



**Universidad
Norbert Wiener**

UNIVERSIDAD PRIVADA NORBERT WIENER

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA MÉDICA

“RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO DEL MÉTODO DE CULTIVO
HORIZONTAL ISO 6579:2002 FRENTE AL MÉTODO FDA-BAM
PARA EL AISLAMIENTO DE *Salmonella spp.* EN OVOPRODUCTOS”

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADA
EN TECNOLOGÍA MÉDICA LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMIA
PATOLÓGICA.

Presentado por:

Bachiller: LIZ GISELLA PIO DAVILA

LIMA – PERÚ

2020

Dedico este trabajo:

A dios, por ser el incondicional en mis sueños.

A mis padres y hermanos, por ser medio de fortaleza ante las vicisitudes.

*A mis abuelos por sus imperdibles bendiciones, a mis tíos por sus
inesantes apoyos y a mis primas por sus complicidades.*

ASESOR DE TESIS

Licenciado Tecnólogo Médico en Laboratorio Clínico y Anatomía patológica

José María Olivo López

Laboratorio de Microbiología, Instituto Nacional de Salud del Niño

Ministerio de Salud, Lima

JURADOS

Dr. Casimiro Urcos Javier Francisco, Presidente

Dr. Sandoval Vega Miguel Hernán, Secretario

Mg. Rojas León Roberto Eugenio, Vocal

INDICE

ÍNDICE DE TABLAS	9
ÍNDICE DE GRÁFICOS	10
Resumen	11
Summary	12
CAPÍTULO I: EL PROBLEMA	13
1.1. Planteamiento del problema.	13
1.2. Formulación del problema.	16
1.3. Justificación.	16
1.4. Objetivos.	17
1.4.1. Objetivos Generales.	17
1.4.2. Objetivos Específicos.	17
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	18
2.1. Antecedentes.	18
2.2. Base teórica.	30
2.3. Terminología básica.	68
2.4. Hipótesis.	69
2.5. Variables e indicadores	70
CAPÍTULO III: DISEÑO METODOLÓGICO	71
3.1. Tipo de Investigación.	71
3.2. Ámbito de investigación.	71
3.3. Población y muestra	71
3.4. Procesamiento Microbiológico	74
3.5. Procesamiento y análisis de datos	77
3.6. Aspectos éticos.	77
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	78
4.1. Resultados.	78
4.2. Discusión.	87
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	90
5.1 Conclusiones.	90
5.2 Recomendaciones.	92
ANEXOS	93
REFERENCIAS	105

ÍNDICE DE TABLAS

TABLAS N°	página
TABLA N°1 <i>Salmonella</i> especies, subespecies, serotipos y habitad usual (Sistema Kauffman-White)	33
TABLA N°2 Número de jabas y unidades de huevos procesados durante el tiempo de estudio	79
TABLA N°3 Número de bacterias identificadas por semana en ovoproductos	80
Tabla N°4 Número de bacterias identificadas por semana	82
TABLA N°5 Porcentaje de bacterias aisladas por ovoproductos durante el periodo de estudio. Datos en (%)	83
TABLA N° 6 Tipo de bacteria por ovoproducto en quince semanas de estudio	85
TABLA N° 7 Concordancia del método ISO 6579: 2002	86

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICOS N°	página
Gráfico 1	
Estructura de las bacterias gram (+) y gram (-)	31
Gráfico 2	
Estructura antigénica de <i>Salmonella</i> spp.	34
Gráfico 3	
Estructura interna y externa del huevo.	37
Gráfico 4	
Flujograma de trabajo para el aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i> en ovoproducto.	76
Gráfico 5	
Porcentaje total de bacterias aislados por semana en ovoproductos en la empresa VADIS SA.	81
Gráfico 6	
Porcentaje de bacterias aisladas en ovoproductos en la empresa VADIS S.A durante el periodo de estudio	82

Resumen

Introducción: ISO 6579:2002 y FDA-BAM se usan frecuentemente para la detección de *Salmonella* en huevos, pero su rendimiento aún no se ha estimado. El objetivo de este estudio fue determinar el rendimiento diagnóstico según el método de cultivo horizontal ISO 6579: 2002 y el método FDA-BAM para el aislamiento de *Salmonella spp.* en ovoproductos.

Metodología: Se realizó un estudio descriptivo, de corte transversal, prospectivo en la huevera Negociaciones VADIS S.A. (Lima, Perú), para su análisis y comercialización. El procesamiento microbiológico fue con el método ISO 6579:2002 y FDA-BAM. Para los ovoproductos (yema, huevo filtrado, yema sin pasteurizar y clara). Se realizó las pruebas diagnósticas y el acuerdo global entre prueba según Coeficiente kappa de Cohen (overall inter-test).

Resultados: Los huevos procesados fueron de 1 130 580 en 15 semanas de estudio, con un promedio de 75372 ± 47045 huevos. El métodos de cultivo horizontal ISO 6579:2002 presento una sensibilidad de 100% (IC 95%: 9.5 a 90.5%), una especificidad del 99.3% (IC 95%: 97.6 a 100.0%), un valor predictivo positivo de 66.7% (IC 95%: 20.7 a 100.0%), valor predictivo negativo de 100% (IC 95%: 96.5 a 99.9%), y una exactitud de 99.4% (IC 95%: 96.5 a 99.9). Se obtuvo una concordancia diagnóstica buena ($K=0.80$), una proporción total de concordancia observada de 0.99 y una proporción esperada al azar de 0.97.

Conclusión: Este estudio demostró el rendimiento diagnóstico óptimo para el método de cultivo horizontal ISO 6579: 2002 frente al método FDA-BAM para el aislamiento de *Salmonella spp.* en ovoproductos.

Palabras claves: *Salmonella*, huevo, FDA, ISO, rendimiento, aislamiento, cultivo microbiológico, Perú.

Summary

Introduction: ISO 6579:2002 and FDA-BAM are frequently used for the detection of Salmonella in eggs, but their performance has not yet been estimated. The objective of this study was to determine the diagnostic performance according to the horizontal culture method ISO 6579: 2002 and the FDA-BAM method for the isolation of Salmonella spp. in egg products.

Methodology: A descriptive, cross-sectional, prospective study was conducted at Negociaciones VADIS S.A. (Lima, Peru), for its analysis and commercialization. Microbiological processing was done with the ISO 6579:2002 and FDA-BAM methods. For egg products (yolk, filtered egg, unpasteurized yolk and white). Diagnostic tests and overall agreement between tests were performed according to Cohen's kappa coefficient (overall inter-test).

Results: Processed eggs were 1 130 580 in 15 weeks of study, with an average of 75372 ± 47045 eggs. The horizontal culture method ISO 6579:2002 presented a sensitivity of 100% (95% CI: 9.5 to 90.5%), a specificity of 99.3% (95% CI: 97.6 to 100.0%), a positive predictive value of 66.7% (95% CI: 20.7 to 100.0%), a negative predictive value of 100% (95% CI: 96.5 to 99.9%), and an accuracy of 99.4% (95% CI: 96.5 to 99.9). Good diagnostic agreement was obtained ($K=0.80$), a total observed agreement ratio of 0.99 and an expected randomized ratio of 0.97.

Conclusion: This study demonstrated the optimal diagnostic performance for the horizontal culture method ISO 6579: 2002 versus the FDA-BAM method for isolation of Salmonella spp. in egg products.

Keywords: Salmonella, egg, FDA, ISO, performance, isolation, microbiological culture, Peru.

CAPÍTULO I: EL PROBLEMA

1.1 Planteamiento del problema

La salmonelosis es una infección producida por el género bacteriano *Salmonella*, concerniente a la familia *Enterobacteriaceae*, un microorganismo universal. La bacteria *Salmonella* vive en el intestino humano o animal y la vía de transmisión es fecal-oral o a través de alimentos, agua o leche contaminada y/o por contacto directo de persona a persona.¹

La *Salmonella* es muy común en alimentos, sobre todo del tipo *Salmonella spp.* hay más de dos mil tipos de *Salmonella*, pero las más relevantes en salud humana vinculados con el contagio a través de los alimentos son *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium*, ambas conforman los dos serotipos más significativos de Salmonelosis transmitida desde animales a seres humanos en la mayor parte del mundo.²

La *Salmonelosis* es la causa más frecuente de toxiinfecciones alimentarias y de alteraciones gastroentéricas en todo el mundo. El principal reservorio de

Salmonella son las aves de corral, el ganado vacuno y el porcino, por lo tanto, son fuentes de infecciones importantes todas las carnes de estos animales y los huevos.^{3,4}

Los síntomas se manifiestan entre 6 y 72 horas (generalmente entre 12 a 36 horas) después de la ingesta de agua o alimentos contaminados por *Salmonella*, y la enfermedad dura entre dos y siete días.⁵ Las principales sintomatologías intestinales típicas incluyen disentería, cefalalgia, dolor abdominal, náusea, hasta complicaciones tan severas como gastroenteritis leve.^{6,7}

Los ovoproductos han sido los alimentos que han originado el mayor índice de brotes de *Salmonella* y los de mayor riesgo de salud, especialmente aquellos que contienen huevo crudo, como: la mayonesa, las salsas, los helados, las cremas, entre otros. Los casos de Salmonelosis en alimentos se han incrementado en estos últimos años, debido en gran medida a la falta de medidas de prevención sanitaria, insuficiencia en lavado de manos, alta tasa de infección en aves de corral y probablemente, al cambio climático.^{1,8} Aun así, el aislamiento e identificación de *Salmonella* es necesario en la industria alimentaria dado su impacto industrial, es por ello que se han dado avances para la confirmación de resultados positivos que determinan en corto tiempo la presencia de *Salmonella* en ovoproductos, como son los kits comerciales de pruebas rápidas.

Existen diferentes métodos de identificación y diagnóstico de *Salmonella* en microbiología de alimentos: Los kits comerciales son un gran apoyo para la identificación rápida de *Salmonella* por que facilitan su identificación a corto plazo, como lo son: sistemas API 20E y Rapid 20E API (ambos de BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia), Petrifilm™ y Tecra Salmonella Visual Immunoassay (ambos de 3M, Minnesota, USA), 1 – 2 test (BioControl Systems, Washington, USA), además, de otros métodos rápidos para la

identificación de *Salmonella* como las técnicas de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*).⁹

Otros métodos de identificación son los sistemas automatizados para el aislamiento e identificación de *Salmonella* como: BacTrac 4300 (Sy-Lab, Purkersdorf, Austria), Bactiflow[®] (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia) y un sinnúmero de empresas comercializadores de equipos de automatización para la microbiología alimentaria.¹⁰

Finalmente, existen métodos convencionales como el cultivo estandarizado ISO (International Organization for Standardization) y el FDA-BAM (Food and Drug Administration), ambos se desarrollan bajo un sistema protocolizado de cultivo en cuatro etapas: Pre-enriquecimiento y enriquecimiento en las etapas preliminares y posterior siembra en agares selectivos, seguido de procedimientos de pruebas bioquímicas y serotipificación donde estos métodos son los más usados.^{11,12}

Si bien ambos métodos son métodos convencionales tienen diferencias en su desarrollo. EL método ISO se desarrolla inicialmente con agua peptonada tamponada y se diferencia en utilizar medios como Muller-Kauffman Tetracionato Nobiovocina, por el contrario, el método FDA se desarrolla inicialmente con Caldo Trypticase Soya y se diferencia en utilizar medios como Caldo Tetracionato, además ambos métodos tienen diferentes grados y tiempos de incubación asimismo requieren modificaciones específicas en las etapas de aislamiento e identificación dependiendo del tipo de alimento. Igualmente, estas pruebas requieren de 5-11 días para la confirmación de los resultados.^{13,14}

Hasta ahora, no se ha desarrollado una evaluación concienzuda del performance en ambos métodos diagnósticos en microbiología de alimentos. Esto constituye un problema para su elección por la industria alimentaria de

producción aves de corral basados en el rendimiento diagnóstico de cada uno. Ante esta problemática se planteó el siguiente problema de investigación.

1.2 Formulación del problema

¿Cuál es el rendimiento diagnóstico del método de cultivo horizontal ISO 6579:2002 frente al método FDA-BAM para el aislamiento de *Salmonella spp.* en ovoproductos?

1.3 Justificación

* Esta investigación contribuyó al conocimiento de la eficacia de resultados para métodos de cultivos como una herramienta más de trabajo para la identificación de *Salmonella spp.* en ovoproductos y como análisis microbiológicos en alimentos.

* Este estudio fue importante porque nos permitió evaluar el rendimiento microbiológico del aislamiento de *Salmonella spp.* en ovoproductos.

* La identificación rápida y certera para la verificación y reproducibilidad de los análisis microbiológicos en la industria alimentaria en la identificación de *Salmonella spp.* fue muy importante debido al aumento de la frecuencia en la aparición de especies de *Salmonella spp.*

* Este estudio amplió los conocimientos científicos sobre la identificación de *Salmonella spp.* en ovoproductos para los análisis microbiológicos además de su identificación y post diagnóstico, y por consiguiente sobre el manejo de las industrias alimentarias para el consumo humano.

1.4 Objetivo

1.4.1 General

- Determinar el rendimiento diagnóstico del método de cultivo horizontal ISO 6579: 2002 frente al método FDA-BAM para el aislamiento de *Salmonella* spp. en ovoproductos.

1.4.2 Específico

- Evaluar la concordancia diagnóstica del método de cultivo horizontal ISO 6579:2002 frente al método FDA-BAM para la identificación de *Salmonella* spp. en ovoproductos.
- Evaluar las pruebas diagnósticas para el método de cultivo horizontal ISO 6579: 2002 frente al método FDA-BAM para el aislamiento de *Salmonella* spp. en ovoproductos.
- Estimar el tipo de bacteria presente en cada ovoproducto.

CAPÍTULO II:

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

Actualmente no se ha realizado estudios comparativos sobre el rendimiento diagnóstico entre los métodos de cultivo horizontal ISO 6579:2002 frente al método de cultivo FDA-BAM en ovoproductos para la identificación de *Salmonella* en el Perú, o estudios afines sobre esta temática.

2.1.1 Antecedentes Internacionales

En el 2017, **Alberti y Burgos** realizaron una investigación comparando el desempeño de dos métodos alternativos para la detección de *Salmonella*, compararon Assurance GDS System, que es parte de la gama de los métodos moleculares, y el inmunoensayo VIA TECRA, que es una prueba de ELISA, contra lo descrito en el método horizontal para la detección de *Salmonella* ISO 6579:2002. La matriz utilizada para los ensayos fue carne fresca de pollo. Determinaron el tamaño de muestra utilizando la fórmula de Cochran y obtuvieron un tamaño muestral mínimo de 72 sin embargo el estudio se desarrolló con 96 muestras. El método inmunoensayo VIA TECRA obtuvo 88% de sensibilidad, 86% y especificidad, 14% de tasa de falsos positivos y 12% de tasa de falsos negativos, mientras que el Assurance GDS System alcanzó un 85% de sensibilidad, un 81% de especificidad, 19% de tasa de falsos positivos y

un 15% de tasa de falsos negativos. Los autores detectaron *Salmonella* en carne de pollo mediante los tres métodos de ensayo, con gran rendimiento del método Assurance GDS System y VIA TECRA.¹⁵

García C. (2015) evaluó diferentes métodos para el control sanitario. En principio obtuvo e íntegro la información sanitaria de las explotaciones avícolas estudiadas; Segundo, abordó el diseño e implementación de los mapas de seroprevalencia para el control de IANBP (influenza aviar de baja patogenicidad de declaración obligatoria), y el mapa de prevalencia para *Salmonella spp.*; Tercero, controló y representó en un mapa dinámico la respuesta serológica después de una vacunación única *in ovo* frente a IBD, utilizando una vacuna de inmunocomplejos en pollos. Cuarto se basó en el estudio cualitativo de la contaminación por *Salmonella spp.* (ISO 6579) en gallinas ponedoras, previa al sacrificio por ser positiva a *Salmonella Enteritidis*. Cuarto, serotiparon cepas según el método de Kauffman-White-Le-Minor y se caracterizaron mediante macrorrestricción genómica utilizando la técnica de electroforesis en campo pulsante (PFGE). Quinto, evaluó el efecto *in vitro* de bacteriófagos frente a *Salmonella Enteritidis*, previamente inoculada en muestras de heces frescas de gallinas ponedoras. El autor concluye e indica que el uso de bacteriófagos redujo el aislamiento de *Salmonella Enteritidis* en las muestras de heces a las 24h, por lo que podría ser considerado una herramienta de prevención.¹⁶

Villagómez S. (2015) investigó el aislamiento y tipificación serológica *S. enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. Infantis* en carcasas de pollo destinadas a consumo humano en un camal industrializado, incluyendo 15 muestras de piel de pechuga después de su faenamiento, contenidas en 5 pools y 25 sacos ciegos representados en 1 pool de contenido cecal después de la evisceración. Luego de dos meses de muestreo obtuvo 75 muestras

de piel conformadas en 25 pools y 5 pools de heces, estas fueron pre-enriquecidas, enriquecidas de forma selectiva y aislada según la norma ISO 6579. De las 25 muestras 20 (80%) fueron positivas a *Salmonella spp.* En nueve cepas (37.5%) el 100% fueron *Salmonella Infantis*. La conclusión del trabajo fue que el alto número de aislamientos de *Salmonella spp.*, y la presencia notable del serotipo *Infantis* en carcasas de pollo destinadas a consumo humano en un camal industrializado es un problema importante de salud pública.¹⁷

Robledo LA. (2015) realizó la investigación comparativa de *Salmonella spp.*, en alimentos mediante método tradicional ISO 6579, método de inmunofluorescencia (ELFA) y método inmunoenzimático (ELFA) con proteínas recombinantes de fagos, con el objetivo de obtener datos cuantitativos y una ampliación de la validación de un método inmunoenzimático. Los autores indican la fiabilidad y seguridad en la utilización de las tres técnicas de detección, de estos los métodos inmunoenzimáticos responden positivamente a las necesidades de las empresas por obtener resultados en poco tiempo (24-48 horas). Ciertos grupos de alimentos, como las carnes frescas, muestran niveles de presencia y ausencia de *Salmonella* más altos que otros grupos, según el método utilizado. En conclusión, la ampliación de la validación ha permitido mejorar las condiciones de preparación de la muestra en huevos y carnes de ave de corral.¹⁸

Logacho M. (2015) detectó la presencia de *Salmonella Enteritidis*, *Typhimurium* e *Infantis* en materia prima y alimento balanceado en una fábrica de elaboración de piensos para pollos de engorde, a través de métodos bacteriológicos y serológicos. Al final del período de muestreo obtuvo un total 194 muestras (154 muestras de materia prima y 40 muestras de alimento terminado), que fueron procesadas en base a la norma ISO 6579. El 4.12% (8/194) de las muestras fueron positivas para

Salmonella spp., de las materias primas utilizadas, la harina de carne presentó mayor contaminación (22.22%). Las cepas de *Salmonella* aisladas se tipificaron, identificándose al serotipo *Salmonella Infantis* (1,03%). Estos resultados sugieren la entrada del microorganismo al sistema productivo de pollos de engorde a través del alimento balanceado y sus ingredientes.¹⁹

Romero QM, et al., (2015) evaluaron la comparación del método convencional ISO 6579-2002 con PCR Tiempo Real como prueba de Tamizaje para la detección de *Salmonella spp.*, en 25 muestras carne molida correspondientes a los 5 lotes en estudio. Obtuvieron un 100% de positividad por ambos métodos, lo que demostró la alta sensibilidad de método de PCR Tiempo Real como prueba de tamizaje para la detección de este agente patógeno.²⁰

Bird P, et al., (2014) desarrollaron un estudio comparativo entre el método de cultivo cualitativo cromógeno Petrifilm de 3M™ SALX y el análisis bioquímico en el aislamiento de *Salmonellaspp.*, en muestras ambientales de alimentos. Desarrollaron un estudio multicéntrico se utilizaron la guía de valuación USDA/FSIS y el FDA/BAM. Incluyeron un total de 17 laboratorios, donde se evaluaron 1872 muestras. Para el sistema 3M Petrifilm SALX, se analizó la carne cruda molida utilizando 25 g de las porciones de prueba y se analizó el alimento para perros seco utilizando 375 g de partes de ensayo. Ambas matrices de muestras fueron contaminadas artificialmente con *Salmonella* a tres niveles de inoculación: un nivel de control no inoculado (0 CFU/ porción de prueba), un bajo nivel de inóculo (0.2-2 UFC/porción de prueba) y un alto nivel de inóculo (2-5 CFU/Prueba). Para la carne molida cruda y las porciones secas de comida canina, no se encontraron diferencias significativas en el intervalo de confianza del 95% cuando se usó detectadas con 3M™ SALX Men comparación con los métodos USDA/FSIS o el FDA/BAM.²¹

Zabaleta G. (2014) determino la susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos de *Salmonella spp.*, provenientes de plantas y puntos de venta en la cadena cárnica porcina. Realizó un muestreo estratificado obteniendo 1202 muestras entre canales, superficies, utensilios y carnes. El aislamiento se realizó mediante el método horizontal ISO 6579:2002; realizando Pre-enriquecimiento con caldo BHI y enriquecimiento en caldo. Se identificaron los serotipos *Salmonella spp* con la técnica de antisueros. Se realizó la detección de susceptibilidad antimicrobiana con la técnica de micro dilución en caldo con el sistema MicroScan utilizándose como control *E. coli* ATCC 25922. Aislaron 70 cepas de *Salmonella spp.*, siendo las más prevalentes *S. Typhimurium* (70%), *S. Javiana* (9%) y *S. Derby* (6%). Se detectó resistencia a Trimetoprima/Sulfametoxazol en un 14,1% de las cepas seguido de Cefotaxima con un 9,4% y Ampicilina en un 6,2%. El autor aisló 70 cepas de *Salmonella spp.*, con alta prevalencia de *S. thyphirium*.²²

Álvarez PH. (2013) evaluó dos métodos (método USDA con caldo RV y caldo Tetrionato en comparación con medio XLT4 y ISO 6579) para la detección de *Salmonella spp* en embutidos artesanales. Ambos métodos fueron validados en el Laboratorio Nacional de Salud. Se usó como estándar el método FDA-BAM. Obtuvieron un valor de $\kappa=0.97$ (IC 95% = 0.9291 a 1%), una sensibilidad del 100% y una especificidad del 98.59%, para ambos métodos. Como conclusión se demostró que los métodos son repetibles y reproducibles, además de presentar una buena sensibilidad y especificidad.²³

Zhang et al. (2013) desarrollaron un método mejorado del FDA-BAM (1000 gr de huevo en 2Lt de caldo tripticasa soya seguido del pre-enriquecimiento con caldo RV Tetrionato) para el aislamiento de *Salmonella* en huevos en comparación con el método FDA-BAM

convencional. En los 8 ensayos realizados con *Salmonella Enteritidis*, el método alternativo fue significativamente ($P < 0.05$) más productivo que el método de referencia en 3 ensayos, y significativamente ($P < 0.05$) menos productivo que el método de referencia en 1 ensayo. No hubo diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los 2 métodos para los otros 4 ensayos de *Salmonella*, Los autores concluyeron que el método alternativo tiene el potencial de reemplazar el método de cultivo BAM actual para la detección y aislamiento de *Salmonella* en huevos.²⁴

Soria M. (2012) determino la presencia de *Salmonella spp.*, y las características físicas y pH del huevo para consumo humano y evaluó la sensibilidad de los aislamientos obtenidos frente a diferentes antimicrobianos de uso en medicina humana y veterinaria. Determino el aislamiento de *Salmonella spp.*, utilizando la metodología FDA/BAM (con modificaciones). La serotipificación de los aislamientos se realizó según el método de Kauffmann-White. Los huevos de cáscara marrón y los de cáscara blanca mostraron diferencias en sus parámetros físicos y valores de pH. La prevalencia de *Salmonella spp.*, fue del 1,8 % (29/1.643 muestras), encontrándose 8 serovariedades de *Salmonella spp.*, las cuales fueron sensibles a amoxicilina/ácido clavulánico, ciprofloxacinaa e imipenem que serían de elección en la terapia de infecciones causadas por este patógeno. Los dos métodos evaluados no presentaron diferencias entre sí en la capacidad discriminatoria para *Salmonella*.²⁵

Ramírez W. (2012) propuso un manual de técnicas microbiológicas para los diferentes grupos alimentación. Desarrollo una investigación bibliográfica basada en las metodologías del FDA-BAM para la elaboración del manual aplicado a los siguientes microorganismos: *Listeria monocytogenes*; mohos y levaduras; *Escherichia coli*, bacterias coliformes y *Enterobacterias*; *Escherichia coli* O157:H7; *Salmonella spp*; entre otros. El autor concluye que las técnicas de análisis microbiológico

de alimentos, referenciadas en las metodologías normalizadas de FDA, presentan variaciones dependiendo de los diferentes grupos alimenticios o tipo de alimento por analizar, además las metodologías analíticas deben validarse antes de su aplicación, esto con el objetivo de obtener resultados precisos y confiables.²⁶

Méndez I, et al., (2011) realizaron un estudio donde demostraron la presencia de *Salmonella spp.*, en alimentos de venta callejera. Recolectaron 42 muestras de alimentos, para el aislamiento y caracterización de *Salmonella spp.*, con el método FDA con pruebas bioquímicas, serotipificación y realizando la prueba de susceptibilidad antimicrobiana. Aislaron bacterias en 18 muestras (42,9%), de las cuales solo dos fueron positivas por serotipificación para *Salmonella entérica* (11,1%), 11 de estas 18 muestras fueron positivas para otras bacterias pertenecientes a la familia *enterobacteriaceae* (61,1%) y cinco muestras no pudieron ser identificadas (27,8%). En conclusión, identificaron la presencia de *Salmonella entérica* y otras enterobacterias en alimentos de venta callejera, lo cual representa un alto riesgo para la salud.²⁷

Eyigor A, et al., (2010) evaluaron la capacidad de detección de *Salmonella* con el sistema Lightcycler LC-PCR) en comparación con el método FDA-BAM e ISO 6579. Veinte y tres (50,0%) y 24 (52,2%) de 46 muestras de carne de pollo fueron positivas para *Salmonella* según los métodos de la FDA-BAM e ISO respectivamente. Se encontró que 5 de las 15 (33,3%) muestras de carne de pavo tenían *Salmonella* por ambos métodos. Ninguna de las muestras de carne roja fue positiva para *Salmonella* usando el método de FDA-BAM, y una muestra de carne roja (3,3%) positiva para *Salmonella* con el método ISO. Los resultados de LC-PCR indicaron que 23 (50,0%) y 31 (67,4%) de las muestras de Acido Desoxirribonucleico (ADN) obtenidas de las 46 muestras de carne de pollo pre enriquecidas por los métodos FDA-BAM e ISO fueron positivas

para *Salmonella*. La tasa de detección de *Salmonella* a partir de muestras de carne de pavo por ISO y LC-PCR fue de 6,7%, mientras que ninguna detección fue observada por FDA y LC-PCR. La tasa de detección de PCR de LC-FDA en muestras de carne roja fue de 23,3%, mientras que la ISO y LC-PCR fue del 43,3%. En conclusión, los autores señalan que la baja precisión relativa, puede estar relacionado con la etapa de pre-enriquecimiento de FDA e ISO para preparaciones de muestras de DNA para PCR.²⁸

García et al (2009) realizaron un estudio cualitativo de contaminación de *Salmonella spp.*, de muestras de heces, hisopos cloacales y huevos (interior y exterior) de gallinas ponedoras, previo al sacrificio por ser positiva a *Salmonella Enteritidis*. Seleccionaron 50 jaulas de las que tomaron 150 gr de heces, tres muestras de hisopos cloacales y una muestra de seis huevos. El método de aislamiento e identificación de *Salmonella spp.*, fue según la norma ISO 6579:2002 y su modificación. Obtuvieron un 92% de positividad a *Salmonella spp.*, en heces, sin embargo, de las 150 muestras cloacales solo el 1.3 % resulto positivo. El 34% de las muestras de huevo analizadas exteriormente un día después de la fecha de puesta fueron positivas a *Salmonella spp.*, pero ninguna muestra del interior del huevo fue positiva. El serotipo determinado en heces, hisopos y huevos exterior fue *Enteritidis*. La detección cualitativa a altos niveles (92%) en las heces de gallina ponedora no implicó la presencia del mismo en el interior del huevo. Los autores concluyen que existe la necesidad de evaluar cuantitativamente la presencia de *Salmonella spp.*, en las heces para poder establecer una correlación real con la presencia del patógeno en el interior del huevo.²⁹

Zhang L, Yan Z, y Ryser E. (2006) compararon métodos convencionales para aislar *Salmonella Enteritidis (SE)* en muestras ambientales contaminadas con el método FDA-BAM. Además, compararon la eficacia

de dos medios de enriquecimiento, el caldo de Tetracionato (TT) y Rappaport-Vassiliadis (RV), y tres medios de recubrimiento selectivo, agar verde brillante con novobiocina (BGN), xilosa lisina tergitol 4 agar (XLT4) y agar de sulfito de bismuto (BS). Las muestras de hisopos ambientales se recogieron de dos bandadas de pollos, SE positivas previamente identificadas y se analizaron en paralelo utilizando la prueba Reveal y el método de cultivo de la FDA. El 19,5% (25 muestras) y 18,0% (23 muestras) fueron positivas para SE con la prueba Reveal y el por el método de cultivo FDA, respectivamente. No hubo diferencias significativas en la eficacia ($p = 0,527$) entre los dos métodos. Obtuvieron un número mayor de muestras positivas se obtuvo después del enriquecimiento en RV en comparación con TT. En conclusión, los autores señalan que ningún método único recuperó con éxito SE de todas las muestras ambientales positivas a SE.³⁰

Imge Oktay H. y Heperkan D. (2006) evaluaron dos métodos (Organización Internacional de Normalización (ISO) 11290 y 6579, y mini-The Vitek Immuno Diagnostic Assay System (VIDES) para detectar la presencia de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* en diferentes muestras. *Salmonella* no se observó en ninguna de las muestras, sin embargo, se aislaron otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Un estudio de inoculación con *L. monocytogenes* y *Salmonella Typhi* utilizando las mismas muestras no encontró ninguna diferencia en la eficiencia de los métodos ISO y mini-VIDAS con respecto a la identificación de *Salmonella*. Sin embargo, se concluye que la determinación de en el mini-VIDAS fue más eficiente para identificar *L. monocytogenes* que *Salmonella* en muestras con un bajo recuento de bacterias.³¹

Durango, Arrieta y Mattar (2004) establecieron la frecuencia de *Salmonella spp.*, en alimentos en 636 muestras de alimentos obtenidas en ventas de comidas rápidas callejeras y en plazas de mercados. Los aislamientos se realizaron con el método convencional FDA-BAM. Inocularon 25 g de cada muestra de alimento en 225 ml de caldo de pre-enriquecimiento; luego, inocularon 1 ml a los caldos de enriquecimiento y sembraron en medios de cultivo selectivos para *Salmonella*, las colonias sospechosas se identificaron por pruebas bioquímicas y serológicas. Se aislaron 47 (7,4%) *Salmonella spp.* del total de muestras de carne de res, 9,3%, 12,6% de chorizo, 7,9% de queso, 5,2% de carne de cerdo, 1,6% de pollo y 10,5% de arepa de huevo. Los principales serotipos encontrados fueron *S. Anatum* (26%), *S. Newport* (13%), *S. Typhimurium* (9%), *S. Gaminara* (9%) y *S. Uganda* (9%). En conclusión, el estudio permitió establecer la distribución de los serotipos de *Salmonella spp.*, en alimentos en Colombia.³²

Valentin-bon I, et al. (2003) compararon la eficacia de dos métodos para aislar *Salmonella Enteritidis* (SE) en huevos con cascara. El primer método consistió en un pre-enriquecimiento de la muestra y el segundo fue desarrollado por el Servicio de Inspección de Sanidad Animal y Vegetal (APHIS). Para el método APHIS, cada muestra se cultivó mediante plaqueado directo sobre verde brillante (BG), verde brillante con novobiocina (BGN), desoxicolato de xilosa lisina (XLD) y agar de xilosa lisina agar Tergitol 4 (XLT4). Para el método de Pre-enriquecimiento, las porciones de 25 g de cada grupo se enriquecieron en caldo tripticasa soya modificado con 30 mg/l de FeSO₄. Después de 24 h de incubación, el Pre-enriquecimiento se subcultivaron a Tetracionato y caldos Rappaport-Vassiliadis, y se extendieron a BG, BGN, sulfato de bismuto XLD y XLT4, los aislamientos fueron confirmados bioquímica y serológicamente. En todos los experimentos, el método de Pre-enriquecimiento se recuperó significativamente ($p=$

0.05) y niveles de inóculo que el método APHIS. En conclusión, el método de Pre-enriquecimiento proporciona mayor sensibilidad para el aislamiento de SE que el método APHIS.³³

Seo K, et al. (2003) evaluaron el método de homogenización para detectar de *Salmonella Enteritidis* (SE), usando tres niveles de inóculo (10, 126 y 256 células SE por pocillo de 10 huevos) para llevar a cabo tres experimentos. Los pools de 10 huevos se homogenizaron mediante uno de los cuatro métodos de homogenización mecánica, mezcla eléctrica, masaje de mano, y revolver la mano por 30 s., estos fueron incubados a 37°C y se enumeraron las colonias de SE después de 24 y 48 h de incubación. No se recuperaron SE de muestras de huevo de pools mezclados eléctricamente inoculadas con 10 células, mientras que se encontraron niveles de 10⁶ UFC/ml para muestras de pools batidas o con masaje manual inoculadas con 10 células. Sin embargo, el recuento SE para todas las muestras se acercaron a 9 log₁₀ UFC/ml después de 48 h de incubación. Se concluye que la detección de pequeñas poblaciones SE en muestras de huevo de cáscara podría mejorarse.³⁴

Hammack T. et al. (1999) describieron la eficacia del uso de los medios Rappaport-Vassiliadis (RV), el caldo de selenito cistina (SC) y el caldo de Tetrionato (TT) para la recuperación de *Salmonella spp.* en alimentos con una carga microbiana baja. El medio RV fue preparado a partir de sus ingredientes individuales y se incubó a 42°C, el caldo SC fue comercial y se incubó a 35°C, y el caldo TT a 35°C y 43°C para la recuperación de *Salmonella spp.* Se analizaron 21 tipos de alimentos artificialmente contaminados que incluían alimentos lácteos, especias y productos de huevo, así como otros alimentos de baja carga microbiana. No se encontró diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los caldos de enriquecimiento selectivo para la recuperación de *Salmonella spp.*, de 18 muestras de alimentos. En conclusión, para la recuperación de

Salmonella spp., en alimentos con una carga microbiana baja, se recomienda el uso caldo TT incubado a 35°C y medio RV incubado a 42°C.³⁵

D'Aoust J, et al., (1992) estudiaron la sensibilidad del método estándar de la ISO 6579 e ISO 3565 donde se comparó con el procedimiento de Health Protection Branch (HPB) para la detección de *Salmonelas* transmitidas por alimentos, donde 195 alimentos 84 (43,1%) contenían *Salmonella*, de ellos, 75 (89,3%) y 68 (81,0%) fueron identificados por los métodos ISO y HPB. En conclusión, la aparente falta de acuerdo entre ambos métodos probablemente provenía del bajo número de salmonelosis en varios homogenizados de alimentos y la transferencia desigual del microorganismo en los caldos de pre-enriquecimiento ISO y HPB.³⁶

2.2 Base teórica

2.2.1 Métodos de cultivo tradicional

Los métodos de cultivo tradicional sobre la evaluación del performance entre método de cultivo Horizontal ISO 6579: 2002 frente al método FDA-BAM para la identificación de *Salmonella spp.* se presentan a continuación.

2.2.1.1 Fundamento del método ISO

El método ISO 6579: 2002, describe el método horizontal para la detección de *Salmonella*, comprendiendo principalmente *Salmonella Typhi* y *Salmonella Paratyphi*, además es aplicable en productos destinados al consumo humano y para la alimentación de los animales, incluyendo muestras ambientales en el área de la

producción y manipulación de los alimentos en las etapas de elaboración primaria. El método está basado en las cuatro etapas: Pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo, enriquecimiento en medio líquido selectivo, aislamientos en medio selectivos y diferenciales y confirmación de colonias presuntivas aisladas.^{13,37}(Ver anexo 2).

2.2.1.2 Fundamento del método FDA-BAM

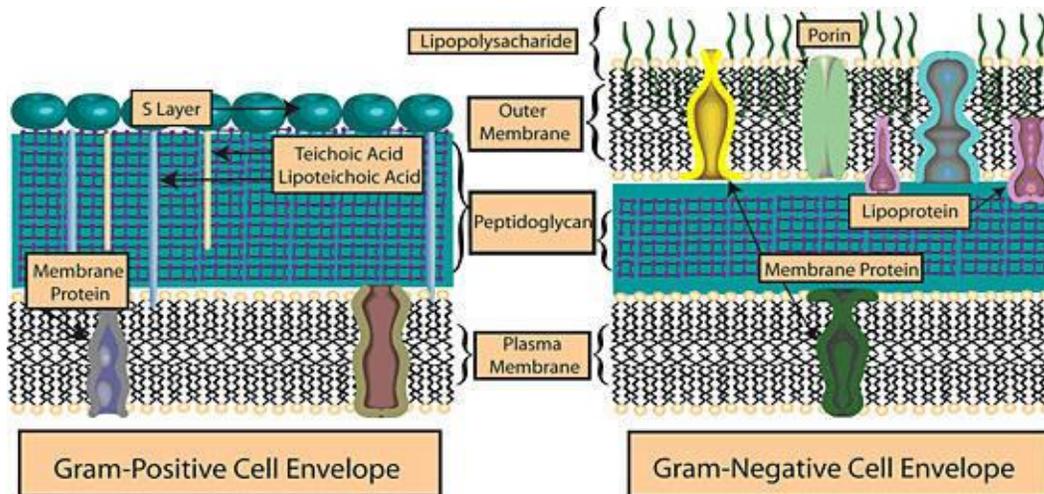
El método FDA-BAM describe la detección, aislamiento e identificación de *Salmonella* en alimentos y muestras ambientales, se ha utilizado principalmente para la búsqueda de *Salmonella Enteritidis*. El método está basado en las siguientes etapas Pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo, enriquecimiento en medio líquido selectivo, aislamientos en medio selectivos y diferenciales y confirmación de colonias presuntivas aisladas: Las colonias sospechosas de *Salmonella* son aisladas nuevamente y su confirmación se realiza por propiedades bioquímicas y serología.^{14,38} (Ver anexo 3).

2.2.2 Genero *Salmonella*

Los microorganismos del género *Salmonella* son bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, no esporulados, mesófilos con una temperatura optima de crecimiento de 35–37°C, estos microorganismos crecen en un amplio rango de temperatura (7- 48°C) a un pH entre 4 y 8, con actividades de agua (a_w) por debajo de 0.93, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, generalmente móviles gracias a la presencia de sus flagelos peritricos con excepción de *S. gallinarum* y *S. pullorum*, su tamaño oscila entre 0,3 a 1 μm por 1,0 a 6,0 μm . Crecen en medios de cultivo habituales, de acuerdo con la presencia de los antígenos: los somáticos O (lipopolisacárido), Vi o K (polisacárido capsular) y las

proteínas H (flagelar) pueden actualmente serotiparse en más de 2.300 serovariedades.^{39,40,41,42,43}

Gráfico 1: Estructura de las bacterias Gram (+) y Gram (-)



Tomado de: Cornell University, College of Agriculture and Life Sciences. Department of Microbiology.

2.2.2.1 Nomenclatura

La nomenclatura para el género *Salmonella* ha evolucionado a partir del concepto inicial de una especie de serotipo propuesto por Kauffmann en el cual se basa en la presencia o ausencia de anticuerpos específicos contra antígenos de la identificación serológica como; antígenos O (somáticos) y H (flagelar) la cual se descubrió accidentalmente en 1896. Cada serotipo se consideró una especie separada (por ejemplo, *S. Paratyphi A*, *S. Newport* y *S. Enteritidis*).^{44,45}

2.2.2.2 Taxonomía

La más reciente clasificación del género *Salmonella* está basada en estudios realizados sobre la base de técnicas de hibridación del ADN de la bacteria y se concluyó que está conformada por dos especies (Tabla 1). Es importante aclarar que, aunque existe solo dos especies de salmonellas según su hibridación de ADN, tanto las especies como las

subespecies mencionadas se encuentran constituidas por más de 2400 variedades serológicas determinadas según las distintas asociaciones de los antígenos somáticos y flagelar.^{46,47,48}

Otras propuestas taxonómicas se han basado en el papel clínico de una cepa, en las características bioquímicas que dividen los serotipos en subgéneros y, en última instancia, en la relación genómica.

Tabla1. *Salmonella* especies, subespecies, serotipos y hábitat usual (Sistema de Kauffmann-White).

Clasificación de la especie y subespecie de <i>Salmonella</i>	Número de serotipos	Hábitat usual
<i>Salmonella entérica</i>		
<i>S. entérica subsp. Entérica (I)</i>	1531	Humanos y animales de sangre caliente.
<i>S. entérica subsp. Salamae (II)</i>	505	Animales de sangre fría y ambiente.
<i>S. entérica subsp. Arizonae (IIIa)</i>	99	Animales de sangre fría y ambiente.
<i>S. entérica subsp. Diarizonae (IIIb)</i>	336	Animales de sangre fría y ambiente.
<i>S. entérica subsp. Houtenae (IV)</i>	73	Animales de sangre fría y ambiente.
<i>S. entérica subsp. Indica (VI)</i>	13	Animales de sangre fría y ambiente.
<i>Salmonella Bongori</i>		
<i>S. Bongori (V)</i>	22	Animales de sangre fría y ambiente.
Total	2579	

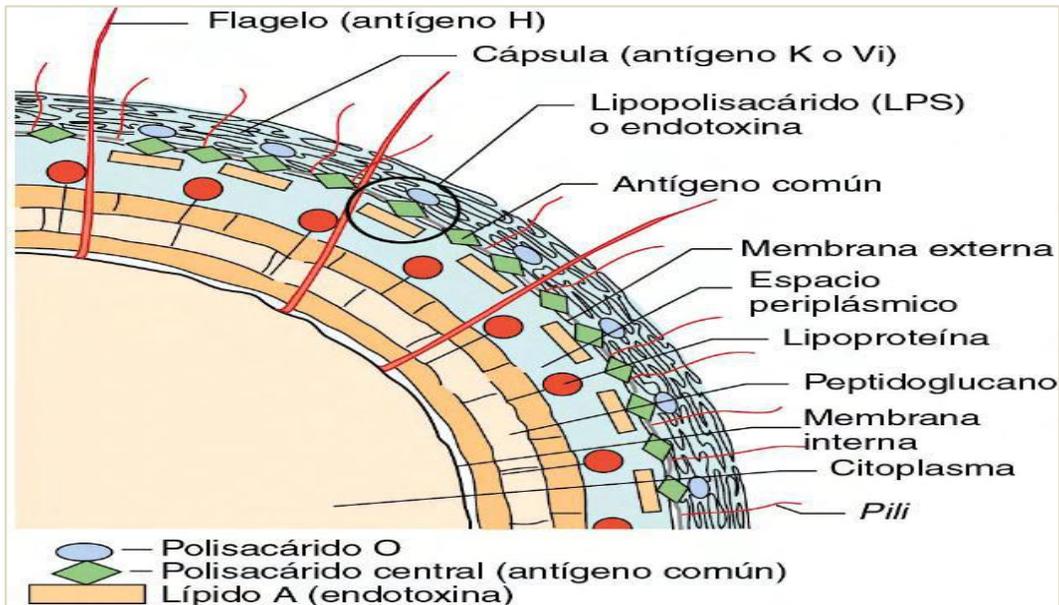
2.2.2.3 Estructura antigénica

La estructura antigénica de *Salmonella* puede diferenciarse en serotipos según su función antigénica de las cepas: Antígenos O y Antígenos H. En ciertas cepas se halla un tercer antígeno que se relaciona con la

virulencia, este antígeno se denomina Antígeno Vi (Serovar typhi, Dublín y Paratyphi C).^{49,50}

- * Antígeno somático (O): Significa sin movimiento, están compuestos por complejos de fosfolípidos y polisacáridos, se sitúa en la pared bacteriana y es termoestable ya que resiste a 100°C durante 2 horas, incluso es alcohol-resistente. Aglutinan con sus anticuerpos homólogos pausadamente, granular y difícil de disociar. Interviene en el poder patógeno del germen.
- * Antígeno flagelar (H): Su nombre deriva del alemán Hauch, por el halo producido en un medio de cultivo a raíz del movimiento, las *salmonellas* pueden ser monofásicas, cuando son el mismo antígeno flagelar específico (*S. typhi*, *S. paratyphi*), o difásicas y se encuentra situado en los flagelos móviles. Son antígenos constituidos por una proteína, la flagelina cuya composición de aminoácidos es constante para un antígeno determinado, es termolábil ya que no es resistente a 100°C durante 2 horas y es inestable al alcohol. La aglutinación con sus anticuerpos es rápida dando lugar a floculos que se disgregan fácilmente.
- * Antígenos “de la cubierta” (Vi): El único que se reconoce en *Salmonella* es el antígeno Vi (de virulencia) que existe en la *S. typhi*, *S. paratyphi C* y *S. Dublín* llamado así por definir la virulencia de la bacteria, ya que otorga resistencia contra la respuesta inmune celular y humoral del huésped. La expresión de este factor necesita de al menos dos genes (ViA + ViB), deben existir ambos en la bacteria para que dicha expresión tenga lugar. Este antígeno rodea a la pared bacteriana y hace imposible la aglutinación de los antígenos somáticos (O) que se encuentran por debajo y para poder determinar la presencia de los antígenos (O) es necesario destruir primero los antígenos Vi por calentamiento. El antígeno Vi aglutina lentamente y la aglutinación que produce es fina y granular.

Gráfico 2: Estructura antigénica de *Salmonella* spp.



Tomado de: Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiología Médica. 7ª Ed. Barcelona: Elsevier; 2014.

2.2.3 Salmonelosis

La salmonelosis continúa siendo una de las principales enfermedades bacterianas de transmisión alimentaria en el mundo y representa un problema de Salud Pública, con enormes costos para la industria y la sociedad.⁵¹ Es una enfermedad aguda, con cambios en la frecuencia de serotipos de un país a otro, con interés en áreas que no han alcanzado las condiciones de saneamiento e higiene. Afecta a todos los grupos de edad, con mayor incidencia en menores de cinco años y mayores de 60 años, que son los grupos más vulnerables.⁵²

2.2.3.1 Manifestaciones clínicas

Los patrones clínicos de la salmonelosis pueden dividirse en gastroenteritis, bacteriemia con o sin infección extra intestinal focal, fiebre tifoidea y estado de portador asintomático. Cualquier serotipo de *Salmonella* puede ser la causa probable de estas manifestaciones

clínicas bajo las condiciones apropiadas, pero en la práctica los serotipos de *S. entérica* se asocian principalmente con gastroenteritis. Los serotipos *Typhi* y aquellos relacionados (*Paratyphi*) causan fiebre tifoidea.⁵³

2.2.4 Mecanismo de transmisión de *Salmonella*

2.2.4.1 En el ave

Luego de la ingesta de agua o alimentos contaminados, *Salmonella* empieza su periodo de infección penetrando al hospedero a través de tejido linfoide, incluyendo las placas de Peyer y tonsilas cecales en las aves. Muchos de los microorganismos patógenos son capaces de ingresar y sobrevivir dentro de las células eucarióticas. Esta bacteria se dirige a células hospederas que no son habitualmente fagocíticas como la superficie de la capa mucosa de células epiteliales.⁵⁴

2.2.4.2 En el huevo

El contenido interno del huevo recién puesto es estéril. Sin embargo, al instante de la oviposición, el huevo tiene cierto grado de contaminación en la superficie debido al paso que da hacia la cloaca. Así mismo, en un período de tiempo parcialmente corto después de la puesta, en el exterior se pueden encontrar gran cantidad de microorganismos que bajo condiciones apropiadas pueden ingresar en el huevo y pueden crecer en su interior e infectarlos.⁵⁵

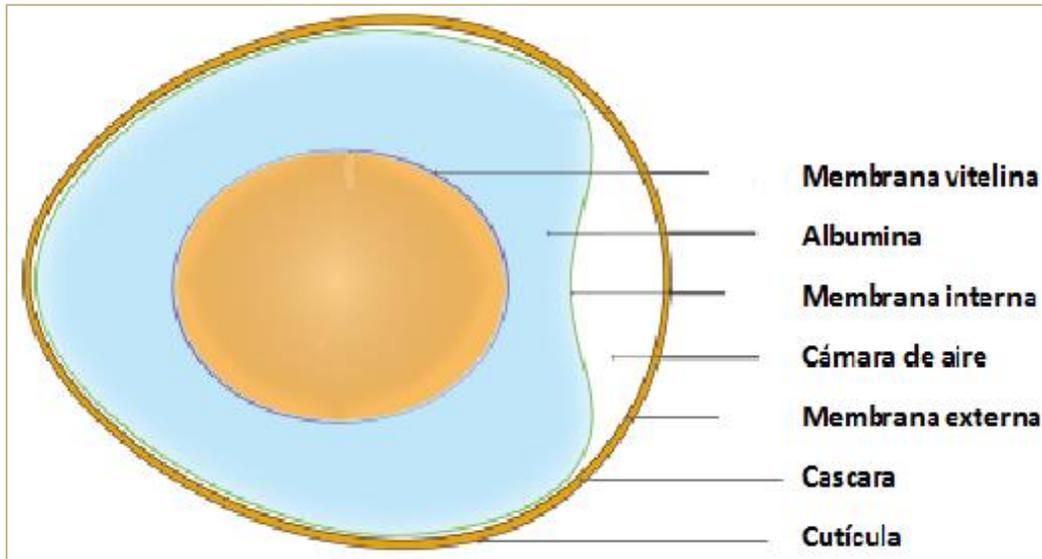
2.2.5 Transmisión vertical

Consiste en la contaminación directa del contenido interno del huevo; yema, albúmina y membrana de la cáscara, antes de la oviposición en donde, el sitio de infección son los órganos reproductivos y/u oviducto previamente infectados. La infección del tejido reproductivo de la gallina ocurre como consecuencia de la diseminación sistémica de *Salmonella* desde el intestino. La invasión de células epiteliales intestinales, libera la infiltración de células inmunes, principalmente macrófagos, los que capturan a *S. Enteritidis* en su interior; aunque la presencia de infección sistémica no implica la situación de huevos contaminados. La estructura del huevo afectado dependerá del sector infectado. Así, la contaminación de albúmina se produciría durante la formación del huevo en el oviducto, mientras la contaminación de la yema se debería a la infección ovárica.⁵⁶

2.2.6 Transmisión horizontal

Consiste en la penetración de bacterias desde el cascaron contaminado hacia el contenido del huevo, durante o después de la oviposición. Dicha contaminación puede ser producto de la infección del tracto reproductivo bajo o por la contaminación ambiental, especialmente de heces. La principal barrera física que impide el ingreso bacteriano al interior del huevo es la cáscara, la cual tiene una cubierta proteica, o cutícula, que la recubre externamente, obstruyendo los poros que ésta posee. Aunque, la humedad e inmadurez de la cutícula después de los primeros minutos tras la oviposición, la hace menos segura en la prevención de la penetración bacteriana, debido a que algunos poros podrían encontrarse abiertos. Por otro lado, las membranas de la cáscara (interna y externa) muestran cierto grado de defensa contra dicha penetración.⁵⁷

Gráfico3: Estructura interna y externa del huevo



Tomado de: Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Gast R, Humphrey TJ, et al. Mechanisms of Egg Contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiol Rev.* 2009; 33:718-738.

2.2.7 Transmisión lateral

Es una ruta de infección que sucede por contaminación a través del alimento, agua, e instalaciones o vectores, como, por ejemplo, aves silvestres, roedores, animales domésticos y humanos. El ingreso al interior del huevo por *Salmonella* y otras bacterias incrementa su permanencia al contacto con material contaminado, principalmente durante el almacenamiento a altas temperaturas y alta humedad relativa. La presencia de *Salmonella enteritidis* en el ambiente de las granjas de gallinas ponedoras generalmente es aceptada como una indicación sensitiva y relevante de los huevos contaminados que pueden producirse. La capacidad de la circulación del aire para diseminar patógenos en ranchos avícolas es un factor importante en la contaminación de los huevos, esto se ha evidenciado en algunos estudios que reportan la presencia de *Salmonella enteritidis* en el medio ambiente. Del mismo modo, en el momento que *Salmonella spp.* está presente en el exterior de los huevos muere rápidamente, pero la

sobrevivencia puede ser posible por una alta humedad relativa y apropiada temperatura, dejando claro que *Salmonella enteritidis* puede mantenerse largos períodos de tiempo en huevos almacenados a temperatura ambiente.⁵⁸

2.2.8 Fuentes e incidencia de Salmonelosis

La intoxicación alimentaria es originada por bacterias del género *Salmonella*, siendo una de las zoonosis de mayor prevalencia en países de altos y bajos ingresos además de ser una de las principales fuentes de enfermedades gastrointestinales en el hombre.⁵⁹

La globalización y el incremento industrial avícola han aumentado el consumo y distribución de pollos, huevos y sus subproductos y por ende la posible transmisión de *Salmonella spp.*⁶⁰

Un dramático incremento de salmonelosis en humanos producido por *Salmonella enteritidis* ocurrió a finales de la década de los 80's y principios de la década de los 90's. En 1995, se recopilaron informes gracias a los sistemas de vigilancia de los países miembros de la Organización Mundial de la Salud (OMS) donde se encontró que 76.1% de los aislamientos correspondieron a *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, y *Salmonella Typhi*. *Salmonella Enteritidis* fue más frecuente en 35 países seguido por *Salmonella Typhi* (12 países) y *Salmonella Typhimurium* (8 países). Las principales serovariedades aisladas globalmente para el año 1995 incluyeron *Salmonella enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella hadar*, *Salmonella infantis*, *Salmonella newport*, *Salmonella typhi*, *Salmonella agona*, *Salmonella virchow* y *Salmonella heidelberg*. Otros aspectos importantes para señalar es que los aislamientos de *Salmonella enteritidis* aumentaron de 25.6% en 1990 a 36.5% en el año 1995.⁶¹

Las infecciones asociadas a *Salmonella spp.*, varía dependiendo del tipo de *Salmonella spp.* Mientras que la fiebre entérica, causada por *Salmonella typhi* y *Salmonella Paratyphi*, conduce a una enfermedad severa, principalmente en naciones que son atendidas precariamente. Las infecciones de *Salmonella* no tifoidea tienden a ser autos limitantes que afectan a comunidades en todo el mundo.⁶²

Sin embargo, la incidencia de fiebre entérica varía de un país a otro. Se calcularon estimaciones de alta incidencia (más de 100 casos por cada 100.000 habitantes al año) en Asia, mientras que, en Europa, Australia, Nueva Zelandia y el Norte de América se notificó una incidencia baja (menos de 10 casos por 100 000 al año). En Estados Unidos, la incidencia de infecciones por *Salmonella typhi* es baja (400 por año) y, en su mayor parte, se relaciona con viajeros estadounidenses que regresan de países con bajo grado de desarrollo o viceversa. Al igual que en los Estados Unidos, la fiebre entérica en el Reino Unido y Canadá es infrecuente y la mayoría de los casos se importan de la India o Pakistán. Una encuesta epidemiológica realizada en España durante un período de nueve años (1997-2005) informó una tasa de hospitalización anual de 0.31 casos por 100 000 habitantes y una tasa de mortalidad de 0.003 casos por 100 000.

En Israel, la incidencia de fiebre entérica disminuyó de 0.42 a 0.23 por 100.000 entre los años 1995 y 2003, con el 57.4% de los casos importados, un mayor número de *Salmonella paratyphi* aislados. En las regiones con incidencia media (10-100 casos por 100.000 habitantes al año) se incluían África, América Latina, el Caribe y el resto de Asia y Oceanía. En los países asiáticos la incidencia anual de *Salmonella typhi* fue mayor en Pakistán (451.7 casos por 100 000) e India (214.2 casos por 100 000) en comparación con Vietnam y China (21.3 y 15.3 casos por 100 000, respectivamente).⁶³

En Perú, solo el 38% de hogares tienen acceso a agua, las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son un importante problema de salud pública, las cuales a menudo, ocurren como brotes, por lo que la vigilancia epidemiológica es de vital importancia. Mediante el Sistema de Vigilancia Epidemiológica. Entre los años 2010-2012 se han reportado un promedio de 35 brotes de ETA por año, 47% de los cuales se relacionaron clínicamente con casos agudos de salmonelosis. Los alimentos mayormente implicados fueron los preparados con Mayonesa con 43% del total de casos (crema de mayonesa, ensaladas). El total de personas afectadas fueron 2800 y el 51% de los brotes reportados tuvieron entre 10 a 50 afectados en promedio. Mediante los programas de vigilancia sanitaria de alimentos, se reportaron al *Staphylococcus aureus* y *Salmonella Spp.* como los patógenos más frecuentes en alimentos examinados.⁶⁴

La vigilancia epidemiológica es esencial para determinar el impacto de este patógeno sobre la morbilidad y mortalidad de la enfermedad en la población en riesgo.

2.2.9 Métodos de caracterización y recuperación de *Salmonella*.

La detección microbiológica de *Salmonella* en alimentos requiere de cuatro etapas sucesivas basadas en los lineamientos del método de cultivo horizontal ISO 6579:2002 frente al método FDA-BAM. Estos métodos incluyen los siguientes medios de cultivo.

2.2.9.1 Medios selectivos y diferenciales

Los medios microbiológicos para el aislamiento de *Salmonella* pueden ser de aislamiento primario, diferencial y selectivo, como:

A. Caldo Trypticasa Soya

Medio adecuado para el desarrollo de microorganismos exigentes. Utilizado en el control de esterilidad de productos biológicos, farmacéuticos y cosméticos, también es recomendado por el CLSI para la preparación de inóculo de pruebas de susceptibilidad en disco difusión de Kirby-Bauer y como medio de ensayo de esterilidad.

Principios: La tripteína y la peptona de soya aportan nutrientes ricos en péptidos, aminoácidos libres, bases púricas y pirimídicas, minerales y vitaminas, la peptona de soya contiene alta cantidad de hidratos de carbono que estimulan el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, el fosfato dipotásico otorga capacidad buffer y la glucosa es la fuente de energía. ⁶⁵

Contiene:

- * Tripteina
- * Peptona de soya
- * Cloruro de sodio
- * Fosfato dipotásico
- * Glucosa
- * Agua purificada

Nota: el pH del medio aproximado es 7.3

B. Agua peptonada tamponada (APT)

Medio usado como diluyente y para enriquecimiento bacteriano a partir de alimentos y otros materiales de interés sanitario. *Principio:* Diluyente recomendado por las normas ISO 6579 y la FDA-BAM para la homogenización de las muestras de alimentos. De gran ayuda a la investigación de *Salmonella spp.*, se recomienda la trituración y homogenización de 25 g. de muestra con 225 ml de agua peptonada tamponada y estéril y esta misma mezcla es lo que se incuba a 37°C durante 16-20h. Como Pre-enriquecimiento en caldos selectivos, como tetrionato o selenito verde-brillante.

Contenido:

- * Peptona
- * Cloruro sódico
- * Fosfato disódico
- * Fosfato Monopotásico

Nota: el pH aproximado es 7.0

C. Agar nutritivo

Medio de cultivo nutritivo no selectivo, es útil porque permanece solido incluso a relativas temperaturas elevadas. Además, el crecimiento bacteriano en este agar lo hace en la superficie, por lo que se distinguen mejor las colonias pequeñas, lo cual la pluripeptona y el extracto de carne constituyen la fuente de carbono, nitrógeno y aportan nutrientes para el desarrollo bacteriano. El

cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el agar es el agente solidificante.

Contenido:

- * Pluripeptona
- * Extracto de carne
- * Cloruro de sodio
- * Agar

Nota: el pH aproximado es 7.3

D. Caldo Tetrionato

Permite el crecimiento de *Salmonella* y previene el crecimiento de parte de la flora acompañante. *Principio:* Con adición de yodo al caldo tetrionato habrá oxidación de tiosulfato de sodio con formación de tetrionato. La toxicidad del medio está relacionada con la presencia de estos dos compuestos (tetrionato y tiosulfato). El medio es tamponado con carbonato de calcio neutralizara los ácidos que pueden ser producidos por descomposición de tetrionato por algunas bacterias. Inhibe coliformes mientras que permite que los bacilos de tifoidea-paratifoidea crezcan libremente en la muestra fecal.

Contiene:

- * Peptona
- * Sales biliares
- * Tiosulfato de sodio
- * Carbonato de calcio
- * Solución de yodo

Nota: el pH del medio es aproximadamente 8.4

E. Medio Rappaport-Vassiliadis

Medio selectivo utilizado para el enriquecimiento de *Salmonella* en aguas y alimentos. *Principio:* Inhibe el crecimiento de la microflora acompañante. La peptona de soja, el pH 5.2 y el incremento de la temperatura de incubación (41,5°C) favorece el crecimiento de *Salmonella spp.* El medio está formulado en cinco características diferenciales de *Salmonella* respecto a otras enterobacterias: Capacidad de resistir altas presiones osmóticas, multiplicación a pH relativamente bajos y son más resistentes a la presencia del verde de malaquita además tienen menos requerimientos nutricionales. La temperatura de incubación es un factor selectivo. Las características del medio son azul oscuro y claro, las cepas crecen en este medio en forma de residuo lechoso, mientras que el color del medio no cambia.

Contiene:

- * Peptona de soja
- * Cloruro sódico
- * Dihidrogenofosfato de potasio
- * Fosfato dipotásico
- * Cloruro de magnesio anhidro
- * Verde de malaquita

Nota: el pH del medio aproximado es 5.2

F. Caldo Muller-Kauffman Tetracionato Novobiocina (MKTTn)

El caldo Tetracionato es un medio que suprime el crecimiento de coliformes y otras bacterias entéricas. *Principio:* Contiene digestión péptica de tejido animal y caseína enzimática que, hidrolizada como fuentes de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales, la bilis del buey promueve el crecimiento de *Salmonella* y el verde brillante son agentes selectivos, que inhiben el crecimiento de organismos gram-positivos y la mayoría de los organismos gram-negativos.

Las especies de *Proteus* pueden ser inhibidas por la adición de novobiocina, el cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico mientras que el carbonato de calcio actúa como el agente tampón, el tiosulfato de sodio es una fuente de azufre y los aniones tetracionato funcionan, así como el agente selectivo. ⁶⁶

Contenido:

- * Extracto de carne
- * Hidrolizado enzimático de caseína
- * Cloruro de sodio (NaCl)
- * Carbonato de calcio (CaCO₃)
- * Tiosulfato de sodio
- * Tetracionato de sodio
- * Bilis de buey
- * Verde brillante
- * Novobiocina sal de sodio
- * Agua

Nota: el pH del medio aproximadamente es 8.2

G. Caldo infusión cerebro corazón

Este medio se basa en el caldo de Rosenow. Los primeros estudios demostraron que el medio era más eficaz que otros como base glucosada en el aislamiento de determinadas bacterias. *Principio:* Por la presencia de peptona, infusión de cerebro de ternera e infusión de corazón de res, se tienen los componentes necesarios para nutrir microorganismos exigentes. La glucosa se emplea para la fermentación y el fosfato como tampón. Por la adición de antibiótico es un medio adecuado para el estudio de hongos patógenos. Debido a su contenido de glucosa es menos indicado para la caracterización de hemólisis, pero puede utilizarse suplementado con sangre. ⁶⁷

Contenido:

- * Infusión de cerebro de ternera
- * Infusión de corazón de res
- * D (+)-Glucosa
- * Peptona de gelatina
- * Cloruro de sodio
- * Di-Sodio hidrogeno fosfato

Nota: el pH aproximadamente es 7.4

H. Caldo lactosado

Medio clásico, para las pruebas tentativas de presencia de coliformes y enriquecimiento de *Salmonella*. *Principio:* Es un medio rico en nutrientes y no contiene inhibidores del crecimiento bacteriano. El

extracto de carne y la peptona son la fuente de carbono y nitrógeno, mientras que la lactosa es el hidrato de carbono fermentable. Por la fermentación de la lactosa, se produce ácido y gas, y éste último (se demuestra al usar las campanas Durham). Usado como medio de Pre-enriquecimiento, porque permite recuperar células injuriadas, diluye sustancias tóxicas o inhibitorias y favorece el desarrollo de *Salmonella* con respecto a otras bacterias. ⁶⁸

Contiene:

- * Peptona de gelatina
- * Extracto de carne
- * Lactosa

Nota: el pH del medio es aproximadamente 6.9

I. Caldo selenito cistina

Se desarrolló de acuerdo a la fórmula de Leiffson, añadiendo la cistina para cumplir las especificaciones de la FDA. *Principio:* la peptona aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, el selenito de sodio inhibe flora Gram positiva y la mayoría de la flora entérica excepto *Salmonella spp.*, la L-cistina es el agente reductor y fue propuesta por la FDA para el aislamiento de *Salmonella* en productos alimenticios incrementando la recuperación por reducción de la toxicidad del selenito.

Contenido:

- * Peptona
- * Lactosa

- * Biselenito sódico
- * Fosfato sódico
- * L-Cistina

Nota: el pH es aproximadamente 7.0

J. Agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD)

Para aislamiento de bacterias enteros patógenos, especialmente de los géneros *shigella*, *salmonella* y *Arizona*. *Principio:* El efecto inhibitor es débil, el desoxicolato produce la inhibición de bacterias coliformes y permite la diseminación de cepas de *Proteus* que puede llegar a confundirse con *Salmonella*. Además, *Salmonella Spp.* produce fermentación de xilosa, descarboxilación de lisina y genera ácido sulfhídrico. Las características morfológicas de *Salmonella* se observan con pigmentación rosa o roja, algunas veces transparentes con o sin centro negro o completamente negras. Este género bacteriano al no fermentar xilosa, lactosa ni sacarosa no da lugar a que vire a amarillo, el rojo fenol; como tampoco descarboxila la lisina, no se produce color rojo púrpura alrededor de las colonias, al no haberse producido cadaverina. ⁶⁹

Contiene:

- * Xilosa
- * L- lisina
- * Lactosa
- * Sacarosa
- * Cloruro sódico
- * Extracto de levadura
- * Rojo fenol
- * Dexocicolato sódico

- * Tiosulfato sódico
- * Citrato férrico amónico
- * Agar – agar

Nota: el pH del medio aproximado es 7.4

K. Agar MacConkey (MC)

Es un medio selectivo y diferencial, se utiliza para aislar y diferenciar las bacterias del género de Enterobacteriaceae. *Principio:* Este medio tiene la capacidad de fermentar la lactosa. Las sales biliares y el cristal violeta inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas. El colorante neutro rojo es un indicador de pH que es incoloro por encima de un pH de 6,8 y rojo a un pH inferior a 6,8, el ácido que se acumula de la fermentación de la lactosa da vuelta al colorante rojo. Los fermentadores de lactosa cambian de color rojo a MacConkey mientras que los no fermentadores de lactosa siguen siendo su color normal o el color del medio. Las formulaciones sin cristal violeta permiten el crecimiento de Enterococcus y algunas especies de Staphylococcus, que fermentan la lactosa y aparecen rosadas en el medio.⁷⁰

Contiene:

- * Peptona
- * Lactosa
- * Sales biliares
- * Cloruro de sodio
- * Rojo neutro
- * Cristal violeta
- * Agar – agar

Nota: el pH del medio aproximado 7.2.

L. Agar verde brillante (BGA)

Medio selectivo y diferencial utilizado para el aislamiento de *Salmonella* en aguas y alimentos. *Principio:* El verde brillante, reprime el crecimiento de casi todos los gérmenes a excepción de *Salmonella*. La presencia de lactosa y sacarosa permite una buena diferenciación, que da colonias rosadas con un halo rojo, frente al resto de la flora, que forma colonias más pequeñas de color verde-amarillo, debido a la acidificación producida por la fermentación de la lactosa y/o de la sacarosa, los nutrientes son peptona y extracto de levadura, su inhibidor es el verde brillante, el indicador es un carbohidrato (lactosa) y su inhibidor de pH rojo de fenol (alcalino: rojo; ácido: amarillo). Las características de las colonias se observan de color rojo, ya que no fermenta lactosa utiliza las peptonas como fuente de energía produciendo sustancias alcalinas que elevan el pH del medio, modificándolo para una coloración rojo más intensa.⁷¹

Contiene:

- * Peptona de carne
- * Peptona de caseína
- * Cloruro sódico
- * Extracto de levadura
- * Lactosa
- * Sacarosa
- * Rojo fenol
- * Verde brillante
- * Agar – agar

Nota: el pH del medio aproximado es 7.0

M. Agar Hektoen (HE)

Es un medio de cultivo selectivo utilizado para el aislamiento de enterobacterias patógenas, principalmente *Shigella* y *Salmonella*. *Principio:* El medio tiene un elevado valor nutritivo, las sales biliares que contiene inhiben el crecimiento de la flora gram positiva y algunos gram negativos, los indicadores azules de bromotimol y fucsina ácida permiten la diferenciación de las bacterias lactosa positivo (de color amarillo-naranja) de la lactosa negativa (de color azul-verdoso), tiene la capacidad de fermentar lactosa, sacarosa o salicina y reducir el azufre a sulfuro de hidrógeno (H₂S). Además de los tres azúcares, se incluye Tiosulfato sódico como fuente de azufre, añade citrato de amonio férrico para reaccionar con H₂S y formar un precipitado negro. Organismos como *Salmonella*, *Shigella* y *Proteus* que no fermentan ninguno de los azúcares producen colonias azul-verdes. Las especies *Proteus* y *Salmonella* que reducen el azufre a H₂S forman colonias que contienen un precipitado negro.⁶⁷

Contiene:

- * Peptona
- * Extracto de levadura
- * Sales biliares
- * Lactosa
- * Sacarosa
- * Salicina
- * Cloruro sódico
- * Tiosulfato sódico
- * Citrato férrico – amónico
- * Fucsina acida
- * Azul de bromotimol

- ✧ Agar – agar

Nota: el pH del medio aproximadamente es 7.5

N. Agar sulfito de bismuto (BS)

Es altamente selectivo usado para el aislamiento de *Salmonella typhi* y otros bacilos entéricos. *Principio:* La Peptona y el extracto de carne aportan nutrientes esenciales para el crecimiento, la dextrosa es el carbohidrato fermentable y provee de carbono y energía, el indicador bismuto sulfito y el verde brillante son inhibidores de bacterias gram positivas y de algunas bacterias del grupo coliformes, el sulfato ferroso se incluye para la producción de H₂S y el hierro es precipitado dando colonias positivas características de color marrón a negro con brillo metálico. Las colonias típicas de *Salmonella Spp.* pueden ser café, gris o negras con o sin brillo metálico, generalmente el medio circundante (halo) es café que posteriormente se torna negro; algunas cepas producen colonias verdes sin la formación del halo oscuro.⁷²

Contiene:

- ✧ Peptona
- ✧ Extracto de carne
- ✧ Glucosa
- ✧ Sulfato de hierro
- ✧ Fosfato disódico
- ✧ Sulfato de bismuto
- ✧ Verde brillante
- ✧ Agar – agar

Nota: el pH del medio aproximadamente es 7.6

O. Xilosa Lisina Tergitol XLT4

XLT4 Agar es un medio de aislamiento diferencial selectivo para la detección específica de *Salmonella* spp. de muestras ambientales, de alimentos. *Principio:* Digestivo enzimático de tejido animal, fuente de complejos compuestos de nitrógeno en XLT4, el extracto de levadura se añade como una fuente de vitaminas y cofactores. La diferenciación de *Salmonella* de otros organismos que también crecen en este medio se basa en la fermentación de Xilosa, Lactosa y Sacarosa, descarboxilasa de Lisina y la producción de sulfuro de hidrógeno, la producción de sulfuro de hidrógeno se detecta mediante la adición de iones férricos añadiendo tiosulfato sódico como fuente de azufre inorgánico, el Cloruro de Sodio mantiene el equilibrio osmótico del medio, el rojo de fenol se añade como un indicador de los cambios de pH, que resultan de las reacciones de fermentación y descarboxilación, el agar es el agente solidificante, el suplemento XLT4 se añade para inhibir el crecimiento de organismos que no son *salmonella*.⁷³

Contiene:

- * Recuento enzimático de tejido animal
- * Xilosa
- * L-lisina
- * Lactosa
- * Sacarosa
- * Cloruro de sodio
- * Extracto de levadura
- * Rojo de fenol
- * Citrato de amonio férrico
- * Tiosulfato de sodio

✧ Agar

Nota: el pH del medio aproximadamente es 7.4

P. Salmonella-Shigella (SS)

Medio indefinido, diferencial y selectivo usado originalmente para el aislamiento de *Salmonella* y muchas especies de *Shigella*. *Principio:* Contiene sales biliares y colorante verde brillante que actúan como agentes selectivos contra gram-positivos y gram-negativos. La lactosa se une como carbohidrato fermentable y el tiosulfato de sodio proporciona una fuente de azufre reducible, el rojo neutro es el indicador de pH y el citrato férrico reacciona con H₂S para formar un precipitado negro, lo que indica una reducción del azufre, los fermentadores de lactosa producirán colonias rojizas a medida que el rojo neutro cambia de incoloro a rojo en el pH bajo. Las especies *Salmonella* y *Shigella* tienen su color natural debido a su incapacidad para fermentar la lactosa. Las especies de *Salmonella* y *Proteus* reducen típicamente el azufre, que está indicado por colonias con centros negros.⁶⁷

Contiene:

- ✧ Extracto de carne
- ✧ Peptona
- ✧ Lactosa
- ✧ Sales biliares
- ✧ Citrato sódico
- ✧ Tiosulfato sódico
- ✧ Citrato férrico
- ✧ Verde brillante
- ✧ Rojo neutro

- ✧ Agar – agar

Nota: el pH del medio aproximadamente es 7.0

2.2.9.1 Confirmación bioquímica

Agar hierro tres azúcares (TSI)

Usado para la identificación de enterobacterias. *Principio:* La fermentación de azúcares en el medio (glucosa, lactosa y sacarosa) produce una acidificación que hace que pase de rojo a amarillo. Las bacterias que fermentan glucosa se detectan por su color inicial en la parte superior del tubo, la producción de ácido sulfhídrico se observa por la presencia de deposiciones negras de sulfuro de hierro en el fondo del tubo producidas por la reacción del tiosulfato en presencia del citrato férrico. Asimismo, la producción de gas en la fermentación se detecta por divisar burbujas o la rotura del agar. ⁷⁴

Contiene:

- ✧ Peptona
- ✧ Extracto de levadura
- ✧ Lactosa
- ✧ Sacarosa
- ✧ Dextrosa
- ✧ Cloruro de sodio
- ✧ Sulfato férrico – amónico
- ✧ Tiosulfato sódico
- ✧ Rojo fenol
- ✧ Agar – agar

Nota: el pH del medio aproximadamente es 7.4

Agar lisina hierro (LIA)

El agar hierro lisina es un medio útil de detección, porque la mayoría de los aislamientos de *Salmonella* descarboxila lisina y producen H₂S, mientras la producción de gas varía por serotipo. *Principio:* En el agar, las cepas de *Salmonella* dan una reacción alcalina típica (púrpura) en la cuña y el tope, y puede producir gas y H₂S (ennegreciendo el medio). Cuando la reacción en el tope del tubo es alcalina, la lisina descarboxila y el aislamiento se denomina “positivo a lisina”. A diferencia de la mayoría de otras *Salmonella*, los aislamientos de *S. Paratyphi* A son negativos a lisina y aparecen amarillos en agar hierro lisina. Si se sospecha que hay infección por *S. Typhi* y se necesita hacer un diagnóstico rápido para identificar el tratamiento apropiado, se deben investigar los aislamientos sospechosos con antisueros antes de hacer la identificación bioquímica.⁷⁵

Contiene:

- ✧ Peptona
- ✧ Extracto de levadura
- ✧ Glucosa
- ✧ L-lisina
- ✧ Citrato férrico amónico
- ✧ Tiosulfato de sodio
- ✧ Purpura de bromocresol
- ✧ Agar- agar

Nota: el pH del medio aproximadamente es 6.7

Citrato de Simmons

Determina si un organismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono para el metabolismo, provocando alcalinidad. *Principio:* el metabolismo del citrato comprende una condensación de acetilo con la coenzima A oxalacetato para entrar en el ciclo de Krebs.⁷⁶

Contenido:

- * Sulfato magnésico
- * Fosfato mono amónico
- * Fosfato bipotásico
- * Citrato sódico
- * Cloruro sódico
- * Azul de bromotimol
- * Agar – agar

Nota: el pH del medio es aproximadamente 6.8

Sulfhídrico Indol Movilidad (SIM)

Medio diferencial para la determinación de motilidad y producción de SH₂ e indol. *Principio:* Medio desarrollado inicialmente para distinguir las distintas especies, medio semisólido con lo cual los microorganismos móviles se pueden desplazar libremente. Al mismo tiempo, la riqueza de aminoácidos azufrados y la presencia de tiosulfato en cantidad suficiente permite que los organismos capaces, produzcan abundante sulfhídrico que se pone de manifiesto al reaccionar con el hierro y producir precipitados negros que oscurecen el medio.

La cantidad de tiosulfato presente nunca llega a inhibir los mecanismos de motilidad, pero en cambio asegura la producción del

SH₂ en aquellos gérmenes que no son capaces de hacerlo a partir de la cistina o cisteína. Este medio permite que el triptófano de las peptonas produzca abundante indol, se detecta con el reactivo de Kovacs directamente o con previa extracción e incluso con tiras de papel impregnado de reactivo. Estas tres características son básicas entre las enterobacterias y a partir de ellas se puede pasar a medios más diferenciales o selectivos.⁶⁷

Contiene:

- * Peptona de caseína
- * Peptona de carne
- * Sulfato férrico- amónico
- * Tiosulfato sódico
- * Agar – Agar

Nota: el pH del medio es aproximadamente 7.3

UREA (Medio Christensen)

Medio usado para diferenciar microorganismos en base a la actividad ureásica. Identifica bacterias que hidrolizan urea, tales como *Proteus* spp., estafilococos y otras enterobacterias. *Principio:* en este medio la tripteina y la glucosa, aportan los nutrientes para el desarrollo de los microorganismos. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el rojo de fenol es el indicador de pH, el agar es el agente solidificante. Las bacterias hidrolizan la urea por medio de la enzima ureasa liberan amoniaco y dióxido de carbono. Estos productos

alcalinizan el medio de cultivo haciendo viral el indicador rojo de fenol del color amarillo a rojo. ⁷⁷

Contiene:

- * Tripteina
- * Glucosa
- * Cloruro de sodio
- * Fosfato Monopotásico
- * Agar - agar
- * Rojo de fenol.

Nota: el pH final aproximadamente 6.8

2.2.9.2 Confirmación serológica y Serotipificación

Los métodos de tipificación ayudan a identificar cepas no relacionadas entre sí y en conjunto con estudios epidemiológicos ya que se ha reconocido su utilidad en los programas de vigilancia, asimismo se determina las fuentes y rutas de infección. Entre los métodos de tipificación se encuentra la Serotipificación, la cual enfrenta la cepa en estudio con sueros que contienen anticuerpos que reconocen antígenos característicos; en el caso de *Salmonella* se basa en la caracterización de sus antígenos somáticos. (O) y flagelar (H) y capsulares o de superficie (Vi) mediante reacciones con antisueros específicos.^{78, 79}

La Serotipificación es el paso inicial para el diagnóstico de rutina de las cepas de *Salmonella* y se realiza con antisueros polivalentes y monovalentes disponibles comercialmente. Hasta la fecha, se han identificado y clasificado más de 2500 serotipos de *Salmonella* en el esquema de Kaufmann-White. Este esquema diferencia entre antígenos O (somáticos) de la superficie celular, antígenos H1 y H2

(flagelares) de la fase 1 o fase 2, respectivamente y los antígenos Vi (capsulares) sin embargo, solo puede estar presente en muy pocos serotipos, como Typhi, Paratyphi C o Dublín. Cada serogrupo de *Salmonella* tiene un antígeno O específico del grupo, dentro de cada grupo O, diferentes serotipos se distinguen por la combinación de antígenos O y H que están presentes, cada serotipo tiene una fórmula antigénica específica donde los antígenos O están indicados por números arábigos, los antígenos H1 por letras minúsculas y los antígenos H2 nuevamente por números arábigos.

En estas fórmulas, los antígenos subrayados solo pueden expresarse una vez que el cultivo realice su conversión lisogénica mediante el fago convertidor correspondiente, mientras que las letras o números entre paréntesis indican antígenos que pueden estar presentes o ausentes sin relación con la conversión del fago. Para la mayoría de los aislados asignados a *Salmonella enterica* y la subespecie I, la fórmula antigénica corresponde a un nombre de serotipo. En contraste, los serotipos identificados después de 1996 en las subespecies salamae, houtenae e indica y en la subespecie bongori se designan solo por fórmula antigénica.⁶⁶

1. Antígeno somáticos o antígenos O

Están compuestos por complejos de fosfolípidos y polisacáridos; su composición es aproximadamente: 60% polisacáridos, 20-30% lípidos y 3,5-4% hexosamina. Son cadenas laterales de polisacáridos del lipopolisacárido de envoltura (LPS) que se encuentra en todos los microorganismos gram-negativos. La cadena de polisacáridos del Ag O es un polímero de unidades

repetidas de oligosacáridos (de 3 a 5 azúcares) lineales o ramificados. La naturaleza de los grupos terminales y el orden en que se encuentran las unidades repetidas de la cadena determina la especificidad antigénica somática de la bacteria. Como esta estructura difiere ampliamente entre las distintas serovariedades, hay diferencias en la especificidad antigénica. Estos antígenos son termoestables y resistentes a ácidos diluidos y alcohol. La estructura somática se denomina con la letra O seguida de dos puntos y luego de números arábigos separados por comas, por ej. *S. Typhimurium* O: 1, 4, 5,12; *S. Enteritidis* O: 1, 9,12.

Se clasifican de la siguiente manera:

1) Factores mayores, que identifican el grupo antigénico O; por ej., el factor O: 4, el factor O: 9

2) Factores menores, que pueden ser:

- a. Los que tienen poco o ningún valor discriminativo porque siempre están asociados a otro factor; por ej., O:12 que siempre está asociado con O:2, O:4 y O:9, como se presenta en *S. Paratyphi A* O: 1,2,12; *S. Typhimurium* O: 1,4,5,12 y *S. Enteritidis* O: 1,9,12.
- b. Surgen como consecuencia de una modificación química de los antígenos mayores; por ej., O: 5 resulta de la acetilación de la abeciosa presente en las unidades repetidas del polisacárido responsable de la especificidad O: 4,12; O: 1 resulta de la inserción de un residuo de glucosa en la galactosa de la cadena de polisacárido, como es el caso de la serovariedad *S. Typhimurium* O: 1, 4, 5,12^{80,81}

2. Antígeno Flagelar o antígeno H

Los antígenos flagelares son proteicos y termolábiles. Correspondiente a la flagelina, proteína estructural de los flagelos. La mayor parte de los serotipos de *salmonella* alteran dos formas distintas de flagelina denominadas fases, por lo que consideran bifásicos. Sin embargo, algunas serovariedades solo producen un único tipo de antígeno H siendo monofásicos e incluso inmóviles. ⁸²

3. Antígeno capsular o antígeno Vi

El antígeno capsular es un polisacárido, constituido por ácido N-acetilglucosaminourónico. Entre los antígenos capsulares de las Enterobacterias, el Vi es el más importante en el género *Salmonella*. Se encuentra en sólo tres serovariedades: S. Typhi, S. Paratyphi C y en algunas cepas de S. Dublín. En su descripción original, Felix y Pitt introdujeron el término antígeno Vi (virulencia) porque las cepas de Typhi serotipo no encapsuladas se atenuaron en un modelo de ratón. La pérdida del antígeno Vi produce una reducción de aproximadamente 10.000 veces en la virulencia del serotipo Typhi después de la infección intraperitoneal de ratones tratados con mucina. Dado que el modelo de ratón tratado con mucina no es una imitación cercana de la fiebre tifoidea, los estudios voluntarios han sido esenciales para establecer el papel del antígeno Vi durante la patogénesis. ⁸³

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):

La reacción de PCR, es una técnica in vitro que tiene la capacidad del ADN polimerasa que copia una cadena de ADN. Un fragmento específico de ADN se amplifica debido al uso de dos oligonucleótidos sintéticos (iniciadores), normalmente de entre 20 y 30 nucleótidos, cuyas secuencias coinciden con los extremos del fragmento de interés. El ADN se amplifica mediante un proceso cíclico que consta de tres pasos: primero el ADN molde de doble cadena es desnaturalizado a altas temperaturas convirtiéndolo en ADN de cadena sencilla. Luego, los dos oligonucleótidos sintéticos se anillan en hebras opuestas del ADN a una temperatura que solo permite la hibridación con la diana correcta. Por último, se sintetiza una nueva hebra de ADN utilizando los oligonucleótidos como iniciadores para la ADN polimerasa y usando el ADN diana como molde. Así se genera otra vez ADN de doble cadena.

En los próximos ciclos los iniciadores se unirán tanto al ADN original como a la nueva síntesis, por lo que el número de copias del fragmento comprendido entre los dos iniciadores aumentará de forma exponencial. Habiendo una única copia de ADN molde en la mezcla de reacción de PCR, en unas horas se pueden generar millones de copias. Aunque mediante PCR se pueden detectar los ácidos nucleicos de un único organismo, el volumen de 1-10 µl de muestra que se utiliza en la reacción acorta el límite de detección a 10³ células/ml. Normalmente los patógenos alimentarios están presentes en los alimentos a concentraciones muy bajas, por lo tanto, la detección directa es prácticamente imposible.

Por eso, se realizan grandes esfuerzos en intentar desarrollar métodos de extracción capaces de concentrar los microorganismos diana, de separarlos de la matriz alimentaria y solucionar posibles

inhibiciones de la reacción de PCR causadas por sustancias presentes en los alimentos. ⁸⁴

2.2.9.3 Otros métodos de detección rápida

El sistema 3M petrifilm *Salmonella* express, es comúnmente utilizado en la industria de alimentos. El aislamiento e identificación de *Salmonella spp.* se realiza mediante métodos de cultivo tradicionales y consiste en una serie de etapas que requiere excesivo trabajo y puede ocasionar una gran incertidumbre respecto a los resultados obtenidos (3M Petrifilm 2013).

El sistema 3M Petrifilm Salmonella Express System (SALX) es utilizado como prueba cualitativa para la rápida detección y confirmación bioquímica de *Salmonella spp.*, en alimentos reemplazando la metodología tradicional; es un medio cromogénico listo para el análisis que contiene un agente gelificante soluble en agua fría; compuesto por el 3M™ Enriquecimiento Base para Salmonella (Mezcla de nutrientes, mezcla selectiva).

Además, el sistema 3M™ Suplemento para Enriquecimiento de Salmonella (Agentes selectivos), Medio Rappaport Vassiliadis (Cloruro de magnesio, cloruro de sodio, caseína peptona, fosfato de monopotasio, verde malaquita, agua desmineralizada), la Placa 3M™ Petrifilm™ Salmonella Express (bilis rojo violeta y un agente gelificante soluble en agua fría) y el Disco de Confirmación 3M™ Petrifilm™ Salmonella Express (Citrato, TSI, Urea, Fenilalanina, lisina, arginina y ornitina). ⁸⁵

Sistema API 20 E

Los sistemas API son pruebas bioquímicas simplificadas para la identificación de bacterias y se han diseñado diferentes kits comerciales para varios grupos de bacterias como: enterobacterias, lactobacilos y anaerobios. Las pruebas individuales consisten en sustancias químicas deshidratadas en un conjunto de cápsulas de plástico (moldeadas en una tira de plástico) que se inoculan con una suspensión bacteriana. El kit API 20E se ha adaptado para la identificación de bacterias Gram negativas distintas de las enterobacterias para las que se diseñó originalmente.⁸⁶

Muchos de los evaluadores de nuevos sistemas de identificación compararon esos sistemas con la API 20E. Las evaluaciones originales de API 20E informaron tasas de precisión de 88.4% (13) y 94.6% (11) a las 24 horas con una base de datos de 11 géneros y 17 especies. No se han realizado cambios en la selección de pruebas bioquímicas incluidas en la franja 20E durante los últimos 19 años, pero la base de datos en el Índice de perfil analítico se ha ampliado y actualizado muchas veces y ahora incluye 19 géneros y 64 especies. Encontrándose también en una base de datos asistida por computadora.

Evaluamos la API 20E frente a pruebas bioquímicas convencionales para determinar si la precisión de la API 20E para la identificación de cepas de enterobacteriáceas sigue siendo comparable a la informada hace 19 años o si las expansiones de la base de datos han resultado en una disminución de la precisión.⁸⁷

CHROMagar

Medio cromogénico para el aislamiento de especies de *Salmonella*, incluidas *S. typhi* y *Salmonella* lactosa positiva. Este medio cumple la norma ISO 6579: 2002. Mediante la detección de *Salmonella* lactosa positiva en color malva intenso. Principios: En el CHROMagar *Salmonella*, ciertas peptonas seleccionadas suministran los nutrientes. Los organismos gram negativos suelen verse inhibidos a consecuencia de la base selectiva del medio.

La adición de un agente antifúngico impide el crecimiento de especies de *Cándida* y se utilizan otros agentes antimicrobianos para inhibir el crecimiento de bacterias gram negativas no fermentadoras de glucosa y especies de *Proteus*, que podrían superar en crecimiento a las colonias de *Salmonella*. Se incluye una mezcla cromógena en el medio, debido a diferencias metabólicas en presencia de ciertos cromógenos, las colonias de especies de *Salmonella* presentan un color malva (rosado a morado), mientras que las bacterias no deseadas se ven inhibidas o producen colonias verdes azuladas o incoloras. ^{88,89}

2.3 Definición operacional de términos^{90,91,92,93,94}

Salmonella: Son bacterias gram negativas aeróbicas facultativas, habita en el intestino de los animales y aguas residuales.

Salmonelosis: Es una enfermedad gastrointestinal debida a una infección de Salmonella transmitida por alimentos.

Intoxicación alimentaria: Es la enfermedad que resulta de la ingestión de alimentos que contienen toxinas generadas por microorganismos. La enfermedad es debida a la ingestión y acción de la toxina activa.

Ovoproductos: Son derivados del huevo, tras su procesado para eliminar cualquier riesgo sanitario, alargar la vida útil y/o facilitar el manejo del huevo en industrias alimentarias. Puede ser huevo entero o clara y yema. Evita la manipulación de cáscaras y adaptan su composición y características funcionales a las necesidades de los usuarios.

Bacterias aerobias mesófitas: Bacteria que descompone la materia orgánica a temperaturas que oscilan entre 30 y 40 C.

Pienso: (Alimento para animales) todo material simple o compuesto, ya sea elaborado, semielaborado o sin elaborar, que se emplea directamente en la alimentación de animales destinados al consumo humano.

Actividad del agua (a_w): Es la cantidad de agua libre que está disponible en los alimentos para el crecimiento microbiano.

2.4 Hipótesis

El método de cultivo horizontal ISO 6579:2002 frente al FDA-BAM tuvieron un alto rendimiento diagnóstico para el aislamiento de *Salmonella spp.* en ovoproductos.

2.5 Variables e indicadores

Variable	Indicador	Tipo	Escala de medición	Valores
Método de cultivo horizontal ISO 6579: 2002 (V. Dependiente)	Aislamiento de colonias. Unidad Formadora de Colonia (UFC)	Numérica	Discontinua	<p>Aislamiento positivo:</p> <p><i>Salmonella</i> >1 UFC</p> <p>Aislamiento negativo:</p> <p><i>Salmonella</i> < 1 UFC</p>
Método de cultivo FDA-BAM (V. independiente)	Aislamiento de colonias. Unidad Formadora de Colonia (UFC)	Categoría	Nominal	<p>ISO: Pre-enriquecimiento Enriquecimiento selectivo Aislamiento e identificación Confirmación bioquímica y serológica.</p> <p>FDA: Pre-enriquecimiento Enriquecimiento selectivo Aislamiento e identificación Confirmación bioquímica y serológica.</p>

CAPÍTULO III: DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. Tipo de investigación

Para el desarrollo de este estudio se empleó el tipo de investigación descriptiva, transversal, prospectiva. El enfoque de investigación fue cuantitativo.

3.2. Ámbito de Investigación

El ámbito de investigación está referido a las Ciencias de la Salud y Microbiología Alimentaria ligado a las prioridades de seguridad alimentaria, toxico-infección y sanidad.

3.3. Población y muestra

Para la presente investigación solo se incluirán huevos de gallina evaluados en la huevera Negociaciones VADIS S.A. (Lima, Perú), respetando los siguientes criterios de exclusión e inclusión establecidos previamente:

3.3.1. Población

Se analizaron todos los huevos referidos a la Huevera Negociaciones VADIS S.A. (Cercado de Lima, Perú) para su análisis y comercialización. Todos estos fueron incluidos en el procesamiento semiautomatizado para la obtención de ovoproductos en tres etapas: 1) Etapa de recepción y evaluación macroscópica de los huevos, 2) Lavado simple de huevos, y 3) procesamiento automatizado de rompimiento y distribución de ovoproductos en diferentes sistemas.

3.3.2. Muestra

La muestra fue constituida por todas las muestras referidas para análisis microbiológico de cada ovoproducto. Para establecer el tamaño muestral se calculó usando EPIDAT 4.1 (Xunta de Galicia, España) considerando una sensibilidad de 95%, una heterogeneidad de 50% y un margen de error de 0,05 obteniéndose un tamaño muestral de 384 muestras de huevos referidos para su análisis microbiológico de *Salmonella* con los métodos ISO 6579:2002 y FDA/BAM, durante el periodo de setiembre del 2016 a octubre del 2017.

Se analizaron un total de 1 130 580 huevos procesados durante las 15 semanas de estudio con un tamaño muestral de 384 muestras de ovoproductos como mínimo respetando los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de inclusión

- Huevos adecuadamente conservados (Anexo 4).
- Ovoproductos almacenados por menos de 24 horas.
- Ovoproductos derivados con código de seguimiento de Lote.

Criterios de exclusión

- Huevos rotos, quebrados o evidentemente contaminados.
- Huevos que no tengan el peso y tamaño adecuado.
- Huevos que contengan en su interior un embrión.

Cultivo microbiológico

Medios de cultivo

Los protocolos de preparación de los medios de cultivo utilizados en cada etapa se describieron como material suplementario (Anexo 5).

Fase de enriquecimiento: se utilizó la mezcla de caldo infusión cerebro-corazón – BHI (Merck, Darmstadt, Alemania) con agar peptona (Oxoid, Hampshire, England) para 225 ml y caldo lactosado (Merck, Darmstadt, Alemania).

Fase de enriquecimiento selectivo: se utilizó caldo Rappaport-Vassiliadis con Caldo Tetrionato según Mueller-Kaufman (Oxoid, Hampshire, England) en proporción de 4,5 gr cada uno. Además, caldo selenito-cistina (Merck, Darmstadt, Alemania). Todas las fases de enriquecimiento se llevaron a cabo en tubos de vidrio de 28×200mm (Pyrex, Massachusetts, USA).

Fase de aislamiento e identificación: se realizó sobre Agar XLD (Oxoid, Hampshire, England), agar verde brillante (BD, Heidelberg, Germany) y Agar *Salmonella-Siguella* - SS (Britania, Caba, Argentina).

Fase de diferenciación bioquímica: se utilizó agar TSI, LIA, SIM, Citrato y Urea (Oxoid, Hampshire, England). La prueba de indo se realizó sobre medio sim con tiras embebidas en reactivo de Kovocac's (Merck, Darmstadt,

Alemania). Todas las fases de diferenciación bioquímica llevaron a cabo en tubos de vidrio de 13×100mm (Pyrex, Massachusetts, USA).

3.4 Procesamiento de cultivo

Todas las etapas del procesamiento de cultivo se realizaron en conformidad con los protocolos de trabajo para el aislamiento microbiológico de *Salmonella* en los métodos ISO 6579:2002 y FDA/BAM descritos con anterioridad (**Anexo 2 y 3**).^{13,14,37,38}

Se confirmó la presencia de *Salmonella* con pruebas serológicas y moleculares como se han realizado en estudios anteriores²⁸, (Grafico 4)

Fase de enriquecimiento: Para realizar la fase de Pre-enriquecimiento se obtuvieron las muestras de 25 ml de ovoproductos en un recipiente de plástico, el cual se procedió a inocular en la mezcla de caldo infusión cerebro-corazón BHI con agar peptona para 225 ml, del mismo modo en caldo lactosado. Los inóculos se incubaron por 24 horas a 37°C.

Fase de enriquecimiento selectivo: Para realizar la fase de enriquecimiento selectivo se utilizaron tanto caldo Rappaport-Vassiliadis con caldo tetrionato según Muller-Kauffmann proporción de 4,5 gr cada uno, y caldo selenito-cistina donde se inocularon las muestras procedentes del enriquecimiento. Se incubo a 37°C por 24 horas.

Fase de aislamiento: La fase de aislamiento se realizó sobre agar XLD, agar verde brillante y agar *Salmonella-Shigella* (SS). En estos medios de cultivo se sembró por el método de estría completa y Dowell con un asa de siembre tipo Khole de 100 µL. Las placas se incubaron por 24 horas a 37±2°C. La lectura se desarrolló de acuerdo con las características morfológicas de las

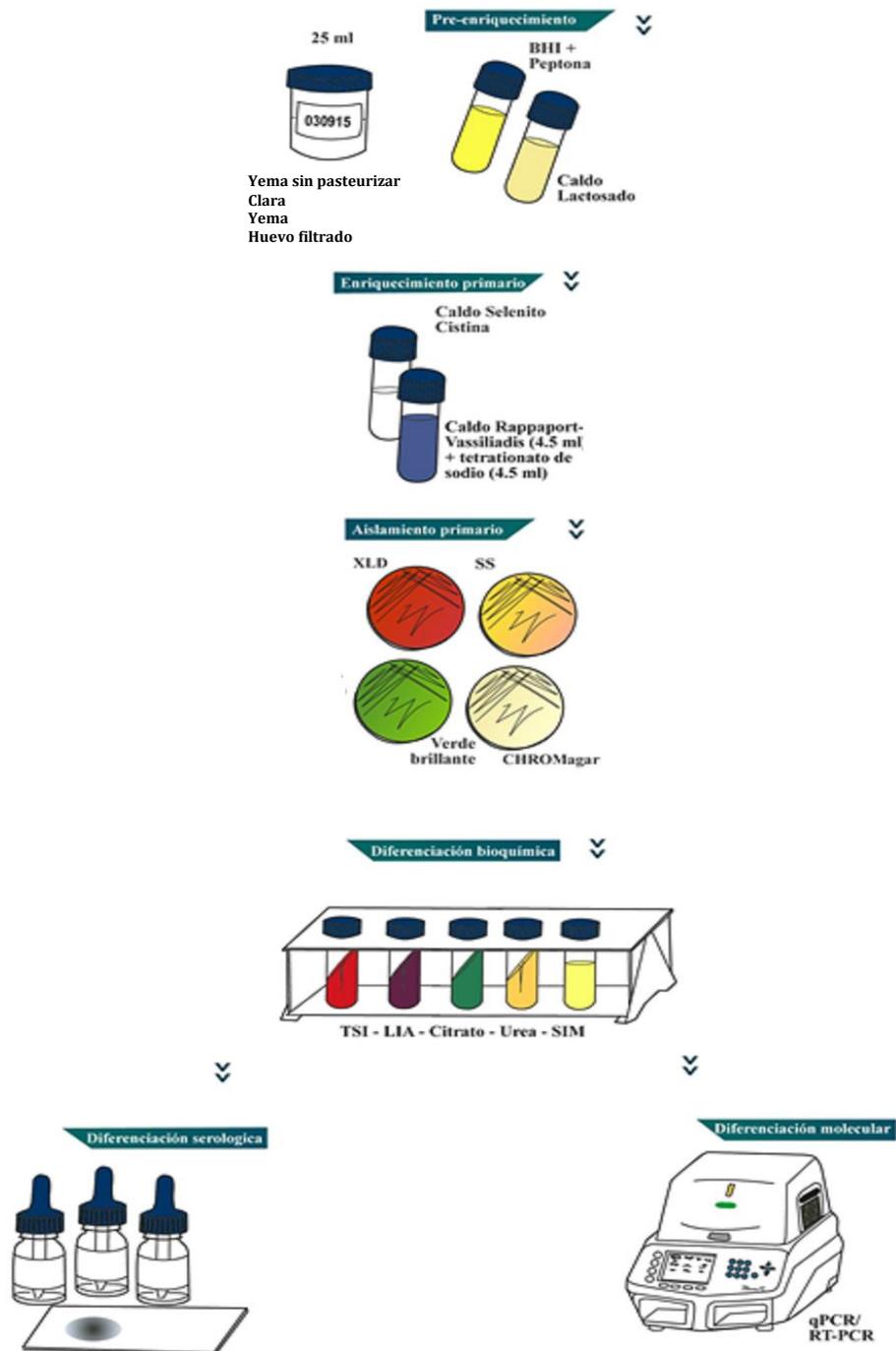
colonias, considerándose positivos las colonias sospechosas para *Salmonella*.

Fase de diferenciación bioquímica: Para la diferenciación bioquímica se empleó la batería de determinación convencional: agar *Triple Sugar Iron* (TSI), agar Lisina (LIA), Agar SIM, agar Citrato de Simmons y agar Urea.¹ Se inocularon las cepas sospechosas de *Salmonellade* acuerdo con las características de cada medio semisólido y sólido, se incluyó la prueba de índole el medio SIM. Se incubaron por 24 horas a 37°C. Se consideran positivos para *Salmonella spp* la que manifestaron el siguiente resultado: *Todos en escala semicuantitativa* TSI:K/A (+, ++, +++); LIA: K/K o K/A (++, +++); SIM: (+, V, +); Citrato: (+/-); y Urea: (+/-) (Anexo 6).

3.4.1. Determinación molecular

Se realizó el control externo periódico de lote mediante Reacción de Cadena de Polimerasa (PCR) en un laboratorio externo de referencia SGS Consultores. Se realizó la determinación e identificación de *Salmonella* en muestras de huevo por PCR en tiempo real conforme el método de Seo *et al.*, (2004) descrito con anterioridad.⁹⁵

Gráfico 4. Flujo de trabajo para el aislamiento e identificación de *Salmonella* en ovoproductos.



3.4.2. Control de calidad

Para asegurar la calidad del estudio se utilizó como control interno de calidad la cepa ATCC 19430 *Salmonella entérica subsp. enterica serovar* (American Type Culture Collection, USA) la cual fue analizada simultáneamente con cada lote procesado (Anexo 6).

El control de calidad externo de los métodos bacteriológicos convencionales fue el análisis molecular de *Salmonella* en los ovoproductos, con estos procesos se aseguraron los resultados y la calidad de los análisis microbiológicos.

3.5 Procesamiento y análisis de datos

El análisis de datos se realizó en tres procesos básicos: codificación, tabulación y construcción de tablas y gráficos. La técnica que se utilizará para la verificación estadística de los resultados fue mediante el analizador estadístico IBM SPSS versión 20.0 (Armonk, USA) y MS-Excel. Se considerará valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. Se utilizará estadística descriptiva y análisis de concordancia diagnóstica Kappa Cohen, pruebas diagnósticas (sensibilidad, especificidad, etc.)

3.6 Aspectos éticos

La investigadora desarrollo este estudio en cumplimiento con los estándares internacionales de calidad y los lineamientos éticos de investigación. Por lo tanto, considero los datos únicamente para este estudio.

CAPÍTULO IV:

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados.

En el desarrollo del estudio se incluyeron 3140.5 jabas de huevos, cada jaba contuvo 360 huevos y el total de huevos procesados fueron 1130580 en 15 semanas de duración del estudio. El promedio de huevos fueron 75372 ± 47045 (rango:3600-222300), la semana ocho fue la semana con mayor número de huevos y la semana cuatro y nueve fueron donde se procesaron menor cantidad de huevos. Los datos adicionales se muestran en la tabla 2.

Tabla2. Número de jabas y unidades de huevos procesados durante el tiempo de estudio.

Semanas	Número de jabas*	Número de unidades
1	110	39600
2	175	63000
3	181	65160
4	100	36000
5	130	46800
6	120	43200
7	196	70560
8	617.5	222300
9	100	36000
10	225	81000
11	320	115200
12	295	106200
13	220	79200
14	180	64800
15	171	61560
Total	3140.5	1130580

*Cada jaba contiene 360 huevos.

Fuente: Primaria

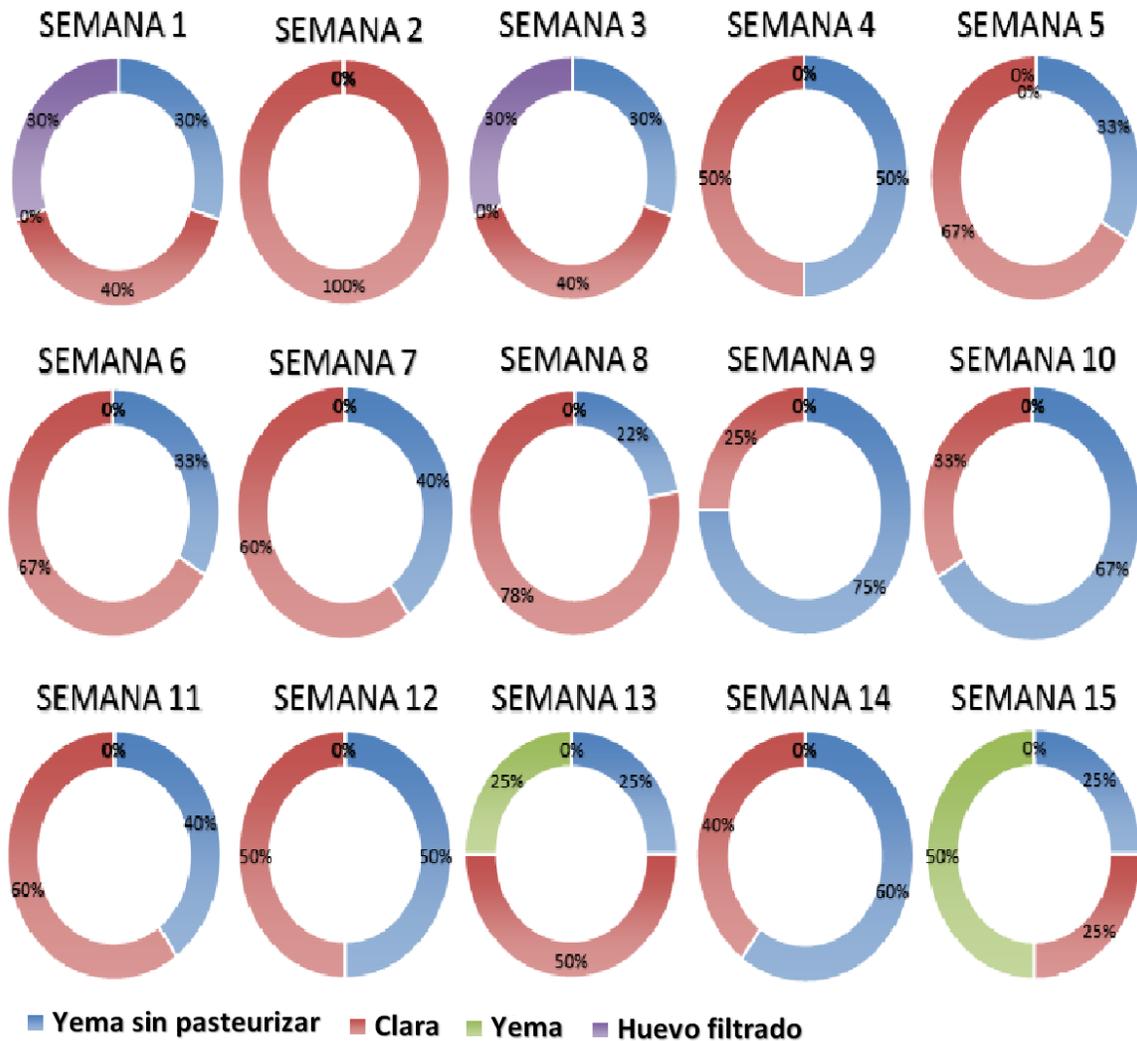
En la tabla 3, se analizaron los ovoproductos con un total de 286 bacterias aisladas, donde observamos que en la semana 3 hubo mayor aislamiento en yema sin pasteurizar, clara y huevo filtrado. Y la semana 15 hubo menores aislamientos en yema sin pasteurizar, clara y yema.

Tabla 3. Número de bacterias identificadas por semana en ovoproductos

Leyenda	Ovoproducto	SEMANAS															Total
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
1	Yema sin pasteurizar	3	0	12	8	4	4	8	8	12	16	8	12	4	12	1	112
2	Clara	4	16	16	8	8	8	12	28	4	8	12	12	8	8	1	153
3	Yema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	2	6
4	Huevo filtrado	3	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15
		10	16	40	16	12	12	20	36	16	24	20	24	16	20	4	286

Fuente: Primaria

Gráfico 5. Porcentaje total de bacterias aisladas por semana en ovoproductos en la empresa VADIS S.A.



Fuente: Tabla 4

En el gráfico 5, se observan detalladamente los porcentajes totales por semana en donde los ovoproductos con menor frecuencia fueron yema, presentes en las semanas trece y quince con un 25% y 50% cada una, además de huevo filtrado en las semanas uno y tres con 30% cada una. Al final de las quince semanas se aisló un total de 286 (100%) de bacterias.

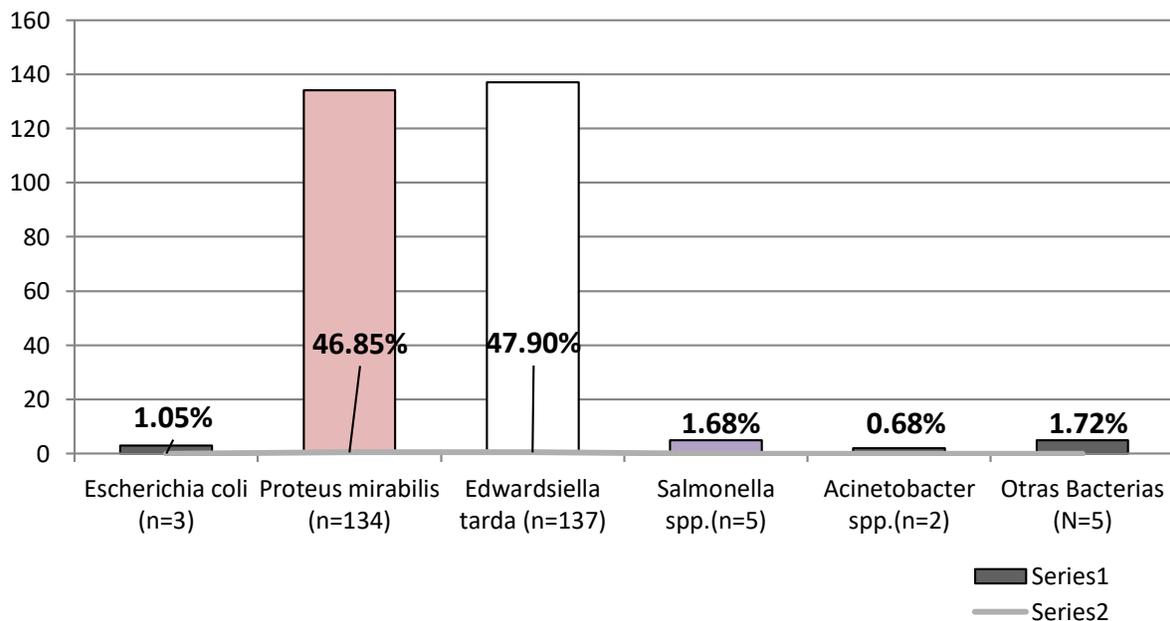
Tabla 4. Número de bacterias identificadas por semana.

LEYENDA	IDENTIFICACION	SEMANAS															Total
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
1	<i>Escherichia coli</i> (n=3)	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
2	<i>Proteus mirabilis</i> (n=134)	0	7	20	8	4	6	10	18	8	12	10	12	8	10	1	134
3	<i>Edwardsiella tarda</i> (n=137)	0	9	20	8	5	6	10	18	8	12	10	12	8	10	1	137
4	<i>Salmonella spp.</i> (n=5)	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	5
5	<i>Acinetobacter spp.</i> (n=2)	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
6	Otras Bacterias (N=5)	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
		10	16	40	16	12	12	20	36	16	24	20	24	16	20	4	286

Fuente: Primaria

En la tabla 4, observamos el número de bacterias identificadas por semana de estudio, precisando la mayor cifra de aislamientos en: *Edwardsiella tarda* con 137 y *Proteus mirabilis* con 134 además de *Salmonella spp.* con 5 identificaciones bacteriológicas respectivamente.

Gráfico 6. Porcentaje de bacterias aisladas en ovoproductos en la empresa VADIS S.A. durante el periodo de estudio.



Fuente: Primaria

En el Gráfico 6 se revisa los porcentajes de bacterias aisladas mostrando con gran predominio a *Edwardsiella tarda* con 47.9%, seguido de *Proteus mirabilis* con 46.8%, y con menor presencia a *Salmonella spp.* con 1.68%.

Se realizaron 286 aislamientos donde se identificaron las siguientes bacterias: *Escherichia coli* (1.05%), *Proteus mirabilis* (46.85%), *Edwardsiella tarda* (47.9%), *Salmonella spp.* (1.68%), *Acinetobacter spp.* (0.68%), y otras bacterias (1.72%) como *Providencia* una bacteria gram-negativa, fermentadora glucosa, no fermentadora de lactosa, móvil, y capaces de desaminar la fenilalanina; *Klebsiella pneumoniae*, bacteria inmóvil, Gram negativa, anaerobia facultativa y con una prominente cápsula de polisacáridos, y *Morganella morgani*, bacilos gram-negativos.

Tabla 5. Porcentaje de bacterias aisladas por ovoproductos durante el periodo de estudio. Datos en n (%)

	<i>E. coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>	Otras Bacterias	TOTAL
Yema sin pasteurizar	1 (0.3)	56 (19.6)	55 (19.2)	0(0)	1 (0.3)	1 (0.3)	114 (39.9)
Clara	2 (0.7)	72 (25.2)	74 (25.9)	3 (1.0)	0(0)	2 (0.7)	153 (53.5)
Yema	0(0)	0(0)	2(0.7)	2 (0.7)	0(0)	0(0)	4 (1.4)
Huevo filtrado	0(0)	6 (2.1)	6 (2.1)	0(0)	1 (0.3)	2 (0.7)	15 (5.2)
TOTAL	3 (1)	134 (46.9)	137 (47.9)	5 (1.7)	2 (0.6)	5 (1.7)	286 (100.0)

Fuente: Primaria

En la Tabla 5 se detalla el total de bacterias aislados en porcentajes durante el tiempo de estudio, donde observamos los ovoproductos como: yema sin pasteurizarse aislaron un total de 114 (39.9%) bacterias y donde se obtuvo el mayor porcentaje fue en *Proteus mirabilis* con 56 (19.6%). En clara se aislaron un total de 153 (53.5%) bacterias donde se obtuvo el mayor porcentaje fue en *Edwardsiella tarda* con 74 (25.9%), en los ovoproductos donde encontramos *Salmonella spp.*

fueron en yema con 2 (0.7%) y clara con 3 (1.0%). En huevo filtrado se aisló un total de 15 (5.2%) bacterias dando con mayor porcentaje a *Edwardsiella tarda* con 6 (2.1%) aislamientos, y a *Proteus mirabilis* con 6 (2.1%) aislamientos.

En la tabla 6 se describe el tipo de bacterias aislada por ovoproducto durante las quince semanas de estudio. Donde los ovoproductos que tuvieron mayor aislamiento de bacterias fueron yema sin pasteurizar (112 aislamientos), clara (153 aislamientos), sin embargo, los de menor aislamiento fueron yema (6 aislamientos) y huevo filtrado (15 aislamientos). De 286 aislamientos bacterianos se determinó la presencia de 5 (1.7%) cepas de *Salmonella spp.*, en yema y clara.

Tabla 6. Tipo de bacteria por ovoproducto en 15 semanas de estudio.

	Yema sin pasteurizar				Clara				Yema				Huevo Filtrado			
	<i>E. coli</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>	Otras bacterias	Total	-	<i>E. coli</i>	Otras bacterias	Total	-	-	-	Total	-	<i>Acinetobacter spp.</i>	Otras Bacterias	Total
SEMANA 1	1	1	1	3	0	2	2	4	0	0	0	0	0	1	2	3
SEMANA 2	-	-	-	0	0	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. tarda</i>	16	0	0	0	0	0	0	0	0
SEMANA 3	-	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. tarda</i>	12	-	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. tarda</i>	16	-	-	-	0	-	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. tarda</i>	12
SEMANA 4	-	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. tarda</i>	8	-	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. tarda</i>	8	-	-	-	0	-	-	-	0
SEMANA 5	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. tarda</i>	-	4	<i>Salmonella spp.</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. tarda</i>	8	-	-	-	0	-	-	-	0
SEMANA 6	-	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. tarda</i>	4	-	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. tarda</i>	8	-	-	-	0	-	-	-	0
SEMANA 7	-	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. tarda</i>	8	-	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. tarda</i>	12	-	-	-	0	-	-	-	0
SEMANA 8	-	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. tarda</i>	8	-	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. tarda</i>	28	-	-	-	0	-	-	-	0
SEMANA 9	-	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. tarda</i>	12	-	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. tarda</i>	4	-	-	-	0	-	-	-	0
SEMANA 10	-	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. Tarda</i>	16	-	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. tarda</i>	8	-	-	-	0	-	-	-	0
SEMANA 11	0	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. tarda</i>	8	0	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. tarda</i>	12	0	0	0	0	0	0	0	0
SEMANA 12	0	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. tarda</i>	12	0	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. tarda</i>	12	0	0	0	0	0	0	0	0
SEMANA 13	0	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. tarda</i>	4	0	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. tarda</i>	8	-	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. tarda</i>	4	-	-	-	0
SEMANA 14	0	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. tarda</i>	12	0	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. tarda</i>	8	0	0	0	0	0	0	0	0
SEMANA 15	0	0	<i>E. tarda</i>	1	-	<i>P. mirabilis</i>	-	1	-	-	<i>Salmonella spp.</i>	2	-	-	-	2
TOTAL DE BACTERIAS	112				153				6				15			

Abreviaturas: *P. mirabilis*: Proteus mirabilis, *E.coli*: Escherichia Coli, *E. Tarda*: Edwardsiella tarda.

Fuente: primaria

El rendimiento diagnóstico para la técnica ISO 6579:2002 tuvo 143 aislamientos de bacterias que coincidieron con la técnica FDA-BAM que también presentó 143 aislamientos de bacterias.

Los métodos de cultivo horizontal ISO 6579:2002 y FDA-BAM tienen alto rendimiento diagnóstico para el aislamiento de *Salmonella spp.*, en ovoproductos (Tabla 7). El método de cultivo horizontal ISO 6579:2002 presentó una sensibilidad del 100.0% (IC 95%: 34.2 a 100.0%), una especificidad del 99.3% (IC 95%: 96.2 a 99.9%), un valor predictivo positivo de 66.7 % (IC 95%: 20.8 a 93.9%), valor predictivo negativo de 100 % (IC 95%: 97.4 a 100%). Además, presentó una proporción de falsos positivos de 0.7% (IC 95%: 0.1 a 3.8), una proporción de falsos negativos de 0.0% (IC 95%: 0.0 a 65.8), y una exactitud de 99.4% (IC 95%: 96.5 a 99.9).

Tabla 7. Concordancia del método ISO 6579:2002 para la determinación de *Salmonella spp* en ovoproductos

ISO	FDA	
	Positivo	Negativo
Positivo	2	1
Negativo	0	143
Índice Kappa	0.80	IC 95% 0.40 a 1.19

Fuente: Primaria

El acuerdo global entre prueba según Coeficiente kappa de Cohen (*overall inter-test*) indica que el grado de concordancia muy buena entre la técnica ISO 6579:2002 y (*kappa* 0.80). La proporción total de concordancia observada fue de 0.99 y la proporción esperada al azar fue de 0.97.

4.2. Discusión

Este estudio se evaluó el rendimiento diagnóstico del método de cultivo horizontal ISO 6579: 2002 frente al método FDA-BAM para el aislamiento de *Salmonella spp.* en ovoproductos en la empresa VADIS S.A, demostrando que hubo un buen rendimiento y concordancia; con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 99.3 %, un valor predictivo positivo de 66.7%, valor predictivo negativo de 100%. Además, presento una proporción de falsos positivos del 0.7%, una proporción de falsos negativos de 0.0%, y una exactitud de 99.4%. Dando un valor de kappa de 0.80, con una concordancia muy buena.

Nuestros hallazgos indican una concordancia diagnóstica buena para el aislamiento de *Salmonella spp* con el método ISO 6579:2002. Estudios previos, como el de Eyigor A, *et al.*, (2010), indican un rendimiento diagnóstico muy bueno con valores del índice Kappa de 0,96 para carne de pollo, y de 1,00 para carne de pavo para el aislamiento de *Salmonella spp* mediante el método ISO6579:2002 frente al método FDA-BAM²⁸. Nuestros resultados concuerdan con este estudio, sin embargo, podría existir un sesgo en esta comparación dado que se evaluó carne de pollo y pavo, en tanto nosotros evaluamos ovoproductos, además pudieran existir diferencias en el pre procesamiento de estas muestras.

Otro estudio realizado en Turquía demostró que tuvo una buena sensibilidad (95.8%) y especificidad (100%) para carne de pollo, además de una sensibilidad y especificidad del 100% en carne de pavo para el aislamiento de *Salmonella spp* mediante el método ISO 6579:2002 frente al método FDA-BAM.²⁸. Nuestros hallazgos concuerdan con este estudio a nivel de especificidad, pero, no a nivel de sensibilidad diagnóstica, ya que nuestros hallazgos demostraron la mitad de rendimiento óptimo para el método ISO

6579:2002 (sensibilidad de 50%) y este estudio indica una mayor sensibilidad.

En el estudio de Feldsine (2003), evaluaron tres tipos de alimentos: queso fresco, huevo en polvo y carne de ave para determinar la presencia de *Salmonella* mediante los métodos The Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (AOAC) y el método ISO 6579:2002. En el queso fresco no hubo diferencias significativas entre ambos métodos para el nivel alto. En huevo en polvo, el método ISO tuvo una sensibilidad de 97.3% para el nivel bajo y 98.6% para el nivel alto, y con una especificidad del 100% para sendos niveles. Para el método AOAC se obtuvo una sensibilidad y especificidad del 100% para ambos niveles. Para carne de ave de corral naturalmente contaminado, con el método ISO tuvo una sensibilidad de 98.6% y especificidad de 100% asimismo para el método AOAC obtuvieron una sensibilidad de 53.4% y especificidad del 100% en el nivel bajo. Nuestros hallazgos coinciden con este estudio a nivel de especificidad. Sin embargo, no a nivel de sensibilidad diagnóstica, ya que nuestros resultados demostraron la mitad de rendimiento para el método ISO 6579:2002 y este estudio indica una mayor sensibilidad.⁹⁶

En el estudio de Castillo (2013), se determinó si la bacteria *Salmonella spp* está presente en huevos frescos. El resultado obtenido fue la ausencia de la bacteria *Salmonella spp* en todas las muestras analizadas, esto nos muestra que la incidencia de huevos contaminados con *Salmonella spp* fue muy baja. Sin embargo, se evidenció muestras contaminadas con otros microorganismos como *Estafilococos coagulasa positiva* y coliformes realizados con el método FDA-BAM modificado. Nuestros hallazgos discuerdan con este estudio por no haber aislado los mismos microorganismos, ya que se trabajó todo el producto en general de los ovoproductos (no solo con huevo fresco), y que no se modificó el método FDA-BAM.⁹⁷

En el estudio de Temelli (2012), se evaluó la capacidad del método bacteriológico el método de *Salmonella* de Vitek para el análisis de inmunodiagnóstico fácil (VIDAS ESLM, Biomérieux, Marcy L'Etoile, Francia) para el aislamiento de *Salmonella* y el sistema de PCR LightCycler (LCPCR) además complementando con el método ISO 6579:2002. Las tasas de detección de *Salmonella* a partir de productos de carne de aves de corral fueron de 5.8% para ISO y 8.69% para LCPCR, mientras que ninguno de estos productos dio positivo por VIDAS. Para carne de aves de corral, los resultados de detección de VIDAS y LCPCR coincidieron con ISO con una precisión de 97.2%, sensibilidad de 91.7% y especificidad de 100% para VIDAS, y 83.3, 100 y 75% respectivamente para PCR. El estudio indica que el método de ensayo inmunodiagnóstico Vitek (VIDAS ESLM) y LCPCR son métodos para complementar el método ISO 6579:2002 ya que demuestra ser eficiente para el aislamiento de *Salmonella*.⁹⁸

En el estudio de Hyeon (2012) se determinó la efectividad de dos caldos de enriquecimiento selectivo Rappaport-Vassiliadis soya (RVS) y tullitato de Muller-Kauffmann con novobiocina (MKTTn), para el aislamiento de *Salmonella* de las cascaras de pollo. Asimismo, compararon el agar cromida *Salmonella* (SM-ID 2), con agar de xilosa lisina desoxicolato (XLD). Sus resultados demuestran que la sensibilidad más alta fue la combinación de RVS-XLD con 99%, seguida de RVS-SM-ID 2 con 97%, MKTTn-XLD con 95%, y MKTTn-SM-ID 2 con 72%. La especificidad más alta se encontró en la combinación (RVS-SM-ID 2) con 89%, 59% para MKTTn-SM-ID 2, 47% para la combinación RVS-XLD, y 0% para MKTTn-XLD. Además, demostraron la sensibilidad y especificidad de los caldos de enriquecimiento selectivos usados. Si extrapolamos estos datos al presente estudio, podemos confirmar que el caldo RVS y el MKTTn son medios de enriquecimiento selectivo adecuado para las investigaciones en ovoproductos.⁹⁹

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones.

Se concluye que:

- La concordancia diagnóstica entre el método de cultivo horizontal ISO 6579:2002 frente al método FDA-BAM para la identificación de *Salmonella spp.*, en ovoproductos fue buena ($kappa$ 0.80). La proporción total de concordancia observada fue de 0.99 y la proporción esperada al azar fue de 0.97.
- El rendimiento diagnóstico presentó una sensibilidad del 100.0%, una especificidad del 99.3%, un valor predictivo positivo de 66.7%, valor predictivo negativo de 100%. para el método de cultivo horizontal ISO 6579: 2002 frente al método FDA-BAM para el aislamiento de *Salmonella spp.* en ovoproductos.

- Se realizaron 286 aislamientos donde identificaron *Escherichia coli* (1.05%), *Proteus mirabilis* (46.85%), *Edwardsiella tarda* (47.9%), *Salmonella spp.* (1.68%), *Acinetobacter spp* (0.68%), y otras bacterias (1.72%).

5.2 Recomendaciones.

El presente estudio nos permitió demostrar que la técnica ISO 6579:2002 para la identificación de *Salmonella* en ovoproductos tubo un alta rendimiento diagnostico con resultados comparables y una alta concordancia diagnostica, por lo que se recomienda su uso en los diferentes servicios a nivel de la industria alimentaria para la determinación microbiológica de infecciones por *Salmonella spp.*

El método ISO 6579: 2002 es ideal para:

- Recomendamos ampliar el estudio a otros centros de procesamiento de huevo, para poder conocer el rendimiento global de las pruebas microbiológicas para el aislamiento de *Salmonella*.
- Se debe ampliar las evaluaciones moleculares de *Salmonella en* ovoproductos, ya que los métodos bacteriológicos presentan dificultades técnicas durante su desarrollo.
- Debido a que no existen datos de estudios en el Perú, donde se hayan validado métodos para ovoproductos, se hace necesario la realización de más estudios y proyectos que contemplen la validación de métodos microbiológicos para la detección de *Salmonella spp.*

Anexos

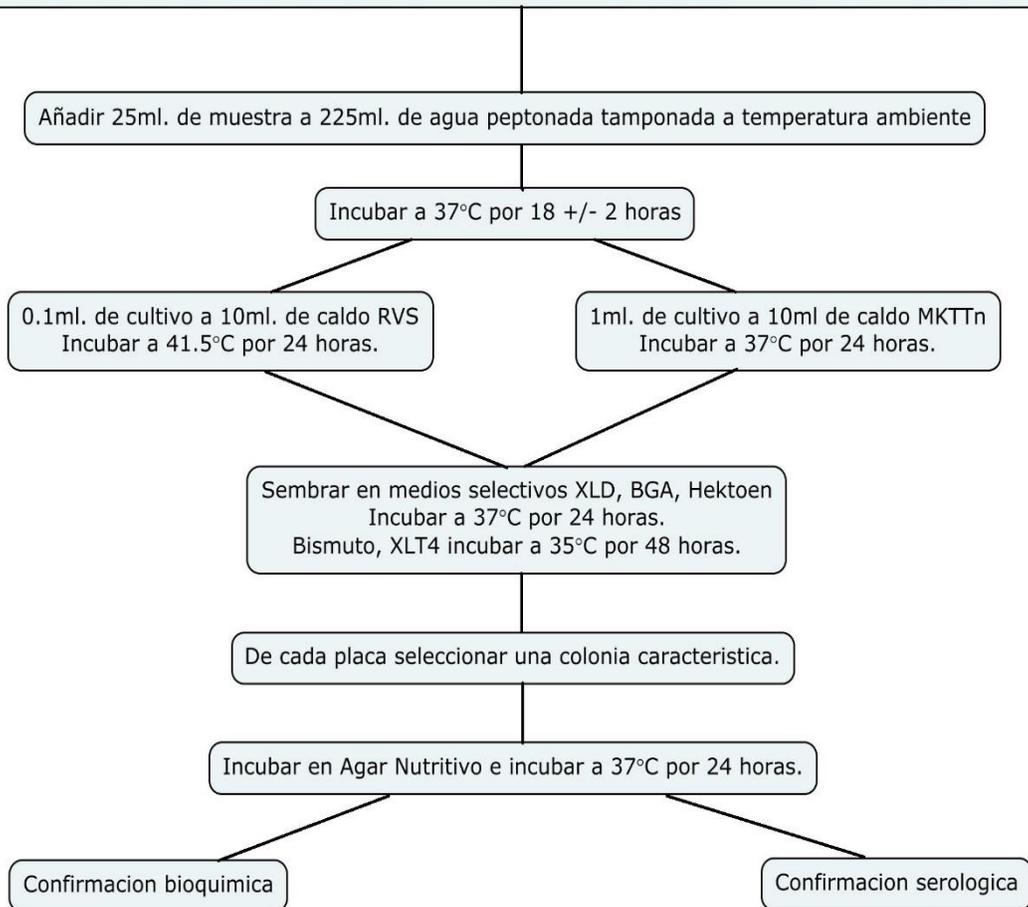
Anexo 1

Matriz de consistencia

Problema General	Objetivos	Marco Teórico	Hipótesis.	Variables e Indicadores	Metodología
<p>Principal</p> <p>¿Cuál es el rendimiento diagnóstico del método de cultivo horizontal ISO 6579:2002 frente al método FDA-BAM para el aislamiento de Salmonella spp. en ovoproductos?</p> <p>Problemas Secundarios</p> <p>a. ¿Cuál es la concordancia diagnóstica entre el método de cultivo horizontal ISO 6579:2002 frente al método FDA-BAM para la identificación de Salmonella spp. en ovoproductos?</p> <p>b. ¿Cuáles son las pruebas diagnósticas para el método de cultivo horizontal ISO 6579: 2002 frente al método FDA-BAM para el aislamiento de Salmonella spp. en ovoproductos?</p> <p>c. ¿Cuáles son las bacterias presentes en cada ovoproducto?</p>	<p>Objetivo General</p> <p>Determinar el rendimiento diagnóstico del método de cultivo horizontal ISO 6579: 2002 frente al método FDA-BAM para el aislamiento de Salmonella spp. en ovoproductos.</p> <p>Objetivos Específicos</p> <p>a. Evaluar la concordancia diagnóstica del método de cultivo horizontal ISO 6579:2002 frente al método FDA-BAM para la identificación de Salmonella spp. en ovoproductos.</p> <p>b. Evaluar las pruebas diagnósticas para el método de cultivo horizontal ISO 6579: 2002 frente al método FDA-BAM para el aislamiento de Salmonella spp. en ovoproductos.</p> <p>c. Estimar el tipo de bacteria presente en cada ovoproducto.</p>	<p>Antecedentes de la Investigación</p> <p>Alberti y Burgos (2017) compararon el desempeño de dos métodos para detectar Salmonella; Assurance GDS System y VIA TECRA, contra el método de cultivo horizontal.</p> <p>Romero QM, et al., (2015) compararon el método convencional ISO 6579-2002 con PCR Tiempo Real como prueba de Tamizaje para la detección de Salmonella spp., en 25 muestras carne molida.</p> <p>Bird P, et al., (2014) compararon el método de cultivo cualitativo cromógeno Petrifilm de 3M™ SALX y el análisis bioquímico en el aislamiento de Salmonella spp., en alimentos.</p> <p>Álvarez PH. (2013) evaluó dos métodos (método USDA con caldo RV y caldo Tetratonato en comparación con medio XLT4 y ISO 6579) para la detección de Salmonella spp en embutidos artesanales.</p> <p>No existen investigaciones donde hayan realizado estudios comparativos sobre el rendimiento diagnóstico entre los métodos de cultivo horizontal ISO 6579:2002 frente al método de cultivo FDA-BAM en ovoproductos para la identificación de Salmonella en el Perú, o estudios afines sobre esta temática, por lo cual considero, que el estudio que estoy realizando, reúne las condiciones metodológicas y temáticas suficientes para ser considerado como una investigación.</p>	<p>El método de cultivo horizontal ISO 6579:2002 frente al método FDA-BAM tiene un alto rendimiento diagnóstico para el aislamiento de Salmonella spp. en ovoproductos.</p>	<p>Para demostrar y comprobar la hipótesis anteriormente formulada, determinando las variables e indicadores que a continuación se mencionan:</p> <p>Variable 1 = Variable Dependiente: Método de cultivo horizontal ISO 6579:2002</p> <p>Indicadores: Aislamiento de colonias UFC.</p> <p>Tipo Numérica</p> <p>Escala de medición Discontinua</p> <p>Valores Aislamiento positivo: Colonia sospechosa de Salmonella >1 UFC.</p> <p>Variable 2 = Variable Independiente: Método FDA BAM</p> <p>Indicadores: Aislamiento de colonias UFC.</p> <p>Tipo Categoría</p> <p>Escala de medición Nominal</p> <p>Valores ISO: pre-enriquecimientos Enriquecimiento selectivo Aislamiento e identificación Confirmación bioquímica y serológica.</p> <p>FDA: pre-enriquecimientos Enriquecimiento selectivo Aislamiento e identificación Confirmación bioquímica y serológica.</p>	<p>Tipo de Investigación</p> <p>Por el tipo de investigación, el presente estudio reúne las condiciones metodológicas de una investigación descriptiva, transversal, prospectiva.</p> <p>Nivel de la Investigación</p> <p>De acuerdo a la naturaleza del estudio de la investigación, reúne por su nivel las características de un estudio descriptivo, transversal, prospectivo.</p> <p>Diseño de la Investigación: No Experimental</p> <p>Método de la Investigación</p> <p>lación: Huevos referidos a la Huevera Negociaciones VADIS S.A</p> <p>Muestra: La muestra está constituida por todas las muestras referidas para análisis microbiológico de cada ovoproducto. Con 286 muestras de huevos referidos para su análisis microbiológico de Salmonella con los métodos ISO 6579:2002 frente al método FDA/BAM, durante el periodo de setiembre del 2016 a octubre del 2017.</p> <p>tipo de Muestra: No probabilística por conveniencia.</p> <p>Control de calidad: Se utilizó como control la cepa ATCC 19430 Salmonella entérica subsp. enterica serovar (American Type Culture Collection, USA).</p> <p>Técnicas. - método basado en las cuatro etapas: pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo, enriquecimiento en medio líquido selectivo, aislamientos en medio selectivos y diferenciales y confirmación de colonias presuntivas aisladas.</p> <p>Instrumentos: Tubos de vidrio, incubadora, placas petri, asa de siembra de Khole.</p> <p>Análisis de datos Analizador estadístico IBM SPSS versión 20.0 y MS-Excel. Se considerará valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.</p>

Anexo 2

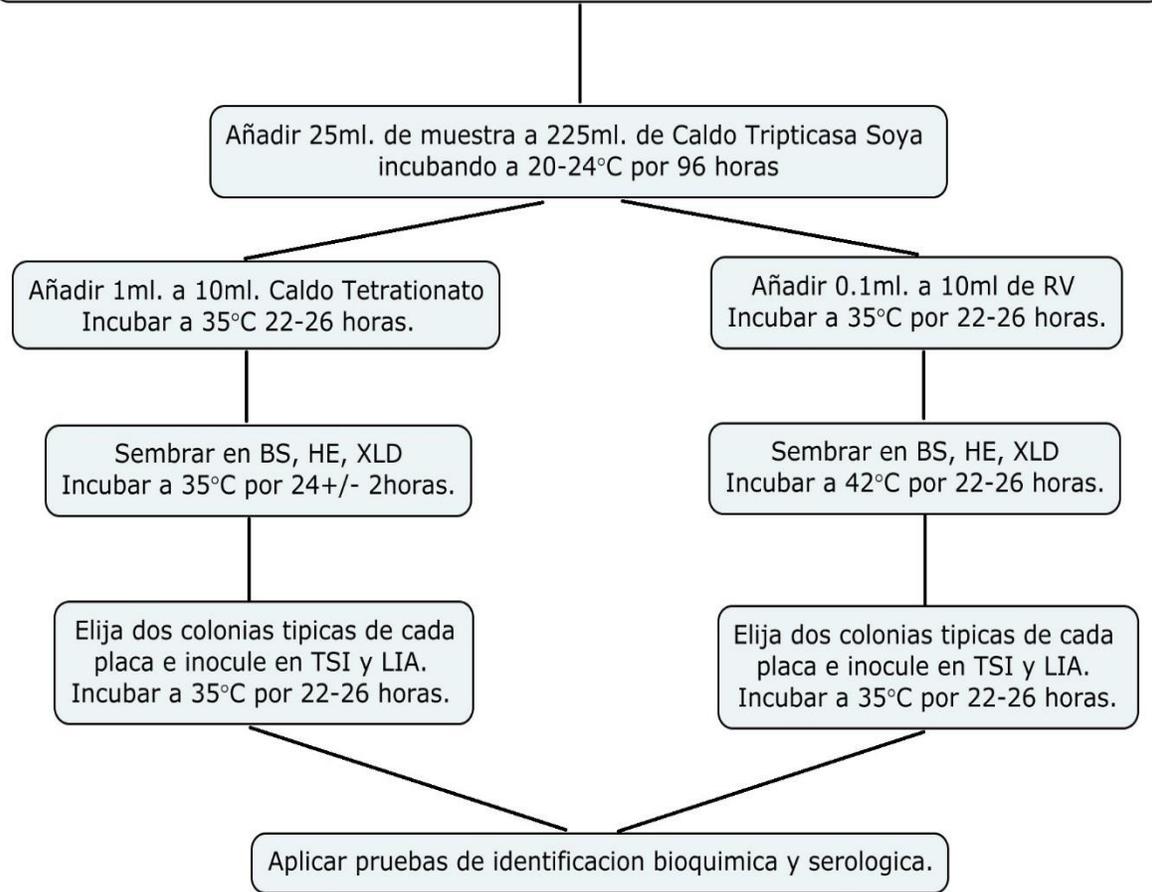
DIAGRAMA DE LA METODOLOGIA ISO 6579:2002 PARA EL AISLAMIENTO DE SALMONELLA EN HUEVOS



Caldo RVS: Rappaport-Vassiliadis con Soya.
Caldo MKTTn: Muller-Kauffman Tetrionato Novoviocina.
XLD: Xilosa Lisina Desoxicolato.
BGA: Agar Verde Brillante
XLT4: Agar Xilosa Lisisna Tergitol 4

Anexo 3

DIAGRAMA DE LA METODOLOGIA FDA-BAM PARA EL AISLAMINETO DE SALMONELLA EN HUEVOS



RV: Rappaport-Vassiliadis.
BS: Bismuto Sulfito.
HE: Hektoen.
XLD: Xilosa Lisina Desoxicolato.
TSI: Hierro Triple Azucar
LIA: Agar Lisina Hierro.

Anexo 4

	EVALUACIÓN DE PROVEEDOR DE SERVICIO DE TRANSPORTE	Cód.: CNP-EVT-F-01 Edición: 03 Revisión: 02 Página: 1 de 1
---	--	---

1. DATOS GENERALES

EMPRESA DE TRANSPORTE

REPRESENTANTE LEGAL DE LA EMPRESA _____

DIRECCION LEGAL _____

TELEFONO _____

RUC _____

EMAIL _____

PRODUCTO A TRANSPORTAR _____

2. REQUISITOS DEL VEHICULO DE TRANSPORTE

Requisitos
- El vehículo de transporte y/o espacio a utilizar para el transporte se deberá encontrar limpio y desinfectado
- El vehículo de transporte deberá contar con una cubierta plástica o parihuelas en la base de la tolva la cual deberá estar en buen estado.
- La tolvera y/o cubierta del espacio a utilizar para el transporte se deberá encontrar en buen estado.
- No se transportaran productos tóxicos y otros que puedan ocasionar la contaminación de los productos a transportar
ACEPTACION FINAL

JAC

Transportista

Anexo 5

ADAC	<h2>Triple Sugar Iron Agar</h2> <p>TSI-Agar</p> <p>Culture medium proposed by SULKIN and WILLETT (1940) and modified by HAJNA (1945) for identifying Enterobacteriaceae.</p>
BAM	
COMPF	
EP	
SMD	
SMWW	
USP	<p>This medium complies with the recommendations of the International Organization for Standardization (ISO) (1975), DIN Norm 10160 for the examination of meat and DIN Norm 10181 for the examination of milk. Its composition is equivalent to that recommended by the United States Pharmacopoeia XXVI (2003), the European Pharmacopoeia II and the German examination procedure for food acc. to § 35 LMBG.</p>

Mode of Action

Degradation of sugar and accompanying acid production are detected by the pH indicator phenol red, which changes its colour from red-orange to yellow, on alkalization it turns deep red. Thiosulfate is reduced to hydrogen sulfide by several species of bacteria, the hydrogen sulfide reacts with an iron salt to give black iron sulfide.

Typical Composition (g/litre)

Peptone from casein 10.0; peptone from meat 10.0; meat extract 3.0; yeast extract 3.0; sodium chloride 5.0; lactose 10.0; sucrose 10.0; D(+)-glucose 1.0; ammonium iron(III) citrate 0.5; sodium thiosulfate 0.5; phenol red 0.024; agar-agar 12.0.

Preparation

Suspend 65 g/litre, dispense into test tubes, autoclave (15 min at 121 °C). Allow the medium to solidify to give slant-agar tubes. pH: 7.4 ± 0.2 at 25 °C.

The prepared medium is clear and red.

Experimental Procedure and Evaluation

Streak the pure culture under investigation on the sloped surface and inoculate the butt of the same tube by a central stab.

Incubation: up to 48 hours at 35 °C aerobically.

Microorganisms	Butt	Slant surface	H ₂ S-production	
<i>S.</i> -typhosa	S	OA	+	Only in the upper part of the butt, often accompanied by ring formation, may take 48 hours
<i>S. paratyphi</i> A	SG			
<i>S. choleraesuis</i>	SG	OA	-	Butt black
<i>S. pullorum</i>	SG	OA	+	
<i>S. paratyphi</i> B	SG	OA	+	
<i>S. typhimurium</i>	SG	OA	+	
<i>S. enteritidis</i>	SG	OA	+	
<i>S. gallinarum</i>	S	OA	+	
<i>Sh. dysenteriae</i> type 1	S	OA	-	
<i>Sh. schmitzii</i>	S	OA	-	
<i>Sh. boydii</i>	S	OA	-	
<i>Sh. flexneri</i>	S	OA	-	
<i>Sh. flexneri</i> type 6 var. Newcastle	S/SG	OA	-	
<i>Alkalescens</i>	S	A/S***	-	
<i>Sh. sonnei</i>	S	S	-	
<i>Dispar</i>	S	S	-	
<i>Ent. aerogenes</i>	SG	S	-	
<i>Ent. cloacae</i>	SG	S	-	
<i>E. coli</i>	SG	S	-	
<i>Citrobacter</i>	SG	S	+	
<i>Klebsiella</i>	SG	S	-	
<i>Pr. vulgaris</i>	SG**	S***	+	Dirty black-green
<i>Pr. mirabilis</i>	SG**	A	+	
<i>Pr. morganii</i>	SG**	OA	-	
<i>Pr. rettgeri</i>	S(A)	OA	-	
<i>K. pneumoniae</i>	S/SG	OA	-	
<i>Ps. aeruginosa</i>	OA	OA*	-	
<i>Ai. faecalis</i>	OA	OA	-	

Abbreviations:

- A = Colour changes to red due to alkalization
- O = No change in the original colour of the culture medium or colour changes to red due to alkalization
- S = Colour changes to yellow due to acid production
- S = Colour changes to yellow and gas is produced
- G
- + = Blackening due to H₂S production
- = No blackening
- * = May be due to pigment production
- * = Some strains: A, possibly without gas production
- * =
- * = On KLIGLER (double sugar iron agar): OA
- * =
- * =

Literature

- Bundesgesundheitsamt: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG. Beuth Verlag Berlin, Köln.
- Deutsches Arzneibuch, 10. Auflage, Chapter VIII, 10.
- DIN Deutsches Institut für Normung: Untersuchung von Fleisch und Fleischerzeugnissen. - Nachweis von Salmonellen (Referenzverfahren). - DIN 10160.
- DIN Deutsches Institut für Normung e.V.: Mikrobiologische Milchuntersuchung. Nachweis von Salmonellen. Referenzverfahren. - DIN 10181.
- European Pharmacopoeia II, Chapter VIII, 10.
- Hajna, A.A.: Triple-Sugar Iron Medium for the identification of the intestinal group of bacteria. - J. Bact., 49: 516-517 (1945).
- International Organization for Standardization: Meat and meat products. - Detection of Salmonella (Reference method). - International Standard ISO 3565 (1975).
- Sulkin, E.S., a. Willett, J.C.: A Triple Sugar-Ferrous Sulphate Medium for use in identification of enteric organisms. - J. Lab Clin. Med., 25: 649-653 (1940).
- United States Pharmacopoeia XXVI, Chapter "Microbial Limit Tests", 2003.

Ordering Information

Product	Merck Cat. No.	Pack size
Triple Sugar Iron Agar	1.03915.0500	500 g

Quality control

Test strains	Growth	Butt	Slant surface
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	good / very good	yellow	yellow
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	good / very good	yellow and black	yellow
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	good / very good	yellow	yellow
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	good / very good	yellow	red
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	good / very good	yellow and black	red
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	good / very good	yellow and black	red
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 14153	good / very good	yellow and black	red and black
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	good / very good	yellow and black	yellow

SIM Medium

Test culture medium used to detect sulfide formation, indole production and motility for the identification of Enterobacteriaceae.

The medium complies with the recommendations of APHA (1992) for food examination.

Typical Composition (g/litre)

Peptone from casein 20.0; peptone from meat 6.6; ammonium iron(II)citrate 0.2; sodium thiosulfate 0.2; agar-agar 3.0.

Preparation

Suspend 30 g/litre, dispense into tubes to give a depth of about 4 cm, autoclave (15 min at 121 °C), allow to solidify in a vertical position.

pH: 7.3 ± 0.2 at 25 °C.

The prepared medium is clear and yellowish-brown.

Experimental Procedure and Evaluation

Introduce a pure culture of the microorganism to be tested into the butt by puncture.

Incubation: 18-24 hours at 35 °C aerobically.

Motility is indicated by a diffuse turbidity of the culture medium surrounding the puncture line. In case of immotility, growth takes place solely along the puncture line. H₂S formation is shown by a blackening in those areas of the medium in which microbial growth has occurred.

After checking the tubes for motility and H₂S production, the indole test is performed. The medium is covered with a layer of KOVACS Indole Reagent. Production of indole causes the reagent layer to become purple in colour.

Microorganisms	H ₂ S	Indole	Motility
<i>Escherichia</i>	-	+	+ / -
<i>Enterobacter</i>	-	-	+
<i>Citrobacter</i>	+	-	+
<i>Klebsiella</i>	-	-	-
<i>Salmonella</i>	+	-	+
<i>Shigella</i>	-	+ / -	-
<i>Prot. vulgaris</i>	+	+	+
<i>Prot. mirabilis</i>	+	-	+
<i>Morganella</i>	-	+	+
<i>Rettgerella</i>	-	+	+
<i>Arizona</i>	+	-	+
<i>Hafnia</i>	-	-	+
<i>Serratia</i>	-	-	+
<i>Providencia</i>	-	+	+
<i>Edwardsiella</i>	+	+	+
<i>Yers. enterocolitica</i>	-	- (+)	-

Quality control

Test strains	Growth	H ₂ S-formation	Indole formation	Motility
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	good / very good	-	+	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 4351	good / very good	-	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	good / very good	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	good / very good	-	-	+
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	good / very good	+	-	+
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	good / very good	+	+	+

Literature

American Public Health Association: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. - 3rd ed. (1992).

COSTIN, I.D.: Die biochemische Identifizierung der Enterobacteriaceae. Kritische Bemerkungen zur Prinzipien und Methoden. - *Zbl. Bakt. I. Ref.*, **219**; 81-151 (1961).

COSTIN, I.D.: Orientierende Identifizierung obligat- und fakultativ-aerob, anspruchsloser, gramnegativer Stäbchen von medizinischem Interesse. - *Med. Labor.*, **30**; 197-217 (1977).

Ordering Information

Product	Merck Cat. No.	Pack size
SIM Medium	1.05470.0500	500 g
Bactident® Indole (dropper bottle)	1.11350.0001	1 x 30 ml
KOVACS Indole Reagent	1.09293.0100	100 ml



Lysine Iron Agar

Test agar introduced by EDWARDS and FIFE (1961) for the simultaneous detection of lysine decarboxylase (LDC) and hydrogen sulfide (H₂S) production for the identification of Enterobacteriaceae, especially for Salmonella and Arizona.

JOHNSON et al. (1966) and TIMMS (1971) obtained good results with Lysine Iron Agar. Identification is improved by using the medium in combination with Triple Sugar Iron Agar (THATCHER and CLARK 1968). HENNER et al. (1982) reported that Lysine Iron Agar is superior to other comparable culture media for differentiating between Proteus and Salmonella.

Mode of Action

Lysine is decarboxylated by LDC-positive microorganisms to give the amine cadaverine which causes the pH indicator bromocresol purple to change its colour to violet. As decarboxylation only occurs in an acidic medium (below pH 6.0), the culture medium must first be acidified by glucose fermentation. This medium can therefore only be used for the differentiation of glucose-fermenting microorganisms.

LDC-negative, glucose-fermenting microorganisms cause the entire culture medium to turn yellow. On prolonged incubation alkalisation of the culture medium surface may occur, resulting in a colour change to violet. H₂S production causes a blackening of the culture medium due to the formation of iron sulfide.

Species of the Proteus-Provencia group, with the exception of a few Proteus morganii strains, deaminate lysine to give α-ketocarboxylic acid; this compound reacts with the iron salt near the surface of the medium, under the influence of oxygen, to form reddish-brown compounds.

Typical Composition (g/litre)

Peptone from meat 5.0; yeast extract 3.0; D(+)-glucose 1.0; L-lysine monohydrochloride 10.0; sodium thiosulfate 0.04; ammonium iron(III) citrate 0.5; bromocresol purple 0.02; agar-agar 12.5.

Preparation

Suspend 32 g/litre, dispense into test tubes, autoclave (15 min at 121 °C). Allow to solidify to give agar slants.

pH: 6.7 ± 0.2 at 25 °C.

The prepared culture medium is clear and violet.

Experimental Procedure and Evaluation

Inoculate the medium with the pure culture under investigation by streaking it onto the slant surface and by a central stab into the butt.

Incubation: 16-24 hours at 35 °C aerobically.

Characteristic reactions of some Enterobacteriaceae cultured on Lysine Iron Agar:

Microorganisms	Butt	Slant surface	H ₂ S production
Arizona	violet	violet	+
Salmonella*	violet	violet	+
Proteus mirabilis Proteus vulgaris	yellow	red-brown	+
Proteus morganii Proteus rettgeri	yellow	red-brown	-
Providencia	yellow	red-brown	-
Citrobacter	yellow	violet	+
Escherichia	yellow	violet	-
Shigella	yellow	violet	-
Klebsiella	violet	violet	-

* Exception: Salm. paratyphi A (no lysine decarboxylase production, butt = yellow, slant surface violet)

Literature

EDWARDS, P.R., a. FIFE, M.A.: Lysine iron agar in the detection of Arizona cultures. - *Appl. Microbiol.*, **9**: 478-480 (1961).

EWING, W.H., DAVIN, B.R., a. EDWARDS, P.R.: The decarboxylase reactions of Enterobacteriaceae and their value in taxonomy. - *Publ. Hlth. Lab.*, **18**: 77-83 (1960).

HENNER, S., KLEIH, W., SCHNEIDERHAN, M., BURROW, H., FRIESS, H., GRANDJEAN, C.: Reihenuntersuchungen an Rind- und Schweinefleisch auf Salmonellen. - *Fleischwirtsch.*, **62**: 322-323 (1982).

JOHNSON, J.G., KUNZ, L.J., BARRON, W., a. EWING, W.H.: Biochemical differentiation of the Enterobacteriaceae with the aid of Lysine-iron-Agar. - *Appl. Microbiol.*, **14**: 212-217 (1966).

RAPPOLD, H., a. BOLDERDIJK, R.F.: Modified lysine iron agar for isolation of Salmonella from food. - *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**: 162-163 (1979).

THATCHER, F.S., a. CLARK, D.S.: Microorganisms in FOOD (University of Toronto Press, 1968).

TIMMS, L.: Arizona infection in turkeys in Great Britain. - *Med. Lab. Techn.*, **28**: 150-156 (1971).

Ordering Information

Product	Merck Cat. No.	Pack size
Lysine Iron Agar	1.11640.0500	500 g

Lysine Iron Agar

Quality control

Test strains	Growth	Butt	Slant
Shigella flexneri ATCC 12022	good / very good	yellow	violet
Escherichia coli ATCC 25922	good / very good	yellow	violet
Salmonella typhimurium ATCC 14028	good / very good	violet and black	violet
Salmonella enteritidis NCTC 5188	good / very good	violet and black	violet
Citrobacter freundii ATCC 8090	good / very good	yellow and black	violet
Proteus mirabilis ATCC 29906	good / very good	yellow and black	reddish-brown
Morganella morganii ATCC 25830	good / very good	yellow	reddish-brown / violet



Citrobacter freundii
ATCC 8090



Morganella morganii
ATCC 25830



Salmonella enteritidis
NCTC 5188



Shigella flexneri
ATCC 12022

Christensen Medio (Urea Agar Base)

USO

Medio utilizado para diferenciar microorganismos en base a la actividad ureásica.

Se utiliza para identificar bacterias que hidrolizan urea, tales como *Proteus* spp. otras enterobacterias y estafilococos.

FUNDAMENTO

En el medio de cultivo, la triptena y la glucosa, aportan los nutrientes para el desarrollo de microorganismos. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, y el rojo de fenol es el indicador de pH. El agar es el agente solidificante.

Las bacterias hidrolizan la urea por medio de la enzima ureasa liberan amoníaco y dióxido de carbono. Estos productos alcalinizan el medio de cultivo haciendo virar el indicador rojo de fenol del color amarillo al rojo.

Es recomendado especialmente para la detección de la actividad ureásica en bacterias que hidrolizan lentamente la urea ya que la fermentación de la glucosa presente activa la enzima ureasa microbiana. Este es el caso de *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp y *Citrobacter* spp.

CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

Código B0210905: envase x 100 g.
Código B0210906: envase x 500 g.

FÓRMULA (en gramos por litro)

TRIPTENA.....	1.0
GLUCOSA.....	1.0
CLORURO DE SODIO.....	5.0
FOSFATO MONOPOTÁSICO.....	2.0
ROJO DE FENOL.....	0.012
AGAR.....	15.0
pH FINAL: 6.8 ± 0.2	

CONTROL DE CALIDAD

MICROORGANISMOS	CRECIMIENTO	COLOR DEL MEDIO
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 43071	+	Rojo rosado
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	+	Rojo rosado
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	Amarillo
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	-	Amarillo

CONTROL DE ESTERILIDAD	RESULTADO
Medio sin inocular	Sin cambios

LIMITACIONES

-Bacterias que hidrolizan lentamente la urea, como ser especies de *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*, viran al color rojo rosado de todo el medio de cultivo luego de 24 horas de incubación, por eso se recomienda incubar el medio hasta 72 horas.

-No calentar o sobrecalentar el medio de cultivo porque la urea se descompone fácilmente.

MATERIALES NECESARIOS NO PROVISTOS

Equipos y material de laboratorio, microorganismos para control de calidad, reactivos y medios de cultivo adicionales según requerimiento.

PRECAUCIONES

- Solamente para uso diagnóstico in vitro. Uso profesional exclu-

INSTRUCCIONES

Suspender 24 g del polvo en 950 ml de agua purificada. Dejar reposar 5 minutos. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición para disolución total. Distribuir en recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 50°C y agregar 50 ml de una solución de urea al 40% previamente esterilizada por filtración o cloroformo. Fraccionar en tubos y dejar solidificar el medio en pico de flauta con fondo profundo.

CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

Medio de cultivo deshidratado: color rosa claro, homogéneo, libre deslizamiento.

Medio de cultivo preparado: color amarillo

ALMACENAMIENTO

Medio de cultivo deshidratado a 10-35 °C.

Medio de cultivo preparado a 2-8 °C.

PROCEDIMIENTO

Siembra

A partir de un cultivo puro del microorganismo en estudio, estriar la superficie del medio en el pico de flauta.

Se recomienda no punzar la capa profunda para controlar el color.

Incubación

En aerobiosis, a 35-37 °C, durante 18-24 horas.

Los microorganismos que hidrolizan la urea lentamente pueden requerir hasta 72 horas de incubación.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Microorganismos que hidrolizan la urea: el medio de cultivo es de color rosado-rojizo.

Microorganismos que no hidrolizan la urea: el medio de cultivo permanece de color amarillo.

sivo.

- No utilizar el producto si al recibirlo su envase está abierto o dañado.

- No utilizar el producto si existen signos de contaminación o deterioro, así como tampoco si ha expirado su fecha de vencimiento.

- Utilizar guantes y ropa protectora cuando se manipula el producto.

- Considerar las muestras como potencialmente infecciosas y manipularlas apropiadamente siguiendo las normas de bioseguridad establecidas por el laboratorio.

- Las características del producto pueden alterarse si no se conserva apropiadamente.

- Descartar el producto que no ha sido utilizado y los desechos del mismo según reglamentaciones vigentes.

REFERENCIAS

- Christensen. 1946. J. Bacteriol. 52:461.

- MacFaddin. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, volume 1. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

- Murray PR, Baron, Pfaller, Tenoer and Tenover. 1999. Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

- MacFaddin. 2000. Biochemical tests for identification of medical bacteria, 3rd ed, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

INDICACIONES AL CONSUMIDOR

Utilizar el producto hasta su fecha de vencimiento.

Conservar el producto según las indicaciones del rótulo.

Salmonella Shigella Agar

IVD

USO

Medio de cultivo selectivo y diferencial utilizado para el aislamiento de *Salmonella* spp. y de algunas especies de *Shigella* spp. a partir de heces, alimentos y otros materiales en los cuales se sospeche su presencia.

FUNDAMENTO

En el medio de cultivo la pluripeptona y el extracto de carne aportan los nutrientes para el desarrollo microbiano.

Las sales biliares y el verde brillante inhiben el desarrollo de una amplia variedad de bacterias Gram positivas, de la mayoría de los coliformes y el desarrollo invasor del *Proteus* spp.

La lactosa es el hidrato de carbono fermentable. El tiosulfato de sodio permite la formación de SH_2 que se evidencia por la formación de sulfuro de hierro.

El rojo neutro es el indicador de pH y el agar es el agente solidificante.

Los pocos microorganismos fermentadores de lactosa capaces de desarrollar, acidifican el medio haciendo virar al rojo el indicador de pH, obteniéndose colonias rosadas o rojas sobre un fondo rojo. *Salmonella*, *Shigella* y otros microorganismos no fermentadores de lactosa, crecen adecuadamente en el medio de cultivo, y producen colonias transparentes.

La producción de ácido sulfhídrico se evidencia como colonias con centro negro debido a la formación de sulfuro de hierro.

Para aumentar la selectividad, se recomienda incubar previamente la muestra en Selenito Caldo (Britania®).

CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

Código B0213805: envase x 100 g.

Código B0213806: envase x 500 g.

FÓRMULA (en gramos por litro)

PLURIFEPTONA.....	5.0
EXTRACTO DE CARNE.....	5.0
LACTOSA.....	10.0
MEZCLA DE SALES BILIARES.....	8.5
CITRATO DE SODIO.....	8.5
TIOSULFATO DE SODIO.....	8.5
CITRATO FÉRRICO.....	1.0
VERDE BRILLANTE.....	0.00033
ROJO NEUTRO.....	0.025
AGAR.....	13.5
pH FINAL: 7.0 ± 0.2	

CONTROL DE CALIDAD

MICROORGANISMOS	CRECIMIENTO	COLOR DE LA COLONIA	PRODUCCIÓN DE SH_2
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	Satisfactorio	Incolora	+
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Satisfactorio	Incolora	+
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	Satisfactorio	Incolora	-
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25631	Satisfactorio	Incolora	-
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 43071	Satisfactorio	Incolora	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25622	Inhibición parcial o total	Rojo-rosada	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Inhibición parcial o total	Incolora	-

CONTROL DE ESTERILIDAD	RESULTADO
Medio sin inocular	Sin cambios

LIMITACIONES

- Por ser un medio altamente selectivo, algunas pocas cepas de *Shigella* pueden no desarrollar adecuadamente en el mismo.
- Ocasionalmente unos pocos microorganismos no patógenos pueden desarrollar pero son fácilmente diferenciados por su capacidad de fermentar la lactosa.

MATERIALES NECESARIOS NO PROVISTOS

Equipos y material de laboratorio, microorganismos para control de

INSTRUCCIONES

Suspender 60 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Reposar 5 minutos y mezclar hasta homogeneizar. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición durante 1 minuto para disolución total.

No esterilizar en autoclave.

Enfriar y distribuir en placas de Petri estériles.

CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

Medio de cultivo deshidratado: color rosado, homogéneo, libre deslizamiento.

Medio de cultivo preparado: color naranja ligeramente opalescente.

ALMACENAMIENTO

Medio de cultivo deshidratado a 10-35 °C.

Medio de cultivo preparado a 2-8 °C.

PROCEDIMIENTO

Siembr

Sembrar estriando directamente la superficie del medio de cultivo.

Incubación

En aerobiosis a 35-37 °C durante 18-24 horas.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Microorganismos fermentadores de lactosa: colonias rosadas o rojas.

Microorganismos no fermentadores de lactosa: colonias del color del medio, incoloras.

Microorganismos productores de SH_2 : colonias con centro negro.

calidad, reactivos y medios de cultivo adicionales según requerimiento.

PRECAUCIONES

- Solamente para uso diagnóstico in vitro. Uso profesional exclusivo.

- No utilizar el producto si al recibirlo su envase está abierto o dañado.

- No utilizar el producto si existen signos de contaminación o deterioro, así como tampoco si ha expirado su fecha de vencimiento.

- Utilizar guantes y ropa protectora cuando se manipula el producto.

- Considerar las muestras como potencialmente infecciosas y manipularlas apropiadamente siguiendo las normas de bioseguridad establecidas por el laboratorio.

- Las características del producto pueden alterarse si no se conserva apropiadamente.

- Descartar el producto que no ha sido utilizado y los desechos del mismo según reglamentaciones vigentes.

REFERENCIAS

- Leifson, E. 1935. New culture media based on sodium desoxycholate for the isolation of intestinal pathogens and for the enumeration of colon bacilli in milk and water. *J. Pathol. Bacteriol.* 40:581.

- Taylor WL, and Harris, B. 1965. Isolation of shigellae. II. Comparison of plating media and enrichment broths. *Am. J. Clin. Pathol.* 44:476.

- MacFaddin. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, volume 1. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

INDICACIONES AL CONSUMIDOR

Utilizar el producto hasta su fecha de vencimiento.

Conservar el producto según las indicaciones del rótulo.

BHI (Brain Heart Infusion) Broth

acc. ISO 6888

Ordering number: 1.10493.0500

For the cultivation of various fastidious bacteria and for the cultivation of staphylococci for the plasma coagulase test.

This culture medium complies with the specifications given by EN ISO 6888 and APHA.

Mode of Action

This culture medium is highly nutritious and buffered to support the growth of fastidious and nonfastidious microorganism, including aerobic and anaerobic bacteria.

Brain heart broth is especially suited for the cultivation of staphylococci for the plasma coagulase test acc. to EN ISO 6888.

The growth of anaerobic or microaerophilic bacteria is considerably improved by adding small quantities of agar-agar (approx. 0.05-0.2 %; article number 1.01614.1000) before autoclaving to the broth.

Typical Composition

Specified by ISO 6888		GranuCult™ BHI (Brain Heart Infusion) Broth acc. ISO 6888	
Enzymatic Digest of Animal Tissues	10 g/l	Nutrient Substrate (Enzymatic Digest of Animal Tissue, Brain-Heart Extract)	27.5 g/l
Dehydrated Calf Brain Infusion	12.5 g/l		
Dehydrated Beef Heart Infusion	5 g/l		
Glucose	2 g/l	D(+)-Glucose	2 g/l
NaCl	5 g/l	NaCl	5 g/l
Na ₂ HPO ₄ , anhydrous	2.5 g/l	Na ₂ HPO ₄ , anhydrous	2.5 g/l
Water	1000 ml/l	Water	n/a
pH at 25 °C	7.4 ± 0.2	pH at 25 °C	7.4 ± 0.2

Preparation

Dissolve 37 g in 1 l of purified water. Dispense into smaller vessels and autoclave 15 min at 121 °C.

The broth is clear and brown. The pH value at 25 °C is in the range of 7.2-7.6.

Experimental Procedure and Evaluation

Depend on the purpose for which the medium is used.

Storage

Store at +15 °C to +25 °C, dry and tightly closed. Do not use clumped or discolored medium. Protect from UV light (including sun light). For *in vitro* use only.

Quality Control

Function	Control strains	Incubation	Method of control	Expected results
Productivity	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	22-26 h at 36-38 °C aerobic	Qualitative	Growth good to very good
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 6305			
	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC® 19815			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853			
	<i>Candida albicans</i> ATCC® 60193	40-48 h at 36-38 °C aerobic		
	<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC® 25285	40-48 h at 36-38 °C anaerobic		
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 10211	40-48 h at 36-38 °C microaerophilic and with addition of X+V-factor			

Please refer to the actual batch related Certificate of Analysis.

The performance test is in accordance with the current version of EN ISO 11133.

Literature

APHA (2012): Standard Methods for the Examination of Water. 22nd ed. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington, D.C.

ISO International Standardisation Organisation. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) - Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium. EN ISO 6888-1:1999.

ISO International Standardisation Organisation. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) - Part 3: Detection and MPN technique for low numbers. EN ISO 6888-3:2003.

ISO International Standardisation Organisation. Microbiology of food, animal feed and water - Preparation, production, storage and performance testing of culture media. EN ISO 11133:2014.

Ordering Information

Product	Cat. No.	Pack size
GranuCult™ BHI (Brain Heart Infusion) Broth acc. ISO 6888	1.10493.0500	500 g
Agar-Agar, granulated, purified and free from inhibitors for microbiology	1.01614.1000	1 kg

Anexo 6

PRUEBAS FRECUENTES EN BACILOS GRAM NEGATIVOS

BACTERIA	L	S	G	H2S	GG	Li	I	Mo	C	U	MR	VP	Ox
<i>Escherichia coli</i>	v	V	+	-	+	V	V	V	-	-	+	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	-	-	+	+	-	V	-	+	-	-	+	-	-
<i>Salmonella paratyphi</i>	-	-	+	V	+	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>Salmonella spp.</i>	-	-	+	+	+	+	V	+	+	-	+	-	-
<i>Shigella spp.</i>	-	-	+	-	-	-	V	-	-	-	+	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	V	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-
<i>Klebsiella ozaenae</i>	V	V	+	-	V	V	-	-	V	V	+	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	V	+	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	+	-	+	-	-	+	+	V	V	+	-
<i>Enterobacter agglomerans</i>	V	+	+	-	V	-	V	+	V	V	V	V	-
<i>Morganella morganii</i>	-	-	+	+	V	-	+	+	-	+	+	V	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	+	+	+	-	-	+	V	+	+	-	-
<i>Proteus vilgaris</i>	-	+	+	+	+	-	+	+	V	+	+	+	-
<i>Proteus rettgeri</i>	-	-	+	-	-	-	++	+	+	+	+	-	-
<i>Providencia stuartii</i>	-	V	+	-	-	-	+	+	+	V	+	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	V	V	+	+	+	-	-	+	+	V	+	-	-
<i>Citrobacter diversus</i>	V	V	+	-	V	-	+	+	+	+	+	-	-
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	+	+	-	V	+	-	+	+	-	-	+	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	+	+	-	-	-	V	37°C	-	+	+	-	-
<i>Aeromonas spp.</i>	-	+	+	-	V	+	+	+	V	-	+	V	+
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	V	+
<i>Vibrio cholerae</i>	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
<i>Pseudomonas spp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Moraxella spp.</i>	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	+
<i>Acinetobacter spp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

L = Fermentación de lactosa
 S = Fermentación de sacarosa
 G = Fermentación de glucosa
 H2S = Producción de H2S
 GG = Gas de glucosa
 Li = Descarboxilación de lisina

I = Producción de indol
 Mo = Movilidad
 C = Asimilación del citrato
 U = Hidrólisis de la urea
 MR = Rojo de Metilo
 VP = Voges Proskauer
 Ox = Oxidasa

Referencias

- 1 Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, et al. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006:242-244.
- 2 D'Aoust J, Maurer J, Bailey JS. Salmonella Species. In: Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. Doyle M, Beuchat LR, Montville TJ. (Eds.) 2d. ed. USA: ASM Press; 2001.
- 3 Osa JM de la, Olmo N, Botas M, Menezet A, Pérez Flores F. Estudio bacteriológico y comercial en huevos de gallina. Rev Alimentaria 1988; 88:41-7.
- 4 International Commission for Microbiological Specifications in Foods. Ecología microbiana de los alimentos. Productos alimenticios. Zaragoza: Editorial Acribia, 1985; vol 2: 528-30
- 5 Organización Mundial de la Salud (OMS). Salmonelosis. Temas de salud. Artículo en Línea [URL] <http://www.who.int/topics/salmonella/es/> Fecha de Acceso: 01/10/2016
- 6 Rosas R. Contaminaciones Alimentarias. Cuadros Principales, Tratamientos y Prevención. OFFARM 2007; 26(6):95-100.
- 7 Chávez E, Higuera A, Huertas M, Brote por Salmonella enteritidis en trabajadores de un hospital Salud Publica Mex 2001; 43:211-216. Artículo original.
- 8 Moya-Salazar J, Pio-Davila L, Teràn-Vazques A, Olivo-Lopez JM. Rendimiento diagnóstico del agar sangre con filtro versus agar karmali para el diagnóstico de Campylobacter en coprocultivo. Horiz Med 2016; 16 (3): 58-65.
- 9 Pascual M, Calderón V. Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas. 2d.ed. Madrid: Díaz de Santos; 2000: 54-55.

-
- 10 Herranz SC. Métodos Rápidos y Automatización en Microbiología Alimentaria. Rev Alimentaria 2008; 109-113.
 - 11 International Organization for Standardization (ISO) Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of Salmonella spp. ISO 6579: 2002. Switzerland: ISO copyright office; 2002.
 - 12 Food and Drug Administration (FDA). Salmonella. In: Bacteriological Analytical Manual, Chapter 5. Andrews WH and Hammack T (Eds.). Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM=ucm070149.htm>, Fecha de Acceso: 04/06/17.
 - 13 International Organization for Standardization (ISO). ISO 6579:2002 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of Salmonella spp. [Internet]. Ginebra: ISO; Jul 2002 [citado el 10 de junio 2017]. Disponible en: <https://www.iso.org/standard/29315.html>
 - 14 Food and Drug Administration (FDA). U.S. Food and Drug Administration Maryland: FDA; FDA Bacteriological Analytical Manual. Chapter 5, Salmonella. [Internet]. [citado el 10 de junio 2017]. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm070149.htm>
 - 15 Alberti AC, Burgos SJ. Comparación de Métodos Rápidos (Screening) Assurance GDS System y de Inmunoensayo Vía Tecra contra el Método Horizontal para la detección de Salmonella spp. (ISO 6579:2002, IDT) en carne de pollo fresca, provenientes de supermercados del área metropolitana de San Salvador. [Tesis]. San Salvador: Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador; 2017.
 - 16 García BC. Control Sanitario del Sector Avícola mediante el diseño e implementación de mapas de Prevalencia y Seroprevalencia. [Tesis Doctoral]. Valencia: Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia; 2015.

-
- 17 Villagómez ES. Aislamiento y Serotipificación de *Salmonella enteritidis*, *Typhimurium*, e *Infantis* en carcasas de pollo destinadas para consumo humano en un camal industrializado de la Provincia de Pichincha. [Tesis]. Quito: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador; 2015.
- 18 Robledo LA. Investigación de *Salmonella* spp en alimentos mediante el método tradicional ISO 6579 y dos métodos inmunoenzimáticos. [Tesis]. Barcelona: Escola Superior D'agricultura De Barcelona (ESAB), Universitat Politècnica De Catalunya; 2015.
- 19 Logacho PM. Detección de *Salmonella enteritidis*, *typhimurium* e *infantis* en materia prima y Alimento balanceado en un sistema productivo de pollos de engorde en la Provincia de Pichincha. [Tesis]. Quito: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador; 2015.
- 20 Romero QM., Sánchez PE., López AJ. Análisis de la comparación del método estándar ISO 6579-2002 con PCR Tiempo Real como prueba de Tamizaje para la detección de *Salmonella* spp en carne molida, CNDRMINSA, Noviembre Diciembre 2014. [Tesis]. Managua: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua; 2015.
- 21 Bird P, Flannery J, Crowley E, Agin J, Goins D, Jechorek R. Evaluation of the 3M™ Petrifilm™ *Salmonella* Express System for the Detection of *Salmonella* Species in Selected Foods: Collaborative Study. J AOAC Int. 2014; 97(6): 1563-1575.
- 22 Zabaleta EG. Evaluación de Susceptibilidad antimicrobiana de *Salmonella* spp., aisladas en la cadena cárnica porcina en tres regiones del país. [Tesis]. Bogotá: Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana; 2014.
- 23 Álvarez PH. Validación de dos métodos para la detección de *Salmonella* spp. en embutidos artesanales, distribuidos en mercados municipales del Departamento de Guatemala. [Tesis]. Guatemala: Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala; 2013.

-
- 24 Zhang G, Thau E, Brown EW, Hammack TS. Comparison of a novel strategy for the detection and isolation of *Salmonella* in shell eggs with the Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual Method. *Poult Sci.* 2013; 92: 3266-3274.
- 25 Alberto SM. Presencia de *Salmonella* y características físicas de huevos destinados a consumo humano. [Tesis Maestral]. Esperanza: Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral; 2012.
- 26 Ramírez AW. Propuesta de un Manual de técnicas Microbiológicas para los diferentes grupos alimenticios, referenciados en las Metodologías Normalizadas de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA). [Tesis]. San Salvador: Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador; 2012.
- 27 Méndez I, Badillo C, Parra G, Faccini A. Caracterización microbiológica de *Salmonella* en alimentos de venta callejera en un sector universitario de Bogotá, Colombia Julio a Octubre de 2010. *Médica UIS* 2011; 24(1):23-9.
- 28 Eyigor A, Temelli S, Tayfun Carli K. Evaluation of ISO 6579 and FDA-BAM Methods to Complement Real-Time Polymerase Chain Reaction for the Detection of *Salmonella* in Naturally Contaminated Poultry Meat and Red Meat. *Foodborne Pathog Dis.* 2010; 7(8): 921-927.
- 29 Garcia C, Catalá-Gregorio P, Soriano JN, Tudon AL, Benites V, Andreu L, et al. *Salmonella* spp. en hisopos cloacales, heces y huevos de gallina ponedoras: estudio preliminar. Zaragoza, Valencia: Presentado al XLVI Simposio Científico de Avicultura. 29 de setiembre – 2 de octubre, 2009.
- 30 Zhang L, Yan Z, Ryser E. Comparison of the Reveal Test, the U.S. Food and Drug Administration Culture Method, and Selective Media for Recovery of *Salmonella* Enteritidis from Commercial Egg Layer Flock Environments. *Journal of Food Protection.* 2006; 69 (11): 2766-2769.

-
- 31 Oktay H, Heperkan D. Evaluation of ISO Method and Vidas Automated System for identifying *Listeria* and *Salmonella* in selected foods. J Rapid Methods Autom Microbiol. 2006; 14: 133-146.
- 32 Durango J, Arrieta G, Mattar S. Presencia de *Salmonella* spp. En un área del Caribe colombiano: Un riesgo para la salud pública. Biomédica 2004; 24:89-96.
- 33 Valentin-bon I, Brackett R, Seo K, Hammock T, Andrews W. Preenrichment Versus Direct Selective Agar Plating for the Detection of *Salmonella* Enteritidis in Shell Eggs Journal of Food Protection, 2003; 66(9):1670-1674.
- 34 Seo K, Brackett R, Valentin-bon I, Holt P. Comparison of Homogenization Methods for Recovering *Salmonella* Enteritidis from Eggs. J Food Prot. 2003; 66(9).
- 35 Hammock T, Amaguaña M, June G, Sherrod P, Andrews W. Relative Effectiveness of Selenite Cystine Broth, Tetrathionate Broth, and Rappaport-Vassiliadis Medium for the Recovery of *Salmonella* spp. from Foods with a Low Microbial Load. J Food Prot. 1999; 62(1):
- 36 D'Aoust J, Sewell A, Warburton D. A comparison of standard cultural methods for the detection of foodborne *Salmonella*. Int J Food Microbiol. 1992; 16.
- 37 Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). Análisis Microbiológico de los Alimentos. Metodología analítica oficial. Microorganismos patógenos. 2011; 1(1):5-22.
- 38 Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). Análisis Microbiológico de los Alimentos. Metodología analítica oficial. Microorganismos patógenos. 2011; 1(1):23-54.
- 39 República de Colombia Ministerio de la Protección Social. Instituto Nacional de Salud (UIERIA). Perfil de riesgo *Salmonella* spp. (no tifoideas) en pollo entero y en piezas. 2011; 17-22.

-
- 40 Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. *Microbiología Medica*. 7a Ed. Barcelona: Elsevier; 2014.
- 41 Jurado JR, Arenas MC, Doblaz DA, Rivero A, Torre-Cisneros J. Fiebre Tifoidea y otras infecciones por Salmonellas. *Medicine*. 2010; 10(52):3497-501.
- 42 Parra M, Durango J, Máttar S. Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por Salmonella. *Revista MVZ Córdoba* 2002; 7(2): 187-200. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69370201>. Fecha de consulta: 18 de junio de 2017.
- 43 Vadillo S, Piriz S, Mateos E. *Manual de Microbiología Veterinaria*. Madrid: Editorial McGraw Hill; 2002. p. 327-338.
- 44 Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. Salmonella Nomenclature. *J Clin Microbiol*. 2000, 38(7): 2465–2467.
- 45 Evangelopoulou GD, Burriel A, Spyrou V. A concise history of Salmonella spp. Nomenclature. : *J Hell Vet Med Soc*. 2010, 61(4): 323-329.
- 46 Patrick A, Grimont D, François-Xavier W. *Antigenic formulae of the Salmonella serovars*. 9° ed. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. Paris, 2007.
- 47 Pachón CD. Aislamiento, identificación y Serotipificación de enterobacterias del genero salmonella en una población de *Crocodylus intermedius* y tetudinos mantenidos en cautiverio en la estación de biología tropical Roberto Franco E.B.T.R.B. de la facultad de ciencias – universidad de Colombia en Villavicencio – Meta. [tesis]. Bogotá: Universidad Javeriana; 2009.
- 48 Estrada AJ, Valencia BB. Determinación de Salmonella spp. en Huevos Frescos de Gallina en los Principales Mercados de la Ciudad de Quito. [Tesis]. Quito: universidad de Central de Ecuador; 2012.

-
- 49 Valcárcel HL. Aplicación de métodos moleculares a la detección y tipificación de patógenos alimentarios en alimentos. [Tesis]. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia; 2014.
- 50 Paucar L, Tenecora J. Determinación de Salmonella spp en Materia Prima Cárnica de la Empresa Italimentos Mediante la Técnica Visual Inmunoensayo Tecra Salmonella Vía. [Tesis]. Cuenca: Universidad de Cuenca; 2013.
- 51 Newell D. Salmonella en aves de corral en el Reino Unido: carga para la salud pública y enfoque del Código de prácticas Lion para su control y prevención. Salmonella 360° Bullitin. N 5, Andover, Reino Unido.
- 52 Gutiérrez Cogco L, Montiel Vázquez E, Aguilera Pérez P, González Andrade C, Serotipos de Salmonella identificados en los servicios de salud de México. Salud Pública de México. 2000.42 (6).
- 53 Kenneth JR, Ray CG. Sherris' Microbiología Médica. 5° Ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2011: 456-461.
- 54 Cantor VW. Alternativas de Desinfección en Huevos Comerciales Como Herramienta para Reducir la Contaminación Causada por Salmonella y sus Repercusiones en el ser Humano. [Tesis]. Fusgasugá: Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cundinamarca; 2015.
- 55 Musgrove M, Smith D. Effect of blood spots in table Egg albumen on Salmonella growth. Poult Sci. 2008. 87(8): 1659- 1661.
- 56 Bravo AP. Efecto del Cambio de Temperatura sobre la Penetración de Salmonella Enteritidis a través de la Cáscara del Huevo. [Tesis]. Santiago: Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile; 2011.
- 57 Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Gast R, Humphrey TJ, et al. Mechanisms of Egg Contamination by Salmonella Enteritidis. FEMS Microbiol Rev. 2009; 33:718-738.

-
- 58 Acosta VF. Caracterización De Salmonella (Salmonella Spp) En Huevos Frescos De Gallinas Mediante La Utilización Del Sistema Microgen GN A En La Parroquia Cotaló. [Tesis]. Cevallos: Facultad De Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica De Ambato, 2016.
- 59 Quesada A, Reginatto GA, Ruiz Español A, Colantonio LD, Burrone MS. Resistencia antimicrobiana de Salmonella spp aislada de alimentos de origen animal para consumo humano. Rev Perú Med Exp Salud Pública. 2016; 33(1):32-44.
- 60 Suárez M, Mantilla J. Presencia de Salmonella serovariedad Enteritidis en productos de origen avícola y su repercusión en salud pública. IATREIA. Colombia 2000; 13(4): 237 – 245.
- 61 Uribe C, Suárez M C, Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. Col Med 2006; 37151-158.
- 62 Hardy A. Salmonella: un problema continuo. Posgrado Medical Journal. 2004; (80)947: 541 - 545.
- 63 Sánchez VF, Abu-El-Haija M, Gomez DO. Salmonella infections: An update on epidemiology, Management, and Prevention. Travel Med Infect Dis. 2011; 9: 263-277.
- 64 Ministerio de Salud. Enfermedades Transmitidas por Alimentos, una importante causa de morbilidad en nuestro País. Bol Epidemiol. 2012; 21 (50): 834-835.
- 65 Murray P, Baron E, Jorgensen J, Landry M, Pfaller M. Manual of Clinical Microbiology. 9° ed. Washington, DC: ASM PRESS; 2007.
- 66 Mahmoud BSM. Salmonella – A Dangerous Foodborne Pathogen. Croacia: Intech 2012.
- 67 CULTIMED. Manual Básico de Microbiología. 4° Ed. España: Panreac Química S.A. Cultimed; 2003.

-
- 68 Castañeda Briones M. Microbiología aplicada. Manual de Laboratorio. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Azcapotzalco: México; 2003.
- 69 Piñeros GJ, Rodríguez VM. Identificación de Salmonella Gallinarum y Salmonella Pullorum en pollo de engorde de la línea Ross 308. [Tesis]. Bogotá: Facultad de ciencias agropecuarias, Universidad de la Salle; 2010.
- 70 Michael J, Leboffe, Burton E. Pierce. A Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory. 4° ed. Colorado: Morton Publishing Company; 2011.
- 71 Hajdenwurcel JR. Atlas de Microbiología de Alimentos. Sao Paulo: FONTE Comunicações e editora; 1998.
- 72 Murray P, Shea I. Pocket Guide to Clinical Microbiology. 3th ed. Washington DC: ASM, 2004.
- 73 Miller RG, Tate CR, Mallinson ET, Schemer JA. Xylose-Lysine-Tergitol 4: An improved selective agar medium for the isolation of Salmonella. Poult Sci. 1991; 70:2429-2432.
- 74 Vandevenne CA, Escolá RM. Métodos de análisis Microbiológicos de los Alimentos. Madrid: Díaz de Santos S.A.; 2002.
- 75 Perilla MJ, Ajello G, Bopp C, Elliot J, Facklam R, Knapp JS, et al. Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo. Atlanta: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC): Centro Nacional para las Enfermedades Infecciosas y Organización Mundial de la Salud, Enfermedades Transmisibles: Vigilancia y Respuesta; 2004
- 76 Mac Faddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. México D.F. Editorial medica Panamericana. 1991.

-
- 77 Kumar S. *Essentials of Microbiology*. 1st Edition. New Delhi: The Health Sciences Publisher; 2016.
- 78 Junod LT. *Susceptibilidad A Antibióticos En Cepas De Salmonella Enterica De Origen Animal Y Alimentario*. [Tesis]. Concepción: Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Concepción; 2010.
- 79 Wattiau P, Boland C, Bertrand S. Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Subtyping: Gold Standards and Alternatives. *Journals.ASM*. Vol. 77, No. 22 p. 7877–7885. 2011.
- 80 Schrader KN, Fernandez-Castro A, Cheung WKW, Crandall CM, Abbott SL. Evaluation of Commercial Antisera for *Salmonella* Serotyping. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008; 46(2):685-688.
- 81 Caffer M, Terragno R, Bisztein N. *Manual de Procedimientos Diagnostico y caracterización de salmonella spp*. Argentina: WHO Global Salm Surv. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas; 2008.
- 82 Cuervo TC. *Tipificación molecular y resistencia a antimicrobianos en Salmonella entérica serotipo Derby procedente de canales de cerdo y alimentos cárnicos*. [Tesis]. Oviedo: Universidad de Oviedo; 2013.
- 83 Raffatellu M, Chessa D, Wilson RP, Tükel C, Akcelik M, Bäumlér AJ. Capsule-Mediated Immune Evasion: a New Hypothesis Explaining Aspects of Typhoid Fever Pathogenesis. *Infection and Immunity*. 2006; 74(1):19-27.
- 84 Martínez BI. *Desarrollo De Métodos De Detección De Salmonella Basados En La Reacción En Cadena De La Polimerasa Y Su Validación En Muestras Alimentarias*. [Tesis Doctoral]. Victoria-Gasteiz. Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología. Universidad del país Vasco. 2011.
- 85 Chumbi ZC. *Determinación De La Presencia De Salmonella Spp. En Huevos De Gallina De Traspatio Comercializados En La Ciudad de Loja*. [Tesis]. Loja:

Facultad Agropecuaria y de Recursos naturales renovables. Universidad Nacional de Loja; 2017.

- 86 Holmes B, Willcox WR, Lapage SP. Identification of Enterobacteriaceae by the API 20E system. *Journal of Clinical Pathology*, 1978; 31(1): 22-30.
- 87 O'Hara CM, Rhoden DL, Miller JM. Reevaluation of the API 20E identification system versus conventional biochemicals for identification of members of the family Enterobacteriaceae: a new look at an old product. *J Clin Microbiol*. 1992; 30(1):123-125.
- 88 Evaluation of a new chromogenic medium, CHROMagar™ Salmonella Plus, for the detection of Salmonella spp. including lactose positive Salmonella, S. Typhi and S. Paratyphi.
- 89 BD BBL™ CHROMagar™. Salmonella. Instrucciones de uso medios en placa Listos para usar. Heidelberg: Becton Dickinson GmbH; 2013.
- 90 Mosby P. Diccionario de medicina, enfermería y ciencias de la salud. ELSEVIER. España 2006; 4ta edición.
- 91 Madigan M. Martinko J. y Parker J. Brock Biología de los microorganismos. 10° ed. Illinois: Pearson Prentice Hall; 1997.
- 92 Battaglia D, Costarrica ML, Aidara-Kane A. El Impacto de los piensos en la inocuidad de los alimentos. FAO and WHO activities related to animal feeding. Documento inédito presentado en la Reunión Conjunta FAO/OMS de Expertos., Sede de la FAO, Roma, 8-12 octubre 2007.
- 93 Amábile CC. Diccionario de Infectología y Microbiología Clínica. México: Bayer Schering Pharma; 2008.
- 94 Engelkirk P, Duben-Engelkirk J. Burton's Microbiology for the Health Sciences. TENTH Ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2001.

-
- 95 Seo KH, Valentin-Bon IE, Brackett RE, Holt PS. Rapid, specific detection of Salmonella Enteritidis in pooled eggs by real-time PCR. *J Food Prot.* 2004; 67(5):864-9.
- 96 Feldsine P, Lienau A, Leung S, Mui L, Humbert F, Bohnert M, Mooijman K, Schulten S, Veld P, Rollier P, et al. 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. *J AOAC Int.* 2003 Mar-Apr; 86 (2): 275–295.
- 97 Castillo G., et al. Propuesta de Monitoreo de Contaminación Microbiológica por Salmonella Enteritidis en Huevos frescos, 2013.
- 98 Temelli S, Eyigor A and Tayfun Carli K. Salmonella detection in poultry meat and meat products by the Vitek immunodiagnostic assay system easy Salmonella method, a LightCycler polymerase chain reaction system, and the International Organization for Standardization method 6579. *Poult Sci.* 2012; 91 (3): 724-31.
- 99 Hyeon J-Y, Park J-H, Chon J-W, Wee S-H, Moon Jin, Kim Youngji and Seo K-H. Evaluation of selective enrichment broths and chromogenic media for Salmonella detection in highly contaminated chicken carcasses. *Poult Sci.* 2012; 91 (5): 1222-1226.

