



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO.

Aislamiento y detección de *Salmonella* en vegetales frescos listos para el consumo.

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Apolo Suquilanda, Carlos Daniel

DIRECTORA: Hualpa Salinas, Diana Inés, Mgtr.

LOJA-ECUADOR

2016

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Magister.

Diana Hualpa Salinas

DIRECTORA DE TESIS.

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO realizado por el Sr. Carlos Daniel Apolo Suquilanda, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, octubre del 2016.

Mgtr. Diana Hualpa Salinas

DIRECTORA

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Carlos Daniel Apolo Suquilanda declaro ser autor del presente trabajo de titulación: Aislamiento y detección de *Salmonella* en vegetales frescos listos para el consumo, de la titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo la Mgtr. Diana 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:.....

Carlos Daniel Apolo Suquilanda

1900651926

DEDICATORIA

Dedico éste trabajo a las personas que quiero en las cuales se encuentran mi familia y amigos, por todas esas veces que me han brindado su ayuda y comprensión, ya que sin la presencia de ellos en mi vida, motivándome, dándome su amor, abrazos y reprensiones que me ayudaron a superarme cada día no habría de culminar con éxito lo que me he propuesto.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS por encaminarme en su voluntad, y sobre todo por su infinito amor para conmigo por regalarme una palabra de verdad todos los días.

A la Universidad Técnica Particular de Loja y al Centro de Biología Celular y Molecular, por brindarme la oportunidad de realizar el proyecto de fin de carrera brindándome sus instalaciones y permitirme desarrollar mis aptitudes para enfrentarme a la vida profesional.

A la Escuela de Bioquímica y Farmacia, bajo la Dirección de la Mg. Luis Cartuche por su constante dedicación para formar profesionales competentes y con calidad humana. A mis maestros que con sus sabios conocimientos me formaron académica y personalmente.

A la Mgtr. Diana Hualpa Salinas, por la oportunidad brindada al entregarme este trabajo de fin de titulación, por la dirección en la presente y su permanente apoyo brindado en el laboratorio y en la redacción de este trabajo, por sus sabios consejos, por su dedicación y comprensión, mi más sincera gratitud.

A mis compañeros de laboratorios por la ayuda y entrega de ellos mismos en este proyecto, por sus consejos y enseñanzas, gracias.

Carlos Daniel Apolo Suquilanda

INDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA.....	i
APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
INDICE DE CONTENIDOS	vi
ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	2
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN.....	4
CAPITULO I.....	6
MARCO TEÓRICO	6
1.1. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA).....	7
1.1.1. Infección alimentaria.....	7
1.1.2. Intoxicación alimentaria.....	7
1.2. <i>Salmonella</i>	8
1.2.1. Fuente y transmisión.....	9
1.2.2. Enfermedad.....	10
1.2.3. Fundamento del método convencional para detección de <i>Salmonella</i> spp en alimentos.....	11
1.2.3.1. <i>Pre-enriquecimiento no selectivo</i>	11
1.2.3.2. <i>Enriquecimiento selectivo</i>	11
1.2.3.3. <i>Medios de cultivo en agar selectivos</i>	12
1.2.3.4. <i>Pruebas bioquímicas diferenciales</i>	13
1.3. Vegetales.....	14
1.3.1. Vegetales listos para el consumo (VLC).....	14
CAPITULO II.....	16

MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
2.1. Muestra	17
2.2. Preparación de la submuestra.....	18
2.3. Pre-enriquecimiento no selectivo.....	18
2.4. Enriquecimiento del medio líquido selectivo	18
2.5. Aislamiento en medios selectivos.....	19
2.6. Identificación preliminar	19
2.7. Identificación bioquímica de las cepas.	19
2.7.1. Descripción de reacciones del agar TSI y LIA.....	20
CAPITULO III.....	21
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	21
CONCLUSIONES	27
RECOMENDACIONES.....	28
BIBLIOGRAFÍA.....	29
ANEXOS	34
ANEXO 1. Flujograma de recolección, preparación y pre-enriquecimiento no selectivo de la muestra.....	35
ANEXO 2. Flujograma de enriquecimiento selectivo, aislamiento en medios selectivos y pruebas bioquímicas.....	36
ANEXO 3. Composición, procedimiento de los caldos utilizados en el pre-enriquecimiento no selectivo y enriquecimiento selectivo.....	37
ANEXO 4. Composición, procedimiento de los agares HE y XLD utilizados como medios selectivos.....	38
ANEXO 5. Composición, procedimiento de los agares ABS, LIA utilizados como medio selectivo y prueba bioquímica.....	39
ANEXO 6. Composición, procedimiento del agar TSI y caldo Urea utilizado como pruebas bioquímicas.....	40
ANEXO 7. Cepas típicas aisladas de los medios selectivos.....	41
ANEXO 8. Cuadro de resultados de pruebas bioquímicas.....	42
ANEXO 9. Imágenes de la parte experimental.....	43

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Especies y subespecies del género Salmonella spp y su habitad usual</i>	9
Tabla 2. <i>Plan de muestreo</i>	17
Tabla 3. <i>Morfología típica o atípica de las cepas de Salmonella spp.</i>	19
Tabla 4. <i>Reacciones bioquímicas del género Salmonella</i>	20
Tabla 5. <i>Porcentaje de muestras presuntivas de Salmonella spp de vegetales listos para el consumo.</i>	22
Tabla 6. <i>Resultados de pruebas bioquímicas en vegetales listos para el consumo.</i>	42
Tabla 7. <i>Reacciones bioquímicas presuntiva de Salmonella spp de las muestras positivas.</i>	42

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Morfología de Salmonella spp.</i>	9
Figura 2. <i>Posibles vía de transmisión de Salmonella spp</i>	10
Figura 3. <i>Ejemplos de alimentos que más se comercializan como productos listos para el consumo.</i>	14
Figura 5. <i>Aislamiento de cepas típicas de Salmonella spp en agar bismuto sulfito (BS) ...</i>	41
Figura 6. <i>Aislamiento de cepas típicas de Salmonella spp en agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)</i>	41
Figura 7. <i>Aislamiento de cepas típicas de Salmonella spp en agar Hektoen (HE)</i>	41
Figura 8. <i>Pre-enriquecimiento no selectivo en caldo lactosa.</i>	43
Figura 9. <i>Enriquecimiento en caldo selectivo.</i>	43
Figura 10. <i>Inoculación en agares selectivos.</i>	44
Figura 11. <i>Inoculación de las pruebas bioquímicas TSI, LIA y complementaria urea.</i>	44
Figura 12. <i>Resultados de las pruebas bioquímicas.</i>	45

ABREVIATURAS.

μL: Microlitros

μm: Micras

AOAC: Asociación de Químicos Analíticos Oficiales

aw: Actividad de agua

BPM: Buenas Prácticas de Manufactura.

CDC: Centro de control y prevención de enfermedades

cm³: Centímetros cúbicos

ETA: Enfermedades transmitidas por alimentos.

g: Gramos

H₂S: Ácido sulfhídrico

HCl: Ácido clorhídrico

LIA: Agar Hierro-Lisina.

mL: Mililitros

N: Normal

NaOH: Hidróxido de sodio

RV: Caldo Rappaport-Vassiliadis

spp: Engloba varias especies del mismo género.

TSI: Agar Triple Azúcar-Hierro.

TT: Caldo Tetrionato

VLC: Vegetales listos para el consumo.

XLD: Agar Xilosa Lisina Desoxicolato

RESUMEN

La demanda de los vegetales listos para el consumo (VLC) ha incrementado en los últimos años, así como las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) asociadas al consumo de estos, siendo una preocupación para la salud pública. Entre los patógenos causantes de ETA relacionados con los VLC se encuentra la *Salmonella* que por su patogenicidad es de gran interés. Este estudio tuvo como objetivo detectar la presencia de *Salmonella* en VLC. Se analizaron 63 muestras de varios vegetales: lechuga, espinaca, zanahoria rallada, col verde con zanahoria rallada, zanahoria baby, tomate baby y manzana baby obtenidos de los supermercados de la ciudad de Loja-Ecuador. La determinación de *Salmonella* se realizó por el método estándar de detección que consiste en; pre-enriquecimiento, enriquecimiento, aislamiento e identificación bioquímica. Los resultados obtenidos fueron analizados de forma cualitativa (ausencia-presencia), encontrando *Salmonella* presuntiva en el 7,9% de las muestras analizadas, incluyendo muestras de: zanahoria rallada, zanahoria baby, tomate baby y manzana baby. Las muestras analizadas no cumplen con la normativa de referencia y pueden ser consideradas como un factor de riesgo de ETA.

Palabras claves: Vegetales listos para el consumo, ETA, *Salmonella* spp, patogenicidad.

ABSTRACT

The demand for vegetables ready for consumption (VLC) has increased in recent years, as well as associated foodborne diseases (ETA) the consumption these, being a concern for public. Among the pathogens causing ETA related with VLC it's found *Salmonella*, which by your pathogenicity is of great interest. This study aimed to detect the presence of *Salmonella* in VLC. Were analyzed 63 samples of various vegetables: lettuce, spinach, grated carrots, green cabbage whit grated carrot, baby carrot, baby tomato and baby apple obtained from supermarkets of the Loja city of Ecuador. *Salmonella* determination was performed by the standard method of detection consisting of; pre-enrichment, enrichment, isolation and biochemical identification. The results obtained were analyzed qualitatively (presence-absence), finding presumptive *Salmonella* in 7.9% of the analyzed samples, including samples of: grated carrot, baby carrot, baby tomato and baby apple. The analyzed samples not compliant with the normative of reference and can be considered as a risk factor of ETA.

Key word: Vegetables ready-to-eat, ETA, *Salmonella* spp, pathogenicity.

INTRODUCCIÓN

Hace algunos años las personas han estado intentando llevar un estilo de vida sana, dando lugar al aumento del consumo de vegetales frescos por su aporte de nutrientes y su bajo contenido energético (Darmon et al., 2005). Painter et al (2013) atribuye a productos cultivados en tierra (frutas y vegetales) el 51% de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) en los Estados Unidos (1998-2008), mientras que los productos de origen animales terrestres y acuáticos representaron el 42% y 6% respectivamente, el 1% no lo determina. El Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos señala que el consumo de diversos productos frescos como frutas y hortalizas, representan el 38% de enfermedades causada por *Salmonella* (Castro-Rosas et al., 2012).

Debido a que *Salmonella* spp es omnipresente en el medio ambiente puede causar toxiinfecciones por los vegetales contaminados, sea esta dada por distintos factores como la manipulación incorrecta en su preparación (Rodríguez-Cavallini, Rodríguez, Del Mar Gamboa, & Arias, 2010) o como Castro-Rosas et al (2012) menciona, puede ser dada por contaminación primaria o secundaria durante su producción. *Salmonella* spp es causante de toxiinfecciones alimentarias siendo la segunda causa de morbilidad en países subdesarrollados (Flores, 2003), y según la OMS (2013) causa más de cien mil muertes anuales. Estas intoxicaciones pueden ocasionar epidemias en distintos países que son un problema para la salud pública (Puig, Robert, & Leyva, 2013).

La salmonelosis es un zoonosis causada por *Salmonella* spp, la bacteria se caracteriza por tener su forma bacilar gram-negativas con movimiento por flagelos peritricos, anaerobios facultativos, descarboxilan lisina y fermentan glucosa con producción de gas y S₂H (Caffer & Terragno, 2001; Gonzalez, Pereira, Soto, Hernández, & Villarreal, 2014), el tiempo de incubación desde que ingresa a la persona es de 8 horas a 3 días, este patógeno es calificado como uno de los responsables de la mayoría de hospitalizaciones, pudiendo causar incluso hasta la muerte (García-Huidobro, Carreño, Alcayaga, & Ulloa, 2012; Reddy, Wang, Adams, & Feng, 2016). La existencia de microorganismos patógenos como la *Salmonella* spp que producen toxiinfecciones alimentarias por productos elaborados en condiciones no adecuadas, representan un potencial peligro para el consumidor, siendo estos datos muy importantes para la entidad productora como para investigaciones futuras.

En el capítulo I se hace referencia a las enfermedades transmitidas por lo alimentos (ETA), infección e intoxicación alimentaria, revisar las fuentes de transmisión de este microorganismo y la enfermedad, además se realiza una descripción del fundamento del método para detección de *Salmonella* spp en las diferentes etapas.

En este contexto se realiza el estudio de *Salmonella* spp partiendo de un estudio desarrollado por Andrade (2015) y Romero (2015) en donde se estudió la Calidad Microbiológica de vegetales listos para el consumo y empacados, y se evidenció la presencia de indicadores de higiene, por lo que se decidió investigar la presencia de patógenos entéricos como la *Salmonella* spp en 63 muestras de VLC, cada muestra con tres unidades del mismo lote. Los resultados obtenidos sirvan de referente para que las empresas implementen medidas de seguridad adecuadas para garantizar la inocuidad de los VLC.

Durante la investigación, se observó dificultades para adquirir las muestras, debido que en algunos casos se encontraban los mismos lotes, dado que en la ciudad de Loja no todos los supermercados tienen los mismos productos. Pese a estos inconvenientes se pudo lograr lo propuesto ampliando el tiempo de muestreo ya que se debía esperar que los productos cambien de lote de producción.

Para determinar la presencia de *Salmonella* spp se tomó parte de la metodología del manual de análisis bacteriológico (BAM): *Salmonella* spp de la FDA (Andrews et al., 2007); la metodología consisten en pre-enriquecimiento, enriquecimiento, aislamiento e identificación bioquímica, que permitió detectar la presencia o ausencia de *Salmonella* spp en 25 g de muestra.

Dada la importancia que tiene el estudio de las cepas de *Salmonella* y la asociación de las enfermedades causadas por el consumo de alimentos contaminados de diferentes maneras, se ha planteado realizar como objetivo determinar la presencia de cepas de *Salmonella* spp por el método de detección en vegetales frescos listos para el consumo y a la vez conocer la incidencia de *Salmonella* spp aislada en estos vegetales.

CAPITULO I
MARCO TEÓRICO

1.1. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)

Las ETA poseen un gran impacto sobre la salud de la población, varios brotes son considerados de gran riesgo debido a que presentan una mayor incidencia, y han ocasionado epidemias en distintos países, poniendo a plena vista la vulnerabilidad de los programas de prevención y control de estas enfermedades, siendo en la actualidad una problemática en todo el mundo (Puig, Robert, et al., 2013).

1.1.1. Infección alimentaria.

Hace algunos años las personas han estado intentando llevar un estilo de vida saludable, dando lugar al aumento del consumo de vegetales frescos por su aporte de nutrientes, vitaminas y minerales, además de su bajo contenido energético (Darmon et al., 2005) donde varios de estos pueden actuar como intermediarios en las ETA como consecuencia de una manipulación incorrecta en su preparación (Rodríguez-Cavallini et al., 2010), Castro-Rosas et al., (2012) menciona que al aumentar la demanda de vegetales frescos va aumentando también la asociación de infecciones. En los Estados Unidos (1998-2008) según Painter et al (2013) los productos cultivados en tierra (frutas y hortalizas) dan lugar al 51% de incidencia de ETA, los productos de origen animal terrestres representan el 42%, los productos de origen animal acuáticos el 6% y el 1% no se determinan.

Existen más de 250 agentes patógenos transmitidos por el consumo de alimentos, los cuales incluyen; bacterias, virus, hongos, toxinas, protozoos, y helmintos (García-Huidobro et al 2012), por lo general se encuentran presentes en las verduras frescas y representan una fuente importante de ETA para el ser humano (Muñoz, Vilca, Ramos, & Lucas, 2013), esto puede ser consecuencia de vegetales contaminados de microorganismos patógenos, durante su crecimiento o en el proceso de la cosecha (contaminación primaria), troceado, remojo, envasado y preparación (contaminación secundaria) (Castro-Rosas et al., 2012).

1.1.2. Intoxicación alimentaria

Existe una variedad de alimentos como carnes, pescado y mariscos, ensaladas, derivados lácteos, frutas y vegetales que son vehículos que promueven la transmisión de enfermedades (Cabello & Benavente, 2002), siendo las bacterias que frecuentan y son más comúnmente reconocidas en intoxicación alimentaria, el *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*

cereus, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* y *Salmonella* spp (Puig et al., 2013) que revisten de gran importancia para el control, debido a su patogenicidad y riesgo que representan.

Salmonella spp es uno de los microorganismos que más toxiinfecciones alimentarias provoca en todo el mundo, constituye la segunda causa de morbilidad en países en vía de desarrollo (Flores, 2003), se estima que en todos los casos existentes de salmonelosis a nivel mundial, causa más de cien mil muertes anuales según la OMS (2013).

El Centro de control y prevención de enfermedades (CDC) de los Estados Unidos señala, que el consumo de diversos productos frescos como, frutas y hortalizas contaminadas, representan el 38% de enfermedades causada por *Salmonella* spp.

En distintas regiones se ha evidenciado que las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) en gran proporción es por *Salmonella* spp (Fernández, Noriega, & Thompson, 2013) y afecta a cualquier persona, especialmente niños, ancianos e inmunodeprimidos (Bajpai, Baek, & Kang, 2012; García-Huidobro et al., 2012), esto se ha convertido en una fuente principal de enfermedades que causan problemas para la seguridad de la salud pública, porque la mayoría de estos alimentos se consumen crudos (Sant'Ana., 2011).

1.2. *Salmonella*

El género *Salmonella* spp pertenece a la familia de las Enterobacteriaceae, se caracterizan por ser bacilos gram negativos de 0,7-1,5 x 2-5 µm, se movilizan por medio de flagelos peritricos (excepto *S. gallinarum*), anaerobios facultativos, no producen esporas ni fermentan lactosa (excepto *S. entérica* subep. arizonae y *S. entérica* subesp. diarizonae), fermentan glucosa con producción de gas (excepto *S. Typhi*); son indol y urea negativo; decarboxilan lisina y ornitina (Caffer & Terragno, 2001). Este bacteria utiliza citrato como fuente única de carbono, su metabolismo es de tipo oxidativo, son generalmente catalasa positiva, y reducen nitratos a nitritos, su temperatura óptima de crecimiento es de 35 a 37 °C, pH óptimo de 6.5 a 7.5, se desarrollan bien a una actividad de agua (aw) de 0.99 a 0.94, pueden llegar a sobrevivir en alimentos secos con un aw de <0.2 (Gonzalez et al., 2014), en la figura 1 observamos la morfología común de la mayoría de las especies de *Salmonella* spp.

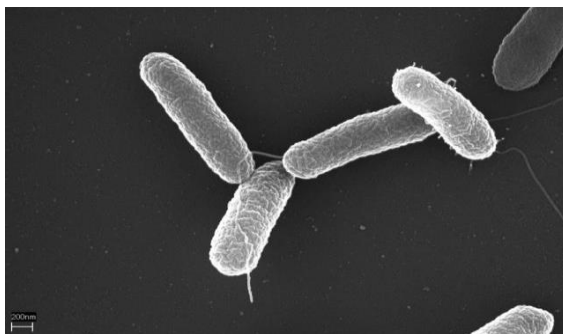


Figura 1. Morfología de *Salmonella* spp.
Se observa su forma bacilar y sus flagelos peritricos
Fuente: (PLOS, 2005)

El tiempo de incubación de la *Salmonella* spp desde que ingresa en la persona es de entre 8 horas a 3 días (García-Huidobro et al., 2012). Su género se divide en 2 especies y 6 subespecies de *S. entérica* que podemos observar en la tabla 1.

Tabla 1. Especies y subespecies del género *Salmonella* spp y su habitad usual

Especies	Subespecie	Habitad Usual
<i>Salmonella entérica</i>	<i>S. entérica subespecie entérica (I)</i>	Animales de sangre Caliente
	<i>S. entérica subespecie salamae (II)</i>	Animales de sangre caliente/Fría/Ambiente
	<i>S. entérica subespecie arizonae (IIIa)</i>	Animales de sangre Fría/Ambiente
	<i>S. entérica subespecie diarizonae (IIIb)</i>	Animales de sangre Fría/Ambiente
	<i>S. entérica subespecie houtenae (IV)</i>	Animales de sangre Fría/Ambiente
	<i>S. entérica subespecie indica (VI)</i>	Animales de sangre Fría/Ambiente
<i>Salmonella bongori</i>	(antes subespecie V)	Animales de sangre Fría/Ambiente

Fuente: realizado por autor, tomado de (ANMAT Federal, 2011; Gonzalez et al., 2014)

1.2.1. Fuente y transmisión.

Salmonella spp al ser una bacteria omnipresente en el medio ambiente es un agente causal común de intoxicaciones por el consumo de alimentos contaminados (Cheung & Kam, 2012); productos cárnicos, lácteos, mariscos, huevos, vegetales suelen ser expuestos al agua contaminada por heces de animales silvestres, aguas residuales o vectores como insectos (Islam et al., 2004), siendo estos una fuente de contaminación (Kisluk & Yaron, 2012).

Existen estudios que revelan la posible transmisión y relación entre de la enfermedad con patógenos fecales, estos asociada a la higiene y el modo de transporte de estos alimentos en los vehículos (Spricigo et al., 2013), en la investigación de Rodríguez et al., (2015) reportaron la bacteria *Salmonella* spp aislada e identificada a partir de vegetales

responsables de los brotes de gastroenteritis, por la contaminación post cosecha debido a la inadecuada manipulación de estas verduras, donde descartan una relación entre las formas de producción de verduras y su contaminación.

Carrasco et al (2012) afirma que la carne, las aves de corral y los huevos, son reconocidos como vehículos constantes de serotipos de *Salmonella* spp involucrados en la enfermedad infecciosa, muchos de los vegetales que se consumen se han reportado como transportadores de *Salmonella* spp, dada por la contaminación cruzada que previamente se produce por distintos factores como los que se ha mencionado.

1.2.2. Enfermedad.

La salmonelosis es una zoonosis de distribución mundial provocada por la bacteria *Salmonella* spp, se notifica con mayor frecuencia en los países desarrollados, debido a que poseen mejores sistemas de información y comunicación para conocer epidemias de origen alimentario, estos constituyen el principal modo de transmisión (Caffer & Terragno, 2001).

Se ha observado que la fuente más frecuente de infección son los alimentos contaminados en su origen, con menor frecuencia cuando estos alimentos son manipulados por un portador o contagio de persona a persona (Caffer & Terragno, 2001). En la figura 2 podemos observar, que los animales silvestres pueden ser portadores del patógeno que probablemente adquieran en ambientes contaminados, estos a su vez puede contaminar tanto, alimentos de uso animal como de consumo humano.

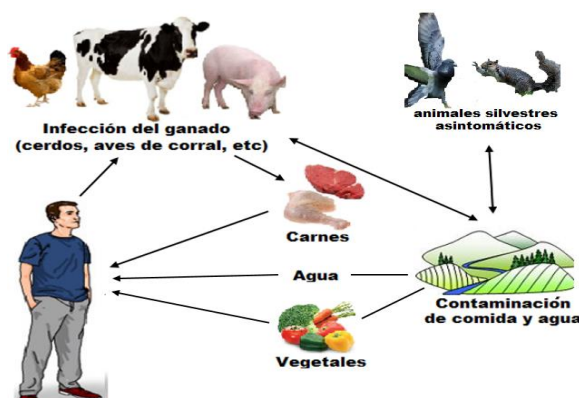


Figura 2. Posibles vía de transmisión de *Salmonella* spp
Fuente: Autor

La infección por este patógeno según Rodríguez et al (2015) es de alto impacto para la salud humana, cuyo agente causal han sido aislado de diferentes alimentos como frutas y hortalizas.

Al microorganismo causante de salmonelosis se lo considera como un “Patógeno Universal” que provoca un cuadro clínico distinguido por diarrea, fiebre, dolor abdominal, complicaciones como disentería, deshidratación grave con insuficiencia renal y shock séptico (García-Huidobro et al., 2012), La *Salmonella* spp es vista como uno de los responsables de la mayoría de hospitalizaciones e incluso provoca la muerte prematura (Reddy et al., 2016).

1.2.3. Fundamento del método convencional para detección de *Salmonella* spp en alimentos.

Para detectar estas bacterias se realiza el pre-enriquecimiento no selectivo de la muestra, seguido del enriquecimiento selectivo para luego realizar la siembra en medios de cultivo selectivos y posterior caracterización de las cepas mediante pruebas bioquímicas (Gonzalez et al., 2014), necesitando un máximo de 5 días para la obtención de resultados.

1.2.3.1. Pre-enriquecimiento no selectivo.

Según la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC), es utilizada para normalizar metabólicamente las células de *Salmonella* spp que se encuentran en determinada matriz para su perfecto desarrollo, el cual puede ser realizado con caldo lactosa estéril (Feldsine et al., 2003) que al no tener inhibidores de crecimiento bacteriano, permite la recuperación de microorganismos e inhibe sustancias tóxicas que favorecen el crecimiento de *Salmonella* spp (BritaniaLab, 2015), ver anexo 4A.

1.2.3.2. Enriquecimiento selectivo.

Según Gonzalez et al (2014), en esta etapa se busca estimular y favorecer el crecimiento de *Salmonella* spp por medios de cultivos para ser aislada y neutralizar eficazmente otras bacterias que se desarrollan en la microflora acompañante de los alimentos que se analizan.

Los medios de cultivo utilizados de mejor resultado son: caldo Tetrationato base (ver anexo 4B) y caldo Rappaport-Vassiliadis (ver anexo 4C).

1.2.3.3. Medios de cultivo en agar selectivos.

En este paso se permite la diferenciación de las cepas de *Salmonella* spp de otras bacterias, esta diferenciación se obtiene por la composición de diferentes medios que confieren el crecimiento de las cepas con aspectos característicos. Para aislar y diferenciar las cepas de *Salmonella* spp, los medios de cultivo por lo general contienen sustancias que inhiben el crecimiento de algunas bacterias, estas sustancias son: sales biliares, verde brillante, desoxicolato, bismuto de sulfito o antibióticos (Gonzalez et al., 2014), los agares utilizados como medios selectivos son: agar xilosa lisina desoxicolato (Mejía Wagner, 2007), agar entérico Hektoen (Gómez-Aldapa et al, 2013) y agar bismuto sulfito (Andrews et al., 2007; Muñoz et al., 2013).

Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD).

La selectividad es de moderada a alta para *Salmonella* spp, la degradación de xilosa, lactosa y sacarosa produce acidez que hace virar el indicador a color amarillo. El tiosulfato y la sal de hierro ponen en evidencia la producción sulfhídrica. La descarboxilación de la lisina a cadaverina se visualiza por la presencia de un color rojo púrpura por aumento del pH. El desoxicolato inhibe bacterias gram positivas (Mejía Wagner, 2007).

Agar hektoen (HE).

Utiliza un sistema inhibidor de sales biliares y desoxicolato de sodio para ciertas bacterias y tiene un indicador de cepas conocidas para diferenciación colonial de los distintos géneros de Enterobacteriaceae, este medio contiene mayores cantidades de peptona para compensar los efectos inhibidores de las sales biliares (King & Metzger, 1968).

Agar bismuto sulfito (BS)

Se lo utiliza para el aislamiento selectivo e identificación preliminar de *Salmonella typhi* y otras *Salmonellas* a partir de materiales presuntos contaminados como alimentos. Las concentraciones de sulfito de bismuto inhiben la flora acompañante Gram-positivas y la mayoría de las enterobacterias, a excepción de *Salmonella* spp y *Shigella* spp (Wilson, 1938) debido a su alto poder inhibidor, este medio desarrolla una cepa buena para ser utilizada. (Andrews et al., 2007).

1.2.3.4. Pruebas bioquímicas diferenciales.

En esta etapa se diferencian las bacterias por su actividad metabólica (Gonzalez et al., 2014). Para la identificación de *Salmonella* spp puede hacerse directamente por las reacciones observadas en los medios de cultivo diferencial primario (LIA, TSI), a veces con la ayuda adicional de pruebas para la actividad ureasa (ANMAT Federal, 2011; Johnson et al., 1966).

Agar Hierro-Lisina (LIA).

Este medio determina si un microorganismo utiliza hidratos de carbono en su metabolismo, la fermentación se produce aeróbicamente (pico de flauta) y anaeróbicamente (profundidad) (Mejía Wagner, 2007).

Utilizado como medio auxiliar para la identificación de *Salmonella* spp, la mayoría de las cuales son sulfuro de hidrógeno positivas y lisina descarboxilasa positiva, una porción profunda negra y un pico de flauta violeta es indicativo de la especie de *Salmonella* spp, si aparece un color rojo en el pico de flauta puede tratarse de especies de *Proteus* y *Providencia*, descartando *Salmonella* (Koneman & Allen, 2008).

Agar Triple Azúcar-Hierro (TSI)

Koneman & Allen (2008) mencionan que en este medio se determina los microorganismos que son capaces de fermentar glucosa, lactosa o sacarosa, se detectan observando las reacciones que producen al crecer en este agar, la mayoría de los investigadores que estudian *Salmonella* spp prefieren el agar TSI, por el agregado de sacarosa a la fórmula que ayuda a evaluar esta especie.

Caldo Urea.

Este medio indica si los microorganismos tienen la enzima ureasa, encargada de la hidrólisis de la urea, cuando se libera amonio esta enzima está presente y se produce un cambio de color amarillo a fucsia en el medio. La *Salmonella* spp es ureasa negativa (Koneman & Allen, 2008).

1.3. Vegetales

Los vegetales son un componente fundamental en la construcción de una dieta sana, y el consumo diario puede ayudar a prevenir afecciones graves tales como enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer (WHO, 2003).

Comprenden en frutas y hortalizas (Rubio Fernández, 2015), que por su definición según Rozano et al (2004) las hortalizas son legumbres verdes cultivadas generalmente en huertas o regadíos que se consumen como alimento, ya sea de forma cruda o cocida, y la fruta es el órgano comestible de la planta procedente de la fructificación, destinada al consumo en su estado natural según la norma técnica ecuatoriana INEN 1 751:96: Frutas frescas. Definiciones y Clasificación.

1.3.1. Vegetales listos para el consumo (VLC).

Se refieren como VLC aquellos sometidos a operaciones sencillas como cortar o triturar, desinfectar y envasar, con el solo objetivo de preservar su frescura, calidad nutricional y propiedades organolépticas, además de los aspectos de salud, se espera que este proceso mínimo tenga altas expectativas de los consumidores, y los vean como alimentos seguros y sencillo de usar (Rubio Fernández, 2015; Ruelas-Chacón et al., 2013; Sant'Ana et al., 2011), algunos de los VLC más comercializados los observamos en la **figura 3**.

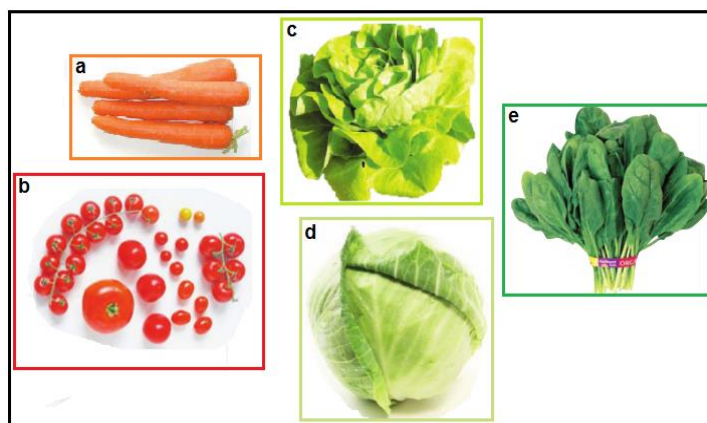


Figura 3. Ejemplos de alimentos que más se comercializan como productos listos para el consumo.

a) Zanahoria; b) Tomate normal y tomate baby; c) Lechuga Verde; d) Col; e) Espinaca

Fuente: editado por autor tomada de (Rubio Fernández, 2015)

El manejo cuidadoso de la higiene del proceso en estos alimentos es crucial para evitar la presencia de patógenos peligrosos, un procesamiento mínimo no es un tratamiento de conservación final (Sant'Ana et al., 2011), lo cual coloca a las industrias en un punto crítico ya que los productos actualmente carece de un método de control eficaz para asegurar la eliminación completa o la muerte de los patógenos transmitidos por los alimentos en frutas y vegetales frescos listos para ser consumidos. (Fernández et al., 2013).

CAPITULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Muestra

Las muestras de vegetales frescos listos para el consumo se obtuvieron durante los meses de mayo a julio del 2016 de los supermercados de la localidad y se trasladaron asépticamente al laboratorio de microbiología de alimentos de la Universidad Técnica Particular de Loja, seguidamente fueron almacenados en refrigeración a 4 °C para su análisis con la finalidad de no alterar su microflora y las características de la muestra.

Para la obtención de la muestra se realizó de acuerdo a la cantidad del producto disponible en el sitio de expendio de un lote no mayor a 50 unidades, escogiendo 3 unidades al azar de cada tipo de vegetal basándonos en algunos puntos de la norma técnica ecuatoriana NTE INEN 1750: hortalizas y frutas frescas. Muestreo (ver Tabla 2).

Se tomó distintas variedades de ensaladas de lechuga para completar el análisis de 10 muestras, ya que su disponibilidad era baja. En ensaladas de espinaca debido a la escasez de lotes se propuso el análisis de zanahoria rallada que se encontraba disponible en varios supermercados.

Tabla 2. Plan de muestreo

	Producto	Muestras	Unidades por muestra
ENSALADAS	Lechuga Criolla lista	1	3
	Lechuga Romana (Ensalada mexicana)	1	3
	Lechuga Verde y crespa roja (Ensalada mix)	2	3
	Lechuga Alemana Roja y verde (Ensalada primavera)	3	3
	Lechuga Romana (Ensalada César)	3	3
	Espinaca	3	3
	Col verde con zanahoria rallada	10	3
	<i>Zanahoria rallada</i>	10	3
	<i>Zanahoria baby</i>	10	3
	<i>Tomate baby</i>	10	3
	<i>Manzana baby</i>	10	3
	TOTAL	63	

Fuente: Autor

2.2. Preparación de la submuestra

Para la preparación de la submuestra de 25 gramos, se aplicó algunas recomendaciones determinadas por la norma técnica ecuatoriana NTE INEN 1529-2: Control Microbiológico de los Alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico, la cual menciona que antes de realizar el procedimiento debe prepararse el área de trabajo y los instrumentos deben estar previamente esterilizados.

La metodología utilizada fue tomada del manual de análisis bacteriológico (BAM): *Salmonella* spp de la FDA (2007). Todo el procedimiento se lo realizó en condiciones de esterilidad para evitar contaminación del ensayo.

2.3. Pre-enriquecimiento no selectivo

- Asépticamente en un frasco con rosca de 500mL que contenía 225 mL de caldo de lactosa estéril (ver Anexo 3A) se pesó 25g de la muestra con ayuda de una balanza analítica y se mezcló durante 2 minutos.
- El caldo lactosa con la muestra se dejó reposar durante 60 ± 5 minutos a temperatura ambiente, se mezcló por agitación, se midió el pH y con NaOH 1N o HCl 1N se los ajustó hasta $6,8 \pm 0,2$. Se homogenizó y se abrió la tapa un 1/4 de vuelta.
- Luego se incubó por 24 ± 2 h a 35 °C, el procedimiento de pre-enriquecimiento se lo puede encontrar en el flujograma del Anexo 1.

2.4. Enriquecimiento del medio líquido selectivo

- Se cerró la tapa de los frascos y se agitó suavemente el caldo de pre-enriquecimiento no selectivo incubado.
- Se transfirió 100 μ L de la mezcla incubada a un 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (anexo 3C), y 1 mL de la mezcla incubada a 10 mL de caldo Tetratonato (TT) (anexo 3B), se homogenizó.
- Se incubó los medios de enriquecimiento selectivo de la siguiente manera: medio RV 24 ± 2 horas a $42 \pm 0,2$ °C (en circulación, controlada por termostato, baño de agua). Incubar el caldo TT 24 ± 2 horas a $35 \pm 2,0$ °C.

En el flujograma del Anexo 2 podemos observar los procedimientos que se realizaron para llegar a las pruebas bioquímicas.

2.5. Aislamiento en medios selectivos.

- Concluida la incubación se procedió a homogenizar los medios de enriquecimiento inoculados TT y RV.
- Con un asa de siembra de 3 mm estéril se tomó una alícuota (10µL) de caldo TT y se inoculó con la técnica de estriado por agotamiento el agar XLD (Anexo 4), BS (anexo 5) y HE (anexo 4), para obtener colonias aisladas.
- Del mismo modo con una asa estéril de 3 mm se repite el paso anterior con el caldo RV.
- Se incubó las placas petri a 35 ± 2 °C durante 24 ± 2 h.

2.6. Identificación preliminar

- Se examinó las placas para observar presencia de colonias que pueden ser *Salmonella* spp.
- Se escogió 2 o más colonias presuntivas de *Salmonella* spp a partir de cada uno de los agares selectivos, después de 24 ± 2 h de incubación siguiendo las indicaciones de la tabla 3.

Tabla 3. Morfología típica o atípica de las cepas de *Salmonella* spp.

AGAR	Cepas típicas
<i>XLD</i>	Transparentes ligeramente rosadas, con centro negro o sin él. Cepas completamente negras. <i>S. paratyphi A</i> : rosadas con un centro rosa oscuro.
<i>HE</i>	Azules o verde azuladas con o sin centro negro Cepas casi completamente negras
<i>BS</i>	Marrones, grises o negras con o sin brillo metálico. Agar se torna negro produciéndose en efecto "halo"
Cepas atípicas	
<i>XLD y HE</i>	Amarillas con o sin centros negros
<i>BS</i>	Verdes con o sin oscurecimiento del medio circundante

Fuente: Andrews et al (2007) ,p.11

2.7. Identificación bioquímica de las cepas.

- Se picó suavemente el centro de la cepas típicas con aguja de inoculación, se inoculó en TSI por punción y estriado en el pico de flauta

- Sin flamear se inoculó en LIA (ver anexo 5) por punción en el fondo 2 veces y se estrió el pico de flauta. El agar LIA debe tener un fondo profundo (4 cm), puesto que la reacción de descarboxilación de lisina es estrictamente anaeróbica.
- Seguido, igualmente sin flamear se introdujo la aguja en el caldo urea (ver anexo 6) como prueba complementaria.
- Se incubaron el TSI, LIA y Urea a 35 °C durante 24 ± 2 h con las tapas sin apretar para mantener las condiciones aeróbicas.
- Las placas se almacenaron en refrigeración de 5 a 8°C para minimiza el crecimiento de contaminantes microbiológicos no deseados.

2.7.1. Descripción de reacciones del agar TSI y LIA

- En Agar LIA, *Salmonella* spp produce típicamente reacción alcalina (púrpura) en el fondo del tubo generalmente con producción de (H₂S) (ver Tabla 4).
- En el agar TSI (ver anexo 6), Las cepas típicas de *Salmonella* spp producen alcalinidad (rojo) en el pico de flauta y ácido en el fondo (amarillo), con o sin producción de H₂S (ennegrecimiento del agar).
- Caldo urea (ver anexo 6), *Salmonella* es negativa para esta prueba.

Tabla 4. Reacciones bioquímicas del género *Salmonella*

Prueba	REACCIÓN		Reacción de especies de <i>Salmonella</i> ^(a)
	Positivo	Negativo	
TSI (Glucosa)	Fondo tubo amarilla	Fondo tubo rojo	+
LIA (Lisina descarboxilasa)	Fondo tubo púrpura	Fondo tubo amarillo	+
H ₂ S (TSI & LIA)	Ennegrecimiento	No ennegrecimiento	+
Ureasa	Color rojo-púrpura	No cambio de color	-

^a +, 90% o más positiva en 1 o 2 días; -, 90% o más negativo en 1 o 2 días.

Fuente: Andrews et al (2007), p.17

CAPITULO III
RESULTADOS Y DISCUSIONES

En la actualidad existe una gran demanda por los vegetales listos para el consumo, pero algunos pueden contaminarse con *Salmonella* spp, siendo una de las preocupaciones para la salud pública (Rodríguez-Cavallini et al. 2010), esto pone en alerta al Centro de Control y Prevención de Enfermedades (2015) que resalta el riesgo potencial y peligroso que representan los alimentos contaminados para el ser humano, el microorganismo tiene una amplia distribución a nivel mundial por ser común en el medio ambiente, por ello es necesario datos de incidencia de *Salmonella* spp que nos ayuden en el análisis y prevención de una variedad amplia de vegetales que se consumen crudos (Gómez-Aldapa et al., 2013). A continuación se presenta los resultados de *Salmonella* spp presuntiva en la tabla 5:

Tabla 5. Porcentaje de muestras presuntivas de *Salmonella* spp de vegetales listos para el consumo.

Producto		No. de Muestras analizadas	Presencia presuntiva de <i>Salmonella</i>	
			nº	Porcentaje
ENSALADAS	Lechuga Criolla lista	1	0	0%
	Lechuga Romana (Ensalada mexicana)	1	0	0%
	Lechuga Verde y crespita roja (Ensalada mix)	2	0	0%
	Lechuga Alemana Roja y verde (Ensalada primavera)	3	0	0%
	Lechuga Romana (Ensalada César)	3	0	0%
	Espinaca	3	0	0%
	Col verde con zanahoria rallada	10	0	0%
Zanahoria rallada		10	2	20%
Zanahoria baby		10	1	10%
Tomate baby		10	1	10%
Manzana baby		10	1	10%
Total		63	5	7,9%

Fuente: Autor

Se determinó la presencia o ausencia de *Salmonella* spp en 63 muestras de vegetales listos para el consumo, después de la etapas de pre-enriquecimiento y enriquecimiento se efectuó una identificación preliminar en agares selectivos XLD, HE y BS, de las que se obtuvo la presencia de cepas con morfología típicas o atípicas de *Salmonella* spp (Anexo 7) en 48 muestras que representaron el 76,2% del total de muestras analizadas, en las muestras

restantes que representan el 23,8% (15/63) (ver anexo 8 tabla 6) no se procedió a realizar pasos siguientes de la metodología por no tener cepas típicas o atípicas con morfología similares a las de microorganismo en estudio, por lo que se las clasificó como negativas para *Salmonella* spp. Para la confirmación bioquímica preliminar de cepas típicas o atípicas de *Salmonella* spp, se utilizó las pruebas bioquímicas LIA, TSI y Urea que permitieron la identificación presuntiva de *Salmonella* spp (Anexo 8, tabla 6) dándonos un resultado de 5 muestras contaminadas que representan el 7,9% de los VLC analizados (ver tabla 5).

En 4 de las muestras positivas presuntivas de *Salmonella* spp analizadas se observó la reacción alcalino/ácido en TSI con ennegrecimiento, lo que sugiere que con base en la prueba bioquímica la bacteria estuvo fermentando glucosa con producción de gas y por la presencia del sulfato de amonio ferroso en el medio se observó producción de H₂S (Koneman & Allen, 2008), en la pruebas bioquímicas LIA se presentó una reacción alcalina en la base con ennegrecimiento por efecto del citrato de amonio férrico y tiosulfato de sodio presente en el agar que identifican el ácido sulfhídrico, el color púrpura en la base es indicativo de que está presente la enzima descarboxilasa característica de *Salmonella* (Koneman & Allen, 2008), sin embargo existen especies raras de *Salmonella* que dan reacciones de TSI alcalino/ácido y LIA positiva sin producción de gas ni ácido sulfhídrico (Forbes et al., 2009, p.330), como es el caso de una de las muestras positivas presuntivas de *Salmonella* analizadas, debido a esta razón dicha muestra fue catalogada como positiva. Se sabe que la bacteria no hidroliza urea por no tener la enzima ureasa, razón por lo que el caldo urea no cambió de coloración en estas 5 muestras positivas presuntivas de *Salmonella* spp (Koneman & Allen, 2008) (ver Anexo 8, Tabla 7)

De acuerdo con la norma sanitaria para criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad de los alimentos y bebidas de consumo humano MINSA/DIGESA (2008), establece la ausencia de esta bacteria en este tipo de productos, por lo tanto, estas muestras pueden representar un gran riesgo en la salud de los consumidores de VLC, lo que nos lleva a cuestionar la calidad y la seguridad de estos vegetales que dependen del agua de riego adecuado y BPM, además los riesgos inherentes de contaminación relacionados al contacto con el suelo, abonos o fertilizantes orgánicos hacen difícil el control de *Salmonella* spp (Oliveira, Souza, Morato Bergamini, & Martinis de Pereira, 2011).

Estudios similares al nuestro muestran de manera sistemática menor presencia del patógeno en São Paulo-Brasil, Sant'Ana et al (2011) y Oliveira et al (2011), reportan la presencia de *Salmonella* en el 0,78% de 512 muestras y 1,2% de 162 muestras respectivamente, Reddy et al (2016) también realizó estudios que demuestran la prevalencia

del microorganismo patógeno mencionado, donde reportaron 0,41% de muestras contaminadas en 111.598 muestras analizadas de VLC comercializados en Estados Unidos entre los años 2004 y 2012. Se sabe que una baja contaminación en el número de muestras es suficiente para dar lugar a una infección, donde las características del huésped, patógeno, matriz del alimento y el medio ambiente juegan un papel importante para adquirirla (Coleman & Marks, 1999).

La presencia de *Salmonella* spp es un indicador de la higiene inadecuada en la planta de procesamiento, se encuentra asociado a diferentes factores de contaminación en este tipo de vegetales, como son: el agua de riego contaminadas con heces de animales silvestres (Islam et al., 2004), contaminación durante su crecimiento o en el proceso de la cosecha, troceado, remojo, envasado y preparación (Castro-Rosas et al 2012), contaminación cruzada y la recontaminación provocada por el manejo inapropiado de las BPM (Carrasco et al., 2012) así como por los patógenos sobrevivientes al proceso de desinfección; Así mismo, *Salmonella* puede internalizarse en el tejido o incorporarse en biopelículas (Muñoz et al., 2013). Se ha reportado que la bacteria tiene la capacidad de sobrevivir al medio ambiente durante un tiempo de 15 a 120 días en suelos no abonados y hasta 41 días en agua dulce, siendo los vectores como insectos y fauna silvestres los que se infectan y que representan un alto riesgo actuando como fuente de transmisión del patógeno a los VLC (Gómez-Aldapa et al., 2013).

Los resultados expuestos de ensaladas de lechugas, ensaladas de espinacas y ensalada de col verde con zanahoria analizadas, no presentaron muestras positivas para la presencia presuntiva de *Salmonella* spp al igual que los resultados emitidos por autores como, Rodríguez-Cavallini et al (2010) y Muñoz Vega et al (2015) que analizaron 18 y 50 muestras de ensaladas listas para el consumo respectivamente, no obstante los trabajos de Almenar et al (2014), Abadias et al (2008) y Reddy et al., (2016), publicaron la presencia de *Salmonella* spp en ensaladas listas para consumir, donde obtuvieron 1,7% de 236 muestras, 1,2% de 300 muestras y 0,59% de 24.349 muestras respectivamente. Debido a que en ensaladas de lechuga listas para el consumo se realizó un muestreo conforme su disponibilidad, se procedió a tomar distintas variedades de lechuga, por lo que se sugiere ampliar el muestreo de cada producto de lechuga en futuras investigaciones.

En la tabla 5, en lo que respecta a zanahoria baby encontramos la presencia presuntiva de *Salmonella* spp en 1 muestra que representa el 10% de un total de 10 analizadas. Se encontró 2 muestras, que no presentaron crecimiento de colonias con morfología típica o atípica de la bacteria en medios selectivos (ver anexo, 8 tabla 6), una investigación similar realizada en la Universidad Ahmadu Bello detectó 4 muestras contaminadas con *Salmonella*

spp de 10 muestras de zanahoria (Maikaji et al., 2015), siendo éste resultado mayor al encontrado en nuestro estudio. Abadias et al., (2008) realizó el análisis de 18 muestras de zanahorias ralladas entre los años 2005 y 2006, de las cuales no confirmó la presencia del patógeno, en nuestros resultados obtuvimos 2 muestras presuntivas de *Salmonella* spp que representan el 20% de 10 analizadas, en 2 de estas no se encontró cepas con morfología típica o atípica perteneciente al género *Salmonella* spp en los correspondientes agares utilizados.

En manzanas baby se obtuvo 1 muestra con *Salmonella* spp presuntiva de 10 muestras analizadas, cabe recalcar que en 5 muestras no se encontró morfología de cepas típicas o atípicas de *Salmonella* spp en agares selectivos, posiblemente por la relación del pH y temperatura, las cuales influyen en el crecimiento de este patógeno en las manzanas cortadas listas para consumir, a una temperatura de 25 °C con un pH ácido no menor a 3.8 el microorganismo es capaz de crecer, al bajar la temperatura a 5 °C se inhibe el crecimiento del patógeno durante su almacenamiento (Abadias et al., 2008). Moreno (2006) e Insunza & Soto, (2015), también proponen que la *Salmonella* spp no tolera muy bien la acidez y su número disminuye considerablemente ejerciendo un efecto germicida, sin embargo no hay que dejar de lado la existencia de respuesta de tolerancia al ácido por parte de la bacteria ya que es una estrategia supervivencia frente a los ambientes estresantes que prevalecen en los alimentos y el anfitrión, según afirman Álvarez-Ordóñez et al., (2012).

En las muestras de tomate baby se encontró la presencia presuntiva de *Salmonella* spp en 1 muestra que representa el 10% de las muestras (tabla 5), en los medios diferenciales no se observó la presencia de cepas típicas o atípicas de *Salmonella* spp en 4 muestras. En la investigación realizada por Li et al., (2016), se analizaron 64 muestras de tomate en donde aislaron 10,9% de muestras que contenían *Salmonella* spp, los estudios de prevalencia realizados por Reddy et al., (2016) en tomates baby reportaron 0,18% de sus muestras contaminadas con *Salmonella* spp de 3.940 analizadas. Los procesos de asepsia empleados en tomate se limitan a la limpieza externa del fruto, pero se sabe que la bacteria es capaz de colonizar el interior a través de la translocación interna de las hojas y darse lugar por el conducto del floema de los tallos, se conoce que el movimiento interno es bajo, pero una vez que alcanza el fruto puede multiplicarse rápidamente sin causar ningún síntoma de deterioro (Gu et al., 2011), esta es una posible ruta de contaminación y complica la inocuidad microbiológica de calidad en este vegetal.

En la identificación preliminar de los medios selectivos en muestras de productos en las que no se observó la morfología de cepas típicas o atípicas de *Salmonella* spp, podría dar a entender que su proceso de manufactura fue correcto, pero éstos datos no garantizan que el

proceso de inocuidad se esté llevando de una manera adecuada, ya que se debe tomar en cuenta a la microflora nativa de los alimentos que actúan como inhibidores en la proliferación del patógeno funcionando como obstáculo en la supervivencia y crecimiento de *Salmonella* spp mediante antibiosis (Leverentz et al., 2006), estos productos fueron: la manzana baby, tomate baby, zanahoria baby, zanahoria rallada y ensalada de col verde con zanahoria.

Los resultados de la investigación realizada indican la presencia de *Salmonella* spp en varias de las muestras analizadas, lo que indica que no cumple con la normativa establecida para este tipo de productos y representan un posible riesgo en la transmisión de ETA.

Se pone de manifiesto la necesidad de reforzar las medidas de control preventivo de las industrias que procesan los vegetales listos para el consumo utilizando métodos más eficientes para el tratamiento de VLC, adaptándolas al microorganismo a tratar, las características de superficie del producto, tiempo de exposición, concentración de desinfectante, pH y temperatura (Maikaji et al., 2015), observación que está de acuerdo con la investigación hecha por Amoah et al (2007).

La metodología empleada en este trabajo solamente nos permitió el aislamiento e identificación de las cepas de *Salmonella* spp, es decir de manera global sin identificar la especie, por lo tanto se requiere realizar pruebas bioquímicas completas y adicionales como serología y sensibilidad antimicrobiana de las cepas presuntivas de *Salmonella* aisladas.

CONCLUSIONES

- Se determinó la presencia presuntiva de *Salmonella spp* en el 7.9% de las muestras de vegetales listos para el consumo analizadas.
- Se observó la presencia de *Salmonella spp* en muestras de zanahorias ralladas, zanahoria baby, tomate baby y manzana baby, las muestras contaminadas no cumplen con los criterios establecidos por la norma MINSA/DIGESA (2008), por lo que pueden considerarse como factores de riesgo en la transmisión de ETA.

RECOMENDACIONES

- Para las muestras de lechugas y espinacas, en las cuales no se obtuvo crecimiento presuntivo para *Salmonella* spp, se debe realizar un seguimiento microbiológico y realizar más estudios.
- Se deben aplicar pruebas adicionales confirmatorias como pruebas bioquímicas completas, serológicas y de sensibilidad antimicrobiana en las cepas presuntivas de *Salmonella* spp aisladas en este estudio para que esta información sea útil en investigaciones futuras o en estudio de posibles brotes de origen alimenticio.

BIBLIOGRAFÍA

- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., & Viñas, I. (2008). Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 123(1–2), 121–129. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.013>
- Almenar, I. V., Rodié, J. U., Teixidó, N., Torres, R., & Abadias, M. (2014). Patógenos de transmisión alimentaria en frutas y hortalizas mínimamente procesadas: Indidencia, capacidad de crecimiento y nuevos metodos de control. *PHYTOMA*. Retrieved from <http://www.phytoma.com/tienda/articulos-editorial/224-189-mayo-2007/8622-patogenos-de-transmision-alimentaria-en-frutas-y-hortalizas-minimamente-procesadas-incidencia-capacidad-de-crecimiento-y-nuevos-metodos-de-control#>
- Álvarez-Ordóñez, A., Prieto, M., Bernardo, A., Hill, C., & López, M. (2012). The Acid Tolerance Response of Salmonella spp.: An adaptive strategy to survive in stressful environments prevailing in foods and the host. *Food Research International*, 45(2), 482–492. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.002>
- Amoah, P., Drechsel, P., Abaidoo, R. C., & Henseler, M. (2007). Irrigated urban vegetable production in Ghana: Microbiological contamination in farms and markets and associated consumer risk groups. *Journal of Water and Health*, 5(3), 455–466. <http://doi.org/10.2166/wh.2007.041>
- Andrade, Y. F. (2015). *Calidad microbiológica de lechuga lista para el consumo*. Universidad Técnica Particular de Loja. Retrieved from [http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/11784/1/ANDRADE ROBLEZ YANIO FERNANDO.pdf](http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/11784/1/ANDRADE%20ROBLEZ%20YANIO%20FERNANDO.pdf)
- Andrews, W. H., Jacobson, A., & Hammack, T. (2007). FDA-Bacteriological Analytical Manual (BAM): Salmonella.
- ANMAT Federal. (2011). Análisis microbiológico de los alimentos. *Red Nacional de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos*, 1, 1–175. Retrieved from http://www.anmat.gov.ar/renaloa/docs/analisis_microbiologico_de_los_alimentos_vol_i.pdf
- Bajpai, V. K., Baek, K. H., & Kang, S. C. (2012). Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review. *Food Research International*, 45(2), 722–734. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.052>
- BritaniaLab. (2015). Lactosado Caldo. Retrieved August 18, 2016, from www.britanialab.com
- Cabello, R. R., & Benavente, I. F. H. (2002). *Síndrome diarreico infeccioso*. (Médica Panamericana, Ed.). Mexico D.F. Retrieved from [https://books.google.com.ec/books?id=nPPrqtLGwe8C&pg=PA238&dq=intoxicacion+por+r+alimentos+salmonella&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwihlozj0qDOAhVFHh4KHcydDWgQ6AEIHzAA#v=onepage&q=intoxicacion por alimentos salmonella&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=nPPrqtLGwe8C&pg=PA238&dq=intoxicacion+por+r+alimentos+salmonella&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwihlozj0qDOAhVFHh4KHcydDWgQ6AEIHzAA#v=onepage&q=intoxicacion%20por%20alimentos%20salmonella&f=false)
- Caffer, M. I., & Terragno, R. (2001). MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA CARACTERIZACION DE SALMONELLA. *Center for Disease Control and Prevention*. Buenos Aires, Argentina. Retrieved from <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/gss/publications/documents/argentina->

leveli/manual_procedimientos_salmonella.pdf

- Carrasco, E., Morales-Rueda, A., & García-Gimeno, R. M. (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-Rosas, J., Cerna-Cortés, J. F., Méndez-Reyes, E., Lopez-Hernandez, D., Gómez-Aldapa, C. A., & Estrada-García, T. (2012). International Journal of Food Microbiology 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/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.025>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2015). Foodborne illness source attribution estimates for Salmonella, Escherichia coli O157 (E. coli O157), Listeria monocytogenes (Lm) and Campylobacter using outbreak surveillance data. Retrieved March 28, 2016, from <http://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/ifsac-project-report-508c.pdf>
- Cheung, P. Y., & Kam, K. M. (2012). Salmonella in food surveillance: PCR, immunoassays, and other rapid detection and quantification methods. *Food Research International*, 45(2), 802–808. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.12.001>
- Coleman, M. E., & Marks, H. M. (1999). Qualitative and quantitative risk assessment. *Food Control*, 10(4–5), 289–297. [http://doi.org/10.1016/S0956-7135\(99\)00052-3](http://doi.org/10.1016/S0956-7135(99)00052-3)
- Darmon, N., Darmon, M., Maillot, M., & Drewnowski, A. (2005). A nutrient density standard for vegetables and fruits: Nutrients per calorie and nutrients per unit cost. *Journal of the American Dietetic Association*, 105(12), 1881–1887. <http://doi.org/10.1016/j.jada.2005.09.005>
- FDA. (2007). Bacteriological Analytical Manual (BAM): Salmonella. Retrieved March 28, 2016, from <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodScienceResearch/UCM309839.pdf>
- Feldsine, P. T., Lienau, A. H., Leung, S., Mui, L. A., Humbert, F., Bohnert, M., ... Capps, K. (2003). Detection of Salmonella in Fresh Cheese, Poultry Products, and Dried Egg Products by the ISO 6579 Salmonella Culture Procedure and the AOAC Official Method: Collaborative Study Bilthoven, The Netherlands. *Journal of AOAC International*, 86(2), 275–295. Retrieved from [http://lib3.dss.go.th/fulltext/Journal/J.AOAC 1999-2003/J.AOAC2003/v86n2p\(mar-apr\)/v86n2p275.pdf](http://lib3.dss.go.th/fulltext/Journal/J.AOAC 1999-2003/J.AOAC2003/v86n2p(mar-apr)/v86n2p275.pdf)
- 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>
- Flores, L. E. (2003). *CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE ESTIRPES DE Salmonella choleraesuis AISLADAS DE AMBIENTES MARINOS*. UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS. Retrieved from http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/Tesis/Basic/flores_al/T_completo.pdf
- Forbes, B. A., Bailey, W. R. (William R., Scott, E. G., Sahm, D. F., Weissfeld, A. S., & Trevino, E. A. (2009). *Bailey & Scott diagnóstico microbiológico*. (Panamericana, Ed.) (12a. ed). Buenos Aires. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=239cauKqSt0C&pg=PA330&dq=TSI+K/A+salmonella&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEWjoidCh3oPOAhUCOxoKHWxDAXsQ6AEIGjAA#v=on>

epage&q=TSI K/A salmonella&f=false

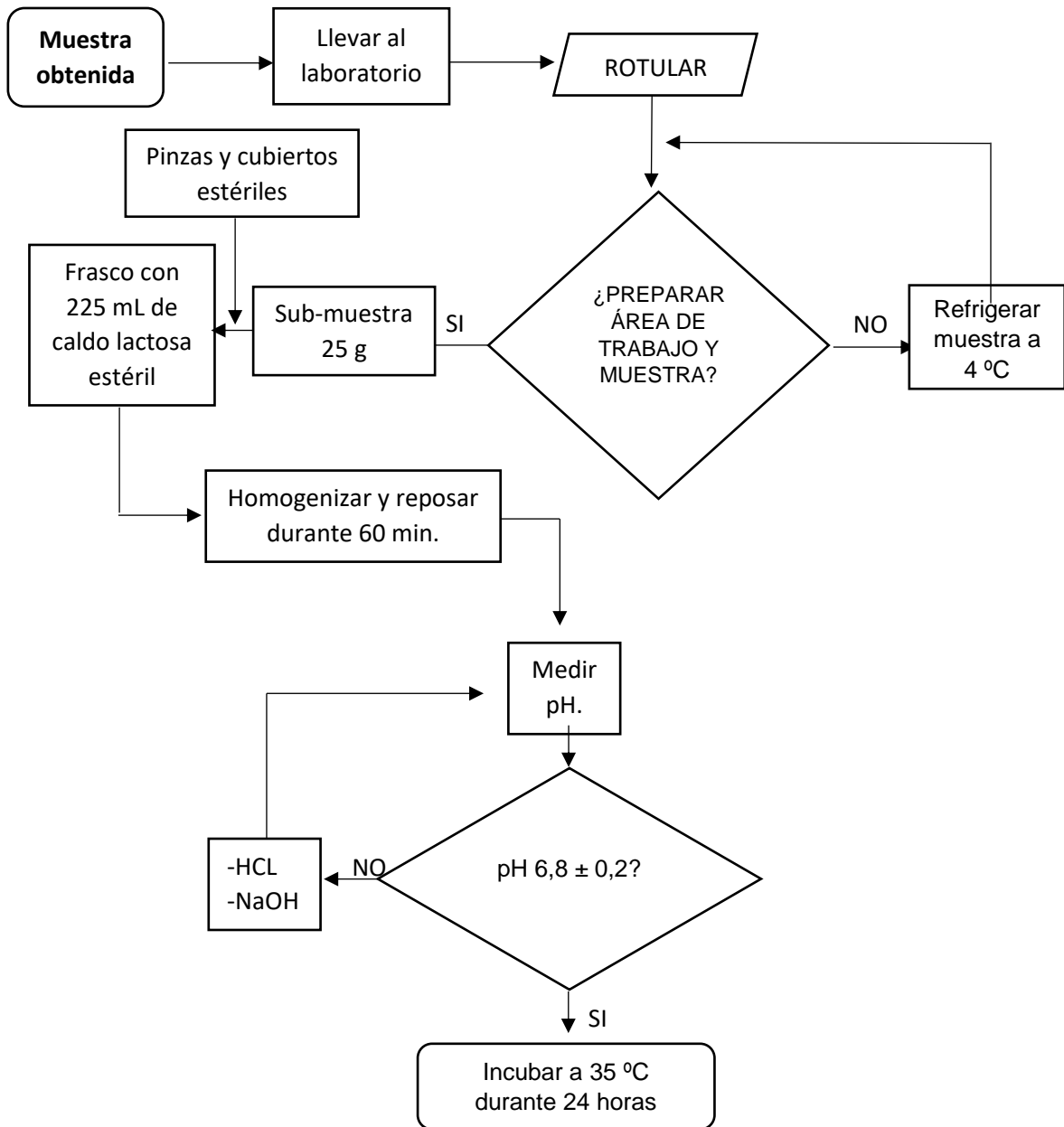
- García-Huidobro, D., Carreño, M., Alcayaga, S., & Ulloa, J. (2012). [Clinical and epidemiological description of severe outbreak of foodborne infection by Salmonella Enteritidis]. *Revista Chilena de Infectología: Órgano Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología*, 29(2), 132–7. <http://doi.org/10.4067/S0716-10182012000200002>
- Gómez-Aldapa, C. A., Rangel-Vargas, E., & Castro-Rosas, J. (2013). Frequency and correlation of some enteric indicator bacteria and salmonella in ready-to-eat raw vegetable salads from Mexican restaurants. *Journal of Food Science*, 78(8), 1201–1207. <http://doi.org/10.1111/1750-3841.12182>
- Gonzalez, J., Pereira, N., Soto, Z., Hernández, E., & Villarreal, J. (2014). Microbiological Isolation of Salmonella spp . And Molecular tools for detection. *Salud Uninorte*, 30(1), 73–94. Retrieved from <http://rcientificas.uninorte.edu.co/index.php/salud/article/viewArticle/5458/5594>
- Gu, G., Hu, J., Cevallos-Cevallos, J. M., Richardson, S. M., Bartz, J. A., & Bruggen, A. H. C. (2011). Internal colonization of Salmonella enterica serovar Typhimurium in tomato plants. *PLoS ONE*, 6(11). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0027340>
- Insunza, M., & Soto, A. (2015). Salmonellosis: Una enfermedad que se transmite por alimentos. *TecnoVet*, 4(2), 1–5. Retrieved from <http://www.revistas.uchile.cl/index.php/RT/article/viewArticle/6249/6105>
- Islam, M., Morgan, J., Doyle, M., Phatak, S., Millner, P., & Jiang, X. (2004). Persistence of Salmonella enterica Serovar Typhimurium on Lettuce and Parsley and in Soils on Which They Were Grown in Fields Treated with Contaminated Manure Composts or Irrigation Water. *FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE*, 1(1), 27–35.
- Johnson, J. G., Kunz, L. J., Barron, W., & Ewing, W. H. (1966). Biochemical Differentiation of the Enterobacteriaceae with the Aid of Lysine-Iron-Agar. *APPLIED MICROBIOLOGY*, 14(2), 212–217. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC546652/pdf/applmicro00228-0074.pdf>
- King, S., & Metzger, W. I. (1968). A New Plating Medium for the Isolation of Enteric Pathogens. *APPLIED MICROBIOLOGY*, 16(4), 577–578. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC547472/pdf/applmicro00240-0031.pdf>
- Kisluk, G., & Yaron, S. (2012). Presence and Persistence of Salmonella enterica Serotype Typhimurium in the Phyllosphere and Rhizosphere of Spray-Irrigated. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(11), 4030–4036. <http://doi.org/10.1128/AEM.00087-12>
- Koneman, E. W., & Allen, S. (2008). *Diagnostico Microbiologico: Texto y Atlas en Color*. (E. W. Koneman, Ed.) (Ed. Médica). Buenos Aires, Argentina. Retrieved from <https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=jyVQueKro88C&pgis=1>
- Leverentz, B., Conway, W. S., Janisiewicz, W., Abadias, M., Kurtzman, C. P., & Camp, M. J. (2006). Biocontrol of the food-borne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* serovar poona on fresh-cut apples with naturally occurring bacterial and yeast antagonists. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), 1135–1140. <http://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1135-1140.2006>
- Li, K., Lemonakis, L., Garry, J., Weidhaas, J., Khouryieh, H., Piedra, M., ... Shen, C. (2016). Microbiological Quality and Safety of Fresh Produce and an Assessment of Post-

- harvest Practice of Vendors at West Virginia and Kentucky Farmers' Markets. Retrieved August 22, 2016, from <https://iafp.confex.com/iafp/2016/webprogram/Paper11958.html>
- Maikaji, F. S., Inabo, H. I., Bale, J. O. O., Chiezey, N. P., Samuel, F. U., Bello, T. K., & Hassan, R. (2015). Efficacy of Some Sanitizing Agents on Salmonella Species. *National Animal Production Research Institute*, 99–107.
- Mejía Wagner, D. C. (2007). *APLICACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS EN PLANTA DE SACRIFICIO PARA LA DETECCIÓN DE Salmonella sp EN CANALES PORCINAS*. PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA. Retrieved from <http://repository.javeriana.edu.co/bitstream/10554/8317/1/tesis291.pdf>
- MINSA/DIGESA. (2008). NORMA SANITARIA QUE ESTABLECE LOS CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE CALIDAD SANITARIA E INOCUIDAD PARA LOS ALIMENTOS Y BEBIDAS DE CONSUMO HUMANO. Retrieved July 21, 2016, from <http://www.senasa.gob.pe/senasa/wp-content/uploads/2015/07/CRITERIOS-MICROBIOLOGICOS-RM-591-2008-MINSA.pdf>
- Moreno, L. (2006). *Frecuencia y comportamiento de Salmonella, Escherichia coli y Organismos coliformes en chile serrano y jalapeño*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Retrieved from [http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/handle/231104/1681/Frecuencia y comportamiento de salmonella, escherichia coli y organismos coniformes en chile y jalapeño.pdf;jsessionid=D80AC46E017A9131984E5BAF4680DF3B?sequence=1](http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/handle/231104/1681/Frecuencia%20y%20comportamiento%20de%20salmonella,%20escherichia%20coli%20y%20organismos%20coniformes%20en%20chile%20y%20jalape%C3%B1o.pdf;jsessionid=D80AC46E017A9131984E5BAF4680DF3B?sequence=1)
- Muñoz, S. J., Vilca, M. L., Ramos, D. D., & Lucas, J. L. (2013). Frecuencia de enterobacterias en verduras frescas de consumo crudo expandidas en cuatro mercados de Lima, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 24(3), 300–306.
- Muñoz Vega, N. M., & Abaca Castillo, E. P. (2015). *Pesquisa de Staphylococcus aureus y Salmonella spp en ensaladas frías listas para el consumo*. Universidad de Talca (Chile). Retrieved from <http://dspace.otalca.cl/handle/1950/10543>
- NTE INEN 1529-2. (2013). Control Microbiológico de los Alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico. Norma Técnica Ecuatoriana Voluntaria, ECUADOR.
- NTE INEN 1750. (1994). Hortalizas y frutas frescas. Muestreo. Norma Técnica Ecuatoriana Obligatoria, ECUADOR.
- NTE INEN 1 751:96. (1996). FRUTAS FRESCAS. DEFINICIONES Y CLASIFICACIÓN. Norma Técnica Ecuatoriana Obligatoria, ECUADOR.
- 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 (non-typhoidal). Retrieved August 1, 2016, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>
- Painter, J. A., Hoekstra, R. M., Ayers, T., Tauxe, R. V., Braden, C. R., Angulo, F. J., & Griffin, P. M. (2013). Attribution of Foodborne Illnesses, Hospitalizations, and Deaths to Food Commodities by using Outbreak Data, United States, 1998–2008. *Emerging Infectious Diseases*, 19(3), 407–415. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.3201/eid1903.111866>

- PLOS. (2005). A Novel Data-Mining Approach Systematically Links Genes to Traits. *PLoS Biol*, 3(5), e166. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030166>
- Puig, Y., Leyva, V., Robert, B., & Pérez, Y. (2013). Agentes bacterianos asociados a brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en la Habana, 2006-2010. *Revista Cubana de Higiene Y Epidemiología*, 51(1), 74–83.
- Puig, Y., Robert, B. A., & Leyva, V. (2013). Epidemiological factors of interest in outbreaks of food-borne diseases in Havana. *Revista Cubana de Higiene Y Epidemiología*, 51(3), 262–268.
- 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>
- Rodríguez, M., Zapata, M. E., Solano, M. A., Lozano, D., Torrico, F., & Torrico, M. C. (2015). Evaluación de la contaminación microbiológica de la lechuga (*lactuca sativa*) en la cadena alimentaria, provincia de Quillacollo, Cochabamba, Bolivia 2015. *Gaceta Médica Boliviana*, 38(2), 31–36. Retrieved from http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1012-29662015000200006
- Rodríguez-Cavallini, E., Rodríguez, C., Del Mar Gamboa, M., & Arias, M. L. (2010). Evaluación microbiológica de alimentos listos para consumo procesados por pequeñas industrias costarricenses. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 60(2), 179–183.
- Romero, B. Y. (2015). *Calidad microbiológica de perejil empacado*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Rozano, V., Quiróz, C., Acosta, J., Pimentel, L., & Quiñones, E. (2004). Hortalizas, las llaves de la energía. *Revista Digital Universitaria*, 5(1067–6079), 1–30.
- Rubio Fernández, R. C. (2015). *Preelaboración y conservación de vegetales y setas*. (ic editorial, Ed.) (1ª Edición, Vol. 1). España-Andalucía. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Ruelas-Chacón, X., Reyes-Vega, M., Valdivia-Urdiales, B., Contreras-Esquivel, J., Montañez-Saenz, J., Aguilera-Carbó, A., & Peralta-Rodríguez, R. (2013). Conservación de Frutas y Hortalizas Frescas y Mínimamente Procesadas con Recubrimientos Comestibles. *Acta Química Mexicana*, 5(9), 31–37.
- 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>
- Spricigo, D. A., 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>
- WHO. (2003). Fruit and vegetable promotion initiative/a meeting report. *Report of the Meeting*, 29. Retrieved from <http://apps.who.int/iris/handle/10665/68395>
- Wilson, J. W. (1938). ISOLATION OF BACT . TYPHOSUM BY MEANS OF BISMUTH SULPHITE MEDIUM IN WATER- AND MILK-BORNE EPIDEMICS, (1936), 507–519.

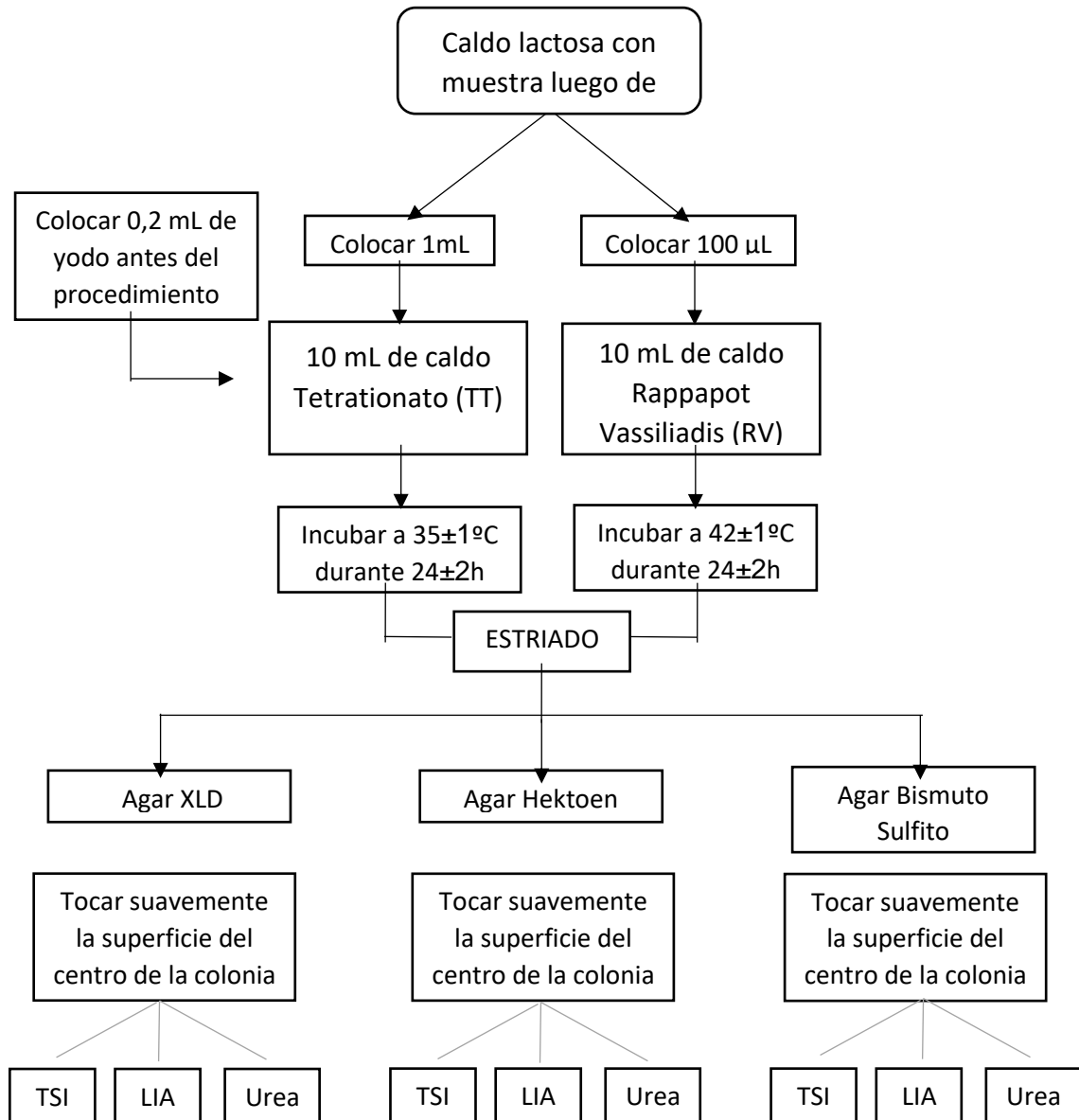
ANEXOS

ANEXO 1. Flujoograma de recolección, preparación y pre-enriquecimiento no selectivo de la muestra.



Fuente: Autor

ANEXO 2. Flujo de enriquecimiento selectivo, aislamiento en medios selectivos y pruebas bioquímicas.



Fuente: Autor

ANEXO 3. Composición, procedimiento de los caldos utilizados en el pre-enriquecimiento no selectivo y enriquecimiento selectivo.

A) Difco™ Caldo Lactosa Base para cultivos de <i>Salmonellas</i> y organismos coliformes.	B) Difco™ Caldo base Tetratonato (TT). Base para medio de enriquecimiento para aislamiento de <i>Salmonella</i> .	C) Difco™ Caldo Rappaport-Vassiliadis R10 *Base para el enriquecimiento selectivo de <i>Salmonella</i> de muestras de alimentos y ambientales.																																
<p>Formula aproximada* por litro</p> <table border="1" data-bbox="226 432 701 592"> <thead> <tr> <th>Composición</th> <th>cantidad</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Extracto de res</td> <td>3 g</td> </tr> <tr> <td>Peptona</td> <td>5 g</td> </tr> <tr> <td>Lactosa</td> <td>5 g</td> </tr> </tbody> </table> <p>Preparación:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Disolver 13 g en 1 litro de agua destilada. 2. Dispensar de 225 ml en frascos de 500 ml Erlenmeyer. 3. Esterilizar en un autoclave 15 minutos a 121°C 4. Enfriar el caldo tan pronto como sea posible. 5. Ajustar el pH final, 6,9 ± 0,2. <p>Permite reparar el daño celular y diluir las sustancias toxicas e inhibidoras proporcionando factores nutricionales y que es apropiado para el desarrollo de la <i>Salmonella</i> spp (Feldsine et al., 2003).</p>	Composición	cantidad	Extracto de res	3 g	Peptona	5 g	Lactosa	5 g	<p>Formula aproximada* por litro</p> <table border="1" data-bbox="790 424 1335 639"> <thead> <tr> <th>Composición</th> <th>Cantidad</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Peptona de proteasa</td> <td>2,5 g</td> </tr> <tr> <td>Digerido pancreático de caseína</td> <td>2,5 g</td> </tr> <tr> <td>Bilis de buey</td> <td>1 g</td> </tr> <tr> <td>Tiosulfato sódico 5H₂O</td> <td>30 g</td> </tr> <tr> <td>Carbonato de calcio</td> <td>10 g</td> </tr> </tbody> </table> <p>Preparación:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Suspender 46 g del medio en 100mL de agua destilada pura. 2. Calentar hasta punto de ebullición en constante agitación. 3. Enfriar por debajo de los 60°C y añadir 2 mL de solución de yodo 4. pH final, 8,4 ± 0,2 5. Utilizar la mezcla inmediatamente. <p>NOTA:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Solución de yodo (6 g de cristales de yodo y 5 g de yoduro potásico en 20 mL de agua) • No calentar el medio después de añadir el yodo • NO AUTOCLAVAR. <p>A partir del tiosulfato presente en el medio se forma tetratonato al añadir el yodo que inhibe el crecimiento de coliformes y otras bacterias intestinales (Mejía Wagner, 2007).</p>	Composición	Cantidad	Peptona de proteasa	2,5 g	Digerido pancreático de caseína	2,5 g	Bilis de buey	1 g	Tiosulfato sódico 5H ₂ O	30 g	Carbonato de calcio	10 g	<p>Formula aproximada* por litro</p> <table border="1" data-bbox="1458 456 2024 703"> <thead> <tr> <th>Composición</th> <th>Cantidad</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Digerido pancreático de caseína</td> <td>4,54 g</td> </tr> <tr> <td>Cloruro de Sodio</td> <td>7,2 g</td> </tr> <tr> <td>Fosfato monopotásico</td> <td>1,45 g</td> </tr> <tr> <td>Cloruro de magnesio (anhidro)</td> <td>13,4 g</td> </tr> <tr> <td>Oxalato de verde malaquita</td> <td>0,036 g</td> </tr> </tbody> </table> <p>Preparación:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Suspender 26,6 g de polvo en 1 litro de agua destilada pura y mezclar bien. 2. Calentar ligeramente para disolver completamente el polvo 3. Dispensar 10 ml de medio completo en tubos de ensayo o frascos adecuados. 4. Autoclave por 15 minutos a 116 ° C (presión 10 psi). 5. El pH final debe ser de 5,1 ± 0,2. <p>Almacenar en el refrigerador y el uso debe ser dentro del mes</p> <p>Es muy selectivo especialmente a 41°C por 24 horas, la concentración de la malaquita y el cloruro de magnesio son bajas para promover el crecimiento de la <i>Salmonella</i> spp (Mejía Wagner, 2007).</p>	Composición	Cantidad	Digerido pancreático de caseína	4,54 g	Cloruro de Sodio	7,2 g	Fosfato monopotásico	1,45 g	Cloruro de magnesio (anhidro)	13,4 g	Oxalato de verde malaquita	0,036 g
Composición	cantidad																																	
Extracto de res	3 g																																	
Peptona	5 g																																	
Lactosa	5 g																																	
Composición	Cantidad																																	
Peptona de proteasa	2,5 g																																	
Digerido pancreático de caseína	2,5 g																																	
Bilis de buey	1 g																																	
Tiosulfato sódico 5H ₂ O	30 g																																	
Carbonato de calcio	10 g																																	
Composición	Cantidad																																	
Digerido pancreático de caseína	4,54 g																																	
Cloruro de Sodio	7,2 g																																	
Fosfato monopotásico	1,45 g																																	
Cloruro de magnesio (anhidro)	13,4 g																																	
Oxalato de verde malaquita	0,036 g																																	

ANEXO 4. Composición, procedimiento de los agares HE y XLD utilizados como medios selectivos.

Difco™ Agar Entérico Hektoen (HE)

Base para el aislamiento de bacilos entéricos gram-negativos.

Formula aproximada* por litro

Componente	Cantidad
<i>Peptona de proteasa</i>	12 g
<i>Extracto de levadura</i>	3 g
<i>Las sales biliares No. 3</i>	9 g
<i>Lactosa</i>	12 g
<i>sacarosa</i>	12 g
<i>salicina</i>	2 g
<i>NaCl</i>	5 g
<i>Tiosulfato de sodio</i>	5 g
<i>citrato de amonio férrico</i>	1.5 g
<i>azul de bromotimol</i>	0.065 g
<i>fucsina ácida</i>	0.1 g
<i>agar</i>	14.0 g

Preparación:

1. Suspender 76 g del medio en 1 litro de agua destilada pura y mezclar bien.
2. Calentar hasta ebullición con agitación frecuente para disolver completamente el polvo
3. No hervir 1 minuto (no sobrecalentar)
4. Enfriar a 45-50 °C y dispensar 20 mL en las cajas petri de 15x100mm
5. Dejar secar por 2 horas con la tapa entre abierta
6. El pH está a $7,5 \pm 0,2$

Diferencia los patógenos entéricos por el color de las colonias y del medio adyacente. Tiosulfato de sodio y citrato de amonio férrico ayuda a la producción del centro negro en colonias, fucsina ácida y azul de bromotimol actúan como sistema indicador y sales biliares, inhiben bacterias gram positivas, peptona proteasa aporta los nutrientes necesarios.

Difco™ XLD (Agar Xylose Lysine Desoxycholate)

Base para el aislamiento y la diferenciación de patógenos entéricos especialmente *Shigella*.

Formula aproximada* por litro

Componente	Cantidad
<i>Extracto de levadura</i>	3 g
<i>L-lisina</i>	5 g
<i>Xilosa</i>	3.75 g
<i>Lactosa</i>	7.5 g
<i>Sacarosa</i>	7.5 g
<i>Desoxicolato de sodio</i>	2.5 g
<i>Citrato de amonio férrico</i>	0.8 g
<i>Tiosulfato de sodio</i>	6.8 g
<i>NaCl</i>	5 g
<i>Agar</i>	15 g
<i>Rojo fenol</i>	0.08 g

Preparación:

1. Disolver 56,93 g del medio en 1 litro de agua destilada y agitar.
2. Calentar hasta punto de ebullición (no sobrecalentar) en constante agitación para una suspensión uniforme
3. Enfriar a 50°C para luego verter en placas petri de 15x100mm 20 mL
4. Dejar secar las placas 2 horas con la tapa parcialmente abierta
5. Tapar todas las placas.
6. El pH final es de $7,4 \pm 0,2$

Xilosa es fermentada por entéricos excepto la *Shigella*. Lisina diferencia al grupo *Salmonella* de los no patógenos. *Salmonella* al agotar el suministro de xilosa, seguidamente descarboxila lisina con reversión a un pH alcalino. La degradación de la xilosa, lactosa y sacarosa genera productos ácidos, que en presencia del indicador de pH rojo fenol, causa un cambio de color en el medio de rojo a amarillo. Desoxicolato de sodio inhibe a bacterias gram positivas

ANEXO 5. Composición, procedimiento de los agares ABS, LIA utilizados como medio selectivo y prueba bioquímica.

<p>Difco™ Agar Bismuto Sulfito (BS) Base para aislamiento de <i>Salmonella Typhi</i> y otros patógenos entéricos.</p> <p style="text-align: center;">Formula aproximada* por litro</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Componente</th> <th style="text-align: left;">Cantidad</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>Polipeptona (o peptona)</i></td> <td>10 g</td> </tr> <tr> <td><i>Extracto de carne</i></td> <td>5 g</td> </tr> <tr> <td><i>Dextrosa</i></td> <td>5 g</td> </tr> <tr> <td><i>Fe₂(SO₄)₃(anhidro)</i></td> <td>4 g</td> </tr> <tr> <td><i>Fosfato disodico (anhidro)</i></td> <td>0.3 g</td> </tr> <tr> <td><i>Sulfito de bismuto (indicador)</i></td> <td>8 g</td> </tr> <tr> <td><i>Verde brillante</i></td> <td>0.025 g</td> </tr> <tr> <td><i>Agar</i></td> <td>20 g</td> </tr> </tbody> </table> <p>Preparación:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Disolver 52 g del medio en 1 litro de agua destilada pura y mezclar bien. 2. Calentar hasta punto de ebullición en constante agitación para una suspensión uniforme. 3. Enfriar a 45-50°C 4. Suspender el precipitado mediante agitación suave y 5. Verter 20 mL en cada caja Petri 15x100 mm y dejar secar las placas 2 horas con la tapa parcialmente abierta 6. Tapar todas las placas. 7. El pH final es de 7,7 ± 0,2 <p>NOTA: Almacenar en oscuridad, pierde la selectividad después de 48h. Puede ser almacenado hasta 15 días en refrigeración (4±2°C).</p> <p>Extracto de carne y peptona proporcionan nitrógeno, vitaminas y minerales, dextrosa es una fuente de energía. Bismuto sulfito y verde brillante se complementan para inhibir bacterias gram positivas y miembros del grupo coliformes para el crecimiento de salmonella. Sulfato ferroso indica la producción de H₂S. cuando está presente el hierro en la formula se precipita y los cultivos de color marrón de <i>Salmonella</i> se tornan negros con brillo metálico.</p>	Componente	Cantidad	<i>Polipeptona (o peptona)</i>	10 g	<i>Extracto de carne</i>	5 g	<i>Dextrosa</i>	5 g	<i>Fe₂(SO₄)₃(anhidro)</i>	4 g	<i>Fosfato disodico (anhidro)</i>	0.3 g	<i>Sulfito de bismuto (indicador)</i>	8 g	<i>Verde brillante</i>	0.025 g	<i>Agar</i>	20 g	<p>Difco™ Agar Hierro-Lisina (LIA) Base para la diferenciación de bacilos entéricos que descarboxilan, desaminan lisina, y producen sulfuro de hidrógeno.</p> <p style="text-align: center;">Formula aproximada* por litro</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Compuestos</th> <th style="text-align: left;">Cantidad</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>Gelysate o peptona</i></td> <td>5 g</td> </tr> <tr> <td><i>Extracto de levadura</i></td> <td>3 g</td> </tr> <tr> <td><i>Dextrosa</i></td> <td>1 g</td> </tr> <tr> <td><i>Clorhidrato de L-lisina</i></td> <td>10 g</td> </tr> <tr> <td><i>Citrato de amonio férrico</i></td> <td>0,5 g</td> </tr> <tr> <td><i>Tiosulfato de sodio (anhidro)</i></td> <td>0,04 g</td> </tr> <tr> <td><i>Púrpura de bromocresol</i></td> <td>0,02 g</td> </tr> <tr> <td><i>Agar</i></td> <td>15 g</td> </tr> </tbody> </table> <p>Preparación:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Suspender 34,56 g del medio en un litro de agua destilada. 2. Calentar con agitación y se deja hervir durante un minuto para disolver por completo el medio. 3. Dispensar en tubos de ensayo. 4. Auto-clavar a 121°C durante 15 minutos. 5. Después de auto-clavar, dejar el medio se solidifique en una posición inclinada. <p>Dextrosa sirve como una fuente de hidratos de carbono fermentables, purpura de bromocresol indica el pH (amarillo:ácido y purpura:alcalino). Citrato de amonio férrico y tiosulfato de sodio indican la formación de H₂S que vuelve negro el medio. Lisina muestra la presencia de la enzima lisina descarboxilasa (producen reacción alcalina) y lisina diaminasas (desarrollan una cuña roja sobre el tope ácida. La formación de gas a menudo puede ser irregular o suprimida.</p>	Compuestos	Cantidad	<i>Gelysate o peptona</i>	5 g	<i>Extracto de levadura</i>	3 g	<i>Dextrosa</i>	1 g	<i>Clorhidrato de L-lisina</i>	10 g	<i>Citrato de amonio férrico</i>	0,5 g	<i>Tiosulfato de sodio (anhidro)</i>	0,04 g	<i>Púrpura de bromocresol</i>	0,02 g	<i>Agar</i>	15 g
Componente	Cantidad																																				
<i>Polipeptona (o peptona)</i>	10 g																																				
<i>Extracto de carne</i>	5 g																																				
<i>Dextrosa</i>	5 g																																				
<i>Fe₂(SO₄)₃(anhidro)</i>	4 g																																				
<i>Fosfato disodico (anhidro)</i>	0.3 g																																				
<i>Sulfito de bismuto (indicador)</i>	8 g																																				
<i>Verde brillante</i>	0.025 g																																				
<i>Agar</i>	20 g																																				
Compuestos	Cantidad																																				
<i>Gelysate o peptona</i>	5 g																																				
<i>Extracto de levadura</i>	3 g																																				
<i>Dextrosa</i>	1 g																																				
<i>Clorhidrato de L-lisina</i>	10 g																																				
<i>Citrato de amonio férrico</i>	0,5 g																																				
<i>Tiosulfato de sodio (anhidro)</i>	0,04 g																																				
<i>Púrpura de bromocresol</i>	0,02 g																																				
<i>Agar</i>	15 g																																				

ANEXO 6. Composición, procedimiento del agar TSI y caldo Urea utilizado como pruebas bioquímicas.

Difco™ Agar Triple Azúcar-Hierro (TSI)

Base para la diferenciación de bacilos entéricos gram-negativos.

Formula aproximada* por litro

Componentes	Cantidad
<i>Extracto de carne bobina</i>	3 g
<i>Extracto de levadura</i>	3 g
<i>Digerido pancreático de caseína</i>	15 g
<i>Peptona de proteosa N° 3</i>	5 g
<i>Dextrosa</i>	1 g
<i>Lactosa</i>	10 g
<i>Sacarosa</i>	10 g
<i>Sulfato ferroso</i>	0,2 g
<i>Cloruro sódico</i>	5 g
<i>Tiosulfato sódico</i>	0,3 g
<i>Agar</i>	12 g
<i>Rojo fenol</i>	0,024 g

Preparación.

1. Suspender los 65 g de polvo en 1 litro de agua destilada pura, mezclar bien.
2. Hervir 1 minuto para disolver completamente el polvo agitando frecuentemente.
3. Llenar 1/3 de los tubos de 16x150mm y autoclavar a 121 °C durante 15 minutos.
4. Enfríe la mezcla en posición inclinada de manera que se formen topes profundos.
5. pH final: 7,4 ± 0,2

TSI Agar contiene tres azúcares (dextrosa, lactosa y sacarosa), rojo de fenol detecta la fermentación de hidratos de carbono. Sulfato de amonio ferroso para detección H₂S (indicado por el ennegrecimiento en el fondo del tubo). La fermentación de carbohidrato se indica por la presencia de gas y cambio de color ácido (amarillos). La pequeña cantidad de ácido producido en la inclinación del tubo durante la fermentación de dextrosa oxida rápidamente, haciendo que el medio permanezca rojo o revertir a un pH alcalino. Después del agotamiento de la dextrosa limitada, organismos capaces de hacerlo comenzarán a utilizar la lactosa o sacarosa.

Difco™ Caldo Urea

Base para la diferenciación de microorganismos, especialmente de la especie *Proteus*, basada en la producción de ureasa.

Formula aproximada* por litro

Componente	Cantidad
<i>Urea</i>	20 g
<i>Extracto de levadura</i>	0.1 g
<i>Fosfato dipotásico (K₂HPO₄)</i>	9.5 g
<i>Fosfato monopotásico (KH₂PO₄)</i>	9.1 g
<i>Rojo fenol</i>	0.01 g

Preparación.

1. Disolver los 38,7 g del polvo en 1 litro de agua destilada pura, mezclar bien.
2. NO CALENTAR NI AUTOCLAVAR.
3. Esterilizar por filtración a través de una membrana de 0,45 micras.
4. Dispensar asépticamente 1,5-3,0 mL a tubos de ensayo estériles de 13 x 100 mm.
5. El pH final, 6,8 ± 0,2
6. Utilizar el mismo día de la preparación.

Este medio indica si los microorganismos tienen la enzima ureasa, encargada de la hidrólisis de la urea, cuando se libera amonio esta enzima está presente y se produce un cambio de color amarillo a fucsia en el medio. La *Salmonella* spp es ureasa negativa (Koneman & Allen, 2008).

ANEXO 7. Cepas típicas aisladas de los medios selectivos.



Figura 4. Aislamiento de cepas típicas de *Salmonella* spp en agar bismuto sulfito (BS)

Fuente: Autor

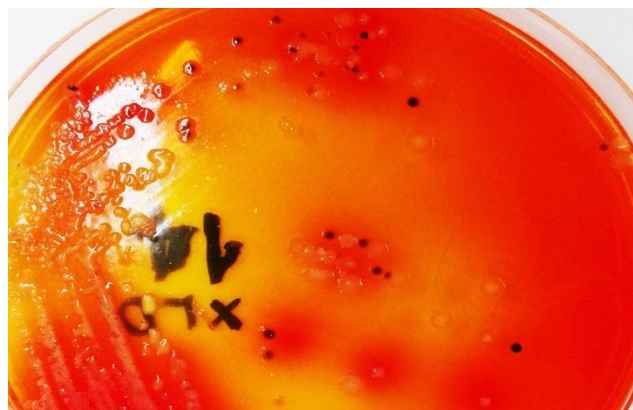


Figura 5. Aislamiento de cepas típicas de *Salmonella* spp en agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)

Fuente: Autor



Figura 6. Aislamiento de cepas típicas de *Salmonella* spp en agar Hektoen (HE)

Fuente: Autor

ANEXO 8. Cuadro de resultados de pruebas bioquímicas.

Tabla 6. Resultados de pruebas bioquímicas en vegetales listos para el consumo.

Producto	No. de Muestras	Ausencia en medio Selectivo	Pruebas bioquímicas		
			Negativo Aus/25g	Positivo Pres/25g	
ENSALADAS	Lechuga Criolla lista	1	0	1	0
	Lechuga Romana (Ensalada mexicana)	1	0	1	0
	Lechuga Verde y crespita roja (Ensalada mix)	2	0	2	0
	Lechuga Alemana Roja y verde (Ensalada primavera)	3	0	3	0
	Lechuga Romana (Ensalada César)	3	0	3	0
	Espinaca	3	0	3	0
	Col verde con zanahoria rallada	10	2	8	0
Zanahoria rallada	10	2	6	2	
Zanahoria baby	10	2	7	1	
Tomate baby	10	4	5	1	
Manzana baby	10	5	4	1	
Total	63	15	43	5	

Fuente: Autor

Tabla 7. Reacciones bioquímicas presuntiva de *Salmonella* spp de las muestras positivas.

No.	Producto	Pruebas bioquímicas					Resultado
		TSI	H ₂ S	GAS	LIA	UREA	
2	Zanahoria rallada	K/A	+	+	K/K (H ₂ S)	-	Positiva
1	Zanahoria baby	K/A	+	+	K/K (H ₂ S)	-	Positiva
1	Tomate baby	K/A	-	-	K/K	-	Positiva
1	Manzana baby	K/A	+	+	K/K (H ₂ S)	-	Positiva

(K)= Alcalino
 (A)= Acido
 (+)= Positivo
 (-)= Negativo
 H₂S= Ácido sulfhídrico

Fuente: Autor

ANEXO 9. Imágenes de la parte experimental.

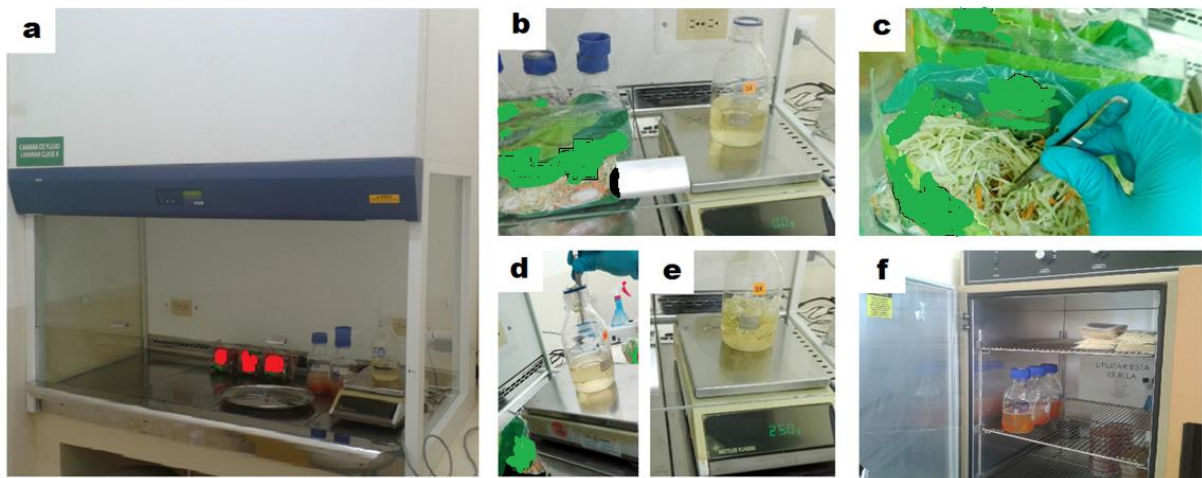


Figura 7. Pre-enriquecimiento no selectivo en caldo lactosa.

a) Empleo de la cabina de bioseguridad en el procesamiento. **b)** Preparación del Frasco con caldo en la balanza analítica. **c)** Toma de la muestra al azar. **d)** Colocación de la muestra en el caldo lactosa. **e)** Cantidad de muestra pesada. **f)** Incubación a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Fuente: Autor

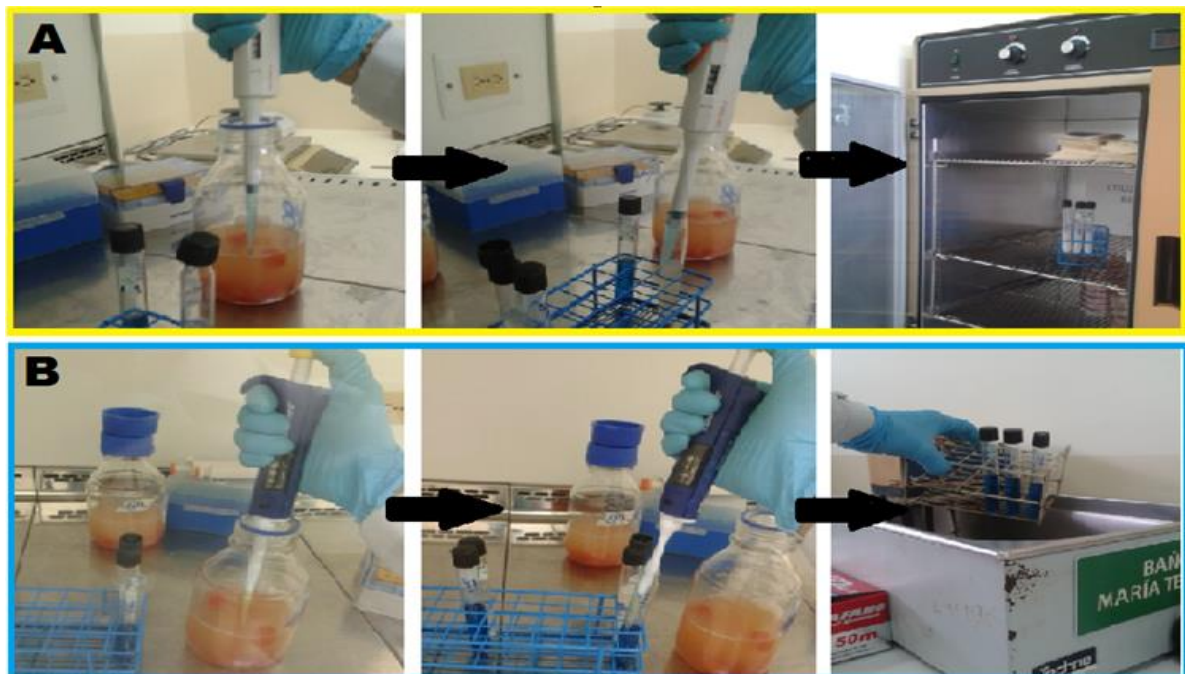


Figura 8. Enriquecimiento en caldo selectivo.

A. Enriquecimiento del caldo TT con 1mL de caldo lactosa pre-enriquecido
B. Enriquecimiento del Caldo RV con 0,1mL del caldo lactosa pre-enriquecido

Fuente: Autor

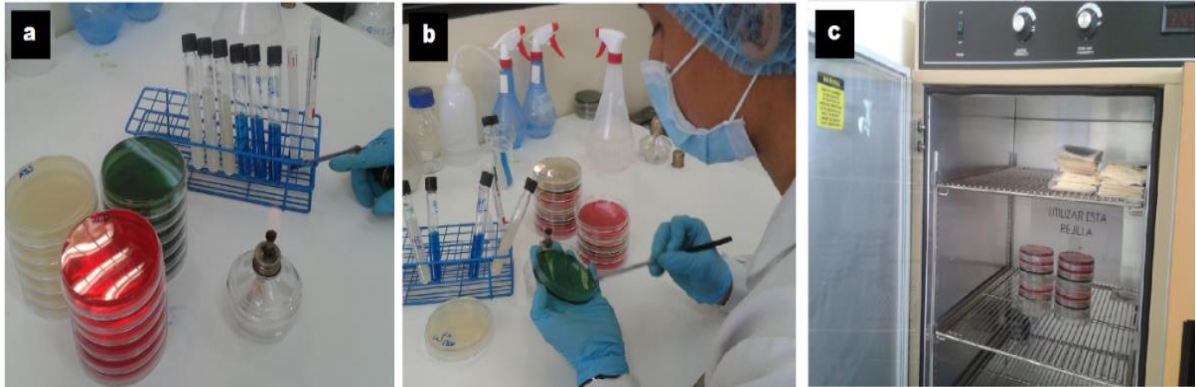


Figura 9. Inoculación en agares selectivos.

a) Preparación de la mesa de trabajo, de los caldos y medios a inocular.

b) Inoculación de los agares selectivos HE, XLD, ABS, de ambos caldos de enriquecimiento con la técnica de estriado por agotamiento.

c) Incubación de los agares selectivos a 35°C durante 24 horas.

Fuente: Autor

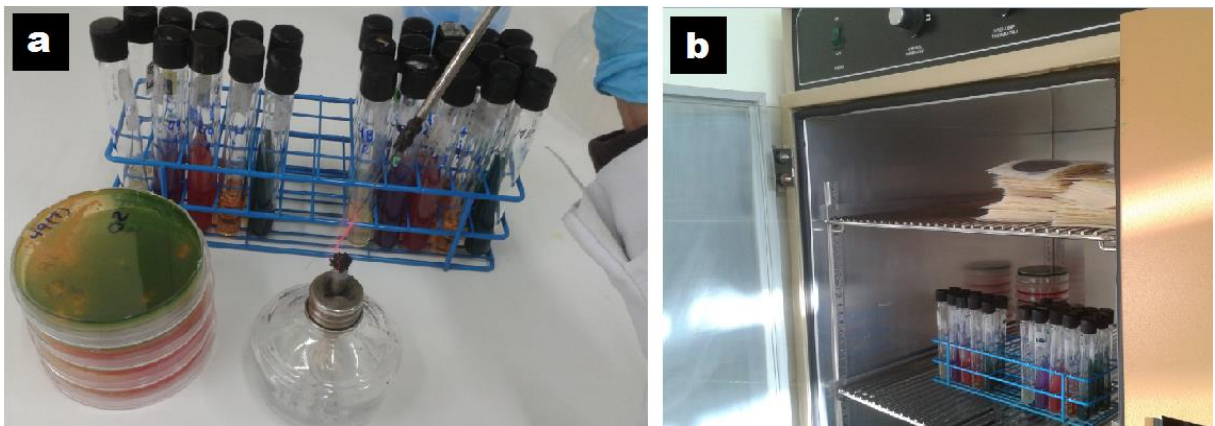


Figura 10. Inoculación de las pruebas bioquímicas TSI, LIA y complementaria urea.

a) Preparación de las cajas típicas/atípicas para ser inoculadas en las baterías.

b) Incubación a 35°C de las baterías inoculadas con la tapa 1/4 abierta durante 24 horas.

Fuente: Autor

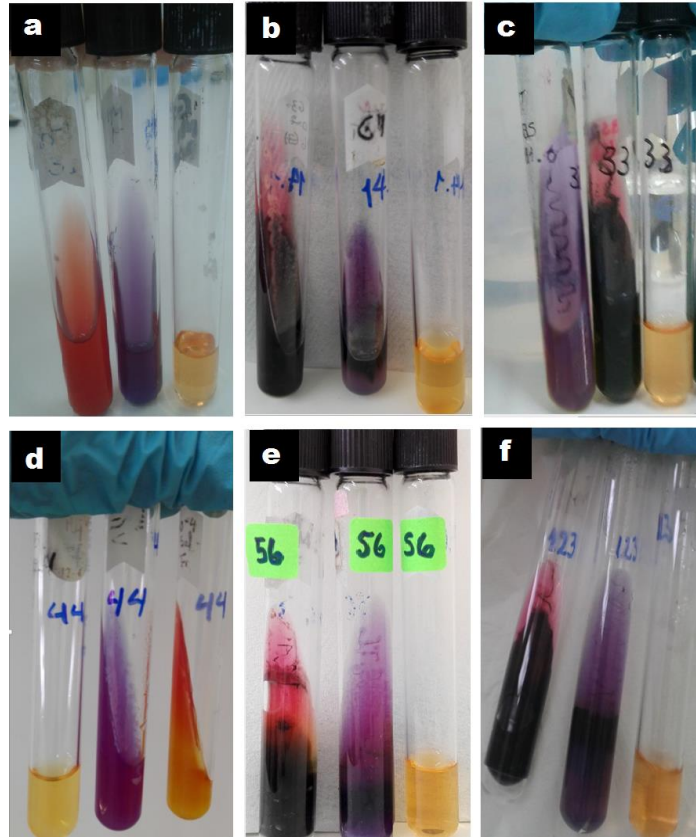


Figura 11. Resultados de las pruebas bioquímicas.

a) Baterías sin inocular. b-f) Presuntivas para *Salmonella*

Fuente: Autor