013).

1.2.3. Reservorios y fuentes de infección.

Salmonella vive principalmente en el tracto gastrointestinal de los animales: aves de corral, ganado vacuno y porcino, animales marinos, e insectos como también el gato,

perro, y reptiles son el depósito para la diseminación de la enfermedad (Santhi *et al.*, 2012). La transmisión puede darse por el contacto de las personas con la materia fecal de los portadores, agua residuales y subterráneas que están contaminadas con este patógeno (Sykes & Marks, 2014). En los últimos años el aumento en el consumo de frutas y verduras ha incrementado los brotes de ETA, por la creciente demanda de alimentos pre-cortados y pre-ensados que induce los nuevos problemas de salud pública por ser el medio idóneo que favorece el crecimiento bacteriano (Warriner *et al.*, 2009; Doyle & Buchanan, 2012; Leff & Fierer, 2013).

También se han identificado como fuentes de infección los vegetales frescos consumidos crudos en ensaladas, el deterioro puede darse antes de la recolección y se puede ver alterado por cualquier circunstancia que altere su aspecto físico, permitiendo así el ingreso del microorganismo (Aytac *et al.*, 2010). Muchas verduras se venden embolsadas y empacadas pero necesitan de un lavado previo antes de su consumo, para evitar desarrollar enfermedades transmitidas por alimentos (Andrews *et al.*, 2007).

1.2.4. Patogenia.

Salmonella es una de las bacterias patógenas zoonóticas de gran interés y la principal causa de salmonelosis, afecta generalmente a la zona intestinal y rara vez a la circulación sanguínea siendo la más común de intoxicaciones alimentarias, la vía de transmisión es fecal-oral a través de los alimentos y agua contaminada con heces de humanos, animales, utensilios de cocina o por contacto directo de persona a persona (Sykes & Marks, 2014). La salmonelosis se caracteriza por un periodo de incubación de 12 a 72 horas, produciendo después: diarrea, dolor abdominal, fiebre, náuseas, y cuadros de deshidratación que dependen de la gravedad de la enfermedad, en algunos casos puede quedar secuelas crónicas si no se la trata a tiempo (Koneman, 2008). Las temperaturas elevadas están relacionadas a infecciones causadas por *Salmonella* permitiendo amplificar la replicación bacteriana y la transmisión a los cultivos alimentarios (Jiang *et al.*, 2015).

1.2.5. Epidemiología.

Salmonella afecta a millones de personas en el mundo, siendo el segundo agente más importante de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) (Andrews *et al.*, 2007), Según la OMS (2015), la mayor parte de salmonelosis son leves aunque en ocasiones puede causar la muerte, dependiendo de la cepa de *Salmonella* en cuestión, desde el

punto de vista epidemiológico, la gastroenteritis por *Salmonella* puede presentarse en pequeños brotes en la población general, sin embargo no es raro que se presente brotes colectivos en hospitales, guarderías, colegios, restaurantes (Méndez, 2007)

1.2.6. Etapas para la detección de *Salmonella*

La presente técnica para la detección de *Salmonella* en alimentos, se basa en métodos convencionales que nos va a permitir recuperar *Salmonella* mediante un esquema general que consiste en 4 pasos básicos: pre-enriquecimiento, enriquecimiento, siembra en agares selectivos y pruebas bioquímicas (Moreno & Mossel, 2006).

1.2.6.1. Pre-enriquecimiento no selectivo.

Según Koneman (2008), esta técnica consiste en mezclar el alimento con un medio nutritivo no selectivo, el cual permite la restauración de cepas de *Salmonella*, ya que es un medio rico en nutrientes y no contiene inhibidores de crecimiento bacteriano (D'Aoust et al., 2001)

1.2.6.2. Enriquecimiento selectivo.

Según Andrews *et al.*, (2001) la etapa de enriquecimiento selectivo nos permite incrementar las poblaciones de *Salmonella* y por otro lado inhibir otros microorganismos presentes. Los caldos comúnmente utilizados son: tetrionato (TT), selenito con cistina (SC), rappaport-vassiliadis (RV), que sumando los tiempos y temperatura de incubación van a permitir el desarrollo del microorganismo sobre otros. (Moreno & Mossel, 2006).

1.2.6.3. Medios selectivos.

Esta técnica nos permite aislar cepas de *Salmonella* ya que son medios selectivos y de diferenciación para el aislamiento de patógenos entéricos gram negativos ya que inhibe el desarrollo de algunos coliformes y otras bacterias no fermentadoras de lactosa facilitando el reconocimiento visual característico de las colonias sospechosas (Fleming & Hunt, 2008). Contienen sustancias selectivas como sales biliares o desoxicolato, verde brillante o el sulfito de bismuto, lo que permite inhibir a los gram positivos y a las bacterias no entéricas para poder diferenciar a *Salmonella* (Andrews *et al.*, 2001). Según Marshall (1992), se utiliza agares como: xilosa lisina desoxicolato (XLD), bismuto sulfito (BS), Hektoen (HE), MacConkey, *Salmonella-Shigella* (SS).

1.2.6.4. **Identificación bioquímica**

Este paso permite la identificación de los cultivos de *Salmonella*, y la eliminación de cultivos sospechosos falsos, se fundamentan en detectar si el microorganismo es capaz de fermentar azúcares, la presencia de enzimas y degradación de compuestos (Marshall, 1992). La identificación de *Salmonella* se da por reacciones en los medios de cultivos TSI, LIA y con pruebas de la ureasa (Koneman, 2008).

UREA: Es una amina que se hidroliza fácilmente, con liberación de amoníaco y dióxido de carbono, utilizando la enzima ureasa para producir alcalinización e hidrolisis de la urea y se produce el cambio de color de amarillo a fucsia. *Salmonella* es urea negativa (Marshall, 1992).

LIA: Las especies de *Salmonella* producen una reacción alcalina para la descarboxilación de la lisina (Moreno & Mossel, 2006).

TSI: Una cepa de *Salmonella* típica produce ácido y gas a partir de la glucosa, no utiliza la lactosa y sacarosa en este medio (Marshall, 1992).

1.3. **Inocuidad de Alimentos**

Los vegetales empacados son verduras y hortalizas frescas que no tienen ningún tratamiento higienizante, en general son alimentos de alto riesgo, muy perecederos que necesitan refrigeración, además pertenecen a alimentos de primera gama dado que no han sufrido ningún proceso térmico (Elika, 2012). Estos alimentos representan una opción fácil y nutritiva para el consumidor aunque en algunos casos representan un riesgo en la salud de quien lo consume, porque pueden estar propensas a contaminación por microorganismos patógenos (Fang *et al.*, 2003).

La lechuga (*Lactuca sativa*), se la cultiva con fines alimenticios habitualmente para consumirla cruda en ensaladas o utilizarla en batidos, o zumos que aportan propiedades beneficiosas para la salud, las variedades de lechuga son diferentes; dependiendo del borde de la hoja pueden ser lisos, ondulados o aserrados y la textura varia de suave a robusta, esta verdura es rica en antioxidantes y minerales, su ciclo de vida es corto por lo que se recomienda refrigeración (Bio, 2007).

La albahaca (*Ocimum basilicum*) se la utiliza en la preparación de alimentos, se la pueda consumir fresca o seca para aderezar tanto a las ensaladas, sopas de verduras o guisos

en carnes, se la debe mantener en refrigeración durante cortos periodos de tiempo porque es un planta que es muy sensible a las heladas (Janick *et al.*, 1999).

La Espinaca (*Spinacea oleracea*) es una verdura delicada, se recomienda guardarla en refrigeración para mantener sus propiedades nutricionales y su sabor, se la consume cruda en ensaladas y en sopas por no más de 1 min para que no pierda gran parte de sus nutrientes (Licata, 2003).

Según, Pascal (2010) el culantro (*Eryngium foetidum*) es la hierba más utilizada en cocina para aderezar ensaladas, sopas, aderezos, pescados ya que es el ingrediente clave en la cocina, se recomienda tenerlo en refrigeración para mantener sus características organolépticas ya que cuando esta seca pierde su sabor característico.

El Perejil (*Petroselinum crispum*) es una hierba aromática utilizada de igual forma en la cocina para ser utilizada en la preparación de una gran variedad de platos, contiene una gran cantidad de vitaminas y minerales que ayuda a prevenir y combatir un gran número de enfermedades (Maroto, 1986).

Según, Cupillard (2001) los brotes de soja son alimentos bajos en colesterol, ricos en vitaminas y minerales, se los usa en preparaciones culinarias donde se los puede consumir crudos en ensaladas. Por consiguiente estos alimentos deben ser incluidos en un nivel de riesgo para la población ya que son alimentos que consumimos todos los días y al ser vegetales de riesgo pueden se causales de enfermedades conocidas como ETA (Rega, 2005).

Se ha evidenciado que los malestares provocados por una intoxicación alimentaria se deben en parte a las condiciones en las que se encuentra el alimento, principalmente aquellos que no necesitan de cocción sino que se los consume crudos, presentando toxinas y agentes como parásitos, bacterias y virus (Pascual, 2005). En general, la producción de vegetales empacados no depende solo del lugar de su producción sino también de las personas que toman contacto con ellos, por lo que es fundamental cumplir con normas de prevención para evitar la contaminación de los alimentos y la propagación de ETA (Zelaya, 2008).

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materia prima

En el desarrollo de este estudio se trabajó con 60 muestras de vegetales frescos empacados en bolsas de polipropileno (lechuga, espinaca, albahaca, culantro, perejil y brotes de soya) realizándose diferentes muestreos por cada una de ellas. Las muestras fueron recolectadas de los principales supermercados de la localidad, las cuales fueron transportadas en condiciones asépticas al laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad Técnica Particular de Loja para su respectivo análisis, sin que difiera en sus características organolépticas.

2.2. Muestreo y preparación de la muestra

La obtención de las muestras se realizó en función de la cantidad de productos disponibles en el sitio de expendio basándose en la norma: muestreo de hortalizas y frutas frescas (INEN 1750:2002), se seleccionaron 3 unidades al azar de cada tipo de vegetal, de un lote no mayor a 50 unidades (**Tabla 1**). Para la preparación de la submuestra de 25 gramos, se aplicaron las recomendaciones establecidas por la norma: control microbiológico de los alimentos y preparación de las muestras (INEN 1529-2:2013), la cual nos dice que si el alimento está formado por capas o extractos tomar equitativamente cada una de las partes de cada muestra sin contaminarlas.

Tabla 2. Muestras analizadas

Muestras	Nº de Muestras	Unidades por muestra
Lechuga	10	3
Espinaca	10	3
Perejil	10	3
Culantro	10	3
Albahaca	10	3
Brotes de soya	10	3
TOTAL	60	

2.3. Pre-enriquecimiento de las muestras

Utilizando el método de la U.S FDA Bacteriological Analytical Manual, Capítulo 5, apartado C (Andrews *et al.*, 2014):

1. Se pesó 25 g de cada uno de los vegetales frescos, y se colocó 225 ml de caldo lactosa (**Anexo A**), se mezcló manualmente y se dejó reposar a temperatura ambiente durante $60 \pm 5,0$ min.
2. Se midió el pH y si es necesario hay que ajustarlo a $6,8 \pm 0,2$ con NaOH 1N o HCl 1N. Se incubó a $35^\circ \pm 2,0^\circ$ C durante $24 \pm 2,0$ horas.

2.4. Enriquecimiento de las muestras

Según la U.S FDA Bacteriological Analytical Manual, Capítulo 5, apartado C (Andrews *et al.*, 2014) se sigue el respectivo procedimiento:

1. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se agitó suavemente las muestras, y se transfirió 1 ml de la mezcla a 10 ml de Tetrionato (TT) y 0,1 ml de la mezcla a 10 ml a Rappaport- Vassiliadis (RV) (**Anexo A**).
2. Finalmente se incubó los medios de enriquecimiento selectivo bajo las siguientes condiciones: TT por 24 ± 2 horas a $35^\circ \pm 2,0^\circ$ C y el RV por 24 ± 2 horas a $42^\circ \pm 2,0^\circ$ C en baño maría.

2.5. Aislamiento de *Salmonella*

De cada caldo se sembró una asada en los diferentes agares: agar sulfito bismuto (BS), agar desoxicolato lisina (XLD) y agar Hektoen entérica (HE) y se incubó las placas a 35° C 24 ± 2 horas (**Anexo B**).

2.6. Identificación preliminar de *Salmonella*

Después de 24 ± 2 horas de incubación, se examinaron las placas con presencia de colonias típicas que pueden ser sospechosas de *Salmonella* spp (**Anexo C**).

Tabla 3. Morfología típica y atípica de *Salmonella* spp.

AGAR	CARACTERÍSTICAS DE CEPAS TÍPICAS
XLD	Colonias de color rosa con o sin centro negro, brillantes, pueden aparecer colonias completamente negras.
HE	Colonias azul-verdes con o sin centro negro, colonias de <i>Salmonella</i> con grandes centros negros brillantes o

	completamente negras.
BS	Colonias negras marrón o gris, brillo metálico en raras ocasiones (ANEXO C).
CARACTERISTICAS DE CEPAS ATÍPICAS	
XLD, HE	Colonias amarillas con o sin centro negro
BS	Colonias verdes con o sin oscurecimiento pequeño del medio circulante

Fuente: Andrews *et al.*, (2007).

2.7. Identificación Bioquímica

Se transfirió la colonia típica de cada medio selectivo, y se inoculó por picadura y estriado en los tubos con agar TSI, LIA y UREA (**Anexo D**). Se incubó los tubos a 24 ± 2 horas a $35^\circ \pm 2.0^\circ$ C. Transcurrido este lapso de tiempo, se procedió a leer las pruebas bioquímicas con características presuntivas para *Salmonella* spp (**Anexo E y F**).

Tabla 4. Resultados de pruebas bioquímicas presuntivas para *Salmonella* spp.

PRUEBA BIOQUÍMICA	RESULTADO PARA SALMONELLA
TSI	K/A H ₂ S
LIA	POSITIVA
UREA	NEGATIVA

Fuente: Andrews *et al.*, (2014).

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la actualidad los vegetales frescos tienen una gran demanda a la hora de servir por la facilidad de preparación que se consumen crudas o se les agrega a los alimentos después de cocinar como un condimento o por decoración, razón por la cual se han asociado a infecciones de tipo alimentario (Zweifel & Stephan, 2012). Los vegetales son componentes esenciales de una dieta saludable, el consumo de los mismos se ha incrementado considerablemente, no obstante debido a malas prácticas desde su cosecha hasta su comercialización se convierten en la fuente principal de transmisión de enfermedades (Gunel *et al.*, 2015).

Se analizaron un total de 60 muestras de las cuales el 18.3 %, es decir 11 muestras (**Tabla 4**) presentaron crecimiento bacteriano con presencia presuntiva para *Salmonella*.

Tabla 5. **Porcentaje de muestras presuntivas de vegetales empacados.**

Producto	No. de muestras analizadas	Presencia Presuntiva de <i>Salmonella</i> spp.	
		n°	%
LECHUGA	10	1	10
ESPINACA	10	2	20
PEREJIL	10	2	20
CULANTRO	10	2	20
ALBAHACA	10	2	20
BROTOS DE SOYA	10	2	20
TOTAL	60	11	18.3

Según el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, 2013), las enfermedades transmitidas por alimentos causan el mayor índice de infecciones y muertes, siendo *Salmonella* el segundo agente más común de brotes afectando al 34 % de los casos (Chaves *et al.*, 2016).

Utilizando un plan de muestreo, se puede establecer la calidad microbiológica de un lote de alimentos (Kaur & Jain, 2012). Según Centre for Food Safety of Hong Kong, (2014) y lo establecido por la Norma: Calidad e inocuidad de los alimentos y bebidas de consumo humano MINS/DIGESA (2008), *Salmonella* spp en vegetales frescos debe estar ausente para considerarlo un parámetro satisfactorio, por tal motivo, la sola presencia de este patógeno es considerada peligrosa para la salud humana. Los resultados de la presente investigación indican que el 18.3 % de vegetales frescos empacados: lechuga, espinaca, albahaca, culantro, perejil y brotes de soya, demuestran la presencia presuntiva de *Salmonella*, las mismas que no cumplen con las condiciones de calidad microbiana establecida en la norma.

En consecuencia de los múltiples factores que están asociados a la contaminación de vegetales y por el aumento de infecciones alimentarias, se han reportado estudios en países europeos, en los cuales se ha obtenido presencia de *Salmonella* (CBI, 2010; Elviss *et al.*, 2009; Zweifel & Stephan, 2012), en Noruega por Delbeke *et al.*, (2015) el cual al analizar vegetales frescos: albahaca, menta y culantro, se detectó la presencia de *Salmonella* en un 28 % del total de las muestras analizadas, provenientes del sureste asiático, estos datos se relacionan al ambiente donde fueron producidos, suelos de cultivo que no mantuvieron las condiciones adecuadas son fuentes de contaminación microbiana (Elviss, *et al.*, 2009).

Valores inferiores a los obtenidos en nuestra investigación se han reportado en Tailandia por Brackett (1994) quien indica una prevalencia de 13,1% correspondiente a *Salmonella* en cuatro variedades de albahaca, provenientes del sudeste asiático dieron como resultado la detección de este patógeno, aunque hay poca información sobre la calidad sanitaria y las razones de su contaminación, en México por Quiroz *et al.*, (2009) quienes demostraron un 11 % correspondiente a *Salmonella* en muestras de culantro, en Turquía datos similares por Elviss *et al.*, (2009) quienes demostraron un 10 % correspondiente a *Salmonella* en muestras de culantro y albahaca originados en campos agrícolas, en vista que el agua utilizada para su riego provenía de zonas ganaderas.

Otros porcentajes menores a los encontrados en nuestro estudio, se realizaron en la India donde se reportó que un 2,96 % en muestras de culantro, reveló la presencia de *Salmonella* obtenidos de huertas (Quiroz *et al.*, 2009), también en Reino Unido se reportó un brote alimentario por *Salmonella* 2 % en muestras de culantro, perejil, y albahaca

(Johnston *et al.*, 2009), un dato similar a lo indicado por Aytac *et al.*, (2010) en Israel se detectó el 1,7 % correspondiente a *Salmonella* proveniente de muestras de culantro y albahaca.

En Canadá se reportó una prevalencia de *Salmonella* de 0.03 %, en lechuga, espinaca, acelga, y cebolla, los productos se obtuvieron de los mercados minoristas que han estado implicados en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, obteniendo así un punto de referencia para la inocuidad de alimentos para considerarlos inaceptables (Oliveira *et al.*, 2010), las tasas de prevalencia son similares con estudios realizados en Estados Unidos por el Programa de Datos Microbiológicos del Departamento de Agricultura, realizados en 2001 y 2012 donde se detectó y aisló patógenos bacterianos *Campylobacter*, *Salmonella*, *E.coli* O157, aunque la presencia de estos patógenos fue baja, hubo un porcentaje alto en *Shigella* 28 %, encontrados en cebollas, verduras de hojas , culantro y melón (Denis *et al.*, 2016).

Según estudios en Washington al analizar muestras de culantro no se reportó presencia presuntiva de *Salmonella* en el total de muestras analizadas en el campo (Singh *et al.*, 2007), en Arabia Saudita tampoco se obtuvieron resultados de las 15 muestras estudiadas aunque de *E.coli* 1 %, por malas prácticas agrícolas durante su producción, distribución y venta del producto (Al-Holy *et al.*, 2013), un dato igual se reportó en Ontario por Arthur *et al.*, (2007) y al sur de los Estados Unidos, Johnston *et al.*, (2009) donde tampoco se detectó la presencia de *Salmonella* en albahaca y culantro de las 61 y 94 muestras analizadas respectivamente, según los estudios realizados se debe al bajo número de muestreo como también al comercio minorista.

El grado de infecciones por patógenos en alimentos, representa un riesgo alto en la transmisión de ETA, los resultados evidenciaron la presencia presuntiva de *Salmonella* en vegetales frescos empacados, motivo por el cual se requiere realizar estudios adicionales para confirmar el diagnóstico presuntivo, y aplicar otras técnicas como: identificación serológica y PCR.

CONCLUSIONES

- En 18.3 % de las muestras analizadas de vegetales frescos empacados, se encontró la presencia presuntiva de *Salmonella* spp.
- De acuerdo a la norma MINSA/DIGESA (2008), las muestras no cumplen con los criterios establecidos, por lo que representan un riesgo en la salud de los consumidores.

RECOMENDACIONES

Para validar las pruebas confirmatorias presuntivas es necesario realizar estudios de serotipificación, las mismas que consisten en confirmar la presencia de cepas de *Salmonella* en vegetales frescos empacados analizados en el muestreo, como también por estudios moleculares como PCR y otras técnicas que pueden complementar los resultados obtenidos.

Es importante la correcta manipulación de los alimentos que se consumen crudos (verduras, frutas) porque no son sometidos a ningún proceso térmico, necesitando de un proceso de lavado, refrigeración y de una desinfección antes de su consumo, con el fin de disminuir el riesgo de una enfermedad de origen alimentario.

Se considera la necesidad de tomar medidas de prevención sobre los posibles factores de riesgos, concientizando a los consumidores de aplicar buenas prácticas de higiene, de igual forma el implemento de datos epidemiológicos por la salud pública, tomando como referencia el presente proyecto para estudios analíticos que permitan analizar la incidencia y la prevalencia de *Salmonella*, con el fin de disminuir los brotes de ETA.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbot, Sh. (1999). *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter and Serratia. The Manual of Clinical Microbiology: American Society for Microbiology. Washington, 7(2), 475 - 482.*
- Al-Holy, M., Osaili, T., El-Sayed, S., AlShamari, E., Ashankyty, I. (2013). Microbiological quality of leafy green vegetables sold in the local market of Saudi Arabia. *Italian Journal of Food Science, 25 (1), 446-452.*
- Andrews, W.H., Flowers, R.S., Silliker, J., Bailey, S. (2001). *Salmonella: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Washington, 12 (4), 357-380.*
- Andrews, W.H., Feng, B., Candish, A. (2007). *Salmonella: three validation programs for methods used in the microbiological analysis of foods. Food Sci.Technol, 7 (2) 147-151.*
- Andrews, W., Jacobson, A., Hammack, T. (2014). *Bacteriological Analytical Manual, Food and Drug Administration (FDA): Salmonella. Washington. Recuperado de <https://www.fda.gov>.*
- Arthur, L., Jones, S., Fabri, M., Odumeruz, J. (2007). Microbial survey of selected Ontario-grown fresh fruits and vegetables. *Food Protection, 70 (1), 2864-2867.*
- Aytac, S.A., Ben, U., Cengiz, C., Taban, B.M. (2010). Evaluation of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* contamination on leafy green vegetables. *Food Agriculture & Environment, 8 (2), 275-279.*
- Berger, C. N., Sodha, S. V., Shaw, R. K., Griffin, P. M., Pink, D., Hand, P. (2010). Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology, 12 (9), 2385-2397.*
- Bio, T. (2007). *Lechuga: Características y beneficios de la lechuga. Recuperado de <http://biotrendies.com/>*
- Brackett, R.E. (1994). Microbiological spoilage and pathogens in minimally processed fruits and vegetables. *Brazilian Journal of Microbiology, 44 (3) , 269-312.*

- Caffer, M. I., Terragno, R., Binsztein, N. (2008). Manual de Procedimientos Diagnóstico y caracterización de *Salmonella* spp. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, 12 (1), 76- 130.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Food borne Disease Outbreaks. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks (2013). United States. Recuperado de <http://www.cdc.gov/foodsafety.html>
- Centre for Food Safety of Hong Kong. Microbiological Guidelines for Food: For ready-to-eat food in general and specific food items (2014). Hong Kong. Recuperado de <https://www.cfs.gov.hk/eindex.htm>
- Chakroun, I., Cordero, H., Mahdhi, A., Morcillo, P., Fedhila, K., Cuesta, A., Esteban, M. Á. (2016). Adhesion, invasion, cytotoxic effect and cytokine production in response to atypical *Salmonella* Typhimurium infection: Microbial Pathogenesis. Recuperado de <http://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.11.004>
- Chaves, R. D., Martinez, R. C., Rezende, A. C. B., Rocha, M. D., Oteiza, J. M., Sant, A. (2016). *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat leafy vegetables. In *Food Hygiene and Toxicology in Ready to Eat Foods*, 8 (2), 123–149.
- Cupillard, V. (2001). Semillas germinadas y brotes tiernos. Editorial Hispano-Americana, 6 (1), 56-87.
- CBI, (2010). CBI market survey: The spices and herbs market in the EU. Recuperado de <http://www.crecemype.pe/portal/>
- D'Aoust, J., Maurer, J., Bailey, J.S. (2001). *Salmonella* Species. *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*, 32 (2), 141-157.
- Delbeke, S., Ceuppens, S., Jacxsens, L., Uyttendaele, M. (2015). Microbiological analysis of pre-packed sweet basil (*Ocimum basilicum*) and coriander (*Coriandrum sativum*) leaves for the presence of *Salmonella* spp. and Shiga toxin-producing *E. coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 23 (2), 11–18.
- Denis, N., Zhang, H., Leroux, A., Trudel, R., Bietlot, H. (2016). Prevalence and trends of bacterial contamination in fresh fruits and vegetables sold at retail in Canada. *Food*

Control, 67 (1), 225–234.

Díaz, T., Valdés, M., Caballero, A., Monterrey, P. (2012). Enfermedades transmitidas por alimentos: Causas más frecuentes en los niños. *Revista de Nutrición e Higiene*, 7(44), 42-44.

Dominguez, S. A., & Schaffner, D.W. (2009). Survival of salmonella in processed chicken products during frozen storage. *Food Prot*, 72(10), 2088-2092.

Doyle, M.P., & Buchanan, R.L. (2012). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, fourth ed ASM Press. Washington, 6 (2), 24-36.

Elika. (2012). *Frutas y Hortalizas listas para el consumo: IV Gama*. Madrid, España. Recuperado de <http://www.elika.eus>.

Elika. (2013). *Salmonella: Descripción de la bacteria*. Recuperado de <http://www.elika.net/datos/pdfs>

Elviss, N.C., Little, C.L., Hucklesby, L., Sagoo, S., Surman-Lee, S., Pinna, E., Threlfall, E.J. (2009). Microbiological study of fresh herbs from retail premises uncovers an international outbreak of salmonellosis. *International Journal of Food Microbiology* 134 (1), 83-88

FAO/WHO. (2008). Microbiological risk assessment series 14: Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs. Recuperado de <http://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0452e/i0452e00.pdf>.

FDA. (2007). Bacteriological Analytical Manual (BAM): *Salmonella*. Recuperado de <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodScienceResearch>

Fang, T.J., Wei, Q.K., Liao, C.W., Hung, M.J., Wang, T.H. (2003). Microbiological quality of 18 degrees C ready to eat food products sold in Taiwan. *Food Microbiol*, 80 (1),241-50.

Fleming, D. O., & Hunt, D.L. (2008). *Biological Safety. Principles and Practices*, 3 (2), 34-45.

Gunel, E., Kilic, G., Bulut, E., Durul, B., Acar, S., Alpas, H., Soyer, Y. (2015). *Salmonella*

- surveillance on fresh produce in retail in Turkey. *International Journal of Food Microbiology*, 199 (3), 72–77.
- Janick, J., James, E., Morales, R., Phippen, B., Vieira, R. (1999). Aroma compounds and a popular culinary and ornamental herb. Perspectives on new crops and new uses. VAASHS Press, 35 (1), 1-25.
- Jiang, C., Shaw, K. S., Upperman, C. R., Blythe, D., Mitchell, C., Murtugudde, R., Sapkota, A. (2015). Climate change, extreme events and increased risk of salmonellosis in Maryland, USA: Evidence for coastal vulnerability. *Environment International*, 83 (2), 58–62.
- Johnston, L.M., Jaykus, L.A., Moll, D., Martinez, M.C., Anciso, J., Mora, B. (2009). A field study of the microbiological quality of fresh produce. *Journal of Food Protection*, 68 (4), 1840-1847.
- Kaur, J., & Jain, S. K. (2012). Role of antigens and virulence factors of *Salmonella enterica* serovar Typhi in its pathogenesis. *Microbiological Research*. Recuperado de <http://doi.org/10.1016/j.micres.2011.08.001>
- Koneman, E. (2008). Análisis Microbiológico de los Alimentos: Microorganismos patógenos. *Médica Panamericana*, 6 (1), 30-44
- Leff, J.W., & Fierer, N., (2013). Bacterial communities associated with the surfaces of fresh fruits and vegetables.
- Leminor, L., Trüper, M., Dworkin, W. (1992). The genus *Salmonella*: A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. New York. Springer-Verlag, 2 (1), 2760-2774.
- Licata, M. (2003). La espinaca: beneficios, propiedades y nutrientes. Departamento de Agricultura de USA-National, 3 (6), 4-5.
- Lösch, L. S. (2010). Patógenos productores de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). *Revista de Inmunología y Microbiología Argentina*, 3(7), 3-6.
- Maroto, J.V. (1986). Perejil: Horticultura herbácea especial. Madrid. Ediciones Mundi-Prensa, 2 (1), 301-304.

- Marshall, R. T. (1992). Standard methods for the examination of Dairy Products. Washington. American Public Health Association, 2 (1), 1-15.
- Méndez, I. (2007). Epidemiología de la salmonelosis. Recuperado de http://www.madrimasd.org/blogs/salud_publica
- Méndez, N., Mossos, D., Mogollón, R. (2006). Epidemiological relationships among strains of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolated from humans, poultry and food. *Revista de la Facultad de Ciencias*, 11 (1), 5-13.
- Mendiola, D. (2002). Enfermedades Transmitidas por Alimentos: definición y clasificación. Ed. Díaz de Santos, 4 (2), 20-45.
- Miller, S.I., Hohmann, E.L., Pegues, D.A. (2000). *Salmonella: Principles and practices of infectious diseases*. Philadelphia, 12 (3), 13-33.
- Mody, R.K. (2015). *Foodborne disease. Principles and Practice of Infectious Diseases*. Elsevier Saunders, 8 (1), 103-107.
- Moreno, C., & Mossel, D. (2006). *Microbiología de Alimentos: manual de laboratorios*. Mexico. Ideaspropias Editorial S.L., 6 (3), 50-76.
- Murphy, S., Gaffney, M. T., Fanning, S., Burgess, C. M. (2016). Potential for transfer of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Senftenberg from contaminated food waste derived compost and anaerobic digestate liquid to lettuce plants. *Food Microbiology*, 59 (3), 7–13.
- NTE INEN 1529-2 (2013): Control microbiológico de los alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico.
- NTE INEN 1750 (2002): Hortalizas y frutas frescas. Muestreo
- NTS MINSA/DIGESA (2008). Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. Recuperado de <ftp://ftp2.minsa.gob.pe/normaslegales/2008/RM591-2008.pdf>
- Oliveira, M., Usall, J., Vinas, I., Anguera, M., Gatiús, F., Abadías, M. (2010). Microbiological quality of fresh lettuce from organic and conventional production. *Food*

Microbiology, 27(5), 679-684.

Olsen, S., MacKinnon, L., Slutsker, L. (2013). Enfermedades transmitidas por alimentos: Brotes y recomendaciones. *Centro de Vida*, 34(2), 125-128.

OMS, (2015). *Salmonella* (no tifoidea). Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/>

Pascal, J. A. (2010). Propiedades del culantro. *Revista de nutrición*. Ed Springer Science & Business Media.

Pascual, M. R. (2005). Enfermedades de origen alimentario: Su prevención. Ed Diaz de Santos, 8(2), 12-20.

Pegues, D.A., Ohl, S., Miller, D.(2002). *Salmonella* including *Salmonella typhi*: Infections of the gastrointestinal tract. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 12 (1),669-697.

Quiroz, S. C., Rodas, O.R., Vazquez, C.R., Fernandez, F.J., Vazquez, C. (2009). Prevalence of *Salmonella* in vegetables. Mexico. *Journal of Food Protection*, 72 (4), 1279-1282.

Rega, M.A. (2005). ETA: Enfermedades transmitidas por alimentos. Departamento de Epidemiología Alimentaria de la DGHYSA. Agencia Gubernamental de Control de la Ciudad de Buenos Aires, 12(3), 32-64.

Santhi, L. P., Sunkoji, S., Siddiram, S., Sanghai, S. S. (2012). Patent research in salmonellosis prevention. *Food Research International*, 45(2), 809–818.

Singh, B.R., Singh, P., Agrawal, S., Teotia, U., Verma, A., Sharma, S., Chandra, M., Babu, N., Agarwal, R.K. (2007). Prevalence of multidrug resistant *Salmonella* in coriander, mint, carrot, and radish in Bareilly and Kanpur, northern India. *Food borne Pathogens and Disease*, 4 (2), 233-240.

Sykes, J. E., & Marks, S. L. (2014). *Salmonellosis: Canine and Feline Infectious Diseases*. Recupera de <http://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0795-3.00045-4>

Traoré, O., Nyholm, O., Siitonen, A., Bonkoungou, I. J., Traoré, A. S., Barro, N., Haukka,

- K. (2015). Prevalence and diversity of *Salmonella enterica* in water, fish and lettuce in Ouagadougou, Burkina Faso. *BMC Microbiology*, 15 (1), 151-156.
- Valdez, G., Sedrés, M., Rodríguez, H., Guevara, G. (2010). Agentes bacterianos asociados a brotes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos. *Revista para la Salud*, 11(3), 1-15.
- Warriner, K., Huber, A., Namyar, A., Fan, W., Dunfield, K. (2009). Recent advances in the microbial safety of fresh fruits and vegetables. *Food Nutr*, 57 (2), 155-208.
- Zelaya, I. T. (2008). Contaminación alimentaria y control sanitario. *Revista de Mejorar la Salud*, 62(1), 453-456.
- Zweifel, C., & Stephan, R., (2012). Spices and herbs as source of *Salmonella* related foodborne diseases. *Food Research International*, 45 (2), 765-769.

ANEXOS

ANEXO A: Flujograma: Pesaje, pre-enriquecimiento y enriquecimiento de muestras

A.1 Preparación Caldo Lactosa, Caldo Tetrionato (TT) y Caldo Rappaport Vassiliadis (RV)

- **Caldo lactosa:** Pesar 13 g y diluir en 1000 ml de agua destilada y disolver.
 - Dispensar 225 ml de la solución preparada en un frasco boeco.
 - Autoclavar a 121 °C durante 15 min.
 - Sacar de la autoclave y dejar que enfrié.
 - Refrigerar a 4°C hasta su uso.

- **Caldo TT:** Pesar 46 g y diluir en 100 ml de agua destilada pura.
 - Calentar y agitar hasta punto de ebullición.
 - Dejar enfriar por debajo de los 60°C y colocar 2 ml de solución de yodo.
 - Dispensar 10 ml en tubos de ensayo estériles.
 - Utilizar la solución el mismo instante.

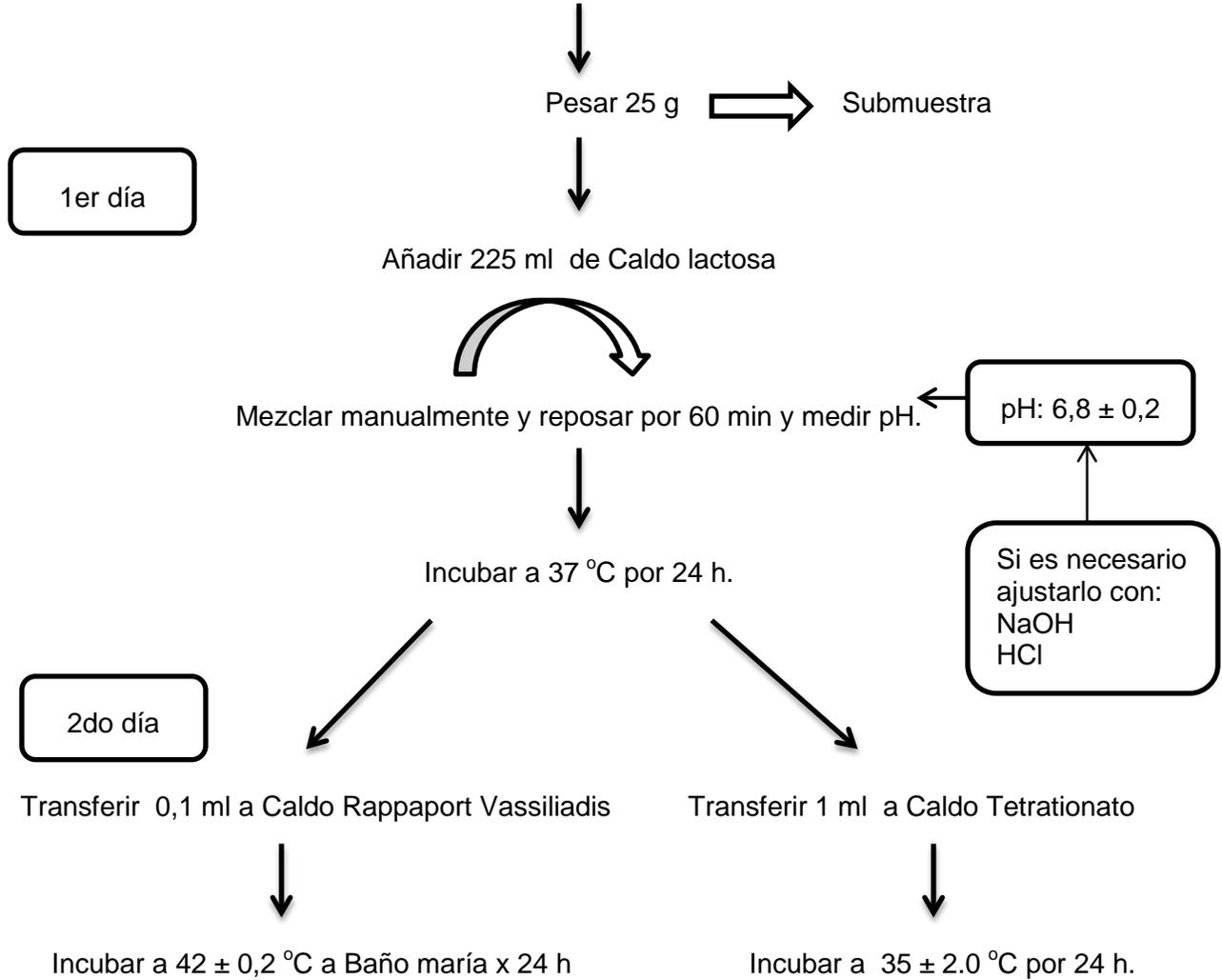
NOTA:

 - Preparación solución de yodo: yodo (I) →6 g ; yoduro de potasio (KI)→ 5 g; agua estéril → 20 ml
 - Disolver KI en 5 ml de agua estéril, luego añadir el yodo disolver y añadir los 15 ml de agua estéril.

- **Caldo RV:** Pesar 26.60 g y diluir en 1000 ml de agua destilada pura.
 - Dispensar 10 ml en tubos de ensayo.
 - Autoclavar a 121 °C durante 15 min.
 - Dejar enfriar y refrigerar a 4°C hasta su uso.

A.2 Pre-enriquecimiento y enriquecimiento de las muestras.

Productos: Lechuga, Espinaca, Albahaca, Culantro, Perejil y Brotes de Soya



ANEXO B: Aislamiento de *Salmonella*.

B.1 Preparación agar XLD, agar BS, agar HE

- **Agar XLD:** Pesar 56.93 g y diluir en 1000 ml de agua destilada y disolver.
- **Agar BS:** Pesar 56 g y diluir en 1000 ml de agua destilada y disolver.
- **Agar HE:** Pesar 76 g y diluir en 1000 m de agua destilada y disolver.
 - Calentar hasta punto de ebullición, agitar hasta disolución completa del medio.
 - Dispensar aproximadamente 20 ml en cajas petri plásticas y esperar hasta que el medio se solidifique.
 - Refrigerar a 4°C hasta su uso.

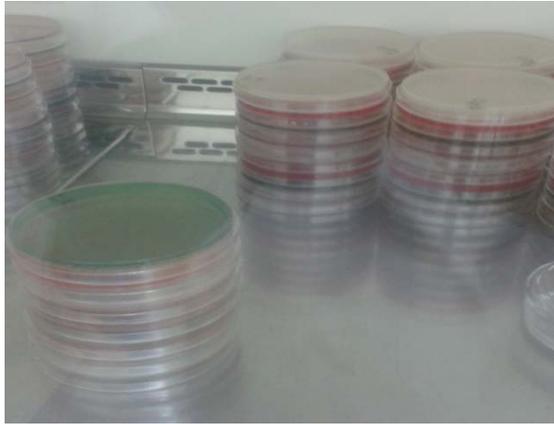


Figura 1. Agar XLD, BS y HE.

B.2 Siembra en medios selectivos

- Mezclar suavemente los tubos de enriquecimiento y tomar una asada de 50 uL de cada tubo de TT y RV.
- Sembrar de forma aislada por agotamiento en placas de agar XLD, agar BS y HE.
- Rotular adecuadamente las placas según el número de muestreo.
- Incubar a 37°C por 24 horas.
- Pasado este tiempo examinar las placas e identificar colonias en agar XLD de color rosa con o sin centro negro o colonias completamente negras, en agar BS colonias negras o gris a veces con brillos metálicos y en agar HE colonias negras brillantes. Considerar estas colonias como típicas para *Salmonella* spp.

ANEXO C: Colonias típicas aisladas en medios selectivos

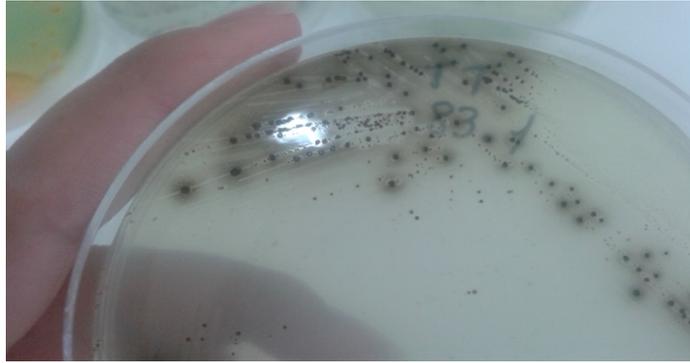


Figura 2. Aislamiento de cepas típicas de *Salmonella* spp en agar BS.

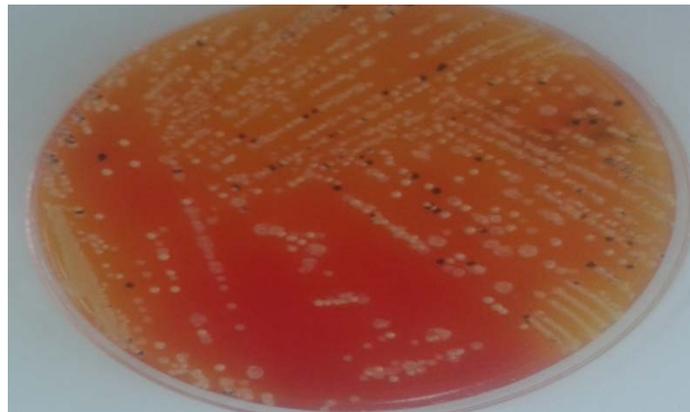


Figura 3. Aislamiento de cepas típicas de *Salmonella* spp en agar XLD

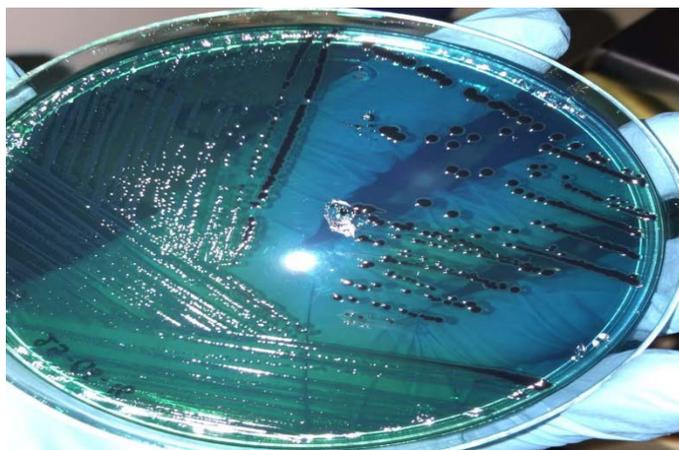


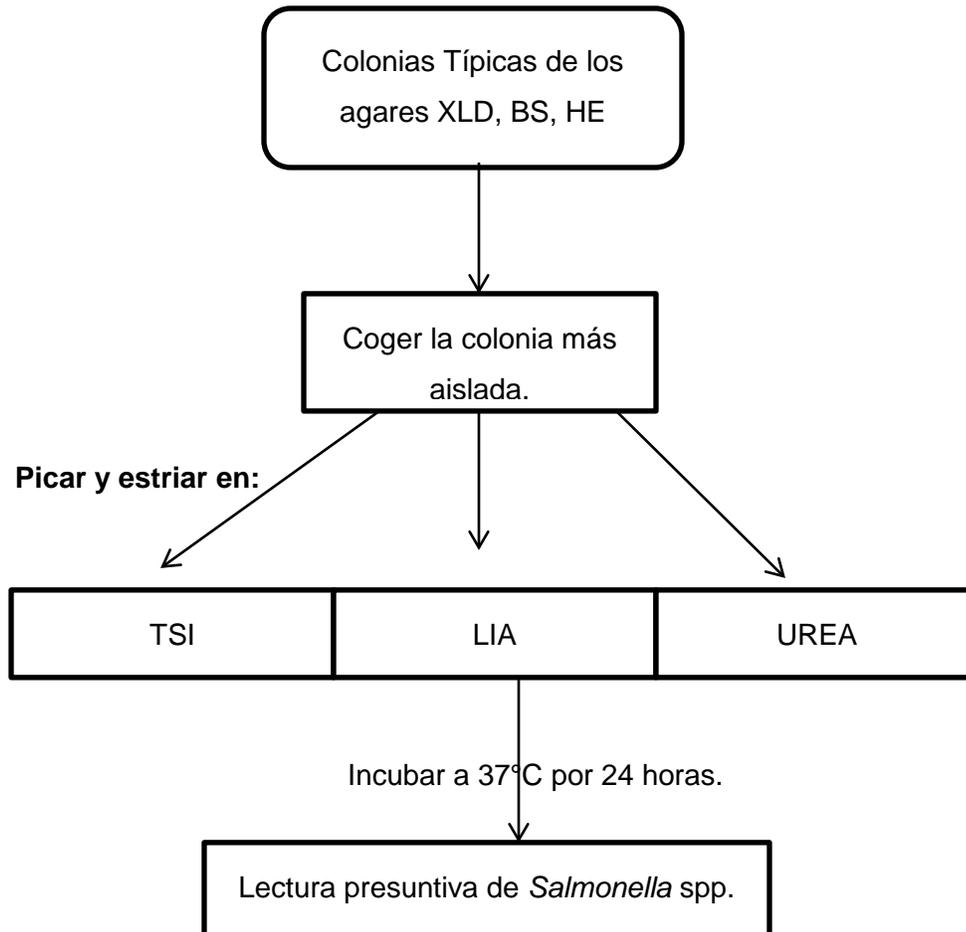
Figura 4. Aislamiento de cepas típicas de *Salmonella* spp en agar HE.

ANEXO D: Identificación bioquímica

D.1 Preparación de baterías TSI, LIA y Urea

- **Agar TSI:** Suspender 65 g y diluir en 1000 ml de agua destilada y disolver.
- **Agar LIA:** Suspender 34.56 g y diluir en 1000 ml de agua destilada y disolver.
 - Calentar hasta punto de ebullición hasta disolución completa del medio.
 - Dispensar aproximadamente la cuarta parte en tubos de ensayo y tapar.
 - Autoclavar a 121 °C a 1 atmósfera de presión durante 15 min.
 - Dejamos que el medio solidifique en posición inclinada.
- **Caldo Urea:** Pesar 38.7 g y diluir en 1000 ml de agua estéril y disolver.
 - NO AUTOCLAVAR NI CALENTAR EL CALDO.
 - Filtrar a través de una membrana.
 - Colocar en cada tubo de ensayo estéril 3 ml de la solución.

D.2 Flujoograma de Identificación en pruebas bioquímicas



ANEXO E: Muestras presuntivas de *Salmonella* spp en pruebas bioquímicas.



Figura 5. Presencia presuntiva de *Salmonella* spp.

Tabla 6. Resultados de pruebas bioquímicas en vegetales empacados.

Producto	No. de muestras	Pruebas Bioquímicas	
		Negativo Aus/25 g	Positivo Pres/25 g
Lechuga	10	9	1
Espinaca	10	8	2
Perejil	10	8	2
Culantro	10	8	2
Albahaca	10	8	2
Brotos de soja	10	8	2
TOTAL	60	49	11 →18.3 %

ANEXO F: Resultados de pruebas bioquímicas

Tabla 7. Reacciones bioquímicas positivas de *Salmonella* spp.

No.	Producto	Pruebas Bioquímicas					RESULTADO
		TSI	H2S	GAS	LIA	UREA	
1	Lechuga	K/A	+	+	K/K	-	POSITIVO
2	Espinaca	K/A	+	+	K/K	-	POSITIVO
2	Perejil	K/A	+	+	K/K (H2S)	-	POSITIVO
2	Culantro	K/A	+	+	K/K	-	POSITIVO
2	Albahaca	K/A	+	+	K/K	-	POSITIVO
2	Brotos de soja	K/A	+	+	K/K (H2S)	-	POSITIVO

K= medio alcalino → color rojo

A= medio ácido → color amarillo

H2S= ácido sulfhídrico

(+) = positivo

(-) = negativo