

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

**Determinación de Salmonella spp. y Shigella spp. en carne y vegetales crudos
empleados como materia prima en las cafeterías de la Ciudad Universitaria.**



Informe de Tesis

Presentado por

Herberth Fabricio Arévalo Pérez

Para optar al título de

Químico Biólogo

Guatemala abril de 2,003

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

DL

06

T(1222)

JUNTA DIRECTIVA

M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán	Decano
Licda. Jannette Magali Sandoval de Cardona	Secretaria
Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo	Vocal I
Lic. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Dr. Federico Adolfo Richter Martínez	Vocal III
Br. Jorge José García Polo	Vocal IV
Br. Liza Leonor Carranza Jul	Vocal V

DEDICATORIA

A Dios: como entidad creadora del universo y que está más allá de toda comprensión humana.

A mi hermana y cuñado: por su infinita confianza, apoyo incondicional y generosidad.

A mis padres: por darme la vida y educación que necesitaba para llegar hasta este punto.

A mi hermano: por la amistad que compartimos durante la niñez y adolescencia.

A: la Universidad de San Carlos de Guatemala, mi *alma mater*.

A: la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, en especial a la escuela de Química Biológica.

A mis catedráticos: por compartir conmigo sus valiosos conocimientos no solamente para mi formación profesional sino también personal.

A mis amigos y compañeros: Eduardo, Luis, Verónica, Miriam, Sandra y a todos los demás con quienes tuve el privilegio de convivir durante todos estos años.

A: todos los personajes y hechos que forman parte de la historia, porque me han inspirado a seguir su ejemplo desde la niñez hasta hoy.

A: todos aquel que espera encontrar respuestas a través de la ciencia, a pesar de que el camino es a veces tortuoso, pero esperanzador al final.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora: Licda. Brenda López de Quevedo, por su valiosa colaboración durante todo este estudio.

A la directora de escuela: Lic. Alba Marina Valdés Ruíz de García

Al personal que labora en la Unidad de Salud-Bienestar Estudiantil, por permitirme efectuar la parte experimental de mi trabajo.

Al Lic. Martín Néstor Fernando Gíl Carrera, revisor.

A la Licda. Amanda Elisa Gálvez Figueroa de Matheu, revisora.

Al área de Microbiología del INCAP, en especial a Claudia Mérida y Lic. Rafael Pratdesaba.

Índice

Sección del Informe	Página
I. Resumen	1
II. Introducción	3
III. Antecedentes	5
A. Generalidades sobre las cafeterías de la ciudad de Guatemala	5
1. Enfermedades Transmitidas por Alimentos en Guatemala	5
2. Consideraciones microbiológicas para la seguridad alimentaria	6
a.) Congelación	7
b.) Refrigeración	8
3. Riesgo microbiológico de los alimentos expendidos en las cafeterías de la ciudad de Guatemala	9
4. Riesgo microbiológico de los alimentos expendidos en las cafeterías del campus de la Universidad de San Carlos de Guatemala	10
B. Niveles de aceptabilidad microbiológica para los microorganismos causales de ETAs	10
C. Salmonelosis transmitida por alimentos	10
1. Generalidades de <i>Salmonella</i> spp	10
a.) Mecanismo de acción	12
b.) Dosis infecciosa	12
c.) Epidemiología de <i>Salmonella</i> spp	13
2. Infecciones y complicaciones producidas por <i>Salmonella</i> spp	14
3. Alimentos implicados en las infecciones producidas por <i>Salmonella</i> spp	15
4. Supervivencia de <i>Salmonella</i> spp en alimentos	17
a.) Calentamiento	17
b.) Desecado	18
c.) Congelamiento	18
d.) Tolerancia al NaCl	18
e.) Irradiación Gamma	18
5. Planes de muestreo para la determinación de <i>Salmonella</i> spp en carnes crudas	19
a.) Carnes rojas	20
b.) Carne de aves	21
6. Métodos de aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i> spp en carne cruda	21
a.) Enriquecimiento no selectivo o pre-enriquecimiento	21
b.) Enriquecimiento selectivo	22
c.) Estriado en medios sólidos selectivos y diferenciales	23
d.) Purificación	23
e.) Confirmación bioquímica básica	24
f.) Identificación serológica	24

Índice

Sección del Informe	Página
g.) Nuevas metodologías de determinación e aislamiento	24
D. Shigelosis transmitida por alimentos	25
1. Generalidades de <i>Shigella</i> spp	25
a.) Mecanismo de acción	26
b.) Dosis infecciosa	27
c.) Epidemiología	27
2. Infecciones y complicaciones producidas por <i>Shigella</i> spp	28
3. Alimentos implicados en las infecciones producidas por <i>Shigella</i> spp	29
4. Supervivencia de <i>Shigella</i> spp en alimentos	30
5. Métodos de aislamiento e identificación de <i>Shigella</i> spp en vegetales crudos	30
IV. Justificación	33
V. Objetivos	34
VI. Hipótesis	35
VII. Materiales y Métodos	36
VIII. Resultados	45
IX. Discusión de Resultados	56
X. Conclusiones	62
XI. Recomendaciones	63
XII. Referencias	65
XIII. Anexos	72

I. Resumen

Es bien conocido que las enfermedades transmitidas a través de los alimentos se consideran una de las causas de muerte más importantes en los países del tercer mundo, incluyendo por supuesto en esto a Guatemala. La proliferación de las ventas callejeras móviles y es posible que esté implicada en la transmisión de dichas enfermedades a determinados grupos poblacionales, dependiendo de la localización de estas ventas. En este trabajo se investigaron materias primas (carne y vegetales crudos) de trece cafeterías localizadas en diversos puntos dentro del campus central de la Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC). Estos productos en particular, se han relacionado con patógenos bacterianos entéricos tales como *Salmonella* spp y *Shigella* spp desde el matadero o bien desde el área de cosecha (dependiendo de la naturaleza del alimento) hasta que son consumidos por la clientela de los expendedores de estas cafeterías.

Dentro del campus central de la Universidad de San Carlos existe una sección (la Unidad de Salud-Bienestar Estudiantil) encargada de la capacitación a las personas responsables de la preparación de éstos y otros alimentos, así como de la evaluación de la calidad microbiológica de los productos terminados de las cafeterías, por lo cual se decidió entonces como aspecto importante indagar la presencia de los dos patógenos bacterianos ya mencionados específicamente en carnes y vegetales crudos empleados como materia prima en trece cafeterías (las carnes crudas se han asociado a estar contaminadas con *Salmonella* spp y los vegetales crudos con *Shigella* spp).

El trabajo se dividió en dos fases de acuerdo a sus propósitos: la primera consistió en una evaluación del desempeño de varias metodologías ya existentes para encontrar cuál era la más apropiada (en términos de sensibilidad, diferencialidad para distinguir estos patógenos de otras enterobacterias y rapidez) para el aislamiento e identificación de *Salmonella enteritidis* en carnes crudas y cuál era la metodología más apropiada para *Shigella flexneri* en vegetales crudos. Para esto se emplearon las anteriores materias primas y se contaminaron de manera intencional con los microorganismos asociados a las mismas.

La segunda fase consistió en tres muestreos a las trece cafeterías del campus universitario, para encontrar naturalmente *Salmonella* spp y *Shigella* spp en carnes y vegetales crudos respectivamente, empleando para ello la metodología que resultara ser más apropiada de acuerdo a los hallazgos de la primera fase del estudio.

En la primera fase se llegó a concluir que de las cuatro metodologías evaluadas para el aislamiento e identificación de cierta especie de *Salmonella* spp, la más adecuada fue Salmosyst/Rambach y que de las dos evaluadas para investigar *Shigella* spp, la metodología Caldo GN/agar SS, MK fue la más conveniente. Posteriormente, en la segunda fase se observó que en realidad para abarcar a todos los miembros del género *Salmonella* spp, es necesario modificar la metodología de elección y que los muestreos para materias primas deben hacerse constantemente, en diferentes estaciones anuales y sin previo aviso para prevenir los posibles falsos negativos en los resultados a obtener.

En este estudio se observó que las materias primas analizadas se hallaban libres de *Salmonella* spp y *Shigella* spp, por lo que los programas de capacitación del Área de Alimentos de la Unidad de Salud han logrado que los expendedores adquieran buenas prácticas de transporte, almacenamiento y manipulación de carnes y vegetales crudos.

II. Introducción

Las enfermedades diarreicas producidas por microorganismos entéricos son consideradas a nivel mundial como la primera causa de muerte en la niñez y la segunda causa de muerte para todas las edades (después de las enfermedades cardiovasculares). En América Latina y el Caribe, los informes epidemiológicos reiteran esta afirmación puesto que dichas infecciones (que son transmitidas al ser humano generalmente a través de alimentos o agua contaminada por microorganismos patógenos) constituyen una de las primeras cinco causas de muerte en niños menores de cinco años. Entre los alimentos implicados en este tipo de padecimientos se encuentran aquellos que son expendidos (ya sea de manera ambulatoria o estacionaria) en la vía pública de áreas urbanas o bien rurales en donde existe gran concentración o desplazamiento de personas (tal como ocurre en los mercados, estaciones de buses, centros hospitalarios, plazas, parques, centros estudiantiles escolares y/o universitarios, etc.).

Entre dichas ventas callejeras, las de tipo estacionario (que incluyen a restaurantes pequeños, cafeterías y comedores) surgen principalmente en los países del tercer mundo debido al elevado grado de desempleo y a la aceptación de estos productos por parte de poblaciones muy diversas (por ejemplo oficinistas, trabajadores en construcción, estudiantes, etc.). Los propietarios de estos establecimientos usualmente son personas de clase media baja que utilizan este tipo de negocio como una forma de ganarse la vida. En Guatemala esta situación no es una excepción, a tal grado que se afirma que la clase de propietario del establecimiento determina casi siempre la clase de alimento que vende (por ejemplo, en las ventas de alimentos más "complejos", éstos son preparados por personas de tipo "ladino", mientras que en las ventas de alimentos más autóctonos, los mismos son preparados por personas indígenas).

Debido a factores socio-culturales inherentes dentro de nuestra sociedad, se sabe que la perspectiva de los propietarios consiste en darle importancia al sabor del producto final y no a las condiciones higiénicas necesarias durante la preparación del alimento ni mucho menos a la calidad de la materia prima que se va emplear (1).

Por tales razones, este estudio tuvo como propósito evaluar la presencia de dos microorganismos patógenos entéricos en materias primas que son utilizadas por las cafeterías que se hallan dentro del campus central de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Las materias primas a evaluar son específicamente carnes y vegetales crudos, debido a que de los primeros han sido asociados frecuentemente a ser vehículos de transmisión de *Salmonella* spp y los últimos se han asociado a ser vehiculadores de *Shigella* spp. Se pretendió determinar la presencia de dichos microorganismos debido no solamente porque estas materias primas constituyan por si solas una fuente de salmonelosis o de disentería bacilar, sino porque existen diversidad de factores que tienden a favorecer la multiplicación y vehiculación de estos patógenos bacterianos dentro de las mismas lo que finalmente lleva a que el producto final, que es consumido por la población estudiantil, se encuentre en riesgo de transmitir estas infecciones.

Además de lo anterior, en el estudio se estableció cuál era el procedimiento más adecuado (entre los ya existentes) para la determinación de *Salmonella* spp a partir de carnes crudas y de *Shigella* spp a partir de vegetales crudos contaminados artificialmente con cepas microbianas conocidas.

III. Antecedentes

A. Generalidades sobre las cafeterías de la ciudad de Guatemala

Dentro de la ciudad capital de Guatemala, existen varios centros de inspección y capacitación para el control de cafeterías, comedores y puestos de venta de alimentos instalados en mercados. Dichas instituciones son las siguientes: los Centros de Salud de las Áreas de Salud Guatemala Norte y Guatemala Sur, el Departamento de Registro y Control de Alimentos (DRCA) y el Departamento de Saneamiento Ambiental de la Municipalidad de Guatemala. Estas organizaciones, con el apoyo de la OMS, realizaron en 1,994 un total de 845 inspecciones a restaurantes, comedores y cafeterías ubicados en todas las zonas (excepto las zonas 14, 15, 16 y 17), encontrándose que de los 894 establecimientos, únicamente 9% de los mismos estaban en buenas condiciones sanitarias, por lo que al resto fue necesario efectuarles recomendaciones correspondientes a dichas condiciones. También se encontró que más del 85% de los manipuladores y empleados no poseen ningún tipo de instrucción sanitaria, sin embargo, el número de personas que requerían capacitación era muy elevado (solamente en la zona 1 eran aproximadamente 2,500) (2).

1. Enfermedades Transmitidas por Alimentos en Guatemala.

De acuerdo con la OMS, las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) constituyen una importante causa de trastornos de gran impacto en el rendimiento económico de las naciones latinoamericanas. Parece ser que el factor desencadenante de las mismas es la contaminación biológica de los alimentos o del agua. Gran parte de las ETAs afectan a la población infantil y las bacterias causantes de las mismas son capaces de producir de toxinas y/o invadir la mucosa intestinal. Entre los microorganismos bacterianos de mayor prevalencia mundial se encuentran los siguientes: *Salmonella* spp, *Clostridium perfringens*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella dysenteriae* y *Clostridium difficile* (3).

En el año de 1,999, el Departamento de Epidemiología del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala, reportó 212 casos de fiebre tifoidea en 17 áreas de salud y

492 casos de intoxicación alimentaria. Durante el 2,000, las ETAs fueron la segunda causa de morbilidad notificada en el país con 469,705 casos. En este mismo año también hubo un incremento de los casos notificados de intoxicaciones alimentarias (1,061) mayor de 100% con respecto al año anterior. Además se reportó que en los brotes de intoxicación alimentaria los alimentos más involucrados fueron siempre los cárnicos, los productos lácteos y los vegetales crudos. Los principales agentes identificados fueron *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli*. No se reportó ninguna información acerca de las parasitosis intestinales (4).

2. Consideraciones microbiológicas para la seguridad alimentaria

Como ya se expresó anteriormente, los riesgos microbiológicos asociados al consumo de alimentos derivan de la presencia de microorganismos patógenos causantes de ETAs. En los Estados Unidos, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), las autoridades estatales y las autoridades locales elaboran normas para la manipulación correcta de los alimentos que reducen los riesgos microbiológicos. El Centro para el Control de Enfermedades Infecciosas (CDC) se encarga de investigar cada brote de toxoinfección alimentaria registrado para establecer, no solo al agente causal y el alimento responsable, sino también para identificar los factores que conducen a su presentación. Los eventos que favorecen la aparición de un brote son los siguientes: (5)

- Presencia de microorganismos patógenos en el producto, ya sea que éste se encuentre crudo o porque se haya contaminado durante el proceso de preparación. Patógenos como *Salmonella* spp están presentes habitualmente en alimentos crudos, y de esta forma pueden llegar al producto final. En otras ocasiones, se produce una contaminación cruzada entre un alimento crudo y otro que ha sido cocinado, o que se va a consumir crudo. Esto ocurre, por ejemplo, cuando un pollo crudo contaminado se trocea en una tabla, en la cual se cortan después verduras para una ensalada. Si la superficie de la tabla no se desinfecta, se produce una contaminación cruzada (5).

- Manipulación incorrecta de alimentos precocinados congelados, refrigerados o cocinados, durante su preparación o almacenamiento. Los alimentos pueden estar contaminados con microorganismos patógenos en un número tan bajo, que no hay riesgo de enfermedad, sin embargo, si el alimento no se refrigera o si se mantiene demasiado tiempo a temperatura ambiente, los microorganismos se multiplican y alcanzan un número suficiente para originar enfermedad. La contaminación también puede producirse por prácticas de manipulación inadecuadas, tales como no lavarse las manos o no protegerse las heridas (5).
- Tratamiento térmico insuficiente o procesado incorrecto del producto. Esto se produce cuando el alimento no alcanza la temperatura suficiente para eliminar al patógeno que está presente en el mismo, lo cual puede evitarse cocinando el alimento adecuadamente o empleando materia prima libre del microorganismo patógeno (5).
- Prácticas de producción animal en las que un elevado número de animales están confinados en áreas reducidas, lo cual implica que cuando un animal elimina microorganismos patógenos, contamina fácilmente a los de su alrededor (5).
- Cuando las plantas de procesado producen un elevado número de unidades de un solo producto, existe un mejor control de los riesgos microbiológicos, pero si se produce algún fallo, el número de individuos en riesgos también se incrementa notablemente (5).

Como ya se mencionó anteriormente, la manipulación incorrecta de los alimentos puede ser responsable de las infecciones y/o intoxicaciones alimentarias, por lo cual, es importante mencionar los efectos del almacenamiento sobre los microorganismos de los alimentos (5).

a.) Congelación

Esta técnica se considera la más conveniente para la conservación de alimentos a largo plazo ya que el contenido nutricional de los mismos queda retenido y los productos se parecen

más al alimento fresco que al usar otros procedimientos. La congelación se inicia entre -0.5 y -3°C , pero si se emplean -18°C , ningún crecimiento microbiano es posible, no obstante la actividad enzimática o actividad microbiana residual no es inhibida. También es importante mencionar que al igual que en la refrigeración, el proceso puede ser que inactive parcialmente a los microorganismos, ya que aunque inicialmente la tasa inicial bacteriana disminuye, los patógenos pueden sobrevivir (de hecho, un producto peligroso no se convierte en inocuo a través de este proceso solamente). El grado de supervivencia será tanto mayor cuanto más rápido sea el proceso de congelación. Por ejemplo, la congelación rápida con N_2 líquido o con CO_2 , es menos bactericida que la congelación lenta. Por tanto, los alimentos congelados (precocinados o no) deben ser seguros microbiológicamente antes de congelarse si queremos que lo sean una vez han sido descongelados. También es importante mencionar que los alimentos congelados, al descongelarse no deben permanecer a temperaturas altas (5,6).

b.) Refrigeración

La refrigeración es un proceso de almacenamiento a temperaturas entre 0 y 5°C que modifica tanto la naturaleza como la rapidez en la aparición de la alteración de un alimento. Este procedimiento inhibe el crecimiento de los microorganismos mesófilos y conduce a que predominen los psicrótrofos y psicrófilos. No obstante, aunque son incapaces de desarrollarse, los mesófilos no son destruidos por completo por dicho proceso, ya que si bien parte de la población es eliminada y dañada por el llamado "choque frío", sus efectos son impredecibles para el resto de la población. El mecanismo principal de este choque es el daño a la membrana celular causado por cambios de fase en los lípidos de la misma, ya que se generan poros hidrófilos a través de los cuales el citoplasma se escapa al exterior de la célula. La magnitud del choque frío depende de factores tales como el tipo de organismo (los gram negativo son más sensibles que los gram positivo), su fase de crecimiento (las células que se hallan en fase exponencial son más susceptibles que las de fase estacionaria), el diferencial de temperaturas, el ritmo de enfriamiento (en ambos casos, cuanto mayor es, mayor es el daño) y el medio de crecimiento (6).

A pesar de lo anterior, el uso de materias primas de buena calidad microbiológica y la manipulación higiénica son indispensables para que los alimentos producidos sean inocuos ya que la refrigeración solamente evita el crecimiento de patógenos mesófilos, pero no garantiza que sean eliminados (6).

3. Riesgo microbiológico de los alimentos expendidos en las cafeterías de la ciudad de Guatemala

En el estudio efectuado por el DRCA en 1,994 se analizaron un total 42 muestras de las cafeterías de la ciudad capital, encontrándose que un 57% del total cumplían con las normas microbiológicas establecidas hasta la fecha. Los análisis microbiológicos efectuados fueron: coliformes totales, coliformes fecales y *Staphylococcus aureus* (2).

Los resultados obtenidos por dicho estudio se detallan en el Anexo 1 (2).

El análisis de coliformes totales y fecales se efectuó ya que estos microorganismos son indicadores de la falta de higiene en la manipulación de los alimentos, siendo los totales indicadores de fallas en la limpieza en los utensilios, mal lavado de vegetales y frutas, etc. La presencia de *Staphylococcus aureus* indica un problema directo del manipulador, ya que a excepción de los lácteos, este microorganismo proviene de heridas e infecciones de la garganta o nariz del manipulador. La presencia de este microorganismo es un riesgo para la salud y se ha comprobado que es capaz de producir intoxicación alimentaria si se halla en cantidades mayores de 10^6 UFC/g de alimento. De las 42 muestras de cafeterías, 16 provenían de cadenas grandes de comida rápida y las otras 26 de establecimientos pequeños. De estas 16, solamente 31% cumplieron con las normas microbiológicas, en cambio en las cadenas grandes, el 100% cumplió con dichas normas (2).

Al comparar lo anterior con los resultados de la Comisión Interinstitucional de Ventas Callejeras, se encontró que 60% de las muestras de alimentos tomadas de la vía pública cumplieron con las normas microbiológicas para los mismos microorganismos, por lo cual, el estudio concluyó lo siguiente: "Los resultados iniciales del análisis microbiológico parecen

indicar que los restaurantes pequeños, cafeterías y comedores pueden representar un riesgo mayor para la propagación de cólera y otras enfermedades diarreicas, que las ventas callejeras” (2).

4. Riesgo microbiológico de los alimentos expendidos en las cafeterías del campus de la Universidad de San Carlos de Guatemala

De acuerdo con los Informes de Control Microbiológico de la Unidad de Salud-Laboratorio Clínico de la Universidad de San Carlos de Guatemala, hasta 1,997 existían dentro del campus trece cafeterías que distribuían principalmente los siguientes alimentos a la población estudiantil: hamburguesas, tortillas con queso, pasteles, cóctel de frutas, refrescos, carne de res o de pollo, ensaladas, sándwiches, etc. Esta organización ha efectuado los siguientes análisis: recuento aeróbico en placa, recuento de coliformes totales. (por el método de Número Más Probable), determinación de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* spp. En el Anexo 2 se muestran algunos de los resultados obtenidos (7).

B. Niveles de aceptabilidad microbiológica para los microorganismos causales de ETAs

Los valores límite de aceptabilidad microbiológica de algunos de los agentes causales más importantes de ETAs se detallan en el Anexo 3 (3,8).

C. Salmonelosis transmitida por alimentos

1. Generalidades de *Salmonella* spp

Salmonella spp pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Es un bacilo gram negativo, asporógeno, anaerobio facultativo, catalasa positivo, oxidasa negativo y es generalmente móvil por flagelos peritricos. Es capaz de desarrollarse desde temperaturas de 5 hasta 47°C con un crecimiento óptimo a 37°C. Usualmente son termosensibles, sin embargo, la termorresistencia

aumenta por el choque térmico subletal a 48°C durante 30 minutos y también puede aumentar notablemente en medios con bajas actividades de agua (a_w). La termorresistencia en si ocurre cuando las bacterias son llevadas de una temperatura baja a una alta en un corto periodo de tiempo dentro o ligeramente por encima del rango normal de crecimiento, lo cual produce un grado de protección contra los efectos letales de un cambio de temperatura más elevado al que se expongan los microorganismos posteriormente. La a_w mínima de crecimiento de las salmonelas es de 0.93 (la a_w límite depende de la especie, ya que por ejemplo *S. newport* tiene una a_w mínima 0.941 y *S. typhimurium* tiene una a_w mínima de 0.945). El pH mínimo de crecimiento varía con el acidulante empleado, de manera que si se trata de ácido acético es de 5.40 y si es ácido clorhídrico o ácido cítrico es de 4.05 (1,6,9,10).

Este género ha sido reconocido como una de las causas principales de infecciones alimentarias. Todos los miembros del género son considerados potencialmente patógenos para el ser humano, sin embargo, difieren en cuanto a las características y a la gravedad de la enfermedad que provocan. La fiebre tifoidea es considerada como la infección más grave y fue la primera en ser descrita por Bretonneau a principios del siglo XIX. En 1,856, William Budd descubrió que cada caso de fiebre tifoidea estaba conectado con los anteriores y que a través de las heces se disemina una toxina específica. El bacilo tífico fue observado por primera vez por Eberth y Koch en 1,880 y fue cultivado por primera vez por Gaffky en 1,884. Posteriormente, en 1,896 se aisló al agente causal de una enfermedad clínicamente similar a la fiebre tifoidea, y se le denominó fiebre paratifoidea (por Achard y Bensaud y más tarde Schottmüller en 1,901). El género *Salmonella* como tal fue reconocido en 1,900 y actualmente se admite (basándose en hibridación ADN/ARN) que dicho género contiene una única especie, *Salmonella enterica* (conocida previamente como *S. cholerae-suis*) la cual incluye siete subespecies (6,11,12).

En 1,941, Kauffman y White idearon un esquema de serotipado para diferenciar a los serotipos dentro del género. Dicha diferenciación se hace en base al antígeno somático (O), el antígeno flagelar (H) y el antígeno capsular o de virulencia (Vi). A partir de este sistema, se han descrito alrededor de 2,200 serotipos (6).

a.) Mecanismo de acción

Ahora se sabe que los microorganismos ingresan por la vía oral, sobreviven el tránsito a través del ácido estomacal, invaden la mucosa intestinal y luego penetran en las células epiteliales del íleon. Después, son englobados por endocitosis mediada por receptores y pasan de las células epiteliales al interior de vacuolas, en donde se multiplican y son liberados hacia la lámina propia a través de la membrana de las células basales. Esto induce la afluencia de células inflamatorias, lo cual provoca la liberación de prostaglandinas que activan la adenilato ciclasa produciendo secreción de líquido hacia el interior de la luz intestinal (se ha comprobado también que la diarrea es debida a la producción de enterotoxinas estimuladoras de la secreción de líquido). Además se afirma que las enterotoxinas actúan aumentando la permeabilidad vascular siendo una de ellas termoestable y la otra termolábil. El microorganismo produce además una citotoxina inhibidora de la síntesis proteica, a la cual se le atribuye la lesión de las células epiteliales de la mucosa intestinal de acuerdo a experimentos efectuados en conejos sanos infectados con el microorganismo. Parece que esta lesión es provocada para exponer a la fibronectina (glicoproteína) subepitelial para que *Salmonella* spp se adhiera a la misma y así logre traspasar la mucosa intestinal (1,3,6,12).

b.) Dosis infecciosa

Varía con el serotipo, la susceptibilidad del individuo y la naturaleza del alimento consumido. Sin embargo, en el caso de adultos saludables, generalmente la dosis infecciosa es de 10^6 células por gramo de alimento, pero en niños, ancianos y adultos susceptibles la dosis puede ser menor de 10 células por gramo de alimento. Los alimentos grasos tales como los chocolates, el salami y los quesos parecen proteger a los microorganismos del efecto de los jugos gástricos, reduciendo la dosis infecciosa. No obstante, en un brote originado por agua a principios de la década de los 70, también se indicó una dosis infectiva baja (<200 células). En este caso, el agua pudo haber protegido a las bacterias al transitar más rápidamente a través del estómago que los alimentos (6,11).

c.) Epidemiología de *Salmonella* spp

Durante los últimos años ha habido un aumento epidémico de las infecciones por este género microbiano, siendo *Salmonella enteritidis* la causa más común, pero generalmente los porcentajes de casos complicados y la mortalidad son bajos (dentro de dicha especie, la subespecie *enteritidis* se considera como responsable de la mayoría de infecciones en el ser humano). La tasa de mortalidad se sitúa aproximadamente en un 4.1%. Como ya se mencionó, la enfermedad es grave en niños y ancianos, no obstante, se han reportado brotes como el de Suecia en 1,953, en donde *S. typhimurium* mató a 105 personas (1,1% de mortalidad) en edad de trabajo. En diferentes partes del mundo predominan distintos serotipos de salmonelas, pero parece ser *S. typhimurium* el tipo más frecuentemente encontrado. Sin embargo, de los 2,200 serotipos existentes, solamente unos 100 se observan de modo regular y se ha demostrado que los distintos serotipos difieren en cuanto a su virulencia para el hombre. La epidemiología de esta infección es bastante compleja, ya que el género parece afectar tanto a animales de sangre caliente como a los de sangre fría. A pesar de esto, los animales son sólo portadores que eliminan salmonelas en forma regular pero en pequeñas cantidades. Se ha determinado que una serie de factores tales como las prácticas de cría animal junto con sus sistemas de reproducción, la producción centralizada de alimentos y de piensos y el comercio internacional de alimentos contribuyen a crear ciclos de perpetuación entre el hombre y los animales (1,6,11-16).

En Estados Unidos, entre 1,973 y 1,987, se desconocía la etiología de aproximadamente 60% de las ETAs reportadas al CDC. Esto se puede atribuir a que las investigaciones de laboratorio fueron tardías o incompletas, a que no se reconoció el agente patógeno de la enfermedad, o a la incapacidad de identificar al microorganismo causal mediante las técnicas de laboratorio disponibles. Posteriormente se confirmó que entre los agentes etiológicos más frecuentes de los brotes se encontraba *Salmonella*, pero no se dio conocer el número de casos provocados por este agente. De acuerdo con los datos de la red de Vigilancia Activa del CDC, las epidemias de ETAs tienen un pico durante los meses más cálidos del año. Las razones de esto son desconocidas, pero puede ser que exista un incremento en la prevalencia de patógenos en el ganado o que exista una mayor exposición

humana a alimentos contaminados durante estos meses, o bien que exista una manipulación inapropiada mayor (por ejemplo, mayor abuso de temperatura) o que se cocinen de manera incompleta los productos durante estas épocas del año. Sin embargo, esto parece estar relacionado con otros patógenos diferentes a *Salmonella* spp, tales como *Campylobacter* spp y *Escherichia coli* (15,17).

En Inglaterra y en Gales, en 1,989 se presentaron más de 26,000 casos reportados de salmonelosis, de los cuales 56% se debieron a *S. enteritidis*. De manera similar, en los últimos años han aumentado los brotes de infección alimenticia por este microorganismo en Holanda, Noruega, Alemania, Austria, España y Portugal. Actualmente, En Estados Unidos, la proyección de la información epidemiológica del CDC estima anualmente una incidencia de 2 millones de casos clínicamente significativos. De estos, el número de casos anuales (desde 1,988 a 1,995) reportados de salmonelosis en dicho país excluyendo la fiebre tifoidea varía entre 40,000 y 50,000 (11,13,18).

En Guatemala, durante el año 2,000, *Salmonella* spp se encontraba entre los agentes microbianos principales identificados como causales de ETAs. Durante 1,999 se reportaron 212 casos de tifoidea por 17 áreas de salud. Seis de estas áreas aportan 80% del total de casos: Santa Rosa (21,4%); Suchitepéquez (20,4%); Sacatepéquez (11,7%); Quetzaltenango (9,2%) y Escuintla (9,2%) (4).

2. Infecciones y complicaciones producidas por *Salmonella* spp

De acuerdo a la sintomatología clínica que provoca, el modo de difusión y la patogenia algunos autores consideran dividir la salmonelosis en dos grupos principales: (a) fiebres tifoideas y paratifoideas (que son producidas por *S. typhi* y *S. paratyphi* A, B, y C) e (b) infecciones entéricas producidas por otras salmonelas. El primer grupo afecta casi de manera exclusiva a los primates y la infección se adquiere a través de alimentos, agua y por contacto directo. La fiebre tifoidea tiene un periodo de incubación que puede ser desde 3 a 56 días (que usualmente es de 10 a 20). El cuadro clínico está caracterizado por septicemia sin enteritis (la enfermedad sistémica es producida por los serotipos adaptados al hospedador que son más

invasivos), fiebre y un estado de portador asintomático que puede perdurar toda la vida. El segundo grupo produce una infección gastrointestinal, que puede complicarse por septicemia o localizaciones externas al tracto intestinal. Se caracteriza por fiebre, diarrea, dolores intestinales y vómito. Los síntomas pueden variar desde un ligero malestar hasta una deshidratación grave. El periodo de incubación puede ser desde 6 a 48 horas y la infección suele ser autolimitante, pero puede ser más grave en personas susceptibles o en las ya enfermas (6,12).

En la enfermedad septicémica, *Salmonella* spp llega a la vesícula biliar, en donde se multiplica infectando la bilis, la cual reinfecta el intestino delgado causando inflamación y ulceración en éste último. El individuo afectado padece de fiebres y diarrea (que ha sido descrita por su aspecto como “sopa de guisantes”) en la que se excretan grandes cantidades del microorganismo. En los casos graves de enfermedad se produce hemorragia a partir de las úlceras, con perforación del intestino que causa peritonitis, sin embargo, en los casos más benignos, las úlceras se curan, la fiebre desciende y la infección remite de 4 a 5 semanas (6).

Además de lo anterior, se ha reportado también que *Salmonella* spp puede provocar complicaciones tales como aortitis, colecistitis, endocarditis, epidídimo-orquitis, meningitis, miocarditis, osteomielitis, pancreatitis, enfermedad de Reiter, síndrome reumatoide, septicemia, tiroiditis y artritis séptica (en personas con anemia drepanocítica). Es posible también que el microorganismo se sitúe en lugares en los que existe una enfermedad o lesiones anteriores (6,17).

3. Alimentos implicados en las infecciones producidas por *Salmonella* spp

Casi todos los alimentos de origen animal (principalmente carnes de res, cerdo y aves, además de huevos y productos industrializados que contienen cualquiera de estas materias primas básicas) pueden ser vehículo de transmisión de salmonelas al ser humano. Se considera además que las aves de corral y sus derivados constituyen la fuente más importante de infección por este género bacteriano. Por tal razón se ha ideado el programa de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control (HACCP) con el propósito de evaluar y reducir la contaminación en dichos alimentos (6,12,13,19).

Los alimentos de origen vegetal tales como los cereales o vegetales para ensaladas, las frutas frescas e incluso (en casos excepcionales) los colorantes de carmín y los productos farmacéuticos también son capaces de vehicular a este patógeno, aunque los brotes en estos casos han sido por contaminación accidental (por ejemplo, para los vegetales, la fuente de transmisión ha sido el agua de riego durante el cultivo, el estiércol de animales usado como abono, etc.). También se sabe que alimentos tales como la levadura, las salsas, los aderezos, las semillas de coco, los pasteles, los postres con crema, la gelatina desecada, la mantequilla de maní, la cocoa y los chocolates son posibles vehículos de transmisión de *Salmonella* spp (12,13,20,21).

La infección es considerada zoonótica debido a que la fuente principal de la misma son los animales infectados. La transmisión feco-oral ocurre cuando el contenido intestinal de un animal infectado es ingerido con un alimento o agua. Los portadores humanos son menos importantes que los animales en la transmisión de la infección, sin embargo, como se mencionó en el inciso III.A.2, puede haber infección si las manos contaminadas fecalmente de un manipulador tocan el alimento, éste es cocinado inapropiadamente y se permite el crecimiento microbiano (6).

Un factor importante en el mantenimiento del ciclo de la infección por *Salmonella* es la costumbre de emplear subproductos animales, tales como carne y harina de huesos, para alimentar a los mismos animales. Estos piensos aparentemente son sometidos a tratamiento térmico, no obstante, después de dicho tratamiento pueden estar expuestos a contaminación por contacto con materias primas no tratadas o bien heces de aves y roedores (6).

Entre los materiales crudos con más probabilidades de estar contaminados se encuentran las canales de gallinas o de pavos, la carne cruda, los embutidos, la leche cruda, los mariscos, las especias y las hierbas. Se ha aislado a algunos serotipos de *Salmonella* spp a partir del exterior de la cáscara de huevos o en la yema de los mismos, como en el caso de *S. enteritidis*, en donde aparentemente el huevo se infecta por transmisión vertical. El problema parece estar relacionado con el fago PT4 de *S. enteritidis*, pero se han informado otros fagotipos

(PI8 y PI13a). Se piensa que estos organismos infectan los ovarios y el oviducto de las aves, contaminando de este modo el contenido del huevo (6,11,13-15).

La leche fresca contiene inevitablemente *Salmonella* spp a tal grado que, el microorganismo puede estar presente incluso si es la misma es pasteurizada con tratamientos suaves. Las salmonelas son incapaces de crecer pero si sobreviven en la leche desecada y reanudan su crecimiento al reconstituir el producto (6).

Alimentos tales como el pescado y sus derivados, se han relacionado con *Salmonella* spp de manera accidental (por ejemplo, por contaminación con heces de roedores o de aves). Los mariscos, que se alimentan por filtración y que son capturados en aguas contaminadas han sido implicados también como productos de riesgo (6).

4. Supervivencia de *Salmonella* spp en alimentos

a.) Calentamiento

Como ya se mencionó III.C.1, las salmonelas son termosensibles, ya que la pasteurización y las condiciones normales de cocimiento generalmente son suficientes para que pierdan su viabilidad y sean destruidas si el alimento posee una elevada a_w , pero si la a_w es baja, aumenta su termotolerancia. Así, el valor D para *S. enteritidis* a 55°C es de aproximadamente 8.2 minutos, y para *S. typhimurium* es de 3.3 minutos. *S. senftenberg* es generalmente más termorresistente, ya que su valor D a 57°C es de aproximadamente 31 minutos o 1 a 2 segundos a 71.7°C. También se sabe que hay interacción entre la resistencia térmica del microorganismo y el pH del alimento para diferentes serotipos. Incluso, se ha verificado que la resistencia al calor aumenta conforme disminuye la a_w y que esto también depende de la concentración lipídica del alimento (1,10,11).

b.) Desecado

El microorganismo puede sobrevivir largos períodos en alimentos secos tales como la leche en polvo, sin embargo, la tasa de muerte microbiana durante el almacenamiento del material deshidratado depende de la humedad relativa y la atmósfera de almacenaje. Si la humedad es baja, el microorganismo puede permanecer vivo durante años en alimentos tales como los chocolates, por ejemplo (11).

c.) Congelamiento

Como se mencionó en III.A.2.a.), el congelamiento puede ser letal, sin embargo, las salmonelas pueden permanecer viables durante largos períodos de tiempo en alimentos congelados tales como carne y pollo. Incluso, se ha logrado desarrollar un modelo predictivo del crecimiento de *Salmonella* en el tejido de la carne de res durante su enfriamiento con el propósito de comprender la cinética de crecimiento de este microorganismo bajo condiciones ambientales cambiantes (11,22).

d.) Tolerancia al NaCl

Se ha reportado que en la carne con un 5.3% o más de NaCl existe crecimiento limitado de este microorganismo (11).

e.) Irradiación Gamma

Este método es empleado para preservar alimentos. Parece fragmentar el ADN y matar a los microorganismos, sin embargo parece ser que algunos factores tales como el tamaño celular, el arreglo estructural del ADN dentro de la célula, la composición química del alimento (el contenido de grasa y proteínas), la temperatura de irradiación, la a_w y el estado fisiológico de las células afectan la resistencia de este microorganismo a dicho método de preservación (23).

5. Planes de muestreo para la determinación de *Salmonella* spp en carnes crudas

Debido a la continua presencia de *Salmonella* spp en alimentos, diversos comités de organizaciones internacionales han recomendado asignar una categoría de muestreo para cada tipo de alimento, dependiendo de: a.) la sensibilidad del consumidor (si son ancianos, enfermos o infantes) b.) la posibilidad de que el alimento haya sufrido un paso letal para *Salmonella* spp durante su fabricación y c.) el historial del alimento. La selección del plan de muestreo depende principalmente de los primeros dos criterios. Para el muestreo de este microorganismo, existen tres tipos de categorías de alimentos:

- Los alimentos de categoría I son aquellos que normalmente no estarían sujetos a un proceso letal para *Salmonella* spp entre el tiempo de muestreo y el consumo, y son fabricados para ancianos, enfermos o niños.
- Los alimentos de categoría II son aquellos que normalmente no estarían sujetos a un proceso letal para *Salmonella* spp entre el tiempo de muestreo y el consumo.
- Los alimentos de categoría III son aquellos que estarían sujetos normalmente a un proceso letal para *Salmonella* spp entre el tiempo de muestreo y el consumo.

Estos planes de muestreo se aplican ya sea para productos terminados bajo vigilancia o para materia prima de fábrica identificable en lotes. La unidad de muestra debe poseer un mínimo de 100 gramos y se recomienda que se tome al azar para que sea representativa del lote. El número de unidades de muestra a tomar depende de la categoría del alimento, de manera que, para los alimentos de categoría I, se recomiendan 60 unidades de muestra, para la categoría II 30 unidades y para la categoría III 15 unidades. Todas estas muestras deben ser analizadas. Este análisis requiere de 25 g de la unidad analítica tomada al azar a partir de los 100 g originales. Para reducir la carga analítica, las unidades analíticas pueden volverse compuestas, dependiendo de la categoría del alimento. El tamaño máximo de una unidad compuesta es de 375 g o 15 unidades analíticas. Para los alimentos de categoría I, se recomienda un mínimo de 4 unidades compuestas, para los de categoría II se recomienda como mínimo 2, para los de categoría III se recomienda mínimo una unidad compuesta (12,24).

a.) Carnes rojas

Para recoger muestras de carne cruda es necesario separar cuidadosamente y sin tocar la carne, las envolturas que cubran la canal o los envases. Los procedimientos de muestreo para este tipo de materia prima se subdividen en tres de acuerdo al tipo de carne:

- Canales y cortes primarios: En este y otros criterios, el número de muestras a tomar (n) es igual a 5. Para las canales refrigeradas o congeladas y en las piezas con huesos largos o deshuesadas, se toman alícuotas de 5 canales o 5 envases con las piezas cárnicas (unidades de muestra). Cada alícuota debe tomarse de diferentes partes de la canal o de la pieza debido a que la contaminación de la carne es desigual, por lo que deben considerarse particularmente las zonas donde el crecimiento microbiano es más frecuente o donde la contaminación sea más factible. Las alícuotas de una misma canal pueden juntarse y formar una única unidad analítica o bien, pueden tratarse por separado como unidades analíticas independientes. Puesto que generalmente la contaminación microbiana de la canal o de las piezas es superficial, debe considerarse la hora de toma de muestra. Si se trata de carne de cordero o de cerdo, deben tomarse muestras, con hisopo, de al menos 2 lugares (pierna y pecho). Si es carne de vacuno o de equino, deben tomarse al menos 3 muestras (pierna, falda y cuello). Para las piezas cárnicas se debe incluir la superficie original de la pieza y una superficie de corte (25).
- Carne deshuesada a granel, carne picada y despojos comestibles: De cada uno de los 5 envases o cajas se toma una unidad de muestra de aproximadamente 200 gramos de tejido muscular. Esta unidad debe estar compuesta por diferentes alícuotas de diversas partes del contenido del envase. Estas porciones deben mezclarse homogéneamente y conformar la unidad analítica apropiada para el análisis (25).
- Envases para venta al detalle: Esta categoría incluye los cortes cárnicos, la carne picada y los despojos refrigerados o congelados que son envasados en paquetes para la venta al detalle. Aquí también es obligatorio el análisis de 5 envases por lote (25).

Si se desea investigar *Salmonella* spp, se requiere de una unidad analítica de 25 gramos.. Las unidades de muestreo deberán tomarse de zonas apropiadas de la canal, de las piezas o de los despojos, de acuerdo a lo expuesto anteriormente (25).

b.) Carne de aves

Los programas actuales de muestreo para carnes de ave especifican que n sea igual a 5, que m sea igual a 0 (siendo m el valor umbral del número de bacterias para considerar un resultado satisfactorio si todas las unidades de que se compone dicha muestra tienen un número de bacterias igual o menor que m) y que c sea igual a 0 (en donde c es el número de unidades de la muestra cuyo número de bacterias podrá situarse entre m y M , sin que la muestra deje de considerarse aceptable si las demás unidades de que se compone la misma tienen un número de bacterias menor o igual a m) (25).

6. Métodos de aislamiento e identificación de *Salmonella* spp en carne cruda

Los métodos de aislamiento e identificación de este microorganismo en alimentos han sido objeto de mayor cantidad de estudios que los correspondientes a cualquier otro microorganismo patógeno. Los procedimientos convencionales de aislamiento e identificación de *Salmonella* spp a partir de alimentos (incluyendo carnes crudas) constan de seis etapas. Las primeras 3 etapas se refieren al aislamiento y las últimas 3 se refieren a la identificación. (6,12,15).

a.) Enriquecimiento no selectivo o pre-enriquecimiento

Esta etapa varía para cada tipo de alimento, ya que a partir de 1,961 se inició el uso de Caldo Lactosado (CL) en clara de huevo desecada, sin embargo, después de diversos estudios se concluyó que la composición de dicho medio no era tan crítica como se suponía, por lo cual se decidió el uso de agua peptonada bufferada. (BPW o APB) (Edel y Kampelmacher, 1,968) como medio de cultivo para propósitos generales. Después se decidió que el caldo nutritivo (NB o CN) también podía usarse para propósitos generales, pero para algunos alimentos puede

emplearse incluso agua destilada (levadura desecada). Para las carnes crudas puede emplearse ya sea APB o CN (6,12,26).

El objetivo de esta fase es favorecer la reparación y el crecimiento de las salmonelas que han sido dañadas por las diferentes condiciones de tratamiento o de almacenamiento al que pudo haber estado sometido el alimento previo al análisis (calor, congelación, desecación, presencia de preservantes, presión osmótica elevada o fluctuaciones de temperatura). La importancia de esta fase radica en que si no se incluyera, no se detectarían células recuperables que pueden causar infección si el alimento es manipulado incorrectamente (6,12,26).

b.) Enriquecimiento selectivo

En esta etapa se inocula el cultivo pre-enriquecido en III.C.6.a.) en un medio de enriquecimiento con el fin de favorecer la proliferación de *Salmonella* spp al provocar una represión selectiva o inhibición del crecimiento de otros microorganismos competitivos tales como los coliformes, *Proteus* y *Pseudomonas* que de estar presentes en el alimento analizado, superarían a *Salmonella* spp. Algunos procedimientos recomiendan emplear más de un caldo selectivo y una temperatura igual a 43°C para garantizar el aislamiento posterior de las salmonelas. Como medios de cultivo se recomienda usar el caldo Selenito-Cistina (SC) y el Tetrionato Verde Brillante (TTVB). De acuerdo a los estudios efectuados por la AOAC, el caldo Rappaport-Vassiliadis (RV), que contiene como agentes selectivos verde de malaquita, cloruro magnésico y un pH ligeramente reducido, se empezó a usar solamente para el análisis de alimentos con una alta carga de microbiota competitiva (tales como los mariscos), sin embargo, se ha establecido que este caldo puede reemplazar al caldo SC ya que puede emplearse tanto para alimentos con alta o baja carga microbiana. Sin embargo, se ha recomendado que el caldo TTVB permanezca como segunda elección para alimentos de alta o baja carga microbiana (excepto que el TTVB se incubará a 43°C para alimentos con alta carga microbiana y a 35°C para alimentos con baja carga microbiana) (6,12,24,26).

c.) Estriado en medios sólidos selectivos y diferenciales

En esta fase también es habitual emplear dos medios diferentes. Los agares selectivos poseen sustancias que inhiben el crecimiento de otros microorganismos. Entre dichas sustancias se encuentran las sales biliares o el desoxicolato (inhibidor de microorganismos gram positivo), el verde brillante, etc. Estos medios también poseen indicadores que colorean las colonias o el medio que las rodea, para diferenciar caracteres bioquímicos de las Unidades Formadoras de Colonias que crezcan en él. Así, *Salmonella* spp generalmente es incapaz de fermentar la lactosa y es capaz de producir sulfuro de hidrógeno, por lo que se recomienda el uso de dos medios sólidos selectivos y diferenciales distintos para evidenciar estas reacciones presuntivas. No obstante, el uso de altas concentraciones de inhibidores no es deseable para que la recuperación sea máxima. Existen al menos ocho medios sólidos producidos comercialmente para el crecimiento y diferenciación de *Salmonella* spp de otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Entre los medios sólidos empleados se encuentra el agar Sulfito de Bismuto (SB) (en el que se observan colonias marrones o grises a negro, a veces con brillo metálico, siendo el agar de elección para *Salmonella typhi*), el agar *Shigella Salmonella* (SS) (en donde se observan colonias negras por la producción de sulfuro de hidrógeno que posteriormente reacciona con el hierro, formando sulfuro de hierro), el agar MacConkey (MK) (donde se observan colonias incoloras, sin embargo, pueden presentarse biotipos lactosa positivo que aparecen de color rosado), el agar Verde Brillante Sulfadiazina (donde se observan colonias incoloras, rosadas o fucsia rodeadas por un color rosado a rojo), el agar Hektoen (colonias azul-verde a azules con o sin centro negro o completamente negras), el agar Rambach (colonias rojas brillantes, excepto *S. typhi* que es incolora), agar Lisina-Manitol-Glicerol (LMG) (para salmonelas atípicas que fermentan la lactosa y *S. typhi*), etc (6,12,26-29).

d.) Purificación

En esta etapa se purifican los aislamientos presuntivos de III.C.6.c.) en placas de agar MK (26).

e.) **Confirmación bioquímica básica**

Esta etapa consiste en inocular una colonia sospechosa de III.C.6.d.) en los medios para evidenciar características bioquímicas que se muestran en el Anexo 4 (24,26,27).

f.) **Identificación serológica**

Para identificar tentativamente a la *Salmonella* spp aislada, se emplean antisueros polivalentes (para el grupo O y para H) o somáticos (para determinar el grupo O al que pertenece la *Salmonella* aislada) (12,26).

g.) **Nuevas metodologías de determinación e aislamiento**

Debido a que el procedimiento convencional ya mencionado requiere de tres a seis días para obtener un resultado de ausencia o presencia, se han descrito otros procedimientos para simplificar la técnica y reducir el tiempo para obtener resultados. Entre estos métodos se hallan aquellos que incluyen medios semisólidos, ensayos inmunoabsorbentes (ELISA tales como el kit *Salmonella* TEK), inmunodifusión, técnicas de impedancia-conductancia e hibridización de ADN (6,19,30).

De acuerdo con Fignato, et al (16), el uso del caldo Salmosyst y el agar Rambach como método rápido de detección de *Salmonella* spp puede reducir el tiempo total de análisis a solamente 48 horas. El caldo base Salmosyst de pre-enriquecimiento que emplea esta metodología contiene únicamente nutrientes, electrolitos y sustancias reguladoras del pH y en él se efectúa un pre-enriquecimiento rápido de 6 a 8 horas para posteriormente agregar un suplemento que proporciona selectividad al caldo para luego incubar de 18 a 22 horas más. Posterior a esto, se utiliza agar Rambach como medio sólido selectivo. Este medio ha sido formulado para distinguir *Salmonella* spp de otras enterobacterias debido a la capacidad de las primeras de producir ácido a partir del propilen-glicol y debido a la capacidad de las últimas (mientras puedan utilizar la lactosa) de producir la β -galactosidasa. Sin embargo, algunas salmonelas son capaces de producir β -galactosidasa (subespecies IIIa, IIIb y V) y pueden ser

pasadas por alto, además de que se ha dado el caso de que algunos microorganismos β -galactosidasa negativos tales como *Citrobacter freundii* dan resultados falsos positivos (16,28,31).

Al comparar este método rápido con uno de los métodos convencionales (en el cual se empleó como medios de cultivo APT para el pre-enriquecimiento, caldo TTVB y caldo SC para el enriquecimiento selectivo, y agar Verde Brillante y agar Lactosa Desoxicolato Citrato para el estriado en medios sólidos) en muestras de carnes crudas contaminadas artificialmente se demostró que ambos métodos eran capaces de detectar al menos 0.4 UFC de *S. enteritidis* por gramo de alimento. Sin embargo, en alimentos contaminados naturalmente, incluyendo carnes de res, pollo, cerdo y caballo, el método rápido mostró una sensibilidad más alta (97.9%) que el método convencional (81.2%) (16).

Para ayudar a identificar salmonelas típicas y atípicas al utilizar estos procedimientos, se ha recomendado utilizar cepas American Type Culture Collection (tales como las ATCC 12325, 9842 y 29934) (24).

D. Shigelosis transmitida por alimentos

1. Generalidades de *Shigella* spp

Los microorganismos del género *Shigella* spp son bacterias bacilares gram negativo, aerobias o anaerobias facultativas, mesófilas, no formadoras de esporas, catalasa positivo (a excepción del bacilo de Shiga o *Shigella dysenteriae* serotipo I), oxidasa negativo, inmóviles (aunque recientemente se ha postulado un modelo que propone que *Shigella* spp posee un gen *icsA*, necesario para movilizarse intracelularmente por medio de una "cola impulsora" de actina) y pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Todas son oxidasa negativo, no producen gas a partir de la glucosa y son incapaces de fermentar la lactosa (excepto algunas cepas de *Sh. sonnei*) al igual que *Salmonella* spp. El género comprende solamente cuatro especies: *Shigella dysenteriae* (subgrupo A), *Shigella flexneri* (subgrupo B), *Shigella boydii* (subgrupo C) y *Shigella sonnei* (subgrupo D). Todas estas especies son consideradas patógenas para el hombre, pero se distinguen en la gravedad de la infección que provocan. Por ejemplo, *Sh. dysenteriae* provoca

una disentería grave en países tropicales, *Sh. sonnei* causa la enfermedad más benigna y *Sh. boydii* junto con *Sh. flexneri* provocan una enfermedad intermedia. El género fue descubierto como el agente etiológico del de la disentería en 1,898 por el microbiólogo japonés Kiyoshi Shiga (6,12,24,32,33).

Shigella spp es relativamente inactiva desde el punto de vista bioquímico si se compara con especies de *Escherichia*, no obstante, los estudios de ADN han demostrado que pertenecen al mismo género. Pese a esto, los microorganismos se mantienen separados porque a diferencia de *Escherichia*, la mayoría de cepas *Shigella* son patógenas. Las shigelas son consideradas lábiles, ya que no sobreviven fuera del intestino de los seres humanos y de otros primates, pero se encuentran frecuentemente en agua contaminada con heces fecales. Su temperatura óptima de crecimiento varía de 10 a 45°C y su termosensibilidad es similar a la de los otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Crecen mejor dentro de la escala de pH de 6 a 8 siendo su pH mínimo de crecimiento igual a 4.5. Aun no se conoce su a_w mínima de crecimiento, pero se supone que es de 0.95 (6,9,34).

a.) Mecanismo de acción

El microorganismo logra sobrevivir al tránsito a través del intestino delgado, los efectos gástricos, las sales biliares y los enzimas pancreáticos por medio de una envoltura "lisa" compuesta por lipopolisacáridos. Las cepas "rugosas" son más sensibles a las sales biliares y son incapaces de invadir la mucosa *in vitro* en el asa intestinal del conejo, aun cuando se expresen todos los genes responsables del fenotipo invasivo. La disentería bacilar es causada por un mecanismo invasivo, en donde los microorganismos se adhieren y penetran las células epiteliales del intestino grueso y se multiplican en su interior. Este mecanismo de invasión depende de la presencia de proteínas de la membrana externa, que son hidrolizadas por los enzimas pancreáticos durante el paso por el intestino delgado, lo cual inactiva temporalmente al microorganismo. Al llegar al colon, las shigelas se hallan en un ambiente reductor en el cual deben competir con la flora residente para fuentes disponibles de carbono, lo cual provoca que se exprese el fenotipo invasivo y que escapen del lumen hacia el nicho intracelular, en donde la glucosa de la sangre del hospedador constituye la fuente de carbono apropiada (32,34).

Después de la invasión, se esparcen a las células epiteliales contiguas, lo cual destruye el tejido. Algunas cepas producen enterotoxinas (de hecho se sabe que son dos, la ShET-1 y la ShET-2) y la toxina de Shiga (que es una exotoxina similar a la Verotoxina de *Escherichia coli* O157:H7), la cual parece jugar un papel en la inhibición de la síntesis de proteínas de la célula hospedadora, no obstante, hay cepas de *Sh. dysenteriae* 1 incapaces de producir esta toxina y aun así, provocan disentería, por lo cual, no se sabe todavía la función exacta de dicha toxina. La virulencia de las shigelas depende de genes como el plásmido de 120 MDa de *Sh. sonnei* y el de 140 MDa de otras shigelas, ya que estos genes portan la información necesaria para la síntesis de proteínas de membrana externa necesarias para la invasión (6,32,34,35).

b.) Dosis infecciosa

El microorganismo es transmitido a través de la vía fecal-oral. Se ha determinado, a partir de individuos voluntarios, que la dosis infecciosa se encuentra en el orden de 10 a 100 organismos, dependiendo de la edad y la condición del hospedador (6,34).

c.) Epidemiología

En todo el mundo, se estima que la shigelosis provoca entre 600,000 a 1.1 millones de muertes por año. De este número, dos tercios son niños menores de 10 años de edad. *Shigella dysenteriae* y *Shigella flexneri* son las especies predominantes en los países tropicales y *Shigella sonnei* es la especie predominante en los países industrializados. Así por ejemplo, las infecciones por *Sh. sonnei* en Inglaterra y el País de Gales fueron 2,319 en 1,989 y 2,228 en 1,990. En 1,991 las infecciones ascendieron a 9,830 casos. En Estados Unidos, durante los últimos años el número de casos ha oscilado entre 300,000 y 400,000 (6,36-38).

Este género ha sido identificado como uno de los agentes causales más frecuentes de enfermedad diarreica aguda en niños que viven en países en vías de desarrollo. En Centro América, el bacilo de Shiga (*Sh. dysenteriae* tipo I) afectó en forma pandémica desde el año 1,969 hasta 1,972. En Guatemala, hubo más de 112,000 casos y al menos 10,000 muertes. La epidemia afectó sin distinción de edades, pero las tasas de incidencia y mortalidad más elevadas

se dieron en niños pequeños. La tasa de mortalidad fue del 7.4%. Muchos de los casos fueron confundidos con amebiasis, y el tratamiento con medicamentos anti-amebianos contribuyó en la elevada mortalidad. Posteriormente, hubo complicaciones mayores debido a la resistencia de la cepa de *Sh. dysenteriae* tipo I al sulfatidiazol, al cloranfenicol y a la tetraciclina. Desde 1,972, no se han presentado epidemias tan graves de disentería causada por el bacilo de Shiga en toda Centro América, sin embargo, en 1,991 se presentaron casos en la ciudad capital de Guatemala y en Rabinal (Baja Verapaz) que fueron confundidos con amebiasis tal como ocurrió en 1,969, sin embargo, se efectuaron cultivos microbianos para facilitar el diagnóstico y tratamiento apropiado. Debido a que el bacilo de Shiga fue aislado en dos lugares separados por más de 100 kilómetros de distancia se sugirió que este patógeno podría haber estado presente en otras áreas del país (39,40).

2. Infecciones y complicaciones producidas por *Shigella* spp

Shigella spp produce una disentería con un período de incubación de 7 horas a 7 días, aunque los brotes transmitidos por alimentos se caracterizan por poseer periodos de incubación de hasta 36 horas como tiempo máximo. Los síntomas consisten en dolor abdominal, vómitos, tenesmo, fiebre y diarrea que puede variar desde un síndrome disentérico clásico con deposiciones sanguinolentas con mucosidad y pus (como en los casos de *Sh. dysenteriae*, *Sh. flexneri* y *Sh. boydii*) hasta una diarrea acuosa cuando se trata de infección por *Sh. sonnei*. No obstante, pese a que *Shigella dysenteriae* provoca disentería, parece ser que las enterotoxinas hacen que el enfermo experimente antes de la disentería una diarrea acuosa. La enfermedad puede durar desde 3 hasta 14 días y se puede desarrollar un estado de portador que puede persistir durante meses. Las formas benignas de la infección son autolimitantes, por lo cual no es necesario el tratamiento, sin embargo, las infecciones por *Shigella dysenteriae* requieren terapia antimicrobiana y de sustitución de líquidos y electrolitos. Esta última especie produce complicaciones tales como el síndrome urémico hemolítico, convulsiones, sepsis y megacolon tóxico. En países desarrollados se han reportado casos de shigelemia (septicemia causada por miembros del género *Shigella* spp) debida a que las defensas del hospedero se encuentran comprometidas (6,34,35,41).

3. Alimentos implicados en las infecciones producidas por *Shigella* spp

Al comparar la shigelosis como ETA con otras infecciones, tales como la salmonelosis por ejemplo, el problema parece ser insignificante debido a la limitada gama de hospedadores de este microorganismo. *Shigella* spp como agente causal de ETA proviene usualmente de la persona portadora que interviene en la preparación del alimento implicado. También, en zonas donde la eliminación de aguas residuales es inadecuada, la infección puede ser transmitida a través de insectos que están en contacto con las heces. Entre los alimentos asociados a la infección por esta bacteria, se encuentran las ensaladas (de papa, lechuga, atún, camarón, macarrones y pollo), los vegetales crudos, la leche (y sus derivados) y las aves. Algunos brotes se han producido debido a que estos alimentos no son cocidos y son sometidos a una manipulación abundante (6,21,34,38,41,42).

Muchas de las hortalizas que no se cocinan antes de su consumo, son envasadas, refrigeradas o congeladas para consumirse directamente en forma de ensaladas, lo cual hace que el alimento se encuentre en un riesgo mayor de contaminación que las hortalizas crudas íntegras. Normalmente, *Shigella* spp no se encuentra en las hortalizas frescas previo a su recolección, excepto en los casos en los que se fertiliza el producto con residuos animales, residuos humanos o con aguas contaminadas con dichos residuos (bajo estas condiciones, estudios han demostrado que patógenos como *Shigella* spp pueden sobrevivir hasta dos meses). La contaminación también puede ocurrir por el uso de recipientes sucios para la preparación de las hortalizas. Parece ser que la supervivencia de patógenos como *Shigella* spp puede ser prolongada (semanas o meses) especialmente si las áreas de cultivo son húmedas o protegidas de la desecación y de los rayos del sol (como en el caso de la lechuga, el repollo, la zanahoria y el rábano). Además es lo anterior, importante mencionar que las hortalizas crudas pueden ser una vía de entrada de *Shigella* spp en las plantas de procesado y en las cocinas, pudiendo contaminar otros alimentos (25,43).

Por tales razones, es importante seguir prácticas agrícolas adecuadas en el cultivo, recogida, envasado y transporte de estos productos a través del conocimiento sobre la fertilización, irrigación, recolección y prácticas de lavado en las áreas de producción (25).

4. Supervivencia de *Shigella spp* en vegetales crudos

En general, patógenos tales como *Shigella spp* no crecen en la superficie externa de vegetales frescos (esto es, si dichas superficies se hallan íntegras, ya que no poseen las enzimas necesarias para destruirlas) debido al carácter protector de las barreras naturales de las plantas. En algunos casos, los niveles de patógenos declinan en la superficie externa por falta de nutrientes y de humedad libre, fluctuaciones de temperatura y por la presencia de luz ultravioleta. De hecho, las condiciones ambientales influyen de manera importante en las poblaciones bacterianas, debido a que generan un ambiente selectivo para los microorganismos capaces de adaptarse a condiciones de estrés. Puesto que muchos de los patógenos bacterianos que afectan al hombre son de origen entérico, éstos tienden a fracasar al tratar de colonizar las plantas con poblaciones microbianas ya adaptadas. No obstante, después de la cosecha, los patógenos son capaces de sobrevivir en vegetales frescos (aunque no crezcan), especialmente si la humedad es elevada. Esta supervivencia puede incrementarse una vez la barrera epidérmica ha sido dañada físicamente o degradada por patógenos de las plantas (bacterianos o fúngicos). Estas condiciones promueven la multiplicación de patógenos (especialmente a temperatura ambiente), sin embargo, es posible que los microorganismos sobrevivan a temperaturas de refrigeración aun cuando estas condiciones reduzcan o eliminen su capacidad de multiplicación. Así, se ha reportado que *Shigella sonnei* es capaz de sobrevivir en la lechuga a 5°C por tres días sin disminuir su población, pudiéndose incrementar dicha población 1,000 veces más a 22°C. También se ha demostrado que *Shigella spp* puede crecer en el repollo a 24°C y a 25 o 37°C en papas maceradas. *Sh. flexneri* y *Sh. sonnei* pueden sobrevivir durante más de 170 días en otros alimentos como la harina o leche y por menos tiempo en alimentos muy ácidos (12,44,45).

5. Métodos de aislamiento e identificación de *Shigella spp* en vegetales crudos

Shigella spp es difícil de aislar a partir de alimentos debido a la falta de sensibilidad de los protocolos desarrollados y a que, en contraste con *Salmonella spp*, se han efectuado muy pocos trabajos con respecto a medios de cultivo y de enriquecimiento específicos para shigelas

tanto para muestras clínicas como para muestras de alimentos, ya que este agente es inhibido por microorganismos menos sensibles que pueden estar presentes en los alimentos. De acuerdo con algunos autores, los procedimientos rutinarios de análisis microbiológico en hortalizas crudas no suelen reducir los riesgos de *Shigella* spp, por lo cual no se recomiendan. Sin embargo, puede ser conveniente una inspección rigurosa de los alimentos cuando exista una sospecha de este microorganismo o bien de haber sido obtenidos en condiciones higiénicas insatisfactorias (12,34,46).

El procedimiento convencional que existe para el aislamiento e identificación de *Shigella* spp en alimentos se basa en un enriquecimiento previo para resucitar a los microorganismos en un medio no selectivo antes de utilizar medios selectivos. Se ha recomendado un enriquecimiento selectivo que puede efectuarse en caldo para organismos gram negativo (GN), en caldo Selenito o en caldo *Shigella* spp con Novobiocina como agente selectivo. Otras fuentes de selectividad para el desarrollo del microorganismo son: el uso de condiciones anaeróbicas (para inhibir a los microorganismos aeróbicos que puedan estar presentes en el alimento) y la incubación de las jarras anaeróbicas a 44°C. Los medios sólidos selectivos de identificación posterior son los mismos que se emplean para el recuento de enterobacterias o *Salmonella* spp (agar MacConkey, XLD, SS, medio entérico Statens Serum Institut (SSI), etc.) aunque no se consideran completamente satisfactorios (6,12,24,47).

Dependiendo de las características del crecimiento en estos medios sólidos (ver Anexo 5), se deben inocular las colonias sospechosas en caldo glucosa, tubos de agar TSI, caldo lisina descarboxilasa, agar para movilidad y triptona. También pueden efectuarse una caracterización fisiológica (ver Anexo 6) y una caracterización serológica (para identificar el serotipo) a partir de un subcultivo en agar no selectivo de 24 horas de incubación (ver Anexo 7) (24,27).

Debido a que las pruebas bioquímicas puede que no puedan distinguir entre *Shigella* spp y *Escherichia coli*, es necesario crear metodologías altamente sensibles (debido a la baja dosis infectiva del microorganismo) para el aislamiento de *Shigella* spp a partir de alimentos. Para ello, se ha ideado un método basado en la Reacción de Cadena de polimerasa (Polymerase Chain Reaction o PCR) para amplificar una región específica de un gen de virulencia del

microorganismo para revelar su presencia en alimentos. Sin embargo, este tipo de ensayo tiene la desventaja de que durante el curso de la reacción no es posible controlar cuidadosamente la restricción de la hibridación, además de que las células no viables presentes en el alimento pueden producir resultados falsos positivos si el segmento blanco de ADN se encuentra intacto. Esto último puede solucionarse empleando un breve enriquecimiento seguido de una dilución antes de efectuar el PCR (46).

IV. Justificación

Debido a que los microorganismos patógenos a investigar han sido reconocidos en el ámbito mundial, latinoamericano y nacional como una de causas más importantes de infecciones transmitidas por alimentos en niños y personas adultas, es necesario que ambos agentes sean investigados no solamente a partir los productos listos para el consumo en las cafeterías de la Universidad de San Carlos de Guatemala, sino también a partir de las materias primas que se utilizan para preparar dichos alimentos. Esto es debido no solamente a que *Salmonella* spp ya haya sido asociada ampliamente a ser vehiculada por medio de carnes crudas o a que *Shigella* spp ya se haya asociado a vegetales crudos, sino porque es la primera vez que un estudio, bajo este universo de trabajo, tendría como propósito evaluar a través de análisis microbiológicos las prácticas de conservación y manipulación de dichas materias primas para garantizar la inocuidad del producto destinado a ser consumido por la población estudiantil.

Además de lo anterior, este estudio contribuiría a monitorear el trabajo de educación, entrenamiento e inspección que hasta la fecha ha efectuado el Área de Alimentos de la Unidad de Salud-Laboratorio Clínico con los expendedores de alimentos de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Por último, también se desea establecer cual es el procedimiento más adecuado para la determinación de *Salmonella* spp y *Shigella* spp a partir de materias primas, utilizando para esto cepas conocidas de estos microorganismos. Esto establecería un procedimiento estándar de operación dentro del Área de Alimentos de la Unidad de Salud-Laboratorio Clínico para aislar e identificar a dichos patógenos bacterianos.

V. Objetivos

A. General

Determinar la presencia de *Salmonella* spp en carnes crudas y *Shigella* spp en vegetales crudos utilizados como materia prima por las cafeterías ubicadas en el campus central de la Universidad de San Carlos de Guatemala

B. Específicos

1. Determinar el procedimiento más adecuado a aplicar para el aislamiento e identificación de *Salmonella* spp por medio de una cepa control conocida.
2. Determinar el procedimiento más adecuado a aplicar para el aislamiento e identificación de *Shigella* spp por medio de una cepa control conocida.
3. Determinar la efectividad de los programas de capacitación llevados a cabo por la Unidad de Salud-Laboratorio Clínico a los expendedores de alimentos de la Universidad de San Carlos de Guatemala con respecto a las metodologías de manipulación de carnes crudas y vegetales para garantizar su inocuidad.

VI. Hipótesis

Debido a que la investigación efectuada era de carácter descriptivo (ya que en la misma no se pretendía aleatorizar o manipular las muestras), no fue necesario formular hipótesis.

VII. Materiales y Métodos

A. Universo y muestra

El universo de trabajo lo conformaron todos los expendedores de cafeterías que emplean carne y vegetales crudos para la preparación de los alimentos que distribuyen dentro de la ciudad capital de Guatemala.

Se consideró como muestra poblacional a todos los expendedores que distribuyen carnes y vegetales crudos en las trece cafeterías ubicadas dentro del campus central de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

B. Materiales

1. Recursos Humanos

- Tesista: Br. Herberth F. Arévalo Pérez.
- Asesor: Licda. Brenda López de Quevedo.
- Personal de los expendios que distribuyen carnes y vegetales crudos a todas las cafeterías del campus central de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

2. Recursos Materiales

a.) Institucionales

- Sección de Microbiología de Alimentos de la Unidad de Salud-Laboratorio Clínico Bienestar Estudiantil de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

b.) Materiales**i. Equipo y Materiales**

- Baño de María con agua circulante (a una temperatura de 43°C)
- Incubadora bacteriológica (a una temperatura de 37°C)
- Mechero Bunsen
- Refrigeradoras bacteriológicas (4°C ± 2°C)
- Autoclave
- Estufa
- Balanza semianalítica (2,000 g de capacidad, sensibilidad de 0.1 g)
- Horno seco (a 70°C)
- Homogenizador (conocido como "Stomacher")
- Espátulas y cucharas estériles
- Jarra Gas-Pak para anaerobiosis

ii.) Cristalería

- Cajas de petri estériles de 15 x 100 milímetros, plásticas o de vidrio.
- Erlenmeyers de 500 mililitros.
- Erlenmeyers de 1,000 mililitros.
- Tubos para cultivo (16 x 150 milímetros y 20 x 150 milímetros) con tapón
- Tubos serológicos (10 x 75 milímetros o 13 x 100 milímetros) con tapón de rosca
- Pipetas estériles de 1 ml con graduaciones de 0.01 mililitros.
- Pipetas estériles de 5 ml con graduaciones de 0.1 mililitros.
- Pipetas estériles de 10 ml con graduaciones de 0.1 mililitros.

iii.) Medios de cultivo

- Caldo Lactosado (CL)
- Agua Peptonada Bufferada (APB)
- Caldo Selenito Cistina (SC)
- Caldo Tetrionato Verde Brillante (TVB)
- Caldo Gram Negativo (GN)
- Caldo Tripticasa Soya (CTS)
- Medio Rappaport-Vassiliadis (RV)
- Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD)
- Agar Verde Brillante (VB)
- Agar Rambach (AR)
- Agar entérico Hektoen (HE)
- Agar Sulfito Bismuto (SB)
- Agar MacConkey (MK)
- Agar *Salmonella Shigella* (SS)
- Agar Tres Azúcares Hierro (Triple Sugar Iron o TSI)
- Agar Lisina Hierro (Lysine Iron Agar o LIA)
- Agar Tripticasa Soya (ATS)

iv.) Reactivos

- Alcohol al 70%.
- Reactivo de Kovacs
- Antisero somático (O) polivalente de *Salmonella*
- Antisero flagelar (H) polivalente de *Salmonella*
- Solución salina fisiológica (al 0.85% de NaCl) estéril
- Agua desmineralizada
- Antiseros polivalentes para *Shigella* spp de los grupos A, A₁, B, C, C₁, C₂ y D.

- Reactivos para tinción de Gram

v.) **Varios**

- Asas de nicromo para inoculación (en argolla y en punta)
- Cepas de *Salmonella* ATCC
- Cepas de *Shigella* ATCC
- Bolsas plásticas ziplock para Stomacher
- Papel pH con un rango de 6.0 a 8.0 y graduaciones máximas de 0.4 unidades de pH por cambio de color.
- Generador de anaerobiosis con indicador
- Fósforos
- Crayón graso
- Papel parafilm M
- Masking-tape
- Termómetros con escala de 0.1°C de temperatura
- Gradillas para tubos de 16 x 150 mm, 20 x 150 mm, 10 x 75 mm y 13 x 100 mm.
- Hielera con baterías de hielo.

C. **Métodos**

1. **Preparación de las cepas ATCC de *Salmonella* spp y *Shigella* spp**

Se inocularon las dos cepas obtenidas a partir del slant de un tubo de ATS en 10 mililitros (ml) de CTS y se incubó 24 horas (h) a 37°C. Después, se prepararon cultivos frescos al inocular alícuotas de 10 ml de CTS con 0.1 ml del CTS inicial para luego incubar dichas alícuotas por 4 h a 37°C. Se prepararon diluciones 1:10 y 1:5 de las alícuotas en APB. Posteriormente, se sembró por vertido en placa cuatro placas por cada dilución en ATS, incubando a 37°C por 48 h. Se efectuó la estimación del número de células viables por conteo

directo en la superficie de la placa de ATS y multiplicación por el factor de dilución, asumiendo que cada colonia representaba una unidad viable, o una Unidad Formadora de Colonia (UFC).

2. Recolección de muestras

a.) Contaminadas artificialmente

El primer paso consistió en recolectar 16 muestras de carne cruda de res y ocho muestras de lechuga cruda. Cada muestra debía pesar aproximadamente 25 g. Las muestras debieron ser transportadas en cadena frío y refrigeradas previo a su análisis microbiológico.

Se inocularon doce de las muestras de carne cruda con las alícuotas ya cuantificadas de una *Salmonella* spp y seis de las muestras de lechuga cruda con las alícuotas ya cuantificadas de una *Shigella* spp. Las cuatro muestras de carne cruda y las dos de lechuga cruda restantes fueron controles negativos libres de estos microorganismos patógenos al no ser inoculados previo al análisis.

b.) Contaminadas naturalmente

Se analizaron 78 muestras para *Salmonella* spp y 78 muestras para *Shigella* spp. Se efectuaron 3 muestreos a cada expendedor de carne cruda y vegetales crudos de cada una de las 13 cafeterías ubicadas dentro del campus de la Universidad de San Carlos de Guatemala (se asumió que cada expendedor proveía de ambas materias primas a cada cafetería).

Como primer paso, se estableció la hora exacta en que cada expendedor llevaba las muestras de carne y vegetales crudos a la cafetería. Se solicitaba al expendedor que proporcionara por duplicado una unidad analítica de aproximadamente 25 g de carne cruda y aproximadamente 25 g de una unidad analítica de vegetales crudos que fueran consumidos como tales.

Se transportaron las muestras asepticamente y bajo condiciones isotermicas (en cadena de frío) al laboratorio para su análisis.

3. Análisis de las muestras

a.) Contaminadas artificialmente

i.) Para *Salmonella* spp

Este análisis evaluó 4 metodologías. Para cada metodología, se tomaron 4 muestras de 25 g de carne cruda, 3 de las mismas inoculadas con la cepa de *Salmonella* spp y 1 no inoculada (como control negativo).

i. Metodología I

Se tomaron 4 muestras de 25 g carne cruda y se les añadió 225 ml de CL como medio de pre-enriquecimiento. Se homogenizaron con Stomacher y se incubaron a 35-37°C por 18 a 24 h. Después de esta incubación, se pipeteó por cada muestra 1 ml de CL en 10 ml de caldo SC. Se incubaron los caldos SC en baño de María a 43°C durante 24 horas. Pasadas las 24 horas, se tomó una asada estéril de cada caldo SC y se efectuó un estriado en agar VB y en agar SB. Se incubaron las placas a 37°C por 24 horas. Se interpretaron de manera que, al observar colonias sospechosas, se efectuaron pruebas bioquímicas usando agar TSI y agar IJA y se incubó 24 horas a 37°C. Se efectuó la serología con antisueros polivalentes O y H a partir del agar TSI incubado.

ii. Metodología II

Se tomaron 4 muestras de 25 g carne cruda y se añadieron 225 ml de CL como medio de pre-enriquecimiento. Se homogenizó con Stomacher y se incubó a 35-37°C por 18 a 24 h. Después de esta incubación, por cada muestra se pipeteó 1 ml de CL en 10 ml de cada caldo

TTVB. Se incubaron los caldos TTVB en baño de María a $43^{\circ}\text{C} \pm 0.1$ durante 24 horas. Pasadas las 24 horas, se tomó una asada estéril de cada caldo TTVB y se efectuó un estriado en agar VB y en agar SB. Se incubaron las placas a 37°C por 24 horas. Luego, se interpretaron dichas placas de manera que, al observar colonias sospechosas, se efectuaran pruebas bioquímicas usando agar TSI y agar LIA y se incubara por 24 horas a 37°C . Luego de esto, se efectuaba la serología con antisueros polivalentes O y H a partir del agar TSI incubado.

iii. Metodología III

Se tomaron 4 muestras de 25 g carne cruda y se añadieron 225 ml de APB como medio de pre-enriquecimiento. Se homogenizó con Stomacher y se incubó a $35-37^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 h. Después de esta incubación, se pipeteó por cada muestra 0.1 ml de APB en 10 ml de caldo RV. Se incubaron los caldos RV en baño de María a $43^{\circ}\text{C} \pm 0.2$ durante 24 horas. Pasadas las 24 horas, se tomó una asada estéril de cada caldo RV y se efectuó un estriado en agar XLD y agar MacConkey. Todo esto se incubó a 37°C por 24 horas. Se interpretaron las placas de medio sólido. Al observar colonias sospechosas, se efectuaron pruebas bioquímicas usando agar TSI y agar LIA y se incubó 24 horas a 37°C . Se efectuó la serología con antisueros polivalentes O y H a partir del agar TSI incubado.

iv. Metodología IV

Se tomaron 4 muestras de 25 g carne cruda y se les añadió 225 ml de Caldo Salmosyst de Pre-Enriquecimiento (CSP). Se homogenizó cada muestra con Stomacher y se incubaron a $35-37^{\circ}\text{C}$ por 6 h. Después de esta incubación, se efectuó cada enriquecimiento selectivo con 10 ml del caldo CSP al cual se añadió una tableta suplementaria y se incubó por 18 h a 37°C . Después de esta incubación, se estrió una asada de caldo de cultivo en una placa de AR por cada muestra. Se incubó a 37°C por 24 h. Las colonias sospechosas se identificaron a través de pruebas bioquímicas y con aglutinación con antisueros polivalentes al igual que en las técnicas previas.

ii.) Para *Shigella* spp

Al igual que para *Salmonella* spp, este análisis evaluó 2 metodologías. Para cada una se tomaron 4 muestras de 25 g de vegetales crudos, 3 de las mismas inoculadas con la cepa de *Shigella* spp y 1 no inoculada.

i. Metodología I

Se tomaron 4 muestras de vegetales crudos y se les añadió 225 ml de caldo GN a 25 g de cada una, para luego homogenizarlas con Stomacher. Se incubaron a 35-37°C durante 18 h. Se transfirió una asada de cada caldo GN a la superficie de agares selectivos SS y MacConkey. Se incubó a 35-37°C por 24 horas. De observarse colonias sospechosas, se purificaban y se transferían a agar MK. Se incubaba de nuevo por 24 h a 37°C. Se transferían luego las colonias puras a agares TSI/LIA y a un medio enriquecido no selectivo y se incubaba 24 h a 37°C.

Se efectuó la tipificación a partir del medio no selectivo empleando antisueros polivalentes para *Shigella* spp de los grupos A, B, C y D.

ii. Metodología II

Se tomaron 4 muestras de vegetales crudos añadiendo a 25 g de cada muestra 100 ml de caldo Tripticasa Soya (el pH se ajustaba a 7.0 de ser necesario). Se homogenizó e incubó por 8 horas a 37°C. Posteriormente, se adicionó 125 ml de caldo GN de doble concentración y se incubó por 16 a 20 h. Se transfirió una asada del caldo GN y se estirió en la superficie de agares selectivos SS y MacConkey. Se incubó a 35-37°C por 24 horas. De observarse colonias sospechosas, se purificaron y transfirieron solamente a agar MK. Se incubó 24 h a 37°C. Se transfirieron las colonias puras a agares TSI/LIA y a un medio enriquecido no selectivo y se incubó 24 h a 37°C.

Se efectuó la tipificación a partir del medio no selectivo con 24 horas de incubación empleando antisueros polivalentes para *Shigella* spp de los grupos A, B, C, y D.

b.) Contaminadas naturalmente

i.) Para *Salmonella* spp

Se efectuó el aislamiento e identificación de *Salmonella* spp a partir de las 78 muestras obtenidas de los expendedores de las 13 cafeterías del campus de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Para ello eligió la metodología con el mejor desempeño en cuanto a aislamiento e identificación a partir de los resultados obtenidos de las muestras de carne cruda contaminadas artificialmente con la cepa ATCC control de *Salmonella* spp.

ii.) Para *Shigella* spp

Se efectuó el aislamiento e identificación de *Shigella* spp a partir de las 78 muestras obtenidas de los expendedores de las 13 cafeterías del campus de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Para ello se eligió la metodología más conveniente y con el mejor desempeño en cuanto a aislamiento e identificación a partir de los resultados obtenidos de las muestras de lechuga cruda contaminadas artificialmente con la cepa ATCC de *Shigella* spp.

4. Diseño de la investigación

Para calcular el número de muestreos a efectuar en este estudio, fue necesario tomar como modelo el valor obtenido a partir de z^2 , en el cual se establece que para un Nivel de Confianza del 90%, debieron efectuarse 3 muestreos por duplicado y para un Nivel de Confianza del 99% sería necesario efectuar 7 muestreos por duplicado. Puesto que se decidió efectuar 3 muestreos por duplicado, al multiplicar el número de muestras obtenidas por dos, por expendedor y por el número de muestreos, se obtuvo un valor igual a 78 para cada unidad de observación (siendo en este estudio dos las unidades de observación, la carne cruda y los vegetales crudos).

VIII. Resultados

En la primera fase del experimento se efectuó el enriquecimiento en Caldo Tripticasa Soya con el propósito de reactivar las cepas a ser empleadas como representativas del género *Salmonella* spp y *Shigella* spp. Posteriormente se efectuó otro enriquecimiento para obtener un inóculo con una alta concentración de dichas cepas ya activadas. Después de ello se llevo a cabo la siembra a partir de dos diluciones del inóculo, empleándose para ello el método de vertido en placa y el de esparcido en superficie de agar. Los resultados obtenidos por el método de vertido en placa se muestran a continuación en la Tabla No. 1.

Tabla No. 1. Estimación de la Carga Microbiana Total Obtenida por el Método de Vertido en Placa (aproximadamente 10^4 UFC/ml * en cada placa)

Dilución	Placas de <i>Salmonella enteritidis</i>				Placas de <i>Shigella flexneri</i>			
	A	B	C	D	A	B	C	D
1:5	1.2 α	2.8 α	2.8 α	2.0 α	1.4 α	2.4 α	2.6 α	1.5 α
1:10	2.9 α	2.2 α	2.9 α	3.2 α	2.5 α	4.2 α	2.5 α	3.9 α

*: UFC/ml: Unidades Formadoras de Colonia por mililitro.

α : Valores expresados por 10^4 UFC/ml

Los resultados obtenidos por el método de esparcido en superficie no se detallan debido a que el crecimiento fue muy numeroso para contar en todas las placas.

La segunda fase consistió inicialmente en la compra y pesaje de 16 muestras de carne cruda y 8 de lechuga cruda. Se procedió a agregarles a cada una los respectivos caldos de enriquecimiento dependiendo de la metodología a ser evaluada ya sea para *Salmonella enteritidis* o para *Shigella flexneri*. Se evaluaron 4 muestras por cada metodología. Tres de éstas se inocularon cada una con un mililitro del caldo que contenía la carga microbiana y se dejó una muestra sin inocular constituyendo el control negativo. De acuerdo con lo expresado en la Tabla No.1, se inoculaba aproximadamente entre 1 y 4×10^4 UFC a cada muestra a evaluar para *Salmonella* spp o *Shigella* spp para los 225 mililitros de cada uno de los caldos de pre-enriquecimiento, por lo que la carga microbiana final se reducía entre 44 y 176 UFC por mililitro ($1 \times 10^4 / 225$ ml y $4 \times 10^4 / 225$ ml) o si se toma en consideración únicamente los 25 gramos de carne o vegetales

crudos, la carga microbiana se reducía entre 400 y 1.6×10^3 UFC ($1 \times 10^4/25$ g y $4 \times 10^4/25$ g) por gramo de materia prima (16).

Los resultados obtenidos a partir de medios selectivos en las muestras contaminadas deliberadamente con *Salmonella enteritidis* se muestran en la Tabla No. 2.

Tabla No. 2. Resultados Obtenidos para *Salmonella enteritidis* en Medios Sólidos Selectivos dependiendo de la Metodología Empleada

Metodología	Agar empleado	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Control Negativo
I	Sulfito de Bismuto	C.N.S.	C.N.S.	C.N.S.	C.N.S.
	Verde Brillante	C.N.S.	C.N.S.	C.S.	C.N.S.
II	Sulfito de Bismuto	C.N.S.	C.N.S.	C.N.S.	C.S.
	Verde Brillante	C.S.	C.N.S.	C.N.S.	C.N.S.
III	XLD	C.S.	C.S.	C.S.	C.N.S.
	MacConkey	C.N.S.	C.N.S.	C.N.S.	C.N.S.
IV	Rambach	C.S.	C.S.	C.S.	C.N.S.

C.N.S. Colonias No Sospechosas.

C.S. Colonias Sospechosas. La morfología colonial depende del medio de cultivo empleado. (Ver Sección III.C.6.a.)).

A partir de las colonias sospechosas para *Salmonella enteritidis* se efectuaron los procedimientos de purificación, confirmación bioquímica e identificación serológica. Los resultados obtenidos a partir de esto se detallan en la Tabla No. 3.

Tabla No. 3. Reacciones Bioquímicas y Serológicas Obtenidas para *Salmonella enteritidis* en cada Metodología

Metodología	No. de colonia	Pruebas bioquímicas ^α		Serología		Identificación
		TSI	LIA	Antígeno O	Antígeno H	
I	C.N.	A/A, g (+), H ₂ S (-)	K/K, g (-), H ₂ S (-)	N.E.*	N.E.	No <i>Salmonella</i>
	1	A/A, g (rd), H ₂ S (+)	K/K, g (-), H ₂ S (+)	N.E.	N.E.	No <i>Salmonella</i>
	2	A/A, g (+), H ₂ S (+)	K/K, g (-), H ₂ S (+)	N.E.	N.E.	No <i>Salmonella</i>
	3	K/A, g (+), H ₂ S (+)	K/K, g (-), H ₂ S (+)	R.P.†	R.P.	<i>Salmonella enteritidis</i>
	4	A/A, g (+), H ₂ S (-)	K/A, g (-), H ₂ S (rd)	N.E.	N.E.	No <i>Salmonella</i>
II	C.N.	A/A, g (+), H ₂ S (-)	K/K, g (-), H ₂ S (-)	N.E.	N.E.	No <i>Salmonella</i>
	1	A/A, g (+), H ₂ S (+)	K/K, g (-), H ₂ S (+)	N.E.	N.E.	No <i>Salmonella</i>
	2	A/A, g (+), H ₂ S (-)	K/A, g (-), H ₂ S (-)	N.E.	N.E.	No <i>Salmonella</i>
	3	A/A, g (+), H ₂ S (-)	K/A, g (+), H ₂ S (rd)	N.E.	N.E.	No <i>Salmonella</i>
	4	A/A, g (+), H ₂ S (-)	K/K, g (-), H ₂ S (rd)	N.E.	N.E.	No <i>Salmonella</i>
III	C.N.	A/A, g (+), H ₂ S (-)	K/A, g (+), H ₂ S (-)	N.E.	N.E.	No <i>Salmonella</i>
	C.N.	A/A, g (+), H ₂ S (-)	K/A, g (+), H ₂ S (-)	N.E.	N.E.	No <i>Salmonella</i>
	1	K/A, g (+), H ₂ S (+)	K/K, g (-), H ₂ S (+)	R.P.	R.P.	<i>Salmonella enteritidis</i>
	2	A/A, g (+), H ₂ S (+)	K/K, g (-), H ₂ S (+)	N.E.	N.E.	No <i>Salmonella</i>
	3	K/A, g (+), H ₂ S (+)	K/K, g (-), H ₂ S (+)	R.P.	R.P.	<i>Salmonella enteritidis</i>
	4	A/A, g (+), H ₂ S (-)	K/K, g (+), H ₂ S (+)	N.E.	N.E.	No <i>Salmonella</i>
	5	K/A, g (+), H ₂ S (+)	K/K, g (-), H ₂ S (+)	R.P.	R.P.	<i>Salmonella enteritidis</i>
6	A/A, g (+), H ₂ S (-)	K/A, g (-), H ₂ S (+)	N.E.	N.E.	No <i>Salmonella</i>	
IV	C.N.	A/A, g (+), H ₂ S (-)	K/K, g (-), H ₂ S (-)	N.E.	N.E.	No <i>Salmonella</i>
	1	K/A, g (+), H ₂ S (+)	K/K, g (-), H ₂ S (+)	R.P.	R.P.	<i>Salmonella enteritidis</i>
	2	K/A, g (+), H ₂ S (+)	K/K, g (-), H ₂ S (+)	R.P.	R.P.	<i>Salmonella enteritidis</i>
	3	K/A, g (+), H ₂ S (+)	K/K, g (-), H ₂ S (+)	R.P.	R.P.	<i>Salmonella enteritidis</i>

α: K: Alcalino; A: Ácido; g: gas; H₂S: Ácido Sulhídrico; +: Reacción Positiva; -: Reacción Negativa; rd: reacción débil;

*: N.E.: No Efectuado.

†: R.P.: Reacción Positiva.

No *Salmonella*: Ausencia de *Salmonella enteritidis* en 25 gramos de carne cruda.

Con respecto a las muestras contaminadas deliberadamente con *Shigella flexneri*, la Tabla No. 4 muestra los resultados obtenidos después del crecimiento medios selectivos.

Tabla No. 4. Resultados Obtenidos para *Shigella flexneri* en Medios Sólidos Selectivos dependiendo de la Metodología Empleada

Metodología	Agar empleado	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Control Negativo
I	Agar SS	C.N.S.	C.S.	C.S.	C.N.S.
	Agar MacConkey	C.S.	C.S.	C.N.S.	C.N.S.
II	Agar SS	C.S.	C.N.S.	C.N.S.	C.N.S.
	Agar MacConkey	C.S.	C.S.	C.S.	C.N.S.

C.N.S. Colonias No Sospechosas;

C.S. Colonias Sospechosas. Al igual que para *Salmonella* spp, la morfología colonial depende del medio de cultivo empleado. (Ver Sección III.D.5 y Anexo 5).

A partir de las colonias sospechosas que se muestran en la Tabla No.4, se efectuaron purificaciones, identificaciones bioquímicas y serológicas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla No. 5.

Tabla No. 5. Reacciones Bioquímicas y Serológicas Obtenidas para *Shigella flexneri* en cada Metodología

Método	No. de colonia	Pruebas bioquímicas *		Confirmación Serológica				Identificación
		TSI	LIA	Antisuero A	Antisuero B	Antisuero C	Antisuero D	
I	C.N.	A/A, g (+), H ₂ S (-)	K/A, g (+), H ₂ S (-)	(-)	(-)	(-)	(-)	No <i>Shigella</i>
	1	K/A, g (+), H ₂ S (-)	K/A, g (+), H ₂ S (-)	(-)	(-)	(-)	(-)	No <i>Shigella</i>
	2	A/A, g (+), H ₂ S (rd)	K/A, g (-), H ₂ S (rd)	(-)	(-)	(-)	(-)	No <i>Shigella</i>
	3	K/A, g (-), H ₂ S (-)	K/A, g (+), H ₂ S (-)	(-)	(+)	(-)	(-)	<i>Shigella flexneri</i>
	4	A/A, g (+) H ₂ S (-)	K/A, g (+), H ₂ S (-)	(-)	(-)	(-)	(-)	No <i>Shigella</i>
II	C.N.	A/A, g (+), H ₂ S (-)	K/A, g (+), H ₂ S (-)	(-)	(-)	(-)	(-)	No <i>Shigella</i>
	1	A/A, g (+), H ₂ S (-)	K/A, g (+), H ₂ S (-)	(-)	(-)	(-)	(-)	No <i>Shigella</i>
	2	A/A, g (+), H ₂ S (-)	K/A, g (+), H ₂ S (-)	(-)	(-)	(-)	(-)	No <i>Shigella</i>
	3	K/A, g (-), H ₂ S (-)	K/A, g (+), H ₂ S (-)	(-)	(+)	(-)	(-)	<i>Shigella flexneri</i>
	4	A/A, g (+), H ₂ S (-)	K/A, g (+), H ₂ S (-)	(-)	(-)	(-)	(-)	No <i>Shigella</i>

*: K: Alcalino; A: Ácido; g: gas; H₂S: Ácido Sulfhídrico; +: Reacción Positiva; -: Reacción Negativa; rd: reacción débil; No *Shigella*. Ausencia de *Shigella flexneri* en 25 gramos de lechuga cruda.

De acuerdo con lo observado en la Tabla No. 3, se eligió la Metodología IV para el aislamiento e identificación de *Salmonella* spp en la segunda fase del estudio. Para *Shigella* spp no se observó una diferencia obvia en cuanto a los resultados obtenidos (tal como se observa en la Tabla No.5) y se eligió la metodología I para ser empleada en la segunda fase del estudio.

Una vez seleccionada la metodología para cada microorganismo a ser investigado, se procedió a efectuar la tercera fase del estudio para carnes y vegetales crudos contaminados naturalmente. Los resultados obtenidos para *Salmonella* spp en el primer muestreo se detallan en la Tabla No. 6.

Tabla No. 6. Reacciones Bioquímicas Obtenidas para *Salmonella* spp en el Primer Muestreo

Cafetería No. *	Alicuota/ RM *	Pruebas bioquímicas ^α		Identificación
		TSI	LIA	
1	-a-	K/A, g (+) H ₂ S (+)	K/A, g (+), H ₂ S (+)	Aus. ^β
2	-a-	A/A, g (+), H ₂ S (-)	K/A, g (+), H ₂ S (-)	Aus.
3	-b-	A/A, g (+), H ₂ S (+)	K/A, g (rd), H ₂ S (+)	Aus.
4	-a-	A/A, g (+), H ₂ S (+)	K/A, g (-), H ₂ S (+)	Aus.
5	-b-	K/A, g (rd), H ₂ S (+)	K/A, g (+), H ₂ S (+)	Aus.
6	-b-	K/A, g (+), H ₂ S (+)	K/A, g (+), H ₂ S (+)	Aus.
7	-b-	A/A, g (+), H ₂ S (+)	K/A, g (+), H ₂ S (+)	Aus.
8	-a-	K/A, g (+), H ₂ S (+)	K/A, g (+), H ₂ S (+)	Aus.
	-b-	A/A, g (+), H ₂ S (-)	K/A, g (+), H ₂ S (-)	Aus.
9	-a-	K/A, g (-), H ₂ S (-)	K/K, g (-), H ₂ S (-)	Aus.
10	-b-	A/A, g (+), H ₂ S (-)	K/A, g (+), H ₂ S (-)	Aus.
11	-a-	K/A, g (+), H ₂ S (rd)	K/A, g (+), H ₂ S (rd)	Aus.
	-b-	K/A, g (+), H ₂ S (+)	K/A, g (rd), H ₂ S (-)	Aus.
12	-b-	A/A, g (rd), H ₂ S (+)	K/A, g (rd), H ₂ S (rd)	Aus.
13	-a-	K/A, g (+), H ₂ S (+)	K/A, g (+), H ₂ S (rd)	Aus.
	-b-	A/A, g (-), H ₂ S (+)	K/A, g (+), H ₂ S (-)	Aus.

*: En el anexo 8 se identifica a cada cafetería de acuerdo con el número correspondiente en la Tabla.

•: De cada cafetería se tomaron 2 muestras. Cada una de éstas representa la alicuota. Agar Rambach es abreviado como "RM".

α: K: Alcalino; A: Ácido; g: gas; H₂S: Ácido Sulphídrico; +: Reacción Positiva; -: Reacción Negativa; rd: reacción débil;

β: Ausente en 25 g de carne cruda. Todas las colonias sospechosas se purificaron y se identificaron en TSI y LIA basándose en la metodología IV indicada en la fase I del estudio.

Muchos microorganismos que se consideraban como sospechosos en agar Rambach y que resultaron no ser *Salmonella* spp eran generalmente *Citrobacter freundii* o *Proteus* spp al efectuar la confirmación bioquímica. Los resultados obtenidos para *Shigella* spp se muestran en la Tabla No. 7.

Tabla No. 7. Reacciones Bioquímicas Obtenidas para *Shigella* spp en el Primer Muestreo

Cafetería No. *	Alicuota, Medio *	Pruebas bioquímicas *		Identificación
		TSI	LIA	
1	-a-, SS	Λ/Λ, g (+), H ₂ S (-)	K/Λ, g (+), H ₂ S (-)	Aus. <i>S.</i> ^β
2	-b-, SS	Λ/A, g (+), H ₂ S (-)	K/A, g (+), H ₂ S (-)	Aus. <i>S.</i>
3	-b-, SS	K/A, g (+), H ₂ S (-)	K/A, g (rd), H ₂ S (-)	Sospechosa de <i>S. flexneri</i> ⁺
4	-a-, MK	A/A, g (+), H ₂ S (-)	K/A, g (+), H ₂ S (-)	Aus. <i>S.</i>
	-a-, MK	K/A, g (+), H ₂ S (+)	K/A, g (+), H ₂ S (+)	Aus. <i>S.</i>
5	-b-, SS	K/A, g (-), H ₂ S (-)	K/K, g (-), H ₂ S (-)	Aus. <i>S.</i>
	-b-, SS	K/A, g (-), H ₂ S (-)	K/K, g (-), H ₂ S (-)	Sospechosa de <i>Salmonella</i> spp. ⁺
6	-a-, MK	K/A, g (+), H ₂ S (-)	K/A, g (+), H ₂ S (-)	Aus. <i>S.</i>
7	-b-, SS	A/A, g (-), H ₂ S (-)	K/A, g (-), H ₂ S (-)	Aus. <i>S.</i>
8	-b-, MK	K/A, g (-), H ₂ S (-)	K/A, g (+), H ₂ S (-)	Aus. <i>S.</i>
9	-a-, SS	A/A, g (+), H ₂ S (-)	K/A, g (+), H ₂ S (rd)	Aus. <i>S.</i>
	-b-, SS	M.N.F.	M.N.F.	Aus. <i>S.</i>
10	-a- y -b-, SS y MK	N.U.F.C.S.	N.U.F.C.S.	Aus. <i>S.</i>
11	-b-, SS	M.N.F.	M.N.F.	Aus. <i>S.</i>
12	-a-, SS	K/A, g (-), H ₂ S (-)	K/A, g (-), H ₂ S (-)	Sospechosa de <i>S. flexneri</i> ⁺
	-a-, SS	K/A, g (+), H ₂ S (-)	K/A, g (-), H ₂ S (-)	Sospechosa de <i>S. flexneri</i> ⁺
13	-a-, SS	A/A, g (rd), H ₂ S (-)	K/A, g (-), H ₂ S (-)	Aus. <i>S.</i>
	-b-, SS	K/A, g (-), H ₂ S (-)	K/A, g (-), H ₂ S (-)	Sospechosa de <i>S. flexneri</i> ⁺

*: En el anexo 8 se identifica a cada cafetería de acuerdo con el número correspondiente en la Tabla.

•: De cada cafetería se tomaron 2 muestras. Cada una de éstas representa la alicuota. Las colonias sospechosas se purificaron y se identificaron en TSI y LIA a partir del medio especificado en esta columna, o sea, agar SS o agar MacConkey (MK).

α: K: Alcalino; A: Ácido; g: gas; H₂S: Ácido Sulhídrico; +: Reacción Positiva; -: Reacción Negativa; rd: reacción débil;

β: Ausente en 25 g de vegetales crudos.

+ : Colonias con pruebas bioquímicas correspondientes a *Shigella* spp o *Salmonella* spp que fueron reaisladas, purificadas y confirmadas nuevamente para pruebas bioquímicas y serológicas en el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP). Ver Anexo 9.

M.N.F.: Microorganismo No Fermentador.

N.U.F.C.S.: Ninguna Unidad Formadora de Colonia Sospechosa (para ser purificada e identificada con TSI, LIA)..

Como se puede observar en la Tabla No. 7, se aislaron cuatro colonias sospechosas de *Shigella flexneri* y una sospechosa de *Salmonella* spp, por lo cual se decidió resembrar cada una de éstas en un medio no selectivo (TSA) y guardarlas en refrigeración hasta su confirmación

serológica (en INCAP) al finalizar la parte experimental del estudio. En la Tabla 12 se muestran los resultados obtenidos en dicha confirmación.

En la Tabla No. 8 se muestran los resultados obtenidos en el segundo muestreo para *Salmonella* spp.

Tabla No. 8. Reacciones Bioquímicas Obtenidas para *Salmonella* spp en el Segundo Muestreo

Cafetería No. *	Alicuota/RM *	Pruebas bioquímicas ^α		Identificación
		TSI	LIA	
14	-b-	A/A, g (-), H ₂ S (+)	R/A, g (+), H ₂ S (-)	Aus. ^β
15	-b-	A/A, g (+), H ₂ S (-)	K/A, g (+), H ₂ S (-)	Aus.
16	-a-	A/A, g (+), H ₂ S (-)	K/A, g (+), H ₂ S (-)	Aus.
17	-b-	K/A, g (rd), H ₂ S (-)	K/K, g (-), H ₂ S (-)	Aus.
18	-b-	M.N.F	M.N.F	Aus.
19	-a- y -b-	N.U.F.C.S.	N.U.F.C.S.	Aus.
20	-a-	A/A, g (-), H ₂ S (-)	K/K, g (-), H ₂ S (-)	Aus.
	-b-	A/A, g (+), H ₂ S (-)	K/K, g (-), H ₂ S (-)	Aus.
21	-a- y -b-	N.U.F.C.S.	N.U.F.C.S.	Aus.
22	-a- y -b-	N.U.F.C.S.	N.U.F.C.S.	Aus.
23	-b-	K/A, g (-), H ₂ S (-)	K/K, g (-), H ₂ S (-)	Aus.
24	-b-	A/A, g (rd), H ₂ S (rd)	K/A, g (+), H ₂ S (+)	Aus.
25	-a-	A/A, g (rd), H ₂ S (+)	K/A, g (+), H ₂ S (+)	Aus.
26	-a- y -b-	N.U.F.C.S.	N.U.F.C.S.	Aus.

*: En el anexo 8 se identifica a cada cafetería de acuerdo con el número correspondiente en la Tabla.

•: De cada cafetería se tomaron 2 muestras. Cada una de éstas representa la alicuota. Agar Rambach es abreviado como "RM".

α: K: Alcalino; A: Ácido; g: gas; H₂S: Ácido Sulphídrico; +: Reacción Positiva; -: Reacción Negativa; rd: reacción débil; Todas las colonias sospechosas se purificaron y se identificaron en TSI y LIA únicamente a partir del agar Rambach.

β: Ausente en 25 g de carnes crudas.

M.N.F: Microorganismo No Fermentador;

N.U.F.C.S.: Ninguna Unidad Formadora de Colonia Sospechosa (para ser purificada e identificada).

Los resultados de *Shigella* spp para el segundo muestreo se muestran en la Tabla No. 9.

Tabla No. 9. Reacciones Bioquímicas Obtenidas para *Shigella* spp en el Segundo Muestreo

Cafetería No. *	Alicuota, Medio †	Pruebas bioquímicas ^α		Identificación
		TSI	LIA	
14	-a- y -b-, SS y MK	N.U.F.C.S.	N.U.F.C.S.	Aus. S. +
15	-a- y -b-, SS y MK	N.U.F.C.S.	N.U.F.C.S.	Aus. S.
16	-b-, SS	A/A, g (+), H ₂ S (-)	K/A, g (+), H ₂ S (-)	Aus. S.
17	-a- y -b-, SS y MK	N.U.F.C.S.	N.U.F.C.S.	Aus. S.
18	B, SS	A/A, g (+), H ₂ S (+)	K/A, g (-), H ₂ S (+)	Aus. S.
19	-a- y -b-, SS y MK	N.U.F.C.S.	N.U.F.C.S.	Aus. S.
20	-b-, SS	K/A, g (+), H ₂ S (-)	K/N, g (+), H ₂ S (-)	Aus. S.
21	-a- y -b-, SS y MK	N.U.F.C.S.	N.U.F.C.S.	Aus. S.
22	-b-, MK	K/A, g (+), H ₂ S (+)	K/N, g (+), H ₂ S (+)	Aus. S.
23	-a-, SS	K/A, g (+), H ₂ S (-)	K/N, g (+), H ₂ S (-)	Aus. S.
24	-b-, SS	K/A, g (+), H ₂ S (-)	K/N, g (-), H ₂ S (-)	Aus. S.
25	-a- y -b-, SS y MK	N.U.F.C.S.	N.U.F.C.S.	Aus. S.
26	-b-, SS	A/A, g (+), H ₂ S (-)	K/K, g (-), H ₂ S (-)	Aus. S.

*: Ver Anexo 8.

†: Los medios a partir de los cuales se efectuó TSI, LIA fueron: agar SS y agar MacConkey (MK).

^α: K: Alcalino; A: Ácido; N: Neutro; g: gas; H₂S: Ácido Sulfhídrico; +: Reacción Positiva; -: Reacción Negativa;

rd: reacción débil;

N.U.F.C.S.: Ninguna Unidad Formadora de Colonia Sospechosa (para ser purificada e identificada).

+: Ausencia de *Shigella* spp en 25 g de vegetales crudos.

Como se observa en las Tablas No. 8 y No. 9, en el segundo muestreo no se obtuvo ninguna Unidad Formadora de Colonia sospechosa para *Salmonella* spp o para *Shigella* spp (en ninguna de las trece cafeterías del estudio) de acuerdo con las características morfológicas observadas en los medios sólidos selectivos. Tampoco se halló alguna que tuviese el viraje del TSI/LIA correspondiente a cualquiera de los dos patógenos bacterianos investigados.

La Tabla 10 muestra los resultados obtenidos en el tercer muestreo para *Salmonella* spp.

Tabla No. 10. Reacciones Bioquímicas Obtenidas para *Salmonella* spp en el Tercer Muestreo

Cafetería No. *	Alicuota/RM *	Pruebas bioquímicas ^α		Identificación
		TSI	LIA	
27	-b1-	A/A, g (-), H ₂ S (+)	K/A, g (-), H ₂ S (+)	Aus. <i>S.</i> ⁺
	-b2-	A/A, g (-), H ₂ S (-)	K/K, g (-), H ₂ S (-)	Aus. <i>S.</i>
28	-a-	K/A, g (+), H ₂ S (+)	K/N, g (rd), H ₂ S (+)	Sospechosa de <i>S. enteritidis</i> †
	-b-	A/A, g (+), H ₂ S (+)	K/A, g (-), H ₂ S (+)	Aus. <i>S.</i>
29	-a- y -b-	N.U.F.C.S.	N.U.F.C.S.	Aus. <i>S.</i>
30	-b-	A/A, g (+), H ₂ S (-)	R/A, g (+), H ₂ S (-)	Aus. <i>S.</i>
31	-b-	A/A, g (-), H ₂ S (-)	K/A, g (-), H ₂ S (-)	Aus. <i>S.</i>
32	-a- y -b-	N.U.F.C.S.	N.U.F.C.S.	Aus. <i>S.</i>
33	-b-	K/A, g (-), H ₂ S (+)	K/K, g (-), H ₂ S (rd)	Sospechosa de <i>Salmonella</i> spp †
34	-a-	A/A, g (+), H ₂ S (+)	K/N, g (+), H ₂ S (+)	Aus. <i>S.</i>
35	-a-	K/A, g (rd), H ₂ S (-)	K/K, g (-), H ₂ S (-)	Aus. <i>S.</i>
36	-a-	A/A, g (+), H ₂ S (+)	K/K, g (-), H ₂ S (+)	Aus. <i>S.</i>
37	-a-	K/A, g (-), H ₂ S (+)	K/N, g (rd), H ₂ S (+)	Sospechosa de <i>Salmonella</i> spp †
38	-a-	A/A, g (rd), H ₂ S (-)	K/A, g (-), H ₂ S (-)	Aus. <i>S.</i>
39	-a-	A/A, g (+), H ₂ S (-)	K/N, g (-), H ₂ S (-)	Aus. <i>S.</i>

*: Ver Anexo 8.

• De cada cafetería se tomaron 2 muestras. Cada una de éstas representa una alicuota. Agar Rambach es abreviado como "RM".

α: K: Alcalino; A: Ácido; N: Neutro; g: gas; H₂S: Ácido Sulhídrico; +: Reacción Positiva; -: Reacción Negativa; rd: reacción débil;

+ : Ausente en 25 g de carnes crudas.

† Colonias con pruebas bioquímicas correspondientes a *Salmonella* spp que fueron reisladas, purificadas y confirmadas nuevamente para pruebas bioquímicas y serológicas en el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP). Ver Anexo 9.

N.U.F.C.S.: Ninguna Unidad Formadora de Colonias Sospechosa de *Salmonella* spp (para ser purificada e identificada).

La Tabla No. 11 muestra los resultados obtenidos para *Shigella* spp en tercer muestreo en vegetales crudos.

Tabla No. 11. Reacciones Bioquímicas Obtenidas para *Shigella* spp en el Tercer Muestreo

Cafetería No. *	Alicuota, Medio †	Identificación bioquímica *		Identificación
		TSI	LIA	
28	-a-, SS	A/A, g (+), H ₂ S (+)	K/K, g (-), H ₂ S (+)	Aus. S. ⁺
	-a-, MK	K/A, g (+), H ₂ S (-)	K/K, g (rd), H ₂ S (-)	Sospechosa de <i>Shigella</i> spp ^β
29	-a- y -b-, SS y MK	N.U.F.C.S.	N.U.F.C.S.	Aus. S.
30	-a-, MK	K/A, g (-), H ₂ S (+)	K/A g (+), H ₂ S (rd)	Aus. S.
	-b-, SS	A/A, g (+), H ₂ S (-)	K/K, g (-), H ₂ S (-)	Aus. S.
31	-a-, SS	A/A, g (+), H ₂ S (-)	K/K, g (+), H ₂ S (-)	Aus. S.
32	-a- y -b-, SS y MK	N.U.F.C.S.	N.U.F.C.S.	Aus. S.
33	-a- y -b-, SS y MK	N.U.F.C.S.	N.U.F.C.S.	Aus. S.
34	-a- y -b-, SS y MK	N.U.F.C.S.	N.U.F.C.S.	Aus. S.
35	-a- y -b-, SS y MK	N.U.F.C.S.	N.U.F.C.S.	Aus. S.
36	-b-, MK	K/A, g (+), H ₂ S (-)	K/N, g (+), H ₂ S (-)	Aus. S.
37	-a- y -b-, SS y MK	N.U.F.C.S.	N.U.F.C.S.	Aus. S.
38	-a- y -b-, SS y MK	N.U.F.C.S.	N.U.F.C.S.	Aus. S.
39	-b-, SS	A/A, g (+), H ₂ S (-)	K/N, g (-), H ₂ S (-)	Aus. S.

*: Ver Anexo 8.

†: Los medios a partir de los cuales se efectuó TSI, LIA fueron: agar SS y agar MacConkey (MK).

∗: K: Alcalino; A: Ácido; N: Neutro; g: gas; H₂S: Ácido Sulfidrico; +: Reacción Positiva; -: Reacción Negativa; rd: reacción débil;

±: Ausencia de *Shigella* spp en 25 g de vegetales crudos.

β: Colonias con pruebas bioquímicas correspondientes a *Shigella* spp que fueron reaisladas, purificadas y confirmadas nuevamente para pruebas bioquímicas y serológicas en el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP). Ver Anexo 9.

N.U.F.C.S.: Ninguna Unidad Formadora de Colonia Sospechosa (para ser purificada e identificada).

IX. Discusión de Resultados

Según se observó en la fase inicial del estudio, el método de vertido en placa era el más apropiado para efectuar la estimación aproximada de la carga microbiana, ya que como se muestra en la Tabla No.1, los valores son similares entre sí al comparar entre una placa y otra, o bien, al comparar entre una dilución y otra. Estas deducciones son válidas para las dos cepas patógenas utilizadas (27).

También vale la pena mencionar que de haberse empleado diluciones más altas del inóculo agregado y un volumen menor a 0.5 mililitros para efectuar la estimación por el método de esparcido en superficie, hubiera sido posible también contar las UFC en cada placa, con lo que se tendría un valor aun más exacto de la carga microbiana ya que esto permitiría comparar los dos métodos aplicados.

Al agregar el inóculo de cada microorganismo a los respectivos caldos de enriquecimiento, se hizo evidente que la carga microbiana se diluyó en determinada masa de materia prima, a partir de lo cual se obtuvieron rangos que pueden expresarse como entre 4×10^2 - 1.6×10^3 UFC/g. Dichos rangos representan los parámetros de sensibilidad que poseen los cuatro métodos evaluados para *Salmonella* spp y los dos métodos evaluados para *Shigella* spp.

En la Tabla No.2 se observa que todas las metodologías aplicadas fueron capaces de detectar colonias sospechosas de la cepa inoculada (*Salmonella enteritidis*) por lo menos una vez por cada una de las tres repeticiones efectuadas. Sin embargo, debe observarse que en las metodologías I, II y III se hicieron en realidad seis repeticiones, ya que sus marchas microbiológicas exigen inocular en dos medios sólidos selectivos de diferente formulación (ver Sección VII.C.3.a.i)). Pese a esto, en las metodologías I y II solamente se detectaron colonias sospechosas en el agar Verde Brillante y en la metodología II se llegó a considerar como sospechosa una de las colonias de éste mismo medio que apareció en el control negativo. Las metodologías III y IV detectaron colonias sospechosas de *Salmonella enteritidis* en tres repeticiones o más, pero lo interesante constituye el hecho de que la metodología III detectó a este microorganismo únicamente en uno de los dos medios sólidos selectivos, en cambio la

metodología IV lo detectó en todas las ocasiones en el único medio sólido selectivo que emplea. Esto demuestra la eficacia de la metodología IV no solamente por el uso de un único medio selectivo (agar Rambach), sino porque no existe confusión con otras enterobacterias que se llegaran a considerar sospechosas y porque los resultados se reducen a un tiempo más corto que en las otras tres metodologías (de entre 4-6 días a 3-4 días).

Además de esto, en la Tabla No. 3 se puede observar que para las metodologías I, II y III fue necesario realizar entre 5 y 8 baterías antes de descartar las colonias sospechosas como "No *Salmonella*", en cambio en la metodología IV solamente se efectuaron 4 baterías con su respectiva serología, siendo 3 de éstas, confirmatorias para *Salmonella enteritidis*.

De lo anterior se puede entonces señalar que la sensibilidad de las metodologías III y IV se halla entre 4×10^2 y 1.6×10^3 UFC/g. Esto tiene correlación con lo reportado por Pignato, et al (16). Sin embargo, este estudio no indica cuál es la sensibilidad aproximada de las metodologías I y II, pero es obvio que de acuerdo a lo que se muestra en la Tabla No 3, la carga microbiana necesaria para que éstos dos métodos detecten *Salmonella enteritidis* debe ser mayor de 1.6×10^3 UFC por gramo de carnes sin cocinar. También es importante considerar otra perspectiva, ya que la sensibilidad se evaluó solamente para tres repeticiones por cada metodología, sin embargo, no se ha considerado que resultados se habrían obtenido de haberse efectuado más o menos repeticiones, o bien, que hubiera pasado de haberse analizado más controles negativos. Todo esto proporcionaría información más amplia no solamente en cuanto a la sensibilidad, sino también en cuanto a la selectividad y diferencialidad que pueden tener las marchas microbiológicas de cada metodología con sus respectivos medios de cultivo, considerando siempre a la metodología III como procedimiento de referencia y de rutina en el Área de Alimentos de la Unidad de Salud (16).

Otros estudios podrían demostrar la efectividad de éstas cuatro metodologías evaluadas para detectar otras especies de *Salmonella* spp. La razón por la que se escogió esta especie en particular fue porque epidemiológicamente, constituye una de las causas más comunes de salmonelosis a escala nacional y mundial (ver sección III.C.1.c.)).

Al revisar las dos metodologías evaluadas para *Shigella flexneri*, se denota (ver la Tabla No. 4) que no existe diferencia alguna en la capacidad de las mismas para detectar colonias sospechosas de esta especie, ya que ambas mostraron el mismo desempeño al ser capaces de detectar al microorganismo en una de las tres repeticiones (ver Tabla No. 5), por lo que puede afirmarse (al igual que para *Salmonella enteritidis*) que su sensibilidad aproximada se halla entre 4×10^2 y 1.6×10^3 UFC/g. Sin embargo, es necesario considerar la posibilidad de que en las repeticiones que se reportan como C.N.S., se haya pasado por alto alguna que pudiera haber correspondido a este microorganismo.

Debe observarse además que no se estableció la sensibilidad de ambas metodologías para las otras tres especies de *Shigella* spp (principalmente para *Shigella dysenteriae*, ya que constituye la causa epidemiológica más importante de shigelosis en nuestro país) (Ver Secciones III.A.1 y III.D.1.c.)). No obstante, en el Área de Alimentos de la Unidad de Salud es *S. flexneri* la especie que se ha encontrado previamente en productos terminados, lo cual explica el porque se empleó dicha especie.

Otros estudios posteriores pueden considerar cuál es la sensibilidad de ambas metodologías en valores menores a los ya expresados (aparentemente, la metodología II es más sensible que la I debido a que el Caldo Trypticosa Soya reactiva a las *Shigella* spp dañadas subletalmente por algún tratamiento térmico u otros factores) (27). Sin embargo, la razón principal por la cual se decidió emplear la metodología I como la más apropiada para los fines de este estudio fue porque no se consideró necesario efectuar ninguna reactivación de las *Shigella* spp que pudieron haber estado dañadas debido simplemente a que todas las materias primas estuvieron solamente sometidas a temperaturas de conservación por refrigeración (incluso, en algunos casos se hallaban a temperatura ambiente), lo cual se ha reportado que no afecta la capacidad de supervivencia de este microorganismo (ver Sección III.D.4).

Con relación a los resultados obtenidos para *Salmonella* spp en las muestras correspondientes a las trece cafeterías analizadas y sus tres repeticiones, las Tablas No. 6, No. 8 y No. 10 demuestran que las reacciones bioquímicas efectuadas a las colonias sospechosas (a excepción de las tres supuestas *Salmonella* spp obtenidas en el tercer muestreo) resultaron ser

falsos positivos pertenecientes a géneros de otras enterobacterias (o también microorganismos no fermentadores de los sustratos de los medios TSI/LIA que supuestamente fueron inhibidos durante el enriquecimiento selectivo, tal como es el caso de *Pseudomonas* spp) no productoras de β -galactosidasa (como en el caso de *Citrobacter freundii*, por ejemplo) que presentaban la misma coloración en agar Rambach que la mayoría de *Salmonella* spp. Otra circunstancia a considerar es que en las carnes crudas hubiese microorganismos del género *Salmonella* spp y que fuesen pasados por alto debido a que tienen la particularidad de poseer dicha enzima β -galactosidasa (para fermentar la lactosa), por lo que son confundidos como si fueran otras enterobacterias (éstos conforman los falsos negativos). De aquí debe tomarse en consideración efectuar una modificación en la metodología Salmosyst/Rambach, de manera que se logre distinguir sin lugar a dudas (posiblemente a través de otro medio sólido selectivo) dichos falsos positivos y/o negativos. De hecho, Cox (29) ha propuesto el agar Lisina-Manitol-Glicerol (LMG) para el aislamiento de cepas de *Salmonella* spp atípicas, particularmente aquellas que fermentan la lactosa y para el aislamiento de *Salmonella typhi*. El agar LMG puede distinguir entre las *Salmonella* spp productoras o no productoras de β -galactosidasa y especies de *Citrobacter* spp (en base a la utilización de celobiosa y glicerol como fuente de carbono).

Con respecto a las tres colonias sospechosas para *Salmonella* spp de la Tabla No. 10 que se confirmaron (en el INCAP), éstas resultaron ser finalmente otros microorganismos diferentes a *Salmonella* spp debido probablemente a que sus reacciones bioquímicas en TSI/LIA constituían una integración de las reacciones de dos o más enterobacterias y por tanto, en conjunto aparentaban ser éste patógeno purificado.

Los resultados de las Tablas No. 7, No. 9 y No. 11 muestran que al igual que para los muestreos de carnes crudas, las cinco colonias sospechosas para *Shigella* spp que se suponían haber dado reacciones bioquímicas típicas para este microorganismo en TSI/LIA, en realidad conformaban reacciones bioquímicas integradas de dos microorganismos o más que aparentaban ser dicho patógeno o bien, si se encontraban purificadas previo a su envío al INCAP, pero como únicamente se les efectuó TSI/LIA como reacciones bioquímicas discriminantes, no era posible tener la certeza de que si se trataba realmente de *Shigella* spp

hasta que se efectuara la serología con los cuatro antisuecos que identifican la especie de que se trata.

Para los tres muestreos de carne y vegetales crudos, debe considerarse además un detalle de suma importancia: todos los expendedores de las trece cafeterías muestreadas fueron notificados de las fechas exactas en que se iban a recoger ambas materias primas. No se sabe si hayan decidido mejorar sus prácticas de transporte, almacenamiento y manipulación de estos productos durante esas fechas específicas y por tanto, los resultados pudieron haber sido sesgados por dicha decisión. Tampoco se sabe que tan valioso hubiera sido haber llevado a cabo los tres muestreos sin previo aviso a cada uno de los expendedores (tal como lo hace rutinariamente el Área de Alimentos de la Unidad de Salud).

A esto debe agregarse que no se puede predecir que resultados se habrían obtenido si se hubieran efectuado más muestreos o si se hubieran hecho en otra estación del año, ya que tal como se indicó en la sección III.C.1.c.), durante los meses cálidos existe un pico de las ETAs (por una diversidad de causas), pero los patógenos más comunes no son *Salmonella* spp (aunque no se sabe con exactitud cuál es el comportamiento estacional de *Shigella* spp) sino otros géneros tales como *Campylobacter* spp y *Escherichia coli*

Finalmente, puede afirmarse que tanto las carnes como los vegetales crudos se encuentran libres de los patógenos investigados, pero es preciso continuar con los monitoreos constantes y sin previo aviso de las materias primas de todos los expendedores de las cafeterías, para que sus productos terminados sean no solo inocuos sino de buena calidad microbiológica para la población estudiantil (tal como lo han verificado los análisis efectuados por el Área de Alimentos de la Unidad de Salud-Bienestar Estudiantil Universitario).

Queda demostrado además que los programas de capacitación a dichos expendedores han cumplido sus propósitos y que es necesario tener un nuevo procedimiento de operación estándar para investigar a los patógenos *Salmonella* spp y *Shigella* spp. Este estudio no abarcó el análisis de las materias primas para otros microorganismos indicadores de calidad

microbiológica e inocuidad (como por ejemplo *Campulobacter* spp o coliformes generales/*Escherichia coli*), pero esto queda sujeto a otros estudios posteriores.

X. Conclusiones

- A. Para estimar la carga microbiana y por tanto, los rangos de sensibilidad de cada una de las metodologías evaluadas para *Salmonella enteritidis* y *Shigella flexneri* se debe emplear el método de vertido en placa.
- B. La metodología IV es la más rápida, sensible, selectiva y diferencial de todas las evaluadas para detectar la presencia de *Salmonella enteritidis* en carnes crudas contaminadas deliberadamente.
- C. Las dos metodologías evaluadas para detectar la presencia de *Shigella flexneri* en vegetales crudos contaminados deliberadamente poseen el mismo desempeño, pero la metodología I fue la más apropiada para los fines de este estudio.
- D. La metodología Salmosyst/Rambach debe modificarse a través de un segundo medio sólido selectivo tal como el indicado por Cox (29), para prevenir falsos positivos y/o negativos que correspondan a otras enterobacterias o *Salmonella* spp atípicas, respectivamente.
- E. Las carnes y vegetales crudos evaluadas en este estudio se encuentran libres de los patógenos investigados, por lo que, a través de las buenas prácticas en el transporte, almacenamiento y manipulación de dichas materias primas se puede lograr que éstas sean inocuas y por tanto, puedan ser empleadas por los expendedores.

XI. Recomendaciones

- A. Determinar cuál es la sensibilidad y especificidad de las cuatro metodologías evaluadas para detectar la presencia de otras especies diferentes a *Salmonella enteritidis* y cuál es la sensibilidad y especificidad de las metodologías I y II para detectar la presencia de especies diferentes de *Shigella flexneri* en valores menores a 4×10^2 UFC/g de vegetales crudos.
- B. Modificar la metodología Salmosyst/Rambach (IV) para lograr distinguir los falsos positivos pertenecientes a otros géneros de enterobacterias y los falsos negativos correspondientes a *Salmonella* spp atípicas.
- C. Purificar las veces que sea necesario las colonias que se consideren sospechosas de estos dos patógenos previo a efectuar cualquier prueba bioquímica y serológica confirmatoria.
- D. Continuar los monitoreos de éstas materias primas de manera que sean sin previo aviso y en época de invierno no solamente para evaluar su inocuidad sino la calidad microbiológica general de las mismas.
- E. Proseguir con la capacitación de los expendedores en las cafeterías del campus universitario en cuanto a buenas prácticas de manufactura e incluso, lograr los prerrequisitos para la aplicación del sistema HACCP dentro de las mismas.
- F. Es necesario contar con la valiosa colaboración de un laboratorio de Referencia tal como el INCAP para confirmar los hallazgos que se consideren sospechosos y contribuir con la información epidemiológica que puedan proporcionar dichos hallazgos.
- G. Los muestreos de carnes y vegetales crudos a ser efectuados en las cafeterías del campus universitario deben hacerse sin previo aviso y en diferentes estaciones del año

para prevenir falsos negativos en los resultados a obtener para *Salmonella* spp y *Shigella* spp.

XII. Referencias

1. Almeida, CR., Schuch, DM, Gelli, DS., Cuellar, JA., Diez, AV., Escamilla, JA. eds. Contaminación microbiana de los alimentos vendidos en la vía pública en ciudades de América Latina y características socio-económicas de sus vendedores y consumidores. Organización Panamericana de la Salud: Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis. 1,996. 176 p. (p. 12-15).
2. Miranda, T. Informe de avance; Programa de Control Sanitario en Mercados, Restaurantes, Cafeterías y Comedores en la Ciudad de Guatemala. Guatemala: LUCAM, Doc.Tec. 1,994. (p. 1-9).
3. Menchú, DE. Evaluación de la Calidad Microbiológica de los Alimentos Vendidos en la Vía Pública, en Áreas de Venta Callejera del Departamento de Guatemala Consideradas Como Riesgo Por el Departamento de Registro y Control de Alimentos del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1,996. (p.4-6, 22, 39-40) 53 p.
4. Cabrera, SS. Situación de las enfermedades transmitidas por alimentos en Guatemala. San José de Costa Rica: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), Doc.Tec. 2,001. II+9 p.
5. Hotchkiss, JH., Potter, NN. Ciencia de los Alimentos. 5 ed. Sanz, B trad. Zaragoza: Acribia, S.A., 1,999. (p. 347-357, 366-371, 451-467, 585-613).
6. Adams, MR., Moss, MO. Microbiología de los Alimentos. Vergés, MR trad. Zaragoza: Acribia, S.A., 1,995. 464 p. (p. 100-106, 241-254, 255-258).
7. Bienestar Estudiantil Universitario Unidad de Salud-Laboratorio Clínico. Informe del Control Microbiológico de Alimentos en Cafeterías y Casetas correspondiente a Enero-

- Noviembre de 1,997. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. Doc. Tec. 1,998. 25 p.
8. Moragas, M., Pablo Busto, MB., eds. Recopilación de normas microbiológicas. Bilbao, España: Grupo de Alimentos de la Sociedad Española de Microbiología. Doc. Tec. 2,001. 25 p.
 9. Mitscherlich, E., Marth, EH., eds. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook; Factors Affecting the Growth of Some Foodborne Pathogens. Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, Germany: U.S. Food & Drug Administration. Center of Food Safety and Applied Nutrition. Doc. Tec. 1,992. 2p.
 10. Bunning, VK. et al. Thermotolerance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* after Sublethal Heat Shock. Appl. Environ. Microbiol. ASM. 1,990;56:3216-3219.
 11. Consejo Industrial para el Desarrollo; División de Prevención y Control de Enfermedades (HCP); Inocuidad de Alimentos para Nutricionistas. Salmonelosis Transmitidas por Alimentos. Organización Panamericana de la Salud: Instituto Panamericano de Protección de los Alimentos y Zoonosis. 2,000.
 12. Microorganismos de los Alimentos 1; Técnicas de Análisis Microbiológico. 2da ed. Ordóñez, JA., trad. Zaragoza: Acribia, S.A. Vols. 2, vol. 1. 1,975. (p. 16-22, 163-175).
 13. U.S. Food & Drug Administration. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook; *Salmonella* spp. United States of America: Center of Food Safety and Applied Nutrition. Doc. Tec. 1,992. 6 p.
 14. Salgado, J., Jaramillo, CJ., Núñez, JF. *Salmonella* spp en tres tipos de chorizos, como peligro dentro de un sistema de análisis de riesgos e identificación de puntos críticos de control (HACCP), en una empacadora de la ciudad de México. Vet. Mex. 1,999; 30: 157-165.

15. Zhao, Cuiwei et al. Prevalence of *Campylobacter* spp, *Escherichia coli* and *Salmonella* spp Serovars in Retail Chicken, Turkey, Pork, and Beef from the Greater Washington, D.C., Area. *Appl. Environ. Microbiol. ASM.* 2,001; 67:5431-5436.
16. Pignato, S. et al. Evaluation of new culture media for rapid detection and isolation of salmonellae in foods. *Appl. Environ. Microbiol. ASM.* 1,995;61:1996-1999.
17. Knabel, SJ. et al. Enfermedades transmitidas a través de los alimentos; Papel que juegan las prácticas usadas en el manejo de los alimentos en el hogar. Pennsylvania, Estados Unidos: Institute of Food Technologists sobre inocuidad alimenticia y nutrición de la Universidad del Estado de Pennsylvania, Doc. Tec. 1,994. 22p.
18. Goodnough, MC., Johnson EA. Control of *Salmonella enteritidis* Infections in Poultry by Polimixin B and Trimethoprim. *Appl. Environ. Microbiol. ASM.* 1,991;57:783-788.
19. Peplow, MO., et al. Sensitivity, Specificity, and Predictive Values of Three *Salmonella* Rapid Detection Kits Using Fresh and Frozen Poultry Environmental Samples versus Those of Standard Plating. *Appl. Environ. Microbiol. ASM.* 1,999;65:1055-1060.
20. Carrera, JA., Caballero TA., Lengomín, ME., Vigilancia de *Staphylococcus* y *Salmonella* en alimentos. *Rev Cubana Aliment Nutr.* 1,998;12:9-16.
21. Zhuang, R-Y., Beuchat, LR. and Angulo, FJ., Fate of *Salmonella monterideo* on and in Raw Tomatoes as Affected by Temperature and Treatment with Chlorine. *Appl. Environ. Microbiol. ASM.* 1,995; 61: 2127-2131.
22. Dickson, JS., Siragusa, GR., Wray, JE., Predicting the Growth of *Salmonella typhimurium* on Beef by Using the Temperature Function Integration Technique. *Appl. Environ. Microbiol. ASM.* 1,992;58:3482-3487.

23. Rocelle, M. et al. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Campylobacter jejuni* in Raw Ground Beef by Gamma Irradiation. *Appl. Environ. Microbiol.* ASM. 1,994; 60:2069-2075.
24. Andrews, WH., Hammack, TS. U.S. Food & Drug Administration; Centers for Food Safety & Applied Nutrition; Bacteriological Analytical Manual Online. 8 ed. Gaithersburg, MD, United States: AOAC International, Doc. Tec. 2,001. 39p.
25. Microorganismos de los Alimentos; Métodos de muestreo para análisis microbiológicos: Principios y aplicaciones específicas. 2da ed. Ordóñez, JA., trad. Zaragoza: Acribia, S.A. Vols. 2 vol. 2. 1,999. (p. 13-17, 75-96, 117-123, 133-136, 177-179).
26. D'Aoust, JY., Purvis, U. Isolation and Identification of *Salmonella* from Foods. Ottawa, Canada: Polyscience Publications. 1,998. (p.1-20).
27. Cano, F., Torres, O., Pratdesaba, R. Manual Microbiología de Alimentos; Laboratorios INCAP. OPS, INCAP y CONCYT. Ciudad de Guatemala: INCAP. 1,999. 187 p.
28. Rambach, A. New Plate Medium for Facilitated Differentiation of *Salmonella* spp from *Proteus* spp and Other Enteric Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* ASM. 1,990;56:301-303.
29. Cox, JM. Lysine-Mannitol-Glycerol Agar, a Medium for the Isolation of *Salmonella* spp., Including *S. typhi* and Atypical Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* ASM. 1,993;59:2602-2606.
30. Poucke, LSG. *Salmonella*-TEK, a Rapid Screening Method for *Salmonella* Species in Food. *Appl. Environ. Microbiol.* ASM. 1,990;56:924-927.

31. Kühn, H. et al. Evaluation of Rambach Agar for Detection of *Salmonella* Subspecies I to VI. *Appl. Environ. Microbiol.* ASM. 1,994;60:749-751.
32. Gross, RJ. Revisiones sobre ciencia y tecnología de los alimentos; Higiene y Seguridad Alimentaria. Watson, D., trad. Zaragoza: Acribia, S.A.. Vols 2, vol. 1, 1,992. (p. 11-13).
33. Goosney, DL., Knoechel, DG., Finlay BB. Enteropathogenic *E. coli*, *Salmonella*, and *Shigella*, Masters of Host Cell Cytoskeletal Exploitation. *Emerging Infectious Diseases*. Atlanta, GA, United States: National Center for Infectious Diseases CDC. 1,999;5:1-20.
34. U.S. Food & Drug Administration. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook; *Shigella* spp. United States of America: Center of Food Safety and Applied Nutrition. Doc. Tec. 2,002. 7 p.
35. Vargas, M. et al. Prevalence of *Shigella* Enterotoxins 1 and 2 among *Shigella* Strains Isolated from Patients with Traveler's Diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, ASM. 1,999;37: 3608-3611.
36. Navia, MM., et al. Typing and Characterization of Mechanisms of Resistance of *Shigella* spp Isolated from Feces of Children under 5 Years of Age from Ifakara, Tanzania. *Journal of Clinical Microbiology*, ASM. 1,999;37:3113-3117.
37. Chiou, C-S., et al. Molecular Epidemiology of a *Shigella flexneri* Outbreak in a Mountainous Township in Taiwan, Republic of China. *Journal of Clinical Microbiology*. ASM. 2,001;39:1048-1056.
38. Kapperud, G. et al. Outbreak of *Shigella sonnei* infection traced to imported iceberg lettuce. *Journal of Clinical Microbiology*, ASM. 1,995;33:609-614.

39. Centers of Disease Control and Prevention. International Notes *Shigella dysenteriae* Type I --Guatemala, Morbidity and Mortality Weekly Report. 1,991;40:247-428, 421.
40. Ramírez AM., et al. Caracterización de un brote de *Shigella boydii* 14 por primera vez en Cuba. Rev Cubana Hig Epidemiol. 1,999;37:90-93.
41. Seymour, C., Crowe, HM., Wilson, ME. Comparative virulence of blood and stool isolates of *Shigella sonnei*. Journal of Clinical Microbiology, ASM. 1,994;32:835-838.
42. Österblad, M. et al. Antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae isolated from vegetables. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, British Society for Antimicrobial Chemotherapy. 1,999;43:503-509.
43. Feachmen R., et al. Sanitation and disease; Health Aspects of Excreta and Wastewater Management. New York: John Wiley, 1,983. 501 p.
44. U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition. Outbreaks Associated with Fresh and Fresh-Cut Produce. Incidence, Growth, and Survival of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce. United States: Analysis and Evaluation of Preventive Control Measures for the Control and Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh-Cut Produce, 2,001. (p.1-39).
45. Islam, M.S., Hasan, MK and Khan, S.I. Growth and survival of *Shigella flexneri* in common Bangladeshi foods under various conditions of time and temperature. Appl. Environ. Microbiol, ASM. 1993;59:652-654.
46. Lampel, KA., et al. Polymerase Chain Reaction for Detection of Invasive *Shigella flexneri* in Food. Appl. Environ. Microbiol, ASM. 1,990;56:1536-1540.

47. Blom, M. et al. Evaluation of Statens Serum Institut Enteric Medium for Detection of Enteric Pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*, ASM. 1,999;37:2312-2316.

XIII. Anexos

Anexo 1

Tabla No. 1
Resultados obtenidos en el análisis microbiológico de las cafeterías de la ciudad capital de Guatemala

Alimento	n	C	%
Ensaladas	12	10	83
Aderezos y salsas	2	2	100
Refrescos	12	1	8
Pollo preparado	2	2	100
Guacamol	2	0	0
Panes preparados	4	3	75
Envueltos en huevo	1	1	100
Tacos, tostadas y dobladas	3	1	33
Fruta y verdura consumida cruda	3	3	100
Total:	42	24	57%

n = número de muestras analizadas

C = número de muestras que cumplen con las normas microbiológicas vigentes

% = porcentaje de muestras que cumplen con las normas microbiológicas vigentes

Referencias: (2)

Anexo 2

Tabla No. 2
Resultados obtenidos por año en las cafeterías del campus de la Universidad de San Carlos de Guatemala

Análisis efectuados	Porcentaje de resultados no aceptados por año		
	1,995	1,996	1,997
<i>Escherichia coli</i>	14.29	34.62	47.62
<i>Staphylococcus aureus</i>	27.27	28.57	47.62
<i>Salmonella spp</i>	0.00	0.00	0.00
GAM	95.24	70.37	50.00
Coliformes totales	85.71	70.00	52.17

GAM: Gérmenes Aerobios Mesófilos

Referencias: (2)

Anexo 3

Tabla No. 3

Concentraciones de agentes causales de ETAs consideradas como riesgo

Microorganismo	Concentración UFC/g considerada como riesgo
<i>Vibrio cholerae</i>	mayor o igual a 10^3
<i>S. aureus</i>	mayor o igual a 10^4
<i>B. cereus</i>	mayor o igual a 10^4
<i>Clostridium perfringens</i>	mayor o igual a 10^4
<i>Salmonella</i>	Presencia
<i>Shigella</i>	Presencia
<i>E. coli</i> O157:H7	Presencia

UFC/g: Unidades Formadoras de Colonia por gramo de alimento

Referencias: (1,3)

Anexo 4

Tabla No.4
Pruebas bioquímicas confirmatorias para *Salmonella* spp

Medio	Reacción	Observación	Reacción típica de <i>Salmonella</i> spp
Triple Sugar Iron Agar (TSI)	Utilización de la Lactosa y/o sucrosa	Reacción positiva: el slant cambia a amarillo Reacción negativa: el slant no cambia de color	Negativo*
	Utilización de la dextrosa	Reacción positiva: el fondo cambia a amarillo con o sin burbujas de gas Reacción negativa: el fondo no cambia de color	Positivo
	Producción de H ₂ S	Reacción positiva: fondo y/o slant de color negro Reacción negativa: No se observa el color negro	Positivo**
Lysine Iron Agar (LIA)	Producción de H ₂ S	Reacción positiva: fondo y/o slant de color negro Reacción negativa: No se observa el color negro	Positivo**
	Lisina descarboxilasa	Reacción positiva: El fondo permanece púrpura Reacción negativa: El fondo cambia a amarillo	Positivo
	Lisina desaminasa	Reacción positiva: el slant cambia a un color rojo vinoso Reacción negativa: El color del slant no cambia	Negativo
Agar Urea de Christensen	Ureasa	Reacción positiva: El slant cambia a rosado o rojo Reacción negativa: El color del slant no cambia	Negativo

*: algunas cepas pueden utilizar uno o ambos sustratos.

** : pueden encontrarse productores lentos de H₂S. Esta reacción puede ser inhibida por cepas productoras de lactosa y/o sucrosa

Referencias: (26,27)

Anexo 5

Tabla No.5
Características de *Shigella* spp en medios de cultivo selectivos para enterobacterias

Medio de Cultivo	Características de <i>Shigella</i> spp
MacConkey	Colonias ligeramente rosadas, translúcidas con o sin bordes rugosos
XLD	Colonias rojas o rosadas de 1 milímetro de diámetro*
SSI	Colonias con transformaciones irregulares características, en donde la superficie y la periferia se observan con aspecto serrado.**
SS	Colonias opacas o sin color.+

*: Se ha reportado que *Shigella dysenteriae* 1 crece pobremente en este medio

** : Estas transformaciones se observan principalmente en *Shigella sonnei* y se deben a altas concentraciones de iones divalentes (Ca++ y Mg++).

+ : Este medio es altamente selectivo, de manera que puede limitar el crecimiento de las shigelas más frágiles como *Shigella sonnei* o *Shigella dysenteriae* 1.

Referencias: (6,12,24,47).

Anexo 6

Tabla No. 6
Características fisiológicas del género *Shigella* spp

Característica microbiana	Reacción
Tinción de Gram	Bacilos gram negativo
Producción de H ₂ S	Negativo
Presencia de la enzima ureasa	Negativo
Reacción de sucrosa, adonitol, inositol y lactosa (en dos días), malonato, citrato y salicina	Negativo
Movilidad	Negativo
Producción de gas a partir de la glucosa	Negativo
Fermentación de la glucosa	Positivo
Descarboxilación de la lisina	Negativo
Reacción de rojo de metilo	Positivo

Referencia: (24)

Anexo 7

Tabla No.7

Caracterización serológica del serotipo de *Shigella* spp por medio de antisueros polivalentes

Antisuero polivalente Grupo	Especie (Serogrupo)	Número de serotipos
A	<i>Shigella dysenteriae</i>	1-7
A1		8-10
B	<i>Shigella flexneri</i>	6
C	<i>Shigella boydii</i>	1-7
C1		8-11
C2		12-15
D	<i>Shigella sonnei</i>	1

Referencia: (27).

Rectángulo	Suspensión	Antisuero polivalente								Solución Salina
		A	A ₁	B	C	C ₁	C ₂	D	A - D	
1	+	+								
2	+		+							
3	+			+						
4	+				+					
5	+					+				
6	+						+			
7	+							+		
8	+								+	
9	+									+

Nota: Se deben mezclar los componentes de cada rectángulo con un asa, cuidando de no mezclar un rectángulo con los otros. Agitar por 3 a 4 minutos con movimientos circulares para acelerar la aglutinación. Si se da una reacción negativa, calentar la suspensión por 30 minutos (para hidrolizar los antígenos capsulares interferentes) y volver a efectuar la caracterización polivalente. También pueden efectuarse las caracterizaciones con antisueros monovalentes a partir de las reacciones polivalentes positivas. Algunos serotipos son tentativos, por lo que pueden ocurrir reacciones negativas.

Referencia: (24).

Anexo 8

Tabla No. 8
 Números Asignados a cada Cafetería Muestreada durante la Fase Experimental

Primer Muestreo		Segundo Muestreo		Tercer Muestreo	
No. de Cafetería (código)	Nombre	No. de Cafetería (código)	Nombre	No. de Cafetería (código)	Nombre
1	Krafftten	14	Krafftten	27	Krafftten
2	Metropolitana	15	Metropolitana	28	Metropolitana.
3	Quality	16	Quality	29	Quality
4	Ingeniería	17	Ingeniería	30	Ingeniería
5	Ingeniería	18	Ingeniería	31	Farmacia
6	C. Comunicación	19	C. Comunicación	32	C. Comunicación
7	Arquitectura	20	Arquitectura	33	Arquitectura
8	Veterinaria	21	Humanidades S4	34	Humanidades S4
9	Humanidades S4	22	Odontología M3	35	Agronomía T9
10	C. Política M5	23	C. Política M5	36	Odontología M3
11	Agronomía	24	Agronomía	37	Derecho S7
12	Odontología M3	25	Veterinaria	38	Veterinaria
13	Derecho S7	26	Derecho S7	39	C. Política M5

Anexo 9
Resultados de las Confirmaciones Bioquímicas y Serológicas de los
Microorganismos Sospechosos para *Salmonella* spp y *Shigella* spp de acuerdo
con lo efectuado en INCAP

INSTITUTO DE NUTRICION DE CENTRO AMERICA Y PANAMA

Calzada Roosevelt Zona 11, Guatemala, C.A.

Teléfonos: (502) 472 3762 al 472 3767

Fax: (502) 473 6529



RESULTADO DE ANALISIS DE LABORATORIO
MUESTRAS DE ALIMENTOS

Muestra: Identificación de cepa 23 B RM		Reg. No. 952540	Fecha de reporte: 22/julio/2002
Referido por: <u>Lic. Herberth Arévalo</u>			
Empresa: <u>Unidad de Salud USAC</u>			
Dirección: <u>Ciudad Universitaria Zona 12</u>			
Teléfono:		Fax:	NIT.
Fecha de toma de muestra:	Hora de toma de muestra:	Fecha de recepción: 17/julio/2002	
Hora de recepción: 12:00 horas	Fecha de inicio del análisis: 17/julio/2002	Fecha de finalización del análisis: 19/julio/2002	
RECUENTOS (UFC / g o ml)		COLIFORMES (NMP / g o ml)	
Aeróbico total: Mohos: Levaduras: Esporoformadores: Otros:		Coliformes totales: Coliformes fecales: <i>Escherichia coli</i> :	
DETERMINACION DE PATOGENOS		DETERMINACIONES ESPECIALES	
<i>Salmonella</i> spp.: NEGATIVO / 25 g		Toxina del cólera:	
<i>Shigella</i> spp.: / 25 g		Toxina lábil de <i>E. coli</i> :	
<i>Vibrio cholerae</i> O1: / 25 g		<i>E. coli</i> O:157 H:7:	
<i>Vibrio parahemolyticus</i> : / 25 g		<i>E. coli</i> enteropatógena:	
<i>Listeria monocytogenes</i> :			
<i>Staphylococcus aureus</i> : UFC / g o ml			
<i>Bacillus cereus</i> : UFC / g o ml			
<i>Clostridium perfringens</i> : UFC / g o ml			
Anaerobios sulfito reductores: UFC / g o ml			
Otros:			
OBSERVACIONES: *			
Método utilizado: BAM 8 th ed. 1995, FDA.			

Lic. Rafael Pratdesaba

[Signature]
Supervisor del Laboratorio
DR. LEONARDO MATA
INCAP



**RESULTADO DE ANALISIS DE LABORATORIO
MUESTRAS DE ALIMENTOS**

Muestra: Identificación de cepa 28 A RM		Reg. No. 952542	Fecha de reporte: 22/julio/2002
Referido por:	<u>Lic. Herberth Arévalo</u>		
Empresa:	<u>Unidad de Salud USAC</u>		
Dirección:	<u>Ciudad Universitaria Zona 12</u>		
Teléfono:	Fax:	NIT.	
Fecha de toma de muestra:	Hora de toma de muestra:	Fecha de recepción: 17/julio/2002	
Hora de recepción: 12:00 horas	Fecha de inicio del análisis: 17/julio/2002	Fecha de finalización del análisis: 22/julio/2002	
RECUENTOS (UFC / g o ml)		COLIFORMES (NMP / g o ml)	
Aeróbico total: Mohos: Levaduras: Esporoformadores: Otros:	/		
DETERMINACION DE PATOGENOS		DETERMINACIONES ESPECIALES	
<i>Salmonella</i> spp.: <i>Shigella</i> spp.: <i>Vibrio cholerae</i> O1: <i>Vibrio parahemolyticus</i> : <i>Listeria monocytogenes</i> : <i>Staphylococcus aureus</i> : <i>Bacillus cereus</i> : <i>Clostridium perfringens</i> : Anaerobios sulfito reductores:	NEGATIVO / 25 g / 25 g / 25 g / 25 g / 25 g UFC / g o ml UFC / g o ml UFC / g o ml UFC / g o ml	Toxina del cólera: Toxina lábil de <i>E. coli</i> : <i>E. coli</i> O:157 H:7: <i>E. coli</i> enteropatógena:	
Otros:			
OBSERVACIONES: *			
Método utilizado: BAM 8 th ed. 1995, FDA.			

Lic. Rafael Pratdesaba

Arévalo
Supervisor de Laboratorio
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA
C.R. LEONARDO MATA
INCAP



**RESULTADO DE ANALISIS DE LABORATORIO
MUESTRAS DE ALIMENTOS**

Muestra: Identificación de cepa 33 B RM		Reg. No. 952541	Fecha de reporte: 22/julio/2002
Referido por: <u>Lic. Herberth Arévalo</u>			
Empresa: <u>Unidad de Salud USAC</u>			
Dirección: <u>Ciudad Universitaria Zona 12</u>			
Teléfono:		Fax:	NIT.
Fecha de toma de muestra:	Hora de toma de muestra:	Fecha de recepción: 17/julio/2002	
Hora de recepción: 12:00 horas	Fecha de inicio del análisis: 17/julio/2002	Fecha de finalización del análisis: 22/julio/2002	
RECUENTOS (UFC / g o ml)		COLIFORMES (NMP / g o ml)	
Aeróbico total: Mohos: Levaduras: Esporoformadores: Otros:		Coliformes totales: Coliformes fecales: <i>Escherichia coli</i> :	
DETERMINACION DE PATOGENOS		DETERMINACIONES ESPECIALES	
<i>Salmonella</i> spp.: NEGATIVO / 25 g <i>Shigella</i> spp.: / 25 g <i>Vibrio cholerae</i> O1: / 25 g <i>Vibrio parahemolyticus</i> : / 25 g <i>Listeria monocytogenes</i> : <i>Staphylococcus aureus</i> : UFC / g o ml <i>Bacillus cereus</i> : UFC / g o ml <i>Clostridium perfringens</i> : UFC / g o ml Anaerobios sulfito reductores: UFC / g o ml		Toxina del cólera: Toxina lábil de <i>E. coli</i> : <i>E. coli</i> O:157 H:7: <i>E. coli</i> enteropatógena:	
Otros:			
OBSERVACIONES: *			
Método utilizado: BAM 8 th ed. 1995, FDA.			

Lic. Rafael Pratdesaba

Aida
Supervisora del Laboratorio
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA
DR. LEONARDO MATA
INCAP



RESULTADO DE ANALISIS DE LABORATORIO
MUESTRAS DE ALIMENTOS

Muestra: Identificación de cepa 37A RM		Reg. No. 952543	Fecha de reporte: 22/julio/2002
Referido por: <u>Lic. Herberth Arévalo</u>			
Empresa: <u>Unidad de Salud USAC</u>			
Dirección: <u>Ciudad Universitaria Zona 12</u>			
Teléfono:		Fax:	NIT.
Fecha de toma de muestra:	Hora de toma de muestra:	Fecha de recepción: 17/julio/2002	
Hora de recepción: 12:00 horas	Fecha de inicio del análisis: 17/julio/2002	Fecha de finalización del análisis: 19/julio/2002	
RECUENTOS (UFC / g o ml)		COLIFORMES (NMP / g o ml)	
Aeróbico total: /		Coliformes totales: /	
Mohos: /		Coliformes fecales: /	
Levaduras: /		<i>Escherichia coli</i> : /	
Esporoformadores: /			
Otros: /			
DETERMINACION DE PATOGENOS		DETERMINACIONES ESPECIALES	
<i>Salmonella</i> spp.: NEGATIVO / 25 g		Toxina del cólera: /	
<i>Shigella</i> spp.: / 25 g		Toxina lábil de <i>E. coli</i> : /	
<i>Vibrio cholerae</i> O1: / 25 g		<i>E. coli</i> O:157 H:7: /	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> : / 25 g		<i>E. coli</i> enteropatógeno: /	
<i>Listeria monocytogenes</i> : /			
<i>Staphylococcus aureus</i> : UFC / g o ml			
<i>Bacillus cereus</i> : UFC / g o ml			
<i>Clostridium perfringens</i> : UFC / g o ml			
Anaerobios sulfito reductores: UFC / g o ml			
Otros:			
OBSERVACIONES:			
*			
Método utilizado: BAM 8 th ed. 1995, FDA.			

Lic. Rafael Pratdesaba

Arévalo
Supervisor del Laboratorio
INSTITUTO DE NUTRICION DE CENTRO AMERICA Y PANAMA
DR. LEONARDO MATA
INCAP

INSTITUTO DE NUTRICION DE CENTRO AMERICA Y PANAMA

Calzada Roosevelt Zona 11, Guatemala, C.A.

Teléfonos: (502) 472 3762 al 472 3767

Fax: (502) 473 6529



RESULTADO DE ANALISIS DE LABORATORIO
MUESTRAS DE ALIMENTOS

Muestra: Identificación de cepa 3 B SS		Reg. No. 952534	Fecha de reporte: 22/julio/2002
Referido por: <u>Lic. Herberth Arévalo</u>			
Empresa: <u>Unidad de Salud USAC</u>			
Dirección: <u>Ciudad Universitaria Zona 12</u>			
Teléfono:		Fax:	NIT.
Fecha de toma de muestra:	Hora de toma de muestra:	Fecha de recepción: 17/julio/2002	
Hora de recepción: 12:00 horas	Fecha de inicio del análisis: 17/julio/2002	Fecha de finalización del análisis: 19/julio/2002	
RECUENTOS (UFC / g o ml)		COLIFORMES (NMP / g o ml)	
Aeróbico total: / Mohos: / Levaduras: / Esporoformadores: / Otros: /		Coliformes totales: / Coliformes fecales: / <i>Escherichia coli</i> : /	
DETERMINACION DE PATOGENOS		DETERMINACIONES ESPECIALES	
<i>Salmonella</i> spp.: — / 25 g <i>Shigella</i> spp.: NEGATIVO / 25 g <i>Vibrio cholerae</i> O1: / 25 g <i>Vibrio parahemolyticus</i> : / 25 g <i>Listeria monocytogenes</i> : / <i>Staphylococcus aureus</i> : UFC / g o ml <i>Bacillus cereus</i> : UFC / g o ml <i>Clostridium perfringens</i> : UFC / g o ml Anaerobios sulfito reductores: UFC / g o ml Otros: /		Toxina del cólera: / Toxina lábil de <i>E. coli</i> : / <i>E. coli</i> O:157 H:7: / <i>E. coli</i> enteropatógena: /	
OBSERVACIONES: * Método utilizado: BAM 8 th ed. 1995, FDA.			

Lic. Rafael Pratdesaba

Arévalo
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA
Supervisor del Laboratorio
DR. LEONARDO MATA

INSTITUTO DE NUTRICION DE CENTRO AMERICA Y PANAMA

Calzada Roosevelt Zona 11, Guatemala, C.A.

Teléfonos: (502) 472 3762 al 472 3767

Fax: (502) 473 6529



RESULTADO DE ANALISIS DE LABORATORIO
MUESTRAS DE ALIMENTOS

Muestra: Identificación de cepa 5 B 55		Reg. No. 952539	Fecha de reporte: 22/julio/2002
Referido por: <u>Lic. Herberth Arévalo</u>			
Empresa: <u>Unidad de Salud USAC</u>			
Dirección: <u>Ciudad Universitaria Zona 12</u>			
Teléfono:		Fax:	NIT.
Fecha de toma de muestra:	Hora de toma de muestra:	Fecha de recepción: 17/julio/2002	
Hora de recepción: 12:00 horas	Fecha de inicio del análisis: 17/julio/2002	Fecha de finalización del análisis: 19/julio/2002	
RECUENTOS (UFC / g o ml)		COLIFORMES (UFC / g o ml)	
Aeróbico total: Mohos: Levaduras: Esporoformadores: Otros:		Coliformes totales: Coliformes fecales: <i>Escherichia coli</i> :	
DETERMINACION DE PATOGENOS		DETERMINACIONES ESPECIALES	
<i>Salmonella</i> spp.: NEGATIVO / 25 g <i>Shigella</i> spp.: NEGATIVO / 25 g <i>Vibrio cholerae</i> O1: / 25 g <i>Vibrio parahemolyticus</i> : / 25 g <i>Listeria monocytogenes</i> : <i>Staphylococcus aureus</i> : UFC / g o ml <i>Bacillus cereus</i> : UFC / g o ml <i>Clostridium perfringens</i> : UFC / g o ml Anaerobios sulfito reductores: UFC / g o ml		Toxina del cólera: Toxina lábil de <i>E. coli</i> : <i>E. coli</i> O:157 H:7: <i>E. coli</i> enteropatógenos:	
Otros:			
OBSERVACIONES: *			
Método utilizado: BAM 8 th ed. 1995, FDA.			

Lic. Rafael Pratdesaba

Ajinch
Supervisor del Laboratorio
DR. LEONARDO MATA
INCAP

INSTITUTO DE NUTRICION DE CENTRO AMERICA Y PANAMA

Calzada Roosevelt Zona 11, Guatemala, C.A.

Teléfonos: (502) 472 3762 al 472 3767

Fax: (502) 473 6529



RESULTADO DE ANALISIS DE LABORATORIO
MUESTRAS DE ALIMENTOS

Muestra: Identificación de cepa 12 A 55		Reg. No. 952535	Fecha de reporte: 22/julio/2002
Referido por: <u>Lic. Herberth Arévalo</u>			
Empresa: <u>Unidad de Salud USAC</u>			
Dirección: <u>Ciudad Universitaria Zona 12</u>			
Teléfono:		Fax:	NIT.
Fecha de toma de muestra:	Hora de toma de muestra:	Fecha de recepción: 17/julio/2002	
Hora de recepción: 12:00 horas	Fecha de inicio del análisis: 17/julio/2002	Fecha de finalización del análisis: 19/julio/2002	
RECUENTOS (UFC / g o ml)		COLIFORMES (NMP / g o ml)	
Aeróbico total: Mohos: Levaduras: Esporoformadores: Otros:		Coliformes totales: Coliformes fecales: <i>Escherichia coli</i> :	
DETERMINACION DE PATOGENOS		DETERMINACIONES ESPECIALES	
<i>Salmonella</i> spp.: — / 25 g <i>Shigella</i> spp.: NEGATIVO / 25 g <i>Vibrio cholerae</i> O1: / 25 g <i>Vibrio parahemolyticus</i> : / 25 g <i>Listeria monocytogenes</i> : <i>Staphylococcus aureus</i> : UFC / g o ml <i>Bacillus cereus</i> : UFC / g o ml <i>Clostridium perfringens</i> : UFC / g o ml Anaerobios sulfito reductores: UFC / g o ml		Toxina del cólera: Toxina lábil de <i>E. coli</i> : <i>E. coli</i> O:157 H:7: <i>E. coli</i> enteropatógena:	
Otros:			
OBSERVACIONES: *			
Método utilizado: BAM 8 th ed. 1995, FDA.			

Lic. Rafael Pratdesaba

LABORATORIO DE INVESTIGACION
LEONARDO MATA
Supervisor del Laboratorio
INCAP



RESULTADO DE ANALISIS DE LABORATORIO
MUESTRAS DE ALIMENTOS

Muestra: Identificación de cepa 13 A SS		Reg. No. 952536	Fecha de reporte: 22/julio/2002
Referido por: <u>Lic. Herberth Arévalo</u>			
Empresa: <u>Unidad de Salud USAC</u>			
Dirección: <u>Ciudad Universitaria Zona 12</u>			
Teléfono:		Fax:	NIT.
Fecha de toma de muestra:	Hora de toma de muestra:	Fecha de recepción: 17/julio/2002	
Hora de recepción: 12:00 horas	Fecha de inicio del análisis: 17/julio/2002	Fecha de finalización del análisis: 22/julio/2002	
RECUENTOS (UFC / g o ml)		COLIFORMES (NAP / g o ml)	
Aeróbico total: Mohos: Levaduras: Esporoformadores: Otros:		Coliformes totales: Coliformes fecales: <i>Escherichia coli</i> :	
DETERMINACION DE PATOGENOS		DETERMINACIONES ESPECIALES	
<i>Salmonella</i> spp.: / 25 g		Toxina del cólera:	
<i>Shigella</i> spp.: NEGATIVO / 25 g		Toxina lábil de <i>E. coli</i> :	
<i>Vibrio cholerae</i> O1: / 25 g		<i>E. coli</i> O:157 H:7:	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> : / 25 g		<i>E. coli</i> enteropatógena:	
<i>Listeria monocytogenes</i> :			
<i>Staphylococcus aureus</i> : UFC / g o ml			
<i>Bacillus cereus</i> : UFC / g o ml			
<i>Clostridium perfringens</i> : UFC / g o ml			
Anaerobios sulfito reductores: UFC / g o ml			
Otros:			
OBSERVACIONES: *			
Método utilizado: BAM 8 th ed. 1995, FDA.			

Lic. Rafael Pratdesaba

Arévalo
Supervisor del Laboratorio
DR. LEONARDO MATA
INCAP

INSTITUTO DE NUTRICION DE CENTRO AMERICA Y PANAMA

Calzada Roosevelt Zona 11, Guatemala, C.A.

Teléfonos: (502) 472 3762 al 472 3767

Fax: (502) 473 6529



RESULTADO DE ANALISIS DE LABORATORIO
MUESTRAS DE ALIMENTOS

Muestra: Identificación de cepa 13 B SS		Reg. No. 952537	Fecha de reporte: 22/julio/2002
Referido por: <u>Lic. Herberth Arévalo</u>			
Empresa: <u>Unidad de Salud USAC</u>			
Dirección: <u>Ciudad Universitaria Zona 12</u>			
Teléfono:		Fax:	NIT.
Fecha de toma de muestra:	Hora de toma de muestra:	Fecha de recepción: 17/julio/2002	
Hora de recepción: 12:00 horas	Fecha de inicio del análisis: 17/julio/2002	Fecha de finalización del análisis: 19/julio/2002	
RECUENTOS (UFC / g o ml)		COLIFORMES (NMP / g o ml)	
Aeróbico total: Mohos: Levaduras: Esporoformadores: Otros:		Coliformes totales: Coliformes fecales: <i>Escherichia coli</i> :	
DETERMINACION DE PATOGENOS		DETERMINACIONES ESPECIALES	
<i>Salmonella</i> spp.: / 25 g <i>Shigella</i> spp.: NEGATIVO / 25 g <i>Vibrio cholerae</i> O1: / 25 g <i>Vibrio parahemolyticus</i> : / 25 g <i>Listeria monocytogenes</i> : <i>Staphylococcus aureus</i> : UFC / g o ml <i>Bacillus cereus</i> : UFC / g o ml <i>Clostridium perfringens</i> : UFC / g o ml Anaerobios sulfito reductores: UFC / g o ml Otros:		Toxina del cólera: Toxina lábil de <i>E. coli</i> : <i>E. coli</i> O:157 H:7: <i>E. coli</i> enteropatógena:	
OBSERVACIONES: *			
Método utilizado: BAM 8 th ed. 1995, FDA.			

Lic. Rafael Pratdesaba

Agenda
 INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA
 DR. LEONARDO MATA
 Supervisor del Laboratorio

INSTITUTO DE NUTRICION DE CENTRO AMERICA Y PANAMA

Calzada Roosevelt Zona 11, Guatemala, C.A.

Teléfonos: (502) 472 3762 al 472 3767

Fax: (502) 473 6529



RESULTADO DE ANALISIS DE LABORATORIO
MUESTRAS DE ALIMENTOS

Muestra: Identificación de cepa 28 A MK		Reg. No. 952538	Fecha de reporte: 22/julio/2002
Referido por: <u>Lic. Herberth Arévalo</u>			
Empresa: <u>Unidad de Salud USAC</u>			
Dirección: <u>Ciudad Universitaria Zona 12</u>			
Teléfono:		Fax:	NIT.
Fecha de toma de muestra:	Hora de toma de muestra:	Fecha de recepción: 17/julio/2002	
Hora de recepción: 12:00 horas	Fecha de inicio del análisis: 17/julio/2002	Fecha de finalización del análisis: 22/julio/2002	
RECUENTOS (UFC / g o ml)		COLIFORMES (NMP / g o ml)	
Aeróbico total: Mohos: Levaduras: Esporoformadores: Otros:		Coliformes totales: Coliformes fecales: <i>Escherichia coli</i> :	
DETERMINACION DE PATOGENOS		DETERMINACIONES ESPECIALES	
<i>Salmonella</i> spp.: — / 25 g <i>Shigella</i> spp.: NEGATIVO / 25 g <i>Vibrio cholerae</i> O1: / 25 g <i>Vibrio parahemolyticus</i> : / 25 g <i>Listeria monocytogenes</i> : <i>Staphylococcus aureus</i> : UFC / g o ml <i>Bacillus cereus</i> : UFC / g o ml <i>Clostridium perfringens</i> : UFC / g o ml Anaerobios sulfito reductores: UFC / g o ml		Toxina del cólera: Toxina lábil de <i>E. coli</i> : <i>E. coli</i> O:157 H:7: <i>E. coli</i> enteropatógena:	
Otros:			
OBSERVACIONES: *			
Método utilizado: BAM 8 th ed. 1995, FDA.			

Lic. Rafael Pratdesaba

[Handwritten Signature]
Supervisor del Laboratorio
DR. LEONARDO MATA
INCAP