



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Serotipificación de cepas de *Salmonella* aisladas de vegetales frescos listos para el consumo

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: Calva Jiménez, Jessica Valeria

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 fin de titulación: **Serotipificación de cepas de *Salmonella spp*, aisladas de vegetales frescos listos para el consumo**, realizado por Jessica Valeria Calva Jiménez, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, abril del 2017

f)

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo Calva Jiménez Jessica Valeria, declaro ser autor del presente trabajo de titulación: Serotipificación de cepas de *Salmonella spp*, aisladas de vegetales frescos listos para el consumo, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Hualpa Salinas Diana Inés, Mgtr, 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 de 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; a 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.....

Autor: Calva Jiménez Jessica Valeria

Cédula: 1104679947

DEDICATORIA

Dedico éste trabajo a Dios “todo tiene su tiempo, y todo lo que se quiere debajo del cielo tiene su hora”.

A mis padres, José y Josefina por su amor, esfuerzo y sacrificio, motivándome a seguir adelante y que no desmaye en ningún momento.

A mis hermanas/no Tatiana, Xiomara y Javier, y a mi hermosa sobrina Victoria Abigail, por su amor por su amor y comprensión para cumplir una meta más en mi vida.

Yeca.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por ser el motor de mi vida, mi amigo y confidente en estos años de preparación, permitiéndome terminar con éxito y humildad un sueño en mi vida.

A mis padres, hermanas y hermano por el gran amor y paciencia, para hacer de mí una mujer luchadora frente a los obstáculos de la vida, mi más sincera gratitud.

A la Mgtr. Diana Hualpa Salinas, por ser una maestra y amiga a la hora de compartir sus conocimientos, en el laboratorio y en la redacción de este trabajo, mis más sinceros agradecimientos por su apoyo y comprensión.

A mis maestros que con sus sabios conocimientos me formaron académica y personalmente.

A Gabriela Jaramillo, por compartir su conocimiento, tiempo y esfuerzo, gracias querida amiga.

A mis amigas y amigos, que han sabido brindarme su apoyo incondicional, a lo largo de estos años llenos de esfuerzo y sacrificios, que a pesar de los malos momentos hemos salido adelante juntos.

A mis compañeras de laboratorio por la ayuda y entrega en este proyecto, gracias por su amor y dedicación.

INDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	i
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
INDICE DE CONTENIDOS.....	v
ABREVIATURAS.....	vi
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPITULO I	5
MARCO TEORICO.....	5
1.1. Enfermedades de transmisión alimentaria (ETA)	6
1.1.1. Infección alimentaria.....	6
1.1.2. Intoxicación alimentaria	7
1.1.3. Toxiinfección alimentaria	7
1.2. Microorganismos indicadores	7
1.3. Familia Enterobacteriaceae.....	8
1.3.1. Grupo Coliforme.....	9
1.3.1.1. Citrobacter.....	9
1.3.1.2. Enterobacter.....	9
1.3.1.3. Klebsiella.....	9
1.3.1.4. Escherichia.....	10
1.3.2. Enterobacterias patógenas	10
1.4. Genero <i>Salmonella</i>	10
1.5. Clasificación taxonómica.....	10
1.6. Morfología y características fisiológicas en medios de cultivo	11
1.7. Condiciones de supervivencia	12
1.8. Reservorios	12
1.9. Patogenia	12
1.10. Epidemiología.....	14
1.10.1. Salmonelosis.....	14
1.10.2. Fiebre tifoidea	14
1.10.3. Gastroenteritis aguda.....	14
1.11. Identificación bioquímica y serotipificación.....	15

1.12. Tratamiento	16
1.13. Vegetales listos para el consumo	16
CAPITULO II	17
MATERIALES Y METODOS.....	17
2.1. Recolección de vegetales listos para el consumo	18
2.2. Aislamiento e identificación.	19
2.2.1. Preparación de la muestra	19
2.2.2. Pre- enriquecimiento	19
2.2.3. Enriquecimiento en medio selectivo líquido.....	19
2.2.4. Aislamiento en medios selectivos.	19
2.2.5. Identificación morfológica de colonias típicas de <i>Salmonella</i>	20
2.3. Identificación	20
2.3.1. Identificación bioquímica	20
CAPITULO III	22
RESULTADOS Y DISCUSION.....	22
CONCLUSIONES	28
RECOMENDACIONES	29
BIBLIOGRAFÍA.....	30
ANEXOS	39
Anexo 1: Flujograma de la metodología	40
Anexo 2: Interpretación e identificación de microorganismos en pruebas bioquímicas	41
Anexo 3: Metodología del Microgen GN-ID Identificación.	42
Anexo 4: Tipo de enterobacterias encontradas en los productos que sirvieron de muestra para nuestro estudio.	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Enterobacterias importancia clínica, género y especie	8
Tabla 2. Descripción de la morfología de las colonias en los diferentes medios	12
Tabla 3. Muestreo.	18
Tabla 4. Interpretación de resultados de pruebas bioquímicas para salmonella.	20
Tabla 5. Porcentaje de enterobacterias aisladas.	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: División taxonómica de la <i>Salmonella</i> spp.	11
Figura 2: Diferencia de serotipos que afectan al hombre y a los animales.....	13
Figura 3: Colonias típicas de <i>Salmonella</i> spp.....	20

ABREVIATURAS

μL: Microlitros

BPM: Buenas Prácticas de Manufactura

ETA: Enfermedades Trasmítidas por Alimentos

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos

TIA: Toxiinfección alimentario

°C: Grados Celsius

g: Gramos

H₂S: Acido Sulfhídrico

LIA: Agar Hierro-Lisina

TSI: Agar Triple Azúcar- Hierro

mL: Mililitros

NaOH: Hidróxido de Sodio

RV: Caldo Rappaport-Vassiliadis

TT: Caldo Tetratoato

spp: Engloba varias especies del mismo género

BAM: Manual Analítico Bacteriológico

XLD: Agar Xilosa Lisina Desoxicolato

SS: Agar Salmonella - Shigella

BS: Agar Bismuto Sulfito

HK: Agar Hektoen

VLC: Vegetal listo para el consumo

RESUMEN

Salmonella, se considera una de las enterobacterias más patógenas, implicada en enfermedades de transmisión alimentaria como salmonelosis y fiebre tifoidea. Entre sus principales características: son bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, no formadores de esporas, generalmente móviles, no fermentador de lactosa y productora de gas. El objetivo planteado en esta investigación fue detectar *Salmonella* en vegetales listos para el consumo: ensalada de lechuga, col más zanahoria, ensalada de espinaca, lechuga, zanahoria rallada, manzana baby, tomate baby y zanahoria baby; que se expenden en los supermercados de la ciudad de Loja, se analizó un total de 139 muestras, de cada lote se tomaron 3 muestras basándonos en la metodología propuesta por el Manual Analítico Bacteriológico (BAM) para aislamiento y detección de *Salmonella* que consistió en la obtención y preparación de la muestra, pre-enriquecimiento, enriquecimiento en medio selectivo, aislamiento en medios sólidos e identificación morfológica y bioquímica. No se detectó la presencia de *Salmonella* en vegetales listos para el consumo (VLC), pero se aisló e identificó otros tipos de microorganismos entéricos, patógenos e indicadores de contaminación fecal: *Citrobacter freundii* 38.85%, *Enterobacter cloacae* 12.95%, *E. coli* 5.75%, *Pantoea agglomerans* 4.31%, *Enterobacter aerogenes* y *Shigella spp*, 1.44% y *Proteus mirabilis* 0.73%.

Palabras clave: vegetales listos para el consumo (VLC), ETAS, *Salmonella* spp, BAM, serotipificación.

ABSTRACT

Salmonella is considered one of the most pathogens Enterobacterias involved on foodborne diseases, such as salmonellosis and typhoid fever. Its main characteristics: are gram-negative bacilli, facultative anaerobes, non-spore forming, generally mobile, non-lactose fermentor and gas producer. The aim of this research was to detect *Salmonella* in ready-to-eat vegetables as: lettuce salad, cabbage and carrot, spinach salad, lettuce, shredded carrot, baby apple, baby tomato and baby carrot; which are sold in supermarkets in the city of Loja. Thus, a total of 139 sample was analyzed and from each batch three samples were taken for isolation and detection of *Salmonella* based on the methodology proposed by the Bacteriological Analytical Manual (BAM) which consisted of the separation and preparation of the sample, pre-enrichment, enrichment in selective medium, isolation in solid means and morphological and biochemical identification. The presence of *Salmonella* in ready-to-eat vegetables was not detected, but other types of enteric microorganisms, pathogens and fecal contamination indicators were isolated and identified: *Citrobacter freundii* 38.85%, *Enterobacter cloacae* 12.95%, *E. coli* 5.75%, *Pantoea agglomerans* 4.31%, *Enterobacter aerogenes* and *Shigella spp*, 1.44% and *Proteus mirabilis* 0.73%.

Key words: ready-to-eat vegetables, ETAS, *Salmonella* spp, BAM, serotyping

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el consumo de vegetales ha incrementado en la sociedad debido al ritmo acelerado de vida que llevan, beneficiándose así las industrias alimenticias con la producción y venta de vegetales listos para el consumo (VLC), el alto valor nutricional de estos alimentos en: minerales, vitaminas, antioxidantes y fibra; además de estar listos para servir a la mesa hace que sean aún más cotizados, estos se expenden exclusivamente en supermercados, contando con un registro sanitario (Dura *et al.*, 2015).

Los VLC cumplen con un proceso de: lavado, desinfección envasado, con la finalidad de alargar la vida, mantener las características y propiedades nutritivas del vegetal en buen estado (Aparecida *et al.*, 2011). Sin embargo, pese al proceso de desinfección por el que pasan se los considera como fuente de transmisión de ETAs (Sabbithi *et al.*, 2014).

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) son causadas por el consumo de vegetales contaminados por agentes patógenos los mismos que afectan la salud del consumidor (Guerrero, 2016). En un estudio realizado sobre enfermedades gastrointestinales y diarreicas tanto en América Latina como en el Caribe son de alta mortalidad, manifestando que el 70 y 80 % son causadas por alimentos y agua contaminados (López *et al.*, 2013). En distintas regiones a nivel mundial se ha evidenciado que las ETA en gran proporción es provocado por *Salmonella* spp (Fernández *et al.*, 2013).

La familia *Enterobacteriaceae*, es el grupo más grande de bacterias gramnegativas de importancia médica, se han descrito más de 30 géneros y 130 especies (Prats, 2012). Las bacterias de esta familia presentan características en común: son anaerobios facultativos, gramnegativos, de movilidad variable; presentan antígenos que permiten su serotipificación como son antígeno somático "O", antígeno flagelar "H" y antígeno capsular "K" o "Vi" (Castro, 2014).

En el capítulo I se realiza una revisión bibliográfica de vegetales listos para el consumo, enfermedades transmitidas por alimentos, descripción de la familia Enterobacteriaceae y principalmente el patógeno *Salmonella* spp, su clasificación, morfología, condiciones de supervivencia, reservorios, patogenia, epidemiología, identificación bioquímica y serotipificación.

En el segundo capítulo se describe la metodología, la obtención de la muestra, preparación, pre-enriquecimiento, enriquecimiento en medio selectivo, aislamiento en medios sólidos e identificación morfología y bioquímica de las colonias.

Finalmente en el tercer capítulo 3 se exponen los resultados obtenidos, discusión, conclusiones y recomendaciones. La presente investigación se inició con la obtención de las muestras de los vegetales listos para el consumo en los supermercados de la ciudad de Loja, tratamiento de la muestra, finalmente no se detectó la presencia de *Salmonella* pero se logró aislar e identificar enterobacterias como: *Citrobacter freundii* 38.85 %, *Enterobacter cloacae* 12.95 %, *E. coli* 5.75, *Shigella spp.* 1.44% *Pantoea agglomerans* 4.31%, *Enterobacter aerogenes* 1.44%, *Proteus mirabilis* 0.73% y finalmente microorganismos no fermentadores 10.79%, microorganismo no identificado 22.30% y no existió crecimiento 1.44% de las muestras analizadas.

CAPITULO I
MARCO TEORICO

1.1. Enfermedades de transmisión alimentaria (ETA)

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) son causadas por la ingesta de alimentos que contienen microorganismo patógenos, la gravedad en la salud del consumidor va a depender de la cantidad de alimento que ingiera (Guerrero, 2016). Por lo general estas enfermedades no necesitan de hospitalización, sin embargo, en ocasiones algunas de ellas si lo requieren (García *et al.*, 2012).

Se establecen uno de los problemas de mayor importancia a nivel mundial, además constituye un contrariedad de salud pública ocasionando una alta morbilidad y mortalidad afectando, principalmente a población: pobre, niños, mujeres embarazadas y ancianos, generando pérdidas económicas y grandes costos a los servicios de salud (Alerte *et al.*, 2012).

En América Latina y el Caribe las enfermedades diarreicas, enteritis y otras enfermedades son las cinco primeras causas de mortalidad, manifestando que entre el 70 y 80 % de enfermedades son causadas por alimentos y agua contaminados (López *et al.*, 2013).

En Estados Unidos las infecciones alimentarias son las más frecuentes siendo responsables de cuatro de las cinco primeras enfermedades, entre los microorganismos con mayor incidencia tenemos: *Salmonella*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* (Madigan *et al.*, 2015). En distintas regiones a nivel mundial se ha evidenciado que las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) en gran proporción es por *Salmonella* spp (Fernández *et al.*, 2013). Las enfermedades de transmisión alimentaria se divide en tres grupos: infección alimentaria, intoxicación alimentaria y toxiinfección alimentaria (Ray & Bhunia, 2010).

1.1.1. Infección alimentaria

La infección alimentaria es una enfermedad causada por la ingestión de patógenos viables presentes en los alimentos como parásitos, bacterias, hongos, virus; quienes conducen al desarrollo de enfermedades gastrointestinales, posterior a la ingesta de los alimentos existe proliferación de estos microorganismos en los tejidos del hospedador y la respuesta del individuo puede variar dependiendo de los factores propios del agente, ejemplos de infecciones alimentarias que se producen por la presencia y proliferación de bacterias del género *Shigella*, *Salmonella*, entre otros (Hernández, 2016).

1.1.2. Intoxicación alimentaria

Se produce por la ingesta de toxinas preformadas, producidas por microorganismos en los alimentos, lo cual conduce a un envenenamiento del consumidor, a este tipo de toxinas que afectan al tracto gastrointestinal se les denomina *enterotoxinas* (Madigan *et al.*, 2015). Además, la intoxicación alimentaria se define como aquella que es provocada por cualquier alimento o líquido que presenta: gérmenes, metales, aditivos, hormonas, etc, ejemplos de intoxicaciones alimentarias se producen por las toxinas de especies del género *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, *Clostridium botulinum*, y por la producción de micotoxinas (Portuondo, 2012).

1.1.3. Toxiinfección alimentaria

Algunos microorganismos pueden producir toxinas in situ, después de que se han ingerido los alimentos e infectar el intestino. Este tipo de enfermedades se denomina toxiinfección alimentaria (TIA) (García *et al.*, 2014). Las enterobacterias son causantes del 57% de las TIAs humanas, ejemplos de microorganismos causantes de TIAs incluyen: envenenamiento alimentario producido por *Bacillus cereus* y gangrena, ocasionada por *Clostridium perfringens* (Terzolo, 2010).

1.2. Microorganismos indicadores

Los microorganismos indicadores son habitualmente asociados e implicados con las enfermedades de origen alimentario, por lo general estas especies son patógenos entéricos es decir que forman parte del tracto gastrointestinal de personas, animales y aves (Ray & Bhunia, 2010). Además son empleados para conocer si el alimento es seguro e higiénico, generalmente son asociados con contaminación fecal (Forsythe, 2010).

Por otro lado, nos permite evidenciar accidentes durante el manejo del agua y alimentos (Hernández, 2016). Se puede dividir a estos microorganismos en dos grupos:

- ❖ Indicadores de proceso, manejo y eficiencia: Coliformes totales, mesófilos aerobios, hongos y levaduras.
- ❖ Indicadores de contaminación fecal: Coliformes fecales, *E. coli*, *Enterococos* y *C. perfringens* (Andino & Castillo, 2010).

1.3. Familia Enterobacteriaceae

La familia Enterobacteriaceae es el grupo más grande de bacterias gramnegativas de importancia médica y se han descrito más de 30 géneros y 130 especies, (Prats, 2012). Las bacterias de esta familia presentan características en común: son anaerobios facultativos, gram negativos, de movilidad variable; presentan antígenos que permiten su serotipificación como son antígeno somático "O", antígeno flagelar "H" y antígeno capsular "K" o "Vi"(Castro, 2014). Estos microorganismos se encuentran en el suelo, agua, vegetación y también como biota normal de muchos animales incluido el ser humano (Puerta & Rodríguez, 2010).

Son responsables de enfermedades a nivel gastrointestinal ya que son unos excelentes colonizadores (Forsythe, 2010). Estudios realizados en alimentos de origen animal y vegetal a nivel mundial, se evidenciaron brotes de enterobacterias siendo estas causantes de enfermedades (Doulgerak *et al.*, 2011).

Existen géneros y especies de enterobacterias de importancia clínica causante de patologías en el ser humano. Ver tabla 1.

Tabla 1. Enterobacterias importancia clínica, género y especie

Género	Especies
<i>Escherichia.</i>	<i>E. coli</i>
<i>Shigella.</i>	<i>S. dysenteriae, S. sonney</i>
<i>Salmonella.</i>	<i>S. enterica, S. typhimurium, S. typhi, S. cholerasuis</i>
<i>Citrobacter.</i>	<i>C. freundii</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>E. cloacae, E. aerogenes</i>
<i>Serratia.</i>	<i>S. marcescens</i>
<i>Proteus.</i>	<i>P. mirabilis, P. vulgaris</i>
<i>Yersinia</i>	<i>Y. enterocolitica, Y. pseudotuberculosis, Y. pestis</i>
<i>Morganella</i>	<i>M. morganii</i>
<i>Providencia.</i>	<i>P. rettgeri, P. stuartii</i>

Autor: (Puerta & Rodríguez, 2010)

Grupo Coliforme

Al grupo Coliforme lo constituyen especies de varios géneros como: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Escherichia*; es muy común encontrarlos en heces de humanos, aves y animales de sangre caliente (Ray & Bhunia, 2010). Además, su determinación en alimentos se emplea como indicador de higiene (Forsythe, 2010).

1.3.1.1. *Citrobacter*

Citrobacter freundii es un patógeno oportunista, presente en la flora de intestinal de animales y humanos, también suele encontrarse en suelo, agua, aguas residuales y comida, es una de las especies más resistentes a los antibióticos (Engelkirk *et al.*, 2011). Son oxidasa negativa, catalasa positiva, y no descarboxila lisina (Cabral, 2010). Tienen la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono, son fermentadores lactosa, producen H₂S, y fácilmente se puede confundir con *Salmonella* (Puerta & Rodríguez, 2010).

1.3.1.2. *Enterobacter*

Generalmente fermentan lactosa, sus colonias son muy parecidas a la *Klebsiella*, tienen motilidad, pero no es tan virulenta (Kenneth & Ray, 2004). Se encuentran normalmente colonizando el intestino de los seres humanos, animales y aves, pero también se los puede encontrar en el medioambiente (Ray & Bhunia, 2010) y, son comúnmente encontradas en el agua, suelo y vegetales (Falomir *et al.*, 2013).

Las principales especies patógenas incluyen: *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *E. agglomerans*, *E. gergoviae* y *E. sakazakii* (Puerta & Rodríguez, 2010).

1.3.1.3. *Klebsiella*.

Estas bacterias poseen un gran tamaño y son regulares con una capsula prominente (Brooks *et al.*, 2014). Se divide en tres grupos: *pneumoniae*, *rhinoscleromatis*, *ozaenae* y *granulomatis* (Prats, 2012). Es normal encontrar este microorganismo en la superficie de los vegetales y frutas, debido al suelo y al polvo, necesariamente no indica contaminación fecal, sin embargo la proliferación y contaminación de la bacteria a los consumidores se debe a los malos procedimientos de higiene a la hora del corte y lavado de los vegetales (Forsythe, 2010).

1.3.1.4. Escherichia

Es la bacteria genio que está dentro de las enterobacterias, es considerada una de las más patógenas, su grado de virulencia es bastante alto, se la puede encontrar en comida fermentada, leche, productos frescos, agua, frutas y vegetales crudos y listos para el consumo (Forsythe, 2010). Su transmisión por lo general es fecal-oral (Ramos, 2016). Dentro de esta especie hay cepas que son patógenas, causantes enfermedades de diarreicas, estas se clasifican según su patogenia: y *E. coli productor de toxina Shiga*, *E. coli enterotoxigenica*, *E. coli enteropatogénica*, *E. coli enteroinvasiva*, *E. coli enteroagregativa*, *E. coli* de adherencia difusa (Campoverde, 2016).

Enterobacterias patógenas

Las enterobacterias patógenas incluyen a los géneros: *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*, entre los bacilos gramnegativos no fermentadores cabe señalar los géneros *Pseudomonas* y *Acinetobacter* (Prats, 2012).

1.4. Genero Salmonella

El género *Salmonella* es un patógeno perteneciente a la familia Enterobacteriaceae; entre sus principales características tenemos: son bacilos gram negativos, con un tamaño de 0,7 a 1,5 x 2,5 µm, son anaerobios facultativos, no formadores de esporas y generalmente móviles (Odumeru & León, 2012). Son fermentadores de maltosa, glucosa y manitol, aunque por otro lado no fermentan sacarosa ni lactosa; son catalasa positiva, oxidasa negativa y reducen nitritos a nitratos (Zaragoza & Derrickson, 2011).

Algunas especies de este género producen sulfuro de hidrogeno y gas debido a la fermentación de hidratos de carbono; la temperatura adecuada para su crecimiento es de 36°C y su pH debe ser de 7.0. (Fallis, 2013).

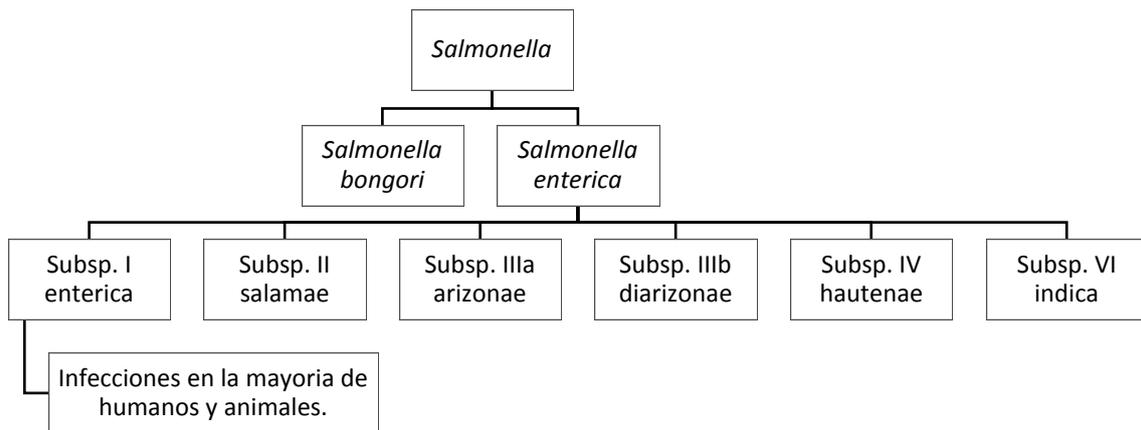
1.5. Clasificación taxonómica

El género *Salmonella* ha sido clasificado varias veces y de varias maneras ya que, debido a su confusa nomenclatura y taxonomía, ha sido tema de contrariedad para científicos de todo el mundo; por tal razón, Kauffaman y White clasificaron a esta bacteria de acuerdo a los antígenos que presentan (Calva, 2010). De acuerdo a esta clasificación, se presentan en

tres grupos: los que presentan el antígeno “O”, son aquellas especies de *Salmonella* que no presentan motilidad, los del grupo “H”, son aquellas especies que presentan flagelo, y por tanto son mótils; y por último, se encuentran aquellas especies que producen factores de virulencia y se dominan del grupo antigénico “Vi” (Delgado, 2015).

Basados en la secuenciación de ADN, la clasificación de *Salmonella* se divide en 2 especies: *S. bongori* y *S. entérica*; esta última se subdivide a su vez en seis subespecies (Uribarren, 2015).

La especie *S. bongori* ha sido aislada de animales de sangre fría y se considera que no es patógena para el hombre (Delgado, 2015). La especie *S. entérica* se ha aislado por lo general de mamíferos y aves y se considera patógena para el ser humano. Se divide a su vez en 6 subespecies (Betancor & Yim, 2012). En la figura 1 se muestra la división taxonómica de *salmonella* spp.



Fuente: (Betancor & Yim, 2012)

Figura 1: División taxonómica de la salmonella spp.

1.6. Morfología y características fisiológicas en medios de cultivo

La morfología y tamaño de las colonias de *Salmonella* oscila entre 2 a 4mm, poseen una textura rugosa o lisa (Robledo, 2015). Su metabolismo es oxidativo y fermentativo, por lo que reducen los nitratos a nitritos y fermentan la glucosa; son catalasas positivos y oxidasas negativos (Odumeru & León, 2012). Su proliferación es buena en medios ordinarios de esta manera puede penetrar en otros tejidos aparte de los del tracto gastrointestinal ya sean

como patógenos o como comensales (Robledo, 2015). Utilizando como base la metodología del BAM (2007) de Palomino y Gonzáles (2014), nos describe la morfología típica de las colonias de *Salmonella* en los diferentes medios de cultivos. Ver tabla 2.

Tabla 2. Descripción de la morfología de las colonias en los diferentes medios

Medios de cultivo	Aspecto de Colonias	Selectividad
Agar SS (Salmonella Shigella)	Incoloro, colonias generalmente negras	Alta
Agar Bismuto	Negras o gris verdoso, con o sin brillo metálico.	Alta
Agar XLD (Xilosa Lisina Dexoxicolato)	Rojas con punto negro	Alta
Agar Hektoen	Verdes- Azuladas con centro negro.	Alta

Fuente:(Palomino & Gonzáles, 2014).

1.7. Condiciones de supervivencia

Los miembros del género *Salmonella* crecen al cabo de 16 a 24 horas en un amplio rango de temperaturas entre 7 a 45°C (Terzolo, 2010). Además, soportan un pH entre 6.6 y 8.2 siendo incapaces de tolerar altas concentraciones de sal; sin embargo, sobreviven a bajas temperaturas en alimentos y agua durante largos períodos (Elika, 2013).

1.8. Reservorios

Por lo general *Salmonella* spp., se transmite a través de la comida contaminada con materia fecal; entre los alimentos que sirven de reservorio de esta bacteria tenemos a : leche, frutas , vegetales y productos derivados del pescado (Carrasco *et al.*, 2012).

En los últimos años, se ha encontrado que los vegetales son un vehículo potencial de *Salmonella*, los cuales pueden contaminarse a través de irrigación del agua, contaminada con desechos fecales, fungicidas e insecticidas, suelo, insectos, animales y, por medio de manipulación humana que no puede ser completamente desinfectado por los métodos tradicionales (Spricigo *et al.*, 2013).

1.9. Patogenia

El género *Salmonella* se transmite por vía oral, a través del contacto con animales contaminados con heces; existiendo diversas fuentes de infección entre las que

encontramos al hombre, animales de granja y animales domésticos, agua en condiciones insalubres, alimentos contaminados, heces, polvo, suelos mal desinfectados, entre otros (Jurado *et al.*, 2010).

Las infecciones causadas por especies del género *Salmonella* se denominan Salmonelosis. Esta se clasifica en dos grupos: aquellas que son causadas por serotipos humanos los cuales ocasionan síndromes tifoideos y las que son debidos a serotipos más generales causantes de diarrea, vómito y fiebre (Sánchez, 2013).

Una vez que se introduce *Salmonella* en el organismo, el desarrollo de la enfermedad va a depender principalmente de la cantidad de microorganismos que se ingirió (inoculo), de su virulencia y de los factores dependientes del huésped (Jurado *et al.*, 2010). En el ser humano, el lugar más propicio para colonizar es el intestino delgado, donde inflama la mucosa intestinal produciendo diarrea (Gyles *et al.*, 2010). Luego de una semana la mucosa intestinal puede ulcerarse y originar una hemorragia o la perforación, las dos complicaciones más graves del cuadro (Jurado *et al.*, 2010).

Serotipos adaptados al hombre	Serotipos adaptados a animales
<i>Salmonella typhi</i>	Aves: <i>Salmonella pullorum</i> y <i>Salmonella gallinarum</i>
<i>Salmonella Paratyphi</i> A, B (aves)	Vacuno: <i>Salmonella dublin</i>
<i>Salmonella sendai</i>	Ovino: <i>Salmonella abortusovis</i>
	Equino: <i>Salmonella abortusequi</i>
	Cerdo: <i>Salmonella choleraesuis</i>
	Conejo: serovariedad perteneciente a la subespecie III a
Otros serotipos no adaptados a hospedadores específicos que afectan a conejos y personas: <i>Salmonella tyhimurium</i> y <i>Salmonella enteritidis</i> .	

Figura 2: Diferencia de serotipos que afectan al hombre y a los animales

Fuente: Tomado de Robledo, (2015).

Estas enfermedades bacterianas se caracterizan por síntomas como: fiebre, cefalea, anorexia, bradicardia, esplenomegalia y estreñimiento (OPS/OMS, 2013).

1.10. Epidemiología

Epidemiológicamente *Salmonella* se clasifica en tres grupos: aquellas que no tienen preferencia por algún huésped en especial, por lo que infectan tanto al hombre como a los animales; aquellas que infectan sólo al hombre: *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A* y *Salmonella paratyphi C*; y finalmente las que infectan a los animales (ISPC, 2014).

Salmonelosis

La salmonelosis es un conjunto de infecciones alimentarias, de mayor frecuencia en el mundo y se asocia a las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) (Betancor & Yim, 2012). Los organismos causantes de salmonelosis pueden estar tanto en consumidores comunes, en el tracto gastrointestinal de los animales y en el hombre causando diferentes enfermedades como diarrea, bacteriemia con fiebre entérica o invasión de estructuras vasculares, hueso u otros sitios localizados (Odumeru & León, 2012).

Estas infecciones alimentarias pueden manifestarse bajo dos aspectos esenciales: las fiebres entéricas que engloban principalmente las fiebres tifoideas; y gastroenteritis que puede ser causada por muchos serotipos (Robledo, 2015).

Fiebre tifoidea

La fiebre tifoidea es una infección sistémica que se produce debido a la ingesta de alimentos contaminados, causado por la *Salmonella typhi* o *paratyphi* (Chutan, 2016). En raras ocasiones, *Salmonella paratyphi* puede provocar un cuadro clínico similar, aunque de menor gravedad (Jurado *et al.*, 2010). Se manifiesta con diarrea, fiebre y erupciones cutáneas, con probabilidad de que provoque sangrado, delirios y alucinaciones; sin embargo, en un estado más avanzado, la fiebre tifoidea puede provocar la muerte (Redacción, 2015)

Gastroenteritis aguda

Denominada salmonelosis no tifoidea debido a que se origina por salmonellas distintas a la *S. typhi* (Jurado *et al.*, 2010), puede afectar a cualquier grupo de edad; sin embargo, los grupos más vulnerables son las personas menores de cinco años y mayores de 60 años de edad. (Hernández *et al.*, 2011). Los síntomas principales son diarrea, vómito, dolor abdominal, fiebre, deshidratación y calambres (Gallegos, 2014). Generalmente los síntomas aparecen de 6 a 48 horas después del consumo de agua o alimentos contaminados; la

mortalidad por esta causa es rara sin embargo los factores propios del huésped y de la cepa de *Salmonella* definen la gravedad de la enfermedad (OMS, 2013).

1.11. Identificación bioquímica y serotipificación

La identificación bioquímica es un conjunto de técnicas y procedimientos que facilita la detección de los microorganismos (Fernández *et al.*, 2010). En la identificación bioquímica de *Salmonella* spp es relativamente estándar, sin embargo se han encontrado algunas variaciones en los medios de cultivo y en las pruebas bioquímicas, que han llevado a tomar como alternativa los métodos moleculares, los cuales realizan un diagnóstico más rápido y simple, sin embargo tienen como desventaja su costo elevado (Pachón, 2009). Para la detección de este microorganismo se ejecutó un procedimiento que consta de pre-enriquecimiento no selectivo, enriquecimiento selectivo, siembra en medios de cultivo selectivos y finalmente la identificación de cepas mediante pruebas bioquímicas (TSI, LIA, SIM, UREA, citrato) (Gonzalez *et al.*, 2014). Mediante el test de Microgen™ GN- ID se puede confirmar el género y especie enterobacterias como *Salmonella* spp (Pazmiño, 2012).

La serotipificación es un método sencillo y rápido, que consta de la mezcla de la cepa en estudio con los anticuerpos que reconocen concretamente los antígenos característicos de cada serotipo y se visualiza a través de la aglutinación, en el género *Salmonella* se diferencian tres tipos de antígenos: antígeno somático o antígeno O, antígeno flagelar o antígeno H y el antígeno capsular o de superficie o antígeno Vi (Tirado *et al.*, 2009).

De los tres tipos de antígenos reconocidos, el antígeno somático o antígeno O se localiza en el lipopolisacárido (LPS) de la pared celular, este antígeno a su vez se clasifica en antígenos mayores y menores, en donde los antígenos somáticos mayores definen el serogrupo o grupo antigénico y son compartidos por todas las *Salmonellas* incluidas en un mismo serogrupo (García, 2011).

El antígeno flagelar o antígeno H está compuesto por flagelinas, subunidades proteicas que forman los flagelos, generalmente la mayor parte de las cepas de *Salmonella* son capaces de expresar alternativamente dos flagelinas antigénicamente diferentes, denominadas fliC (fase 1) y fli B (fase 2) (García, 2011). Los genes que codifican para los dos tipos de flagelinas, se sitúan en zonas distintas del ADN cromosómico, la expresión de un tipo u otro de flagelo se denominan cambio de fase y se debe a la presencia de un elemento genético invertible que cambia de orientación al azar y determina la expresión de un tipo u otro de

proteína flagelar; hay serotipos monofásicos que son capaces de expresar únicamente una especificidad flagelar (Pachón *et al.*, 2011).

Finalmente, el antígeno capsular o de superficie, o antígeno Vi, se ha descrito también en otros géneros bacterianos (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp.); su naturaleza es homopolisacarídica y se encuentra presente únicamente en serovariedades muy invasivas como *S. dublin* y *S. typhi* (García, 2011).

1.12. Tratamiento

Fundamentalmente el tratamiento para gastroenteritis se basa en minimizar la gravedad de la enfermedad y prevenir la diseminación de la infección, por lo tanto está encaminado a restituir líquidos y a equilibrar los electrolitos (Robledo, 2015). Generalmente la enfermedad dura de 4 a 7 días y la mayoría de personas se recuperan sin tratamiento; sin embargo en algunos pacientes necesitan hospitalización (Cabezas, 2011).

El tratamiento para fiebre tifoidea se basa en la administración de amoxicilina o la combinación de antibióticos trimetropin-sulfametoxazol, pudiendo utilizarse una quinolona como el ciprofloxacino de igual manera, debe llevarse a cabo una desinfección completa de los objetos contaminados con heces u orina; finalmente, el paciente no debe manipular ningún alimento ya que puede ser foco de contaminación (Álvarez, 2010).

1.13. Vegetales listos para el consumo

Las costumbres alimenticias han cambiado en gran medida, cada vez hay menos tiempo para preparar comidas nutritivas y equilibradas, como consecuencia de este ritmo de vida, la demanda de productos vegetales naturales, frescos, saludables y dispuestos para consumirse ha incrementado (Dura *et al.*, 2015).

Los vegetales listos para el consumo (VLC) son alimentos para su consumo inmediato, estos son sometidos a procesos de limpieza, corte y envasado, con la finalidad de alargar la vida del vegetal, además de sus propiedades nutritivas, así mismo, tiene como objetivo principal evitar al consumidor la preparación de los alimentos; por esta razón, quien los consume a los VLC, prefieren invertir un poco más de dinero con la finalidad de consumir productos de calidad, frescos y sobretodo satisfacer las necesidades de una buena alimentación (Aparecida *et al.*, 2011).

La contaminación de los alimentos se debe a un deficiente control de la temperatura, malas prácticas de manipulación y a contaminación cruzada de los alimentos procesados con

ingredientes crudos, lo que conduce a que las bacterias presentes se multipliquen en el alimento hasta alcanzar una dosis infectiva (Forsythe, 2010). Los VLC a pesar del proceso de desinfección y limpieza a los que se someten, se consideran como fuente y vehículo de transmisión de enfermedades por alimentos (Sabbithi et al., 2014).

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

2.1. Recolección de vegetales listos para el consumo

Las muestras vegetales listos para el consumo fueron de 139, los cuales se recolectaron en los supermercados de la ciudad de Loja, los cuales se transportaron asépticamente a los laboratorios de microbiología de alimentos de la Universidad Técnica Particular de Loja.

Se consideró la metodología del BAM y la norma técnica NTE INEN 1750: hortalizas y frutas frescas, para la obtención de la muestra se analizaron 3 unidades con el mismo lote de producción (ver tabla 3).

Tabla 3. Muestreo.

Producto	Población en estudio	Unidades por muestra
Lechuga Romana (Ensalada César)	18	3
Lechuga Verde y crespa roja (Ensalada mix)	2	3
Ensalada primavera (Lechuga Alemana Roja y verde)	3	3
Lechuga Romana (Ensalada mexicana)	2	3
Lechuga crespa y seda (ensalada italiana)	17	3
Ensalada de espinaca	4	3
Ensalada cole slaw zanahoria + col	33	3
Lechuga criolla lista	1	3
Zanahoria rallada	28	3
Tomate baby	10	3
Zanahoria baby	11	3
Manzana baby	10	3
Total	139	

2.2. Aislamiento e identificación.

2.2.1. Preparación de la muestra

Previo a la siembra de las muestras en estudio, se tomó como referencia la norma NTE INEN 1529-2: toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico. La cual manifiesta como debe estar la zona de trabajo en la que se va a manipular la muestra y los materiales a utilizarse deben estar previamente esterilizados. Ver **Anexo 1**.

2.2.2. Pre- enriquecimiento

- ❖ En un frasco tapa rosca de 500 ml, se esterilizó 225 ml de caldo lactosa, una vez frío se procedió a pesar asépticamente 25 g de VLC.
- ❖ Posteriormente se agitó por 2 minutos y se dejó en reposo durante 60 minutos, además se reguló el pH y con NaOH 1N o HCl 1N hasta $6,8 \pm 0,2$.
- ❖ Luego de ello se incubó por 24 ± 2 horas a $35 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$.

2.2.3. Enriquecimiento en medio selectivo líquido.

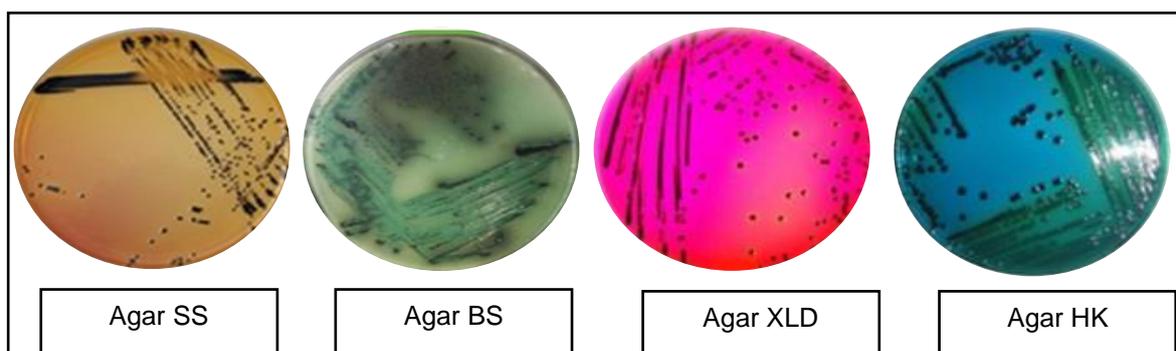
- ❖ Para el enriquecimiento se preparó caldos selectivos como caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) y caldo tetrionato (TT).
- ❖ Se tomó 100 μL del caldo lactosa incubado a un 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis y 1 mL del mismo caldo a 10 mL de caldo Tetrionato (TT) y se homogenizó los tubos.
- ❖ Cada medio de cultivo se incubó a diferentes temperaturas, el medio TT a $35 \pm 2,0$ °C y el RV a $42 \pm 0,2$ °C en baño maría los dos por 24 ± 2 horas.

2.2.4. Aislamiento en medios selectivos.

- ❖ Concluida la incubación, se homogenizo los medios RV y TT.
- ❖ Con un asa de 3 mm estéril se tomó una alícuota de 10 μL de caldo TT, para inocular en los medios sólidos (XLD, BS, SS, HK), mediante la técnica de cuadrantes en agar, para el aislamiento de colonias puras, se repitió el mismo proceso con el caldo RV.
- ❖ Se incubó las cajas inoculadas a $35 \pm 2 \text{ °C}$ por 24 ± 2 h.

2.2.5. Identificación morfológica de colonias típicas de *Salmonella*.

- ❖ Pasado el tiempo de incubación, se procedió a observar e identificar las colonias que presentaron una morfología y características de las colonias típicas para *Salmonella* spp, las mismas se pueden observar en la figura 3.



Fuente: (Pachón, 2009).

Figura 3: Colonias típicas de *Salmonella* spp.

2.3. Identificación

2.3.1. Identificación bioquímica

Sé purificó cepas típicas presuntivas de *Salmonella* spp, posterior a ello para la identificación se utilizó pruebas bioquímicas: TSI, LIA, UREA, SIM y citrato, las mismas que necesitan 24 horas a $37^{\circ}\text{C} \pm 2$, de incubación para la identificación de microorganismos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae enfocado a la identificación de *Salmonella*.

A continuación la interpretación e identificación de *Salmonella* se presenta en la tabla 4, los resultados de las pruebas bioquímicas se muestra en **anexo 2**.

Tabla 4. Interpretación de resultados de pruebas bioquímicas para *Salmonella*.

Microorganismo	TSI	GAS	H2H	LIA	UREA	SIM	INDOL	CITRATO
<i>Salmonella</i> spp	K/A	+	+	+	-	+	-	+
<i>Salmonella</i> Typhi	K/A	-	+	+	-	+	-	-
<i>Salmonella</i> Paratyphi	K/A	-	-	-	-	+	-	-

Fuente: (Palomino & Gonzáles, 2014)

La interpretación e identificación de los diferentes microorganismos encontrados se muestra en el **anexo 2**, se validó mediante el kit Microgen GN-ID identificación, el fundamento y metodología de este kit se muestra en el **anexo 3**.

CAPITULO III
RESULTADOS Y DISCUSION

Una buena alimentación previene y disminuye el aumento de enfermedades, los buenos hábitos alimenticios que incluyen vegetales y frutas mejoran la calidad de vida (Lares *et al.*, 2011). La falta de tiempo en las dos últimas décadas para consumir alimentos sanos, ha provocado la demanda de vegetales listos para el consumo (VLC) (Dura *et al.*, 2015). Representan para el comensal una opción rápida y fácil de alimentación (Rodríguez-Cavallini, *et al.*, 2010).

Sabbithi *et al.*, (2014) manifiesta que los VLC se los considera como vehículos de transmisión de enfermedades de alimentos. A pesar de ser sometidos a diferentes procesos: limpieza, corte, secado y envasado, con el fin de mantener al vegetal en buen estado y mantener sus propiedades nutritivas (Aparecida *et al.*, 2011).

Los VLC pueden contaminarse con *Salmonella* spp siendo un problema de salud pública para quienes ingieran estos alimentos contaminados (Rodríguez-Cavallini *et al.*, 2010). Además de *Salmonella* spp existen otros microorganismos que causan enfermedades a los consumidores y que también se transmiten a través de VLC (Palomino & Gonzáles, 2014).

El presente estudio estuvo enfocado a la identificación y serotipificación de *Salmonella* en vegetales listos para el consumo, obteniendo como resultado la ausencia de *Salmonella* en 139 muestras analizadas por esta razón no se realizó la serotipificación de cepas sin embargo, se procedió a identificar otros tipos de Enterobacterias presentes en los vegetales (**Anexo 4**), se contrarrestaron estos resultados con otros estudios realizados a nivel mundial. En la tabla 5 se encuentran especificadas las Enterobacterias identificadas.

Tabla 5. Porcentaje de Enterobacterias aisladas.

Muestra	Número de Cepas	Microorganismo identificado	Porcentaje
Vegetales listos para el consumo	54	<i>Citrobacter freundii</i>	38.85 %
	18	<i>Enterobacter cloacae</i>	12.95 %
	8	<i>E. coli</i>	5.75 %
	6	<i>Pantoea agglomerans</i>	4.31 %
	2	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1.44 %
	2	<i>Shigella spp.</i>	1.44 %
	1	<i>Proteus mirabilis</i>	0.73 %
	15	Microorganismos no fermentadores	10.79 %

	31	Microorganismo no identificado	22.30 %
	2	No hubo crecimiento	1.44 %
	Total:139		100 %

Fuente: Autor

No se logró identificar (15/139) de las muestras analizadas, razón por la cual se los catalogó como microorganismos no identificados ya que no pertenecen al grupo de bacilos gramnegativos entéricos (Brooks et al., 2014). Se detectó (15/139) muestras de bacilos gramnegativos no fermentadores (BGNNF), los cuales no utilizan los hidratos de carbono como fuentes de energía, estos microorganismos se encuentran distribuidos en el suelo, agua y plantas, a más de 120 especies se les atribuye como patógenos oportunistas (Radice et al., 2011). En dos muestras no existió crecimiento de ninguna colonia en los medios de cultivo suele suceder en VLC ya que son limpiados y desinfectados antes de su comercialización (Aparecida et al., 2011).

Los resultados de ausencia de cepas de *Salmonella* en nuestro estudio de vegetales listos para el consumo son muy similares a estudios realizados en la ciudad de Teherán con un total de 116 muestras (Jeddi et al., 2014), en Irlanda con 1545 muestras (Monitoring & Surveillance, 2015); y en la provincia de Cagliari en Italia con un total de 159 muestras no se observó ninguna cepa de *Salmonella* en VLC (Duggan et al., 2012). Sin embargo cabe recalcar que en otros estudios si se evidencio la presencia de *Salmonella*, como en Irlanda se evaluaron 1000 muestras en donde se detectó 1 muestra contaminada con *Salmonella* que representa el 0.1% (Monitoring & Surveillance, 2015), en Estados Unidos entre los años 2004 y 2012 con un total de 111.598 muestras se reportó 0,41% de muestras contaminadas (Reddy et al., 2016), en São Paulo se reportó el 0,78% de 512 muestras (Sant'Ana et al., 2011), el 1,2% de 162 muestras por (Oliveira et al., 2011) y en España con un total de 236 muestras se encontró 4 muestras que representan el 1.7% de contaminación por *Salmonella* (Brignardello et al., 2014). De igual manera

La ausencia de *Salmonella* en VLC pudo deberse a “factores específicos que impidieron el crecimiento del microorganismo como son: temperatura, pH, Aw y concentraciones de NaCl, provocando estrés a las células, además del exceso de desinfectante” (OPS/OMS, 2015) ; sin embargo estos resultados no indican que los VLC tengan ausencia de microorganismos patógenos que pueden ser causantes de enfermedades, por lo que en el estudio realizado se encontró una variedad de enterobacterias que al igual que *Salmonella* son patógenas para el ser humano entre estas tenemos a *E. coli* y *Shigella spp*, siendo

causantes de enfermedades gastrointestinales y que además están entre los principales patógenos causantes de muertes a nivel mundial (Palomino & Gonzáles, 2014).

E.coli puede sobrevivir en cualquier lugar y más aún en vegetales ya que tiene capacidades de adhesión en la superficie de las plantas además sobreviven en agua y aire, las mayores fuentes de contaminación son el agua contaminada con las que son regados los vegetales (Vera *et al.*, 2015). En el presente estudio se aisló este patógeno de ensaladas de lechuga, col, espinaca y zanahoria con un porcentaje de 5.75% (8/139) del total de las muestras analizadas, resultados similares en la ciudad de Kandy se identificó 2% de *E. coli* en 50 muestras (Silva *et al.*, 2013). Iran reportó el 11.4% (6/20) de contaminación con bacterias patógenas según (Mohammad & Bahreini, 2012) y con una incidencia más baja que la nuestra se detectó la presencia del 0.27% (33/11869) muestras contaminada con *E.coli* en Canadá (Denis, *et al.*, 2016). El 0.5% (1/70) en muestras analizadas en Estados Unidos (Reddy & Feng 2013).

La presencia de *Shigella* en vegetales listos para el consumo se debe a la falta de higiene en el agua con las que suelen ser regadas (Barrantes *et al.*, 2012). En Midland- Odesa, Texas *Shigella* spp fue causante de una gran epidemia por lechugas cortadas y ensaladas listas para consumir (OPS/OMS, 2016). En nuestro estudio se detectó la presencia *Shigella* spp con 1.44% (2/139) en muestras de tomate y manzana baby con una incidencia considerablemente baja. En estudios realizados en Bolivia (Rodríguez *et al.*, 2015), Irlanda (Monitoring & Surveillance, 2015) no se detectó la presencia de *Shigella*. En estudios realizados en a Sin embargo cabe mencionar que pudo haber contaminación a la hora de manipular los vegetales con cuchillos sin desinfectar (Carrasco *et al.*, 2012) o en el proceso de la cosecha, troceado, remojo, envasado y preparación al no manejar correctamente las BPM (Castro-Rosas *et al.*, 2012). La presencia de *Shigella* es una prueba de contaminación fecal (Hernández, 2016). Cabe mencionar que la presencia de este agente patógeno se pudo dar por el medio ambiente o atmosfera que favoreció su crecimiento (Motarjemi *et al.*, 2014). Ya que es resistente a un bajo pH y puede sobrevivir en alimentos con pH ácido, como algunas frutas, verduras y alimentos envasados al vacío o con atmósfera modificada, además de sobrevivir en el agua (Elika, 2013).

Por otro lado se aisló Enterobacterias que afectan principalmente a personas que se encuentran en un estado de inmunodepresión, entre estas tenemos a *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*.

La enterobacteria que se aisló con mayor porcentaje: 38.85% (54/139) fue *Citrobacter* con una incidencia superior a otros estudios, similares realizados en el estado de Osun de Nigeria se identificó el 1.2 % de 50 muestras (Jimoh *et al.*, 2013). En China con un 7,9% (Liu

et al., 2016). Korea el 16.66% (4/24) muestras contaminadas con *Citrobacter* (Song *et al.*, 2011). El 21.57 % en Venezuela, Maracay (Acevedo *et al.*, 2011). Y finalmente en supermercados de Perú se aisló 50% (Guevara *et al.*, 2012). *Citrobacter freundii* tienen la capacidad de producir H₂S, lo que se puede confundir con *Salmonella* (Rodríguez, 2010). En el presente estudio con (4/139) muestras presentaron presencia presuntiva consistente para *Salmonella* pero se confirmó mediante el microgen GN-ID que no eran *Salmonella* si no *Citrobacter freundii*. Dentro de los alimentos que estuvieron contaminados tenemos a ensaladas de lechuga, col más zanahoria, zanahoria rallada, tomate, zanahoria y manzana baby.

De *Enterobacter cloacae* se aisló 12.95% (18/139) en nuestro estudio, valores similares a los encontrados en Corea 33.33% (8/24) muestras (Song *et al.*, 2011), Argentina 75% (9/12) (Zampini *et al.*, 2007), en Sudáfrica 14 % en 252 muestras (Nyenje *et al.*, 2012); finalmente con porcentajes bajos en Italia 2.53 % (Brignardello *et al.*, 2014) y en Colombia el 0.24 % (Méndez *et al.*, 2011). Se atribuye la presencia de esta bacteria en los vegetales listos para el consumo ya que no siempre se elimina por completo al lavarlos o desinfectarlos (Falomir *et al.*, 2013). Se encuentra en vegetales y poseen un mecanismo adherido a la superficie vegetal protegiendo a la Enterobacteria, el cual no siempre se elimina por completo con un lavado (Falomir *et al.*, 2013). La tasa más alta de mortalidad humana ha sido causada por este microorganismo comparado con otras infecciones de Enterobacterias (Álvarez *et al.*, 2014).

Se aisló 4.31 % (6 /139) de *Pantoea agglomerans*, la incidencia del microorganismo es baja; similares a los estudios realizados en Nigeria con el 3.7 % de 50 muestras (Jimoh *et al.*, 2013); en Bogotá 0.4 % (Méndez *et al.*, 2011) y con mayor porcentaje en China con 11.4% (13/114) muestras con *Pantoea agglomerans* (Liu *et al.*, 2016). Este microorganismo ha sido aislado de alimentos como frutas y vegetales, además en heces de seres humanos y de animales (Segado *et al.*, 2012). *Pantoea agglomerans*, en humanos, puede ser un patógeno oportunista causante de síntomas muy severos (Bohra *et al.*, 2012). Por otro lado existen cepas de esta especie que han resultado ser benéficas (Fujikawa & Akimoto, 2011).

Se aisló el 1.44%, de *Enterobacter aerogenes* con una incidencia baja, similares a estudios realizados en Corea, el 0.04 % (4/24) (Song *et al.*, 2011), el 2.4% de 50 muestras en el estado de Osun (Jimoh *et al.*, 2013); en Rusia 9.80 % (15/232) (Levchuk *et al.*, 2012). Finalmente con un incidencia alta el 56% de 18 muestras en la ciudad de Benin en Nigeria (Osamwonyi *et al.*, 2013). La contaminación de los vegetales se pudo deber al agua o suelo (Regli & Pagès, 2015). Esta especie se encuentra considerablemente distribuida en el agua,

suelo y vegetales, formando parte de la flora entérica comensal, está asociada con infecciones oportunistas aunque no existe evidencia de que sea causante de diarrea (Escalante & Padilla, 2010). Esta posee una protección que le permite adaptarse a cualquier medio ambiente y de igual manera su metabolismo se adapta a condiciones externas (Regli & Pagès, 2015)

Se aisló el 0.73 % (1/139) de *Proteus mirabilis* siendo la bacteria con el porcentaje más bajo de este estudio. En estudios similares se encontraron porcentajes mucho más elevados en Sudáfrica el 6.3% de 252 muestras (Nyenje *et al.*, 2012), el 10% en La Paz, de 81 muestras (Calvo *et al.*, 2008), el 14.6 % de 50 muestras en la ciudad de Osun, Nigeria (Jimoh *et al.*, 2013) y finalmente el 50% (6/12) de muestras en Argentina (Zampini *et al.*, 2007). *Proteus mirabilis* es causante de infecciones oportunistas y nosocomiales y puede causar severas infecciones (Bellis, 2013). La presencia de este microorganismo en vegetales puede deberse a factores como contaminación en el lugar de producción y manipulación (Calvo *et al.*, 2008).

De acuerdo a las normas internacionales de alimentos (CODEX) debe existir ausencia de microorganismos patógenos como *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, de acuerdo a los resultados obtenidos las muestras analizadas no cumplen con la norma por lo pueden afectar la salud del consumidor (FAO/OMS, 2016), ya que como se mencionó en apartados anteriores estas enterobacterias son causantes de enfermedades gastrointestinales.

CONCLUSIONES

- ❖ En el presente estudio no se detectó la presencia de *Salmonella spp.* en vegetales frescos listos para el consumo, por tal motivo no se logró realizar la serotipificación de los mismos.
- ❖ La ausencia de *Salmonella* en VLC pudo deberse a diferentes factores específicos, los mismos que impidieron el crecimiento del microorganismo.
- ❖ Los microorganismos aislados en vegetales listos para el consumo en su mayoría son indicadores de contaminación fecal.
- ❖ De acuerdo a los microorganismos obtenidos los vegetales listos para el consumo en su mayoría no están cumpliendo un buen manejo de prácticas de manufactura.
- ❖ Según el CODEX ALIMENTARIUS debe existir ausencia de microorganismos patógenos como *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli*, en base a los resultados obtenidos de vegetales listos para el consumo analizados no se encuentran aptos para el consumo humano ya que las bacterias aisladas son causantes de enfermedades gastrointestinales.

RECOMENDACIONES

- ❖ Para el aislamiento e identificación de *Salmonella spp* se pueden realizar técnicas moleculares como PCR.
- ❖ Incrementar el número de muestras para el aislamiento e identificación de microorganismos patógenos como son *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli* y así obtener un mayor número de resultados los cuales servirían para un estudio epidemiológico, previniendo futuras enfermedades gastrointestinales en los consumidores.
- ❖ Recomiendo realizar nuevos estudios en vegetales listos para el consumo, ya que se encontraron microorganismos que son indicadores de un mal manejo de las BPM e indicadores de higiene.
- ❖ Manipular asépticamente las muestras en estudio, para evitar posibles contaminaciones cruzadas entre los vegetales y dando resultado erróneos

BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, L., Oyón, C., & R., M. (2011). Coliformes totales, fecales y algunas enterobacterias, *Sthaphylococcus* sp. y hongos en ensaladas para perro calientes expandidas en la ciudad de Maracay, Venezuela. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*.
- Alerte, V., Cortés, S., Díaz, J., Vollaire, J., Espinoza, E., Solari, V., Cerda, J., & Torres, M. (2012). Foodborne disease outbreaks around the urban Chilean areas from 2005 to 2010. *Revista Chilena de Infectología*, 29(1), 26–31. <http://doi.org/S0716-10182012000100004>
- Álvarez, C., Osorio, N., & Montoya, M. (2014). Molecular Identification of Microorganisms Associated to the Rhizosphere of Vanilla Plants in Colombia Molecular Identification of Microorganisms Associated to the Rhizosphere of Vanilla Plants in Colombia. *ResearchGate*, (July).
- Álvarez, V. Protocolo De Vigilancia Y Control De Fiebre Tifoidea Y Paratifoidea (2010). Retrieved from <http://www.scielosp.org/pdf/bwho/v82n5/v82n5a08.pdf>.
- Andino, F., & Castillo, Y. (2010). Un enfoque práctico para la inocuidad alimentaria. *Universidad Nacional de Ingeniería UNI - Norte*, 63. Retrieved from <http://avdiaz.files.wordpress.com/2010/02/documento-microbiologia.pdf>
- Aparecida, M., Maciel, V., Morato, A., & Pereira, E. (2011). Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. *Food Control*, 22(8), 1400–1403. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.02.020>
- Barrantes, K., Achí, R., Bolaños, S., Cerdas, M., & Cortés, X. (2012). CALIDAD Microbiológica Y Aislamiento De *Shigella Flexneri* En Vegetales Frescos Del Área Metropolitana De Costa Rica, 2001-2012. *Instituto de Investigación En Salud*, 2001–2002. Retrieved from <http://revistasan.ucr.ac.cr/san/index.php/revistasan/article/view/27/26>
- Bellis, L. (2013). Evaluación de la actividad de extractos y aceites vegetales de plantas de la región contra *Proteus mirabilis* uropatogénico. *Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable*.
- Betancor, L., & Yim, L. (2012). Salmonella y salmonelosis. *Bacteriología, Departamento De De, Departamento Desarrollo Biotecnológico, Facultad de Medicina, UdelaR.*, 1–11.
- Bohra, I., Mahajan, R., Jain, S., Chugh, T., & S, J. (2012). *Pantoea agglomerans* infection behaving like a tumor after plant thorn injury: An unusual presentation. *Indian J Pathol Microbiol*, 55(3), 386–388. Retrieved from <http://www.ijpmonline.org/article.asp?issn=03774929;year=2012;volume=55;issue=3;sp>

age=386;epage=388;aulast=Jain

- Brignardello, S., Sabiu, R., Tedde, T., Cocco, E., Pitzalis, G., Meli, C., & Cogoni, M. (2014). Microbiological findings in ready-to-eat and precooked food distributed in public catering halls in Cagliari Province, Italy. *Italian Journal of Food Safety*, 3(3), 1–5. <http://doi.org/10.4081/ijfs.2014.1733>
- Brooks, G., Carrol, K., Butel, J., Morse, S., & Mietzner, T. (2014). *Jawetz, Melnický Adellberg. Microbiología Médica*. (M. G. Hill, Ed.) (26 a). México.
- Cabezas, M. (2011). “Intervención Educativa Sobre Prevención De Enfermedades Diarreicas Agudas Desde El Enfoque Aiepi Comunitario Para Madres Con Niños Menores De Cinco Años Del Centro De Educacion Inicial Lic. Alfonzo Chávez Jara. Noviembre 2010 Abril 2011”. Escuela Superior Politécnica De Chimborazo Facultad De Salud Pública. Retrieved from <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2042/1/104T0005.pdf>
- Cabral, J. (2010). Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(10), 3657–3703. <http://doi.org/10.3390/ijerph7103657>
- Calva, E. (2010). Salmonella typhi y la fiebre tifoidea: de la biología molecular a la salud pública. *Instituto de Biotecnología, UNAM*. Retrieved from <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap4/>
- Calvo, M., Flores, D., Callisaya, O., & Paredes, P. (2008). Enterobacterias en lechugas expandidas en hipermaxi, ketal y mercado popular Rodríguez de la ciudad de La Paz, agosto-septiembre 2006. *Revista Científica – Sociedad Científica de Estudiantes de Medicina*, 2–3.
- Campoverde, C. (2016). *Detección y aislamiento de cepas presuntivas de E.coli productor de toxina shiga en vegetales (espinaca, zanahoria y col) listos para el consumo*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Carrasco, E., Morales, A., & García, R. (2012). Cross-contamination and recontamination by Salmonella in foods: A review. *Food Research International*, 45(2), 545–556. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.004>
- Castro, A. (2014). *Bacteriología Médica basada en problemas*. (M. Moderno, Ed.) (Segunda). México. Retrieved from https://books.google.com.ec/books?id=0_AWCQAAQBAJ&pg=PT142&dq=enterobaceafamilia&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj19eH83dvRAhWDMYyYKHSTIDjA4ChDoAQgtMAU#v=onepage&q=enterobaceae familia&f=false
- Castro-Rosas, J., Cerna-Cortés, J., Méndez-Reyes, E., Lopez-Hernandez, D., Gómez-Aldapa, C., & Estrada-García, T. (2012). Presence of faecal coliforms, Escherichia coli and diarrheagenic E. coli pathotypes in ready-to-eat salads, from an area where crops

- are irrigated with untreated sewage water. *International Journal of Food Microbiology*, (156(2)), 176–180. <http://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.025>
- Chutan, L. (2016). *Caracterización Epidemiológica, Clínica y Terapéutica de pacientes con Fiebre Tifoidea durante el período de 2010 a 2014 en el Hospital de Cobán, A.V.* UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD.
- Delgado, R. (2015). Peculiaridad de la clasificación taxonómica y nomenclatura del género *Salmonella*. *Acta Médica Del Centro*, 9(4), 73–75.
- 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, 225–234. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.047>
- Doulgeraki, A. I., Paramithiotis, S., & Nychas, G. J. E. (2011). Characterization of the Enterobacteriaceae community that developed during storage of minced beef under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 77–83. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.030>
- Duggan, S., Jordan, E., Gutierrez, M., Barrett, G., OBrien, T., Hand, D., ... Egan, J. (2012). *Salmonella* in meats, water, fruit and vegetables as disclosed from testing undertaken by Food Business Operators in Ireland from 2005 to 2009. *Irish Veterinary Journal*, 65, 17. <http://doi.org/10.1186/2046-0481-65-17>
- Dura, A., Almela, C., & Ortolá. (2015). *Modelización de la tasa respiratoria de caqui rojo brillante. Universidad Politecnica de Valencia.*
- Elika. (2013). *Shigella. Funadacion Vasca Para La Seguridad Agroalimentari*, 1–3.
- Engelkirk, P., Engelkirk, J., & Burton, G. (2011). *Burton's Microbiology for the Health Sciences.*
- Escalante, R., & Padilla, J. (2010). "Frecuencia de bacterias aisladas en líquidos peritoneales de pacientes atendidos en el servicio de nefrología del hospital nacional de niños benjamín bloom, de marzo de 2009 a marzo de 2010." Universidad De El Salvador Facultad De Medicina Escuela De Tecnología Médica Licenciatura. Retrieved from <http://ri.ues.edu.sv/151/1/10135964.pdf>
- Fallis, A. (2013). Identificación de los Sitios de Contaminación en la Cadena de Producción de Tomate y Chile Jalapeño Mediante la Determinación de Microorganismos Indicadores de Contaminación Fecal y Enteropatógenos. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Falomir, M., Rico, H., & Gozalbo, D. (2013). Enterobacter and Klebsiella species isolated from fresh vegetables marketed in Valencia (Spain) and their clinically relevant resistances to chemotherapeutic agents. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(12),

- 1002–7. <http://doi.org/10.1089/fpd.2013.1552>
- FAO/OMS. Codex Alimentarius/ Norma general para los aditivos alimentarios (2016).
- Fernández, A., García, C., Saéz, J., & Valdezate, S. (2010). *Metodos de Identificacion Bacteriana en el Laboratorio de Microbiología*. (E. C. y R. Cantón, Ed.), *Procedimientos en Microbiología Clínica* (Vol. 37). Esoaña. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Fernández, A., Noriega, E., & Thompson, A. (2013). Inactivation of Salmonella enterica serovar Typhimurium on fresh produce by cold atmospheric gas plasma technology. *Food Microbiology*, 33(1), 24–29. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2012.08.007>
- Forsythe, S. (2010). *The Microbiology of Safe Food*. (Oxford, Ed.) (Second). United Kingdom.
- Fujikawa, H., & Akimoto, R. (2011). New blue pigment produced by Pantoea agglomerans and its production characteristics at various temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(1), 172–178. <http://doi.org/10.1128/AEM.00264-10>
- Gallegos, F. (2014). “Resistencia bacteriana en pacientes atendidos con gastroenteritis por salmonella spp. en el hospital corazón inmaculado de maría, del cantón el chaco.” Universidad técnica de ambato facultad de ciencias de la salud.
- García. (2011). *Salmelosis porcina en España: prevalencia, factores de riesgo y resistencia antimicrobiana*. UNIVERSIDAD DE LEÓN.
- García, Carreño, M., Alcayaga, S., & Ulloa, J. (2012). Descripción clínica y epidemiológica de un grave brote de salmonelosis transmitida por alimentos. *Revista Chilena de Infectología*, 29(2), 132–137. <http://doi.org/10.4067/S0716-10182012000200002>
- García, E., Hernández, A., Herrero, J., & Gómez, J. (2014). Infecciones por Salmonella y Yersinia. *Medicine (Spain)*, 11(56), 3322–3326. [http://doi.org/10.1016/S0304-5412\(14\)70777-2](http://doi.org/10.1016/S0304-5412(14)70777-2)
- Gonzalez, J., Pereira, N., Soto, Z., Hernández, E., & Camacho, J. (2014). Aislamiento de Salmonella spp y herramientas moleculares para su detección. *Revista Científica Salud Uninorte*. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.14482/sun.30.1.4316>
- Guerrero, J. Enfermedades Transmitidas por alimentos. PROTOCOLO DE VIGILANCIA EN SALUD PUBLICA, Instituto Nacional De Salud 3–4 (2016).
- Guevara, L., Delgado, A., Herrera, E., Torres, A., Avelino, F., Navarro, A., & Parada, F. (2012). Scientia Agropecuaria Diversidad de enterobacterias asociadas a frutos de tomate (Lycopersi- cum sculentum Mill) y suelos de invernadero Diversity of enterobacteria associated with tomato (Lycopersicum scu- lentum Mill) fruits and greenhouse soils. *Scientia Agropecuaria Sitio*.
- Gyles, C., Prescott, J., Songer, G., & Thoen, C. (2010). *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. (W.- Blackwel & L, Eds.), *Pathogenesis of bacterial infections in animals* (4

- ta). <http://doi.org/10.1126/science.1088196>
- Hernández. (2016). *Microbiología de los Alimentos Fundamentos y Aplicaciones en Ciencias de la Salud*.
- Hernández, C., Aguilera, M., & Castro, G. (2011). Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología*, 31(4), 137–151.
- ISPC. Vigilancia de laboratorio Salmonella spp. 2009-2014, 4 Instituto de Salud Publica Chile 1–5 (2014). <http://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Jeddi, M., Yunesian, M., Gorji, M., Noori, N., Pourmand, M., & Khaniki, G. (2014). Microbial evaluation of fresh, minimally-processed vegetables and bagged sprouts from chain supermarkets. *Journal of Health, Population and Nutrition*, 32(3), 391–399.
- Jimoh, S., Shittu, A., & Morhason, I. (2013). Occurrence of virulence factor and extended spectrum beta lactamase in enterobacteriaceae associated with ready-to-eat-fruits. *International Journal of Biology and Biological Sciences*, 2(5), 83–87.
- Jurado, R., Arenas, C., Doblas, A., Rivero, A., & Torre, J. (2010). Fiebre tifoidea y otras infecciones por salmonellas. *Medicine*, 10(52), 3497–3501. [http://doi.org/10.1016/S0304-5412\(10\)70069-X](http://doi.org/10.1016/S0304-5412(10)70069-X)
- Kenneth, J. R., & Ray, C. G. (2004). *Spread and Control of Infection. Sherris Medical Microbiology*. <http://doi.org/10.1036/0838585299>
- Lares, M., Perez, E., Mileibys, S., Brito, S., & Mata, C. (2011). Evaluation and comparison of the alimentary behavior of health professionals in two hospital centers. *AVFT*.
- Levchuk, O., Mudryk, M., Petrov, V., Dolgikh, A., Kutchak, I., Pauk, A., & Hayran, O. (2012). FINAL REPORT OF THE MICROBIOLOGICAL CHARACTERISATION OF TYPICAL BSAC FOODS. *BaSeFood*, 1–65.
- Liu, H., Zhu, J., Hu, Q., & Rao, X. (2016). Morganella morganii, a non-negligent opportunistic pathogen. *International Journal of Infectious Diseases*, 50, 10–17. <http://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.07.006>
- López, D., Rivero, E., Martínez, A., & Alegret, M. (2013). Enfermedades transmitidas por alimentos en villa clara. *Revista Cubana de Higiene Y Epidemiología*, 51(2), 203–213.
- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., & Stahl, D. (2015). *Brock. Biología de los microorganismos*. (Pearson, Ed.) (14th ed.). Madrid.
- Méndez, I., Badillo, C., Parra, G., & Faccini, Á. (2011). Caracterización microbiológica de Salmonella en alimentos de venta callejera en un sector universitario de Bogotá, Colombia. Julio a octubre de 2010. *Microbiological Characterization of Salmonella in Street-Vended Foods an University Sector in Bogotá, Colombia. July-October 2010.*, 24(1), 23–29. Retrieved from

- <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fua&AN=76362717&lang=es&site=ehost-live>
- Monitoring, & Surveillance. (2015). Survey of the microbiological safety of ready-to-eat, pre-cut and pre-packaged fresh herbs and salad leaves from retail establishments in Ireland (13NS7). *Food Safety- Authority of Ireland*, (May).
- Motarjemi, Y., Moy, G., & Tood, E. (2014). *Encyclopedia of Food Safety*. (A. rights. Elsevier, Inc, Ed.) (1 ra). USA.
- Nyenje, M., Odjadjare, C., Tanih, N., Green, E., & Ndip, R. (2012). Foodborne pathogens recovered from ready-to-eat foods from roadside cafeterias and retail outlets in Alice, eastern cape province, South Africa: Public health implications. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9(8), 2608–2619. <http://doi.org/10.3390/ijerph9082608>
- Odumeru, J., & León, C. (2012). *Salmonella Detection Methods for Food and Food Ingredients, Salmonella – A Dangerous Foodborne Pathogen*. (InTech, Ed.). Croacia.
- Oliveira, M. A., Souza, V. M., Morato Bergamini, A. M., & Martinis de Pereira, E. C. (2011). Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. *Food Control*, 22(8), 1400–1403. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.02.020>
- OMS. (2013). Salmonella (no tifoidea). Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/>
- OPS/OMS. (2013). Tifoidea. *Publicación Científica Y Técnica*, 317–324.
- OPS/OMS. (2016). Peligros biológicos Inocuidad de Alimentos - Control Sanitario - HACCP. OMS.
- Osamwonyi, O., Obayagbona, O., Aborisade, W., Olisaka, F., Uwadiae, E., & Igiehon, I. (2013). Bacteriological Quality of Vegetable Salads Sold at Restaurants Within Okada Town, Edo State, Nigeria. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 5(2), 87–90. <http://doi.org/10.5829/idosi.ajbas.2013.5.1.6674>
- Pachón, D. (2009). *aislamiento, identificación y serotipificación de enterobacterias del género salmonella en una población de crocodylus intermedius y testudinos mantenidos en cautiverio en la estación de biología tropical roberto franco e.b.t.r.b de la Facultad De Ciencia*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Pachón, D., Pulido, A., & Moreno, C. (2011). Aislamiento y serotipificación de Salmonella sp. en estanques con Crocodylus intermedius y testudines cautivos en Villavicencio - Colombia. *Revista MVZ Cordoba*, 16(2), 2564–2575.
- Palomino, C., & Gonzáles, Y. (2014). Técnicas Moleculares Para La Detección E Identificación de Patógenos En Alimentos: Ventajas Y Limitaciones. *Revista Peruana de Medicina Experimental Y Salud Pública*, 31(3), 535–546.

- Portuondo, I. (2012). *Bacillus cereus* y su papel en las intoxicaciones alimentarias. *Revista Cubana de Salud Pública*, 38(1), 98–108. Retrieved from <http://www.scielosp.org/pdf/rcsp/v38n1/spu10112.pdf>
- Prats, G. (2012). *Microbiología y Parasitología Médicas*. (M. Pnamericana, Ed.). Madrid.
- Puerta, A., & Rodríguez, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*, 10(51), 3426–31. [http://doi.org/10.1016/S0304-5412\(10\)70056-1](http://doi.org/10.1016/S0304-5412(10)70056-1)
- Radice, M., Marín, M., Giovanakis, M., Vay, C., Almuzara, M., Limansky, A., ... Gutkind, G. (2011). Criterios de ensayo, interpretación e informe de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos en los bacilos gram negativos no fermentadores de importancia clínica: Recomendaciones de la subcomisión de antimicrobianos de la sociedad argentina de bacteriología. *Revista Argentina de Microbiología*, 43(2), 136–153.
- Reddy, S. P., Wang, H., Adams, J. K., & Feng, P. C. H. (2016). Prevalence and Characteristics of Salmonella Serotypes Isolated from Fresh Produce Marketed in the United States. *Journal of Food Protection*, 79(1), 6–16. <http://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-274>
- Ramos, D. (2016). *Detección y aislamiento de cepas presuntivas de E.coli productor de toxina shiga en vegetales (zanahoria, tomate y manzana) listos para el consumo*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Ray, B., & Bhunia, A. (2010). *Fundamentos de Microbiología de los Alimentos*. (M. G. Hill, Ed.). México.
- Redacción, S. (2015). Tifoidea, una bacteria que ha cobrado 200.000 muertos. *El Espectador*.
- Regli, A., & Pagès, J. (2015). Enterobacter aerogenes and Enterobacter cloacae; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Frontiers in Microbiology*. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00392>
- Robledo, A. (2015). Investigación de Salmonella spp en alimentos mediante el método tradicional ISO 6579 y dos métodos inmunoenzimáticos.
- Rodríguez M., A. P.-G. y F. (2010). A. Puerta-García y F. Mateos-Rodríguez, 10(51).
- Rodríguez, M., Zapata, M., Solano, M., Lozano, D., Torrico, F., & Torrico, R. (2015). Evaluation of microbiological contamination of lettuce (*Lactuca sativa*) in the food chain, province of Quillacollo, Cochabamba, Bolivia 2015. *Scielo Gaceta Médica Boliviana*. Retrieved from http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S1012-29662015000200006&script=sci_arttext
- Rodríguez-Cavallini, E., Rodríguez, C., Gamboa, M., & Arias, M. (2010). Evaluación microbiológica de alimentos listos para consumo procesados por pequeñas industrias costarricenses. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, (60(2)), 179–183.

- Sabbithi, A., Kumar, R., Kashinath, L., Bhaskar, V., & Rao, V. (2014). Microbiological Quality of Salads Served along with Street Foods of Hyderabad , India Microbiological Quality of Salads Served along with Street Foods of Hyderabad , India. *International Journal of Microbiology*, 2014(MAY), 6. <http://doi.org/10.1155/2014/932191>
- Sánchez, M. (2013). *Determinación de la prevalencia de enterobacterias del género Salmonella spp. en huevos frescos de gallina de empresas avícolas de la provincia del Tungurahua*. Universidad Central del Ecuador Facultad De Medicina Veterinaria y Zootecnia. Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/1157>
- Sant'Ana, A. S., Landgraf, M., Destro, M. T., & Franco, B. D. G. M. (2011). Prevalence and counts of Salmonella spp. in minimally processed vegetables in São Paulo, Brazil. *Food Microbiology*, 28(6), 1235–1237. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2011.04.002>
- Segado, A., Alonso, A., Lubián, S., & García, A. (2012). Pantoea agglomerans: ¿un nuevo patógeno en la unidad de cuidados intensivos neonatales? *Archivos Argentinos de Pediatría*, 110(4), e77–e79. Retrieved from http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-00752012000400017&lang=pt
- Silva, G., Abayasekara, C., & Dissanayake, D. (2013). Freshly Eaten Leafy Vegetables : A Source of Food Borne Pathogens ? *Ceylon Journal of Science (Bio. Sci.)*, 42(2), 95–99. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.4038/cjsbs.v42i2.6613>
- Song, W., Park, M., Kim, H., Kim, J., Kim, H., & Lee, K. (2011). Comparison of Clinical and Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoints for β -Lactams in Enterobacteriaceae Producing Extended-Spectrum β -Lactamases and/or Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamases. *Korean Journal of Clinical Microbiology*, 14(1), 24. <http://doi.org/10.5145/KJCM.2011.14.1.24>
- Spricigo, D., Bardina, C., Cortés, P., & Llagostera, M. (2013). Use of a bacteriophage cocktail to control Salmonella in food and the food industry. *International Journal of Food Microbiology*, 165(2), 169–174. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.009>
- Terzolo, H. (2010). Salmonella Enteritidis ¿vacunar o no vacunar? In *Ponencia presentada en el II Congreso del Huevo*. Tungurahua, Baños.
- Tirado, D., Moreno, R., & Celades, E. (2009). Evolución de los serotipos, fagotipos y resistencia a antimicrobianos de. *Microbiología Clínica*, 26(6), 520–527.
- Uribarren, T. (2015). SALMONELOSIS. *Departamento de Microbiología Y Parasitología , UNAM*. Retrieved from <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/salmonelosis.html>
- Vera, A., Manjarrez, C., Acosta, C., Guerrero, V., Parra, R., Noriega, L., & Ávila, G. (2015). Interacciones entre Escherichia coli O157:H7 y Plantas Comestibles. ¿Se han

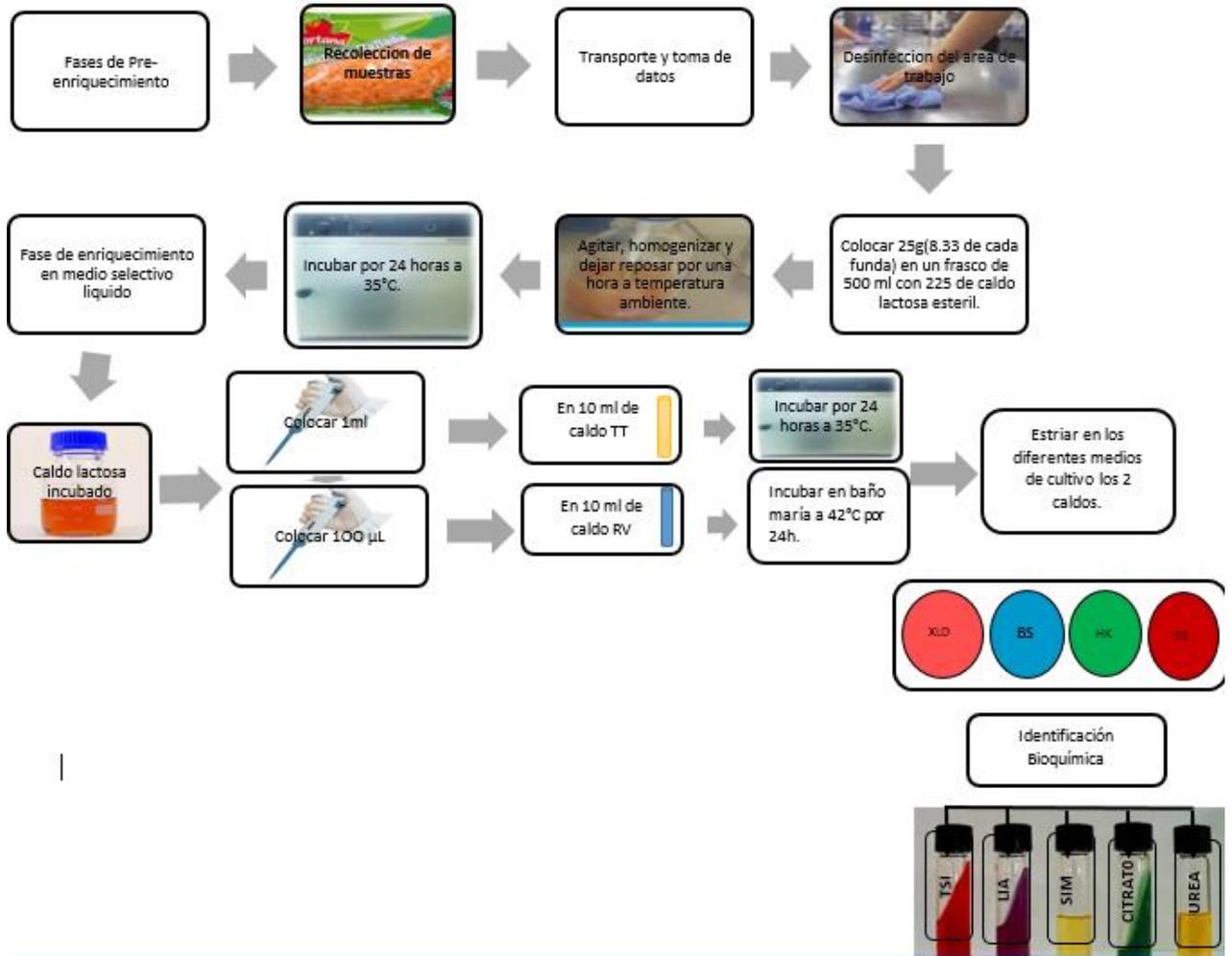
Desarrollado Mecanismos de Internalización Bacteriana? *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 64–83.
<http://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1507-4>

Zampini, C., Cudmani, N., & Isla, M. (2007). Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes. *Microbiología*, 41(3), 99–105.

Zaragoza, N., & Derrickson, B. Análisis microbiológico de los alimentos, 5 Anmat 1–175 (2011).

ANEXOS

Anexo 1: flujograma de la metodología



Anexo 2: Interpretación e identificación de microorganismos en pruebas bioquímicas

Microorganismo	TSI	GAS	H2H	LIA	UREA	SIM	INDOL	CITRATO
<i>E. coli</i>	A/A	+	-	+	-	+/-	+	-
<i>Shigella spp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	A/A	+	-	-	+/-	+	-	+
<i>Citrobacter Freundii</i>	A/A	-	-	-	-	+	-	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	A/A	+	-	+	-	+	-	+
<i>Proteus mirabilis</i>	K/A	+	+	-	-	+	-	+
<i>Pantoea agglomerans</i>	K/A	+/-	-	-	+/-	+	+/-	+/-
Microorganismos no fermentadores	K/K	-	-	+	-	-	-	-
Microorganismos no identificados	A/A	-	+	-	-	-	-	-

Anexo 3: Metodología del Microgen GN-ID Identificación.

PROCEDIMIENTO - INOCULACIÓN E INCUBACIONES

1. Hacer un test oxidasa del organismo aislado. Los organismos oxidasa positivos solo se pueden identificar inoculando tanto las tiras del GN A como GN B.
2. Emulsificar una única colonia obtenida de un cultivo de 18-24 horas en 3 mL de solución salina estéril 0.85% para la tira GN A. Si se van a inocular ambas tiras, GN A y GN B, la colonia se debe emulsificar en 3-5mL de solución salina estéril 0.85%. Mezclar bien.
3. Quitar la lámina adhesiva que sella los pocillos cuidadosamente. NO tirar la tira adhesiva, que a posteriori se volverá a necesitar.
4. Usando una pipeta pasteur estéril, añadir 3-4 gotas (aproximadamente 100µL) de la suspensión bacteriana a cada pocillo de la tira(s).
5. Para comprobar la pureza del inóculo, transferir 1 gota de la suspensión bacteriana a una placa de medio no-selectivo. Incubar la placa aeróbicamente a 35-37°C durante 18-24 horas.
6. Después de la inoculación, revestir los pocillos 1,2 y 3 (numerar la tira GN A empezando por el final de la etiqueta) y pocillos 20 y 24 (tira GN B – el pocillo 13 es al final de la etiqueta) con 3-4 gotas de aceite mineral. (NO añadir aceite en el pocillo 20 si el organismo aislado es oxidasa positivo). Estos pocillos están marcados con un círculo Negro alrededor para facilitar su identificación.
7. Sellar la parte superior de la tira(s) con la cinta adhesiva que se había retirado antes e incubar a 35-37°C. Asegurarse que los “agujeros” de la cinta adhesiva están sobre los pocillos 7, 11 y 12 en la tira GN A strip y sobre el pocillo 14 en la tira GN B
- . 8. Las tiras GN A t GN B se leerán después de 18-24 horas de incubación para las Enterobacteriaceae, y tras 48 horas para los aislados oxidasa positivos.

PROCEDIMIENTO – LECTURA Y ADICIÓN DE REACTIVOS

Tira GN A

1. Quitar la cinta adhesiva y anotar todas las reacciones positivas con la ayuda de la carta de color
(incluida). Anotar los resultados en la hoja de resultados proporcionada.

2. Añadir los reactivos apropiados a los siguientes micropocillos:

a) Añadir 2 gotas de reactivo Kovac's al pocillo 8. Leer y anotar los resultados después de 60 segundos. Formación de color rojo indica un resultado positivo.

b) Añadir 1 gota del reactivo VP I y 1 gota del reactivo VP II al pocillo 10 y leer y anotar los resultados tras 15-30 minutos.

La formación de un color rosa / rojo indica un resultado positivo.

c) Añadir 1 gota del reactivo TDA al pocillo 12 y leer después de 60 segundos. La formación de un color rojo cereza indica un resultado positivo.

3. Hacer el test de reducción de nitrato al pocillo 7 después de leer y anotar el resultado del test ONPG. Añadir 1 gota del reactivo Nitrato A y una gota del reactivo Nitrato B al pocillo y leer después de 60 segundos. El desarrollo de color rojo indica que el nitrato ha sido reducido a nitrito. Si el pocillo 7 se mantiene amarillo o incoloro después de la adición de los reactivos nitrato, añadir una pequeña cantidad de polvo de zinc. Esto indicará si el nitrato ha sido completamente reducido a nitrógeno gas.

Ej. Después de la adición del Nitrato A + B:

Rojo = Positivo

Incoloro / amarillo = Negativo

Después de la adición de polvo de zinc:

Incoloro / amarillo = Positivo

Rojo = Negativo

4. Anotar estos resultados adicionales en la hoja de resultados proporcionada.

Tabla de identificación Microgen™ GN ID

Colour chart/Farbtafel/Tableau 'de couleurs

Microgen™ GN A ID

WELL/NAPFCHEN /GODET	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	7
Reaction	Lysine	Ornithine	H ₂ S	Glucose	Mannitol	Xylose	O.N.P.G.	Indole	Urease	V.P.	Citrate	T.D.A.	Nitrate
Negative													
Positive													

Microgen™ GN B ID

WELL/NAPFCHEN /GODET	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	12
Reaction	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine 24hrs	Arginine 48hrs
Negative													
Positive													

CAUTION: Keep out of direct sunlight. Due to laminate discoloration and paper ageing, the colours on this chart will change.
These colours are provided as general guide to the range of test colours.

Legend:

- Appropriate reagents to be added prior to reading.
- Overlaid with sterile mineral oil.
- Not overlaid with oil for oxidase positive organism.

Fuente: Pazmiño, 2012

Anexo 4: tipo de enterobacterias encontradas en los productos que sirvieron de muestra para nuestro estudio.

Muestras de vegetales listos para el consumo	Número de cepas aisladas	Microorganismo identificado
Ensalada cesar (lechuga romana)	10	<i>Citrobacter freundii</i> 38.85 %
Ensalada primavera (Lechuga Alemana Roja y verde)	1	
Lechuga Romana (Ensalada mexicana)	1	
Lechuga crespita y seda (ensalada italiana)	8	
Ensalada de espinaca	2	
Ensalada cole slaw zanahoria + col	12	
Zanahoria rallada	12	
Tomate baby	1	
Zanahoria baby	5	
Manzana baby	2	
total	54	
Ensalada cole slaw zanahoria + col	6	<i>Enterobacter cloacae</i> 12.95 %
Zanahoria rallada	5	
Tomate baby	2	
Zanahoria baby	1	
Manzana baby	4	
total	18	
Ensalada cesar (lechuga romana)	2	<i>E. coli</i> 5.75 %
Lechuga crespita y seda (ensalada italiana)	2	
Ensalada de espinaca	1	
Ensalada cole slaw zanahoria + col	1	
Zanahoria rallada	1	
Tomate baby	1	
total	8	
Ensalada cesar (lechuga romana)	1	<i>Pantoea agglomerans</i> 4.31%
Ensalada primavera (Lechuga Alemana Roja y verde)	2	
Zanahoria rallada	1	
Tomate baby	2	
total	6	
Zanahoria baby	2	<i>Enterobacter aerogenes</i> 1.44%
total	2	
Tomate baby	1	<i>Shigella spp.</i> 1.44%
Zanahoria baby	1	
total	2	
Ensalada cesar (lechuga romana)	1	<i>Proteus mirabilis</i> 0.73%
total	1	
Ensalada cesar (lechuga romana)	2	
Ensalada mix (Lechuga Verde y	1	

crespa roja)			
Lechuga crespa y seda (ensalada italiana)	4		
Ensalada de espinaca	1		
Ensalada cole slaw zanahoria + col	3	Microorganismos no fermentadores 10.79%	
Lechuga criolla	1		
Zanahoria rallada	2		
Manzana baby	1		
total	15		
Ensalada cesar (lechuga romana)	2		Microorganismo no identificado 22.30 %
Ensalada mix (Lechuga Verde y crespa roja)	1		
Ensalada mexicana (Lechuga Romana)	1		
ensalada italiana (Lechuga crespa y seda)	3		
Ensalada cole slaw zanahoria + col	9		
Zanahoria rallada	7		
Tomate baby	3		
Zanahoria baby	2		
Manzana baby	3		
total	31		
Ensalada cole slaw zanahoria + col	2	No hubo crecimiento 1.44 %	
total	2		
TOTAL	139	100%	

Fuente: Autor