

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



DETECCION DE *Salmonella spp* RESISTENTE A ANTIBIOTICOS EN CARNE
MOLIDA DE RES DISTRIBUIDAS EN LOS SUPERMERCADOS EN LA ZONA 2
DEL DISTRITO 2 DEL AREA METROPOLITANA DE SAN SALVADOR.

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR

CARMEN ALICIA URRUTIA CRUZ

GERSON JOSSUE GUERRA CUBIAS

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA

SEPTIEMBRE 2012

SAN SALVADOR EL SALVADOR CENTROAMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

LICDA. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

SECRETARIO

LICDO. REMBERTO MIXCO LOPEZ

COMITÉ DE TRABAJO DE GRADUACION

COORDINADORA GENERAL

LICDA. MARIA CONCEPCION ODETTE RAUDA ACEVEDO

ASESORA DE AREA DE ANALISIS DE ALIMENTOS, MICROBIOLOGICO

MSc. MARIA EVELYN SANCHEZ DE RAMOS.

ASESORA DE ÁREA DE ANALISIS DE ALIMENTOS, QUIMICA AGRICOLA

MSc. ENA EDITH HERRERA SALAZAR

DOCENTES DIRECTORAS

MSc. CORALIA DE LOS ANGELES GONZALEZ DE DIAZ

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar queremos **agradecer a Dios** por habernos dado la capacidad, fortaleza y voluntad para culminar nuestra carrera con éxito

A **nuestros familiares** que nos brindaron apoyo durante todo el tiempo de nuestra formación académica.

A **nuestra asesora de trabajo de graduación MSc. Coralia de los Ángeles González** por su dedicación y orientación para llevar a cabo la realización del trabajo de graduación.

Al personal encargado en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), por su colaboración.

A los catedráticos de la Facultad quienes nos guiaron, orientaron y brindaron conocimientos durante toda la carrera.

A **nuestros amigos y amigas** que han estado apoyándonos, escuchándonos incondicionalmente.

A **nuestros compañeros y compañeras** por tantas experiencias compartidas juntos en clases, discusiones y laboratorios.

DEDICATORIAS

A **Dios** por guiarme en mi camino darme fortaleza para terminar mi carrera aun cuando sentía que no tenía fuerza y voluntad para seguir adelante.

A mi mamá **Ana Alicia y hermana Mónica** que han sido el soporte durante toda mi vida y mi formación académica siempre ayudándome dándome ánimos para continuar y buenos consejos y sobre todo su amor incondicional.

A **David Abrego** por todo su apoyo, interés, cariño y sabios consejos que me brindo en ciertos momentos difíciles a lo largo de la carrera.

A **Alvin Tedis** por todo su apoyo, paciencia, comprensión, por creer en mí y ayudarme en momentos difíciles y también compartir conmigo momentos felices.

A **Gabriela Menéndez y Yolanda Paniagua** de manera especial por su apoyo cariño y amistad por estar conmigo cuando las he necesitado

A todas **mis amigas** que no podría mencionar cada uno de sus nombres pero que son especiales para mí y que siempre estuvieron pendientes de mí y en espera de verme a finales de ciclo dándome ánimos y todo su cariño.

Carmen Alicia Urrutia C.

DEDICATORIAS

A **Dios primeramente** por darme sabiduría y paciencia para lograr culminar mi carrera y por brindarme salud y protección durante todo este tiempo.

A **mis padres** por darme su apoyo y confiar en mí y ayudarme a cumplir mis metas.

A **Nurian Pérez** por haberme ayudado mucho y brindado de su amistad incondicional sin la cual hubiese sido aun más difícil poder culminar mi carrera.

A todos **mis amigos** que de una forma u otra estuvieron pendientes de mis resultados y se alegraban por mis logros.

A **mi pastor y hermanos de la iglesia** que siempre me llevaron en oración hasta culminar mi carrera.

Gerson Jossué Guerra C.

INDICE	Pág.
Resumen	
Capítulo I.	
1. Introducción	xviii
Capítulo II.	
2. Objetivos	
Capítulo III	
3. Marco Teórico	23
3.1. Carne y Productos Cárnicos	23
a. Manipulación de la carne de res	24
b. Procesado industrial	25
3.2. Generalidades de <i>Salmonella spp.</i>	27
3.3. Enfermedades alimentarias	28
3.3.1. Salmonelosis	29
a. Fuentes de <i>Salmonella spp</i>	29
b. Alimentos implicados	30
c. La enfermedad.	31
3.4. Antibióticos.	32
a. Clasificación de los antibióticos	33
3.5. Método de difusión Kirby Bauer	36
a. Fundamentos para la interpretación de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos por el método de difusión Kirby Bauer.	36

Capítulo IV

4. Diseño Metodológico	39
4.1. Tipo de estudio	39
4.2. Investigación bibliográfica	39
4.3. Investigación de campo	39
4.4. Parte experimental	41
4.4.1. Recolección de muestra	41
4.1.1.1. Preparación de las muestras para el aislamiento de <i>Salmonella spp.</i>	41
4.1.2. Aislamiento de <i>Salmonella spp.</i>	42
4.1.3. Pruebas bioquímicas.	43
4.1.3.1. Agar TSI	43
4.1.3.2. Agar Citrato	43
4.1.3.3. Agar Movilidad	44
4.1.3.4. Caldo Indol	44
4.1.3.5. Caldo Rojo de Metilo	44
4.1.3.6. Voges Proskauer	45
4.1.4. Preparación de tubo McFarland.	45
4.1.5. Método de Difusión Kirby Bauer.	46

Capítulo V

5. Resultados y discusión.	48
VI. Conclusiones.	67

VII. Recomendaciones.

70

Bibliografía

Glosario

Anexos

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

1. Lista de chequeo
2. Mapa del Distrito 2 del área Metropolitana de San Salvador
3. Supermercados ubicados en la zona 2 del distrito 2 del área metropolitana de San Salvador.
4. Síndrome salmonelósicos en las personas.
5. Especificaciones para lectura de Pruebas Bioquímicas.
6. Pruebas Bioquímicas para ***Salmonella spp.***
7. Antibióticos y diámetros en mm para enterobacterias
8. Materiales y equipo de laboratorio para aislamiento e identificación de ***Salmonella spp***
9. Preparación de las muestras para el aislamiento de ***Salmonella spp.***
10. Aislamiento de ***Salmonella spp.***
11. Pruebas Bioquímicas.
12. Prueba de sensibilidad de antibióticos por el método de difusión de Kirby Bauer.
13. Preparación de tubo 0.5 McFarland estándar de turbidez para preparación del inóculo.
14. Imágenes del proceso de aislamiento e identificación de ***Salmonella spp***

15. Medios selectivos y de enriquecimiento utilizados para el aislamiento de ***Salmonella spp*** en muestras de carne de res.

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	Pág.
1. Carne molida de res	25
2. Bacilos Gram negativos de <i>Salmonella spp.</i>	27
3. Gráfico de porcentaje de indumentaria adecuada con la que cumple el personal para la manipulación de la carne.	50
4. Gráfico de porcentaje de requisitos higiénicos para la manipulación de la carne.	51
5. Gráfico de porcentaje de Buenas Prácticas Higiénicas que se cumplen en el área de despacho de carnes.	52
6. Gráfico que muestra los resultados de diámetro (mm) obtenidos en la prueba de difusión en discos por el método de Kirby Bauer.	57
7. Gráfico de porcentaje de cepas de <i>Salmonellas spp</i> que presentan resistencia a los antibióticos.	58
8. Gráfico que muestra resultados de diámetro (mm) obtenidos en la prueba de difusión en discos por el método de Kirby Bauer.	61
9. Grafico de porcentaje de cepas de <i>Salmonella spp</i> que presentan resistencia a los antibióticos	62

INDICE DE TABLAS

pág.

TABLA N°

1. Especialidad y código de muestras de carne molida de res seleccionadas por supermercado 40
2. Colonias características de ***Salmonella spp*** en medios selectivos 42
3. Resultados obtenidos de la verificación de las condiciones higiénicas en las salas de venta de los supermercados de la zona 2 del distrito 2 del área metropolitana de San Salvador. 49
4. Porcentaje de indumentaria adecuada con la que cumple el personal para la manipulación de la carne. 50
5. Porcentaje de requisitos higiénicos que deben practicarse para la manipulación de la carne. 51
6. Porcentaje de Buenas Prácticas Higiénicas que se cumplen en el área de despacho de carnes. 52
7. Código de muestras de carne molida de res por supermercado y sus diferentes especialidades. 54
8. Resumen de resultados del análisis del aislamiento e identificación de ***Salmonella spp*** de muestras de carne molida de res. 55
9. Interpretación del halo obtenido, basado en Performance Standars for Antimicrobial Disk test, CLSI (formerly NCCLS). 56
10. Valores de los resultados de diámetro (mm) obtenidos en la prueba de difusión en discos por el método de Kirby Bauer. 56

11. Porcentaje de resistencia antimicrobiana presentada por <i>Salmonella spp.</i>	58
12. Código de muestras de carne molida de res por supermercado y sus diferentes especialidades.	59
13. Resumen de resultados del análisis de aislamiento e identificación de <i>Salmonella spp</i> a partir de muestras de carne molida de res.	60
14. Valores de los resultados de diámetro (mm) obtenidos en la prueba de difusión en discos Kirby Bauer.	61
15. Porcentaje de resistencia antimicrobiana presentada por <i>Salmonella spp</i> aislada de carne molida de res.	62
16. Clasificación de los perfiles de resistencia presentados por la cepa control (ATCC).	63
17. Resumen de los resultados del análisis de las 20 muestras de carne molida de res seleccionadas y su porcentaje de resistencia a los antibióticos	64
18. Comparación de resultados obtenidos por el método de Kirby Bauer de los cultivos de <i>Salmonella spp</i> con la cepa de <i>Salmonella</i> ATCC 984281	65

RESUMEN.

En la presente investigación se verificó por medio de una lista de chequeo las Buenas Prácticas Higiénicas en el área de despacho de carnes de los supermercados Súper Selectos, La Despensa de Don Juan e Híper Europa, de la zona 2 del distrito 2 del área metropolitana de San Salvador. Posteriormente se recolectaron 10 muestras en la primera semana, y 10 muestras fueron analizadas la segunda semana haciendo un total de 20 muestras de carne molida de res de las especialidades (Especial, Súper Especial, Premium, Extrafina). A las muestras de carne molida seleccionadas se les realizó análisis microbiológicos para detectar ***Salmonella spp*** y probar su resistencia a los antibióticos penicilina, cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina y tetraciclina por el método de difusión Kirby Bauer y se compararon los resultados con una cepa de ***Salmonella*** ATCC 984281 que fue tratada por el método de difusión Kirby Bauer. Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador

Posteriormente se realizó el aislamiento de cepas en estado salvaje de ***Salmonella spp*** por medio de pruebas microbiológicas tradicionales, utilizando medios de enriquecimiento, selectivos y diferenciales, después se identificó por Pruebas Bioquímicas y a las muestras con resultado positivo para ***Salmonella spp*** se les realizó la prueba de susceptibilidad a los antibióticos antes mencionados por el método de difusión Kirby Bauer para determinar la multirresistencia.

Los resultados obtenidos por la lista de chequeo en cuanto a Buenas Prácticas Higiénicas nos demuestran que solo se cumple con el 73% de las Buenas Prácticas Higiénicas con respecto a los puntos verificados, y que el 27% no cumple ya que no usan guantes, no usan mascarillas y las mujeres usan maquillaje, además algunas áreas de despacho tienen las vitrinas abiertas.

De las 20 muestras de carne molida de res de las especialidades antes mencionadas que se analizaron, 55% se les detectó ***Salmonella spp***, y de estas el 100% fue resistente a penicilina 10 µg, 100% fue sensible a gentamicina 10 µg y ciprofloxacina 5 µg, 45.45% presentó resistencia a tetraciclina 30 µg, 9.1% presentó sensibilidad intermedia a tetraciclina 30 µg y 45.45% fue sensible a tetraciclina 30 µg, 9.1% fue resistente a cloranfenicol 30 µg, (9.1%) presentó sensibilidad intermedia y 81.81% fue sensible a este último. Los resultados muestran que la resistencia presentada por las cepas de ***Salmonella spp*** en estado salvaje es debido a la administración indiscriminada de los antibióticos al ganado ya que estos son usados como promotores de crecimiento, como tratamiento veterinario, o para eliminar organismos destructores de productos agrarios.

Con el propósito de comparar los resultados obtenidos de los cultivos de cepas aisladas se realizó el método de Kirby Bauer ensayando una cepa ATCC 984281, cuyos resultados dan a conocer que la cepa presenta susceptibilidad ante gentamicina, ciprofloxacina, tetraciclina y cloranfenicol y resistencia ante penicilina, lo que nos indica que las cepas de ***Salmonella spp*** en estado salvaje presentan mayor resistencia a los antibióticos ensayados que la cepa patrón. Por lo que se recomienda al Ministerio de Salud (MINSAL) realizar análisis en los cuales se puedan tipificar los diferentes serotipos de ***Salmonella spp*** utilizando métodos de análisis más avanzados como la Técnica de Amplificación de la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) y así determinar los serotipos que presentaron sensibilidad intermedia o resistencia frente a tetraciclina y cloranfenicol para poder combatir efectivamente la salmonelosis.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

La presencia de los microorganismos en las carnes es un indicador para determinar la calidad microbiológica de estas; ya que las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAS) son muy frecuentes en los países en vías de desarrollo, estos problemas se presentan debido al consumo de alimentos que han estado expuestos a contaminación por una amplia variedad de microorganismos que pueden ser o no patógenos. Dentro de los microorganismos patógenos se encuentran los diferentes serotipos de ***Salmonella spp*** que han adquirido resistencia a los antibióticos por diferentes motivos, dentro de los cuales según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la mitad de la producción mundial de antibióticos se destina al uso veterinario, para el tratamiento de animales enfermos, como promotores de crecimiento en ganado, en el cual no hay una buena administración del antibiótico ni un cumplimiento exacto del tratamiento, lo que favorece a ***Salmonella spp*** a crear resistencia a los antibióticos que se utilizan comúnmente para tratar la enfermedad en ellos, debido a que las personas consumen la carne que contiene ***Salmonella spp*** resistente a los antibióticos el tratamiento para combatir la salmonelosis resulta ser inefectivo.⁽⁵⁾

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS) han alcanzado niveles muy altos en las últimas décadas ya que la demanda de los alimentos por la sobrepoblación permite que las empresas productoras de alimentos no tengan un control estricto de los productos que comercializan y como consecuencia del manejo inadecuado de toda la cadena de producción de alimentos cárnicos, pasa desapercibido el verdadero origen de múltiples patologías entéricas e intoxicaciones alimentarias.

En la Actualidad se desconocía si en las carnes molidas comercializadas en la cadena de supermercados Súper Selectos, La Despensa de Don Juan, Híper Europa de la zona 2 del distrito 2 del área metropolitana de San Salvador había

presencia de ***Salmonella spp*** resistente a antibióticos, debido a que no se habían realizado estudios sobre ello.

Esta investigación hace referencia a muestras de carne molida de res distribuidas en los supermercados Súper Selectos, La Despensa de Don Juan, Híper Europa de la zona 2 del distrito 2 del área metropolitana de San Salvador durante el período de mayo a septiembre del presente año; en la cual se verificó las Buenas Prácticas Higiénicas en los despachos de carne a través de una lista de chequeo, se detectó ***Salmonella spp*** y se probó la resistencia a los antibióticos penicilina, cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina y tetraciclina por el método de difusión Kirby Bauer en 20 muestras de carne molida de res de las especialidades (Especial, Súper Especial, Premium, Extrafina) y se compararon los resultados con una cepa de ***Salmonella*** ATCC 984281 que fue analizada por el método de difusión Kirby Bauer.

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) durante el período de Mayo a Septiembre del 2012.

Los resultados de las cepas de ***Salmonella spp*** encontradas presentaron resistencia a penicilina, frente a tetraciclina y cloranfenicol algunas cepas presentaron sensibilidad intermedia, resistencia y otras fueron sensibles; ante ciprofloxacina y gentamicina todas las cepas en estado salvaje encontradas fueron sensibles.

Los resultados de la cepa de ***Salmonella*** ATCC 984281 ensayada solamente presentaron resistencia a penicilina y sensibilidad a los demás antibióticos, lo cual difiere con los resultados obtenidos de las cepas aisladas que demuestran que han adquirido resistencia a los antibióticos.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL:

Detectar *Salmonella spp* resistente a antibióticos en carne molida de res distribuidas en los supermercados en la zona 2 del distrito 2 del área metropolitana de San Salvador.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS:

2.2.1. Verificar las Buenas Prácticas Higiénicas en el despacho de carnes a través de una lista de chequeo en los supermercados seleccionados.

2.2.2. Identificar *Salmonella spp* en muestras de carne molida de res por medio de pruebas específicas.

2.2.3. Evaluar la resistencia de la *Salmonella spp* aislada con los siguientes antibióticos penicilina, cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina y tetraciclina utilizando el método de difusión Kirby Bauer.

2.2.4. Comparar los resultados obtenidos por el método de difusión Kirby Bauer con una cepa patrón de *Salmonella* ATCC 984281 resistente a antibióticos.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3. MARCO TEORICO

3.1. CARNE DE RES Y PRODUCTOS CARNICOS ⁽²⁰⁾

Estudios revelan que la carne es un alimento que ofrece un elevado aporte de nutrientes y un bajo contenido de grasas.

Desde el punto de vista nutricional la carne es un gran aporte de proteínas (20 % de su peso) y aminoácidos esenciales; siendo además responsable de reactivar el metabolismo del cuerpo humano. La carne tiene un bajo nivel de sodio, a la vez que una importante cantidad de minerales, tales como potasio, zinc, hierro y selenio. Su contenido en vitamina B (de vital importancia para el buen funcionamiento del corazón y del sistema neurológico, además de la producción de anticuerpos y glóbulos rojos, entre otros) es muy elevado y cubre una gran parte del consumo diario recomendado.

En cuanto al consumo de productos elaborados a base de carne (embutidos crudos o cocidos), se afirma que un consumo de aproximadamente 165 gramos de carne y productos cárnicos cubre más del 15% de las necesidades diarias con respecto a la mayoría de nutrientes.

En cuanto a los productos cárnicos que se consumen habitualmente el más consumido es el jamón curado, seguido del jamón cocido, mortadela, etc. y los embutidos que son consumidos de manera habitual. Las razones para consumir productos cárnicos entre la población es el sabor, seguido de la rapidez y comodidad para consumir este tipo de productos y porque permiten una dieta equilibrada.

a) MANIPULACION DE LA CARNE DE RES.⁽¹³⁾

Antes de la muerte, los tejidos comestibles de un animal sano se pueden considerar estériles ya que se encuentran protegidos de la contaminación Bacteriana por la piel externa, la cual funciona como una cubierta casi perfecta contra la agresión microbiana. Además, el tracto intestinal sirve como barrera efectiva que frena la inmensa masa de microorganismos que contiene. Normalmente, cualquier microorganismo que penetrase estas barreras sería destruido rápidamente por las defensas naturales del organismo vivo. Tras la muerte, sin embargo, estos mecanismos quedan bloqueados o cesan su actividad y de esta forma los tejidos expuestos se convierten en tejidos altamente perecederos, sin protección para detener al gran número de microbios que atraviesan su piel o el tracto intestinal.

La superficie externa de la piel, o el cuero, está intensamente contaminada por una amplia variedad de microorganismos. Cuando el carnicero, clava el cuchillo para realizar la separación de los cortes, aparecen las primeras vías de entrada para los contaminantes y los agentes patógenos. Además, es posible que alguno de los microorganismos del tracto intestinal encuentren su camino hacia la superficie del canal durante las operaciones de destazo mezclando su contenido con el de la carne, esta operación debe realizarse con sumo cuidado para evitar posibles contaminaciones en la carne. Es posible que ocurra, no obstante, alguna contaminación durante el corte del cuello, y es posible que algunos de estos microorganismos puedan llegar a los tejidos musculares por el torrente circulatorio inmediatamente antes de la muerte. Todas estas operaciones deben ser realizadas por personal calificado, con el objeto de mantener los niveles de calidad requeridos. La forma de sacrificar al animal afecta la calidad final de la carne, se procura sacrificar “de una vez” sin generar estrés en el animal para que no exista en los tejidos el ácido láctico característico de los cortes rojos oscuros.

Tras la muerte, el cuerpo de la res denominadas canales o carcasas son enfriadas y clasificadas para después entrar en las cadenas de distribución y procesado alimentarios. Este conjunto de procesos es el que transforma el músculo del animal en carne. Hay que tener en cuenta la aparición del rigor mortis (generalmente después de unas tres horas del sacrificio, aunque en el cerdo y el cordero ocurre en una hora) un fenómeno que tensa la carne y la hace poco agradable para su consumo. Por esta razón se introduce un tiempo de espera de unas 48 horas (a veces 72) en un ambiente refrigerado para que ese fenómeno desaparezca. Durante este tiempo la carne se cuelga "boca abajo" para que las fibras musculares se estiren por su propio peso y se drene la sangre. El despiezado y el corte permiten a un gran número de microorganismos contaminar las superficies, a veces se realiza en lugares limpios. El destino y capacidad de estos microorganismos de afectar a la salud de los consumidores depende en gran medida del uso final que se haga de la carne, las carnes servidas crudas son más susceptibles de afectar que las cocinadas a temperaturas mayores de 80 °C. La carne fresca y refrigerada tiene un alto contenido de agua con un valor de actividad del agua (aw) de 0.99 aproximadamente. Este ambiente es muy adecuado para el crecimiento de microorganismos. Si se dejan sin envoltura protectora al oxígeno, se favorecerá el crecimiento de microorganismos contaminantes.

b) PROCESADO INDUSTRIAL DE LA CARNE DE RES.



Figura N° 1 carne molida de res

La mayoría de la carne hoy en día pasa un intervalo medio entre 4 y 10 días desde que se sacrifica el animal hasta que llega al mercado para ser comercializado. La refrigeración tras el sacrificio crea un medio selectivo que permite el crecimiento sólo de aquellos microorganismos capaces de desarrollarse a temperaturas cercanas a la congelación. El envasado al vacío de la carne con membrana impermeable al oxígeno constituye una segunda limitación sobre el medio ambiente que rodea la carne y permite el crecimiento de un menor número de microorganismos durante la distribución hasta el consumidor. El curado, el ahumado, el cocinado, el escabechado y la fermentación son otros procedimientos que influyen en la naturaleza de la microflora alterante final de la carne prolongando su fecha de caducidad. Las carnes tras el sacrificio necesitan de un periodo de curado que hace que los sabores se distribuyan gracias a reacciones enzimáticas y mejoren propiedades organolépticas como puede ser la ternura de la carne.

Los métodos de curado pueden ser realizados en medios controlados de carácter húmedo o por el contrario seco. En medio húmedo se introducen en embalajes de plástico especiales sometidos al vacío, permaneciendo en su interior durante seis semanas (método cryovac), este método hace que aparezca un mal olor cuando se abre el envoltorio, el mal olor desaparece en unos minutos de ventilación. Los métodos de curado en seco hacen que se cuelguen las carnes en un ambiente controlado en refrigeración y humedad durante un periodo de seis semanas, las carnes curadas por este método pueden perder casi entre un 5% y un 20% de su peso, pudiendo además adquirir sabores no deseados y colores más oscuros.^{(30) (13)}

Muchas de las carnes procesadas se pican finamente (empleando para ello una máquina picadora como la tajadera) y se mezclan con

diferentes especies para finalmente "embutirse" (transformarse en diversos embutidos) en contenedores de plástico o tripas.⁽²⁰⁾

3.2 GENERALIDADES DE *Salmonella spp.*

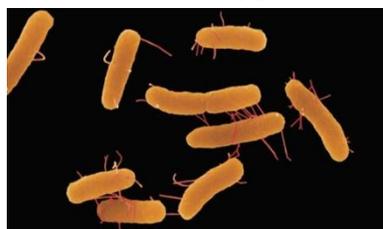


Figura N° 2 Bacilos Gram negativos de *Salmonella spp.*

Las *Salmonellas spp.* son bacilos Gram negativos asporógenos que fermentan la glucosa, generalmente con producción de gas, pero normalmente no fermentan ni la lactosa ni la sacarosa. Cuando el medio de cultivo es apropiado, crecen dentro de intervalos de temperaturas, de pH, y de a_w más amplios que cuando se trata de un medio de cultivo con escasez de nutrientes. Por ejemplo, las temperaturas mínimas de crecimiento en los alimentos oscilan desde 6.7 a 7.8 °C, en el pollo a la King, en la crema de pastelería y en la ensalada de jamón hasta más de 10 °C. Su temperatura máxima de crecimiento es de unos 45.6 °C. La *Salmonella spp.* crece bien a temperatura ambiente, su temperatura óptima de crecimiento es de aproximadamente 37°C ⁽⁶⁾

El intervalo de pH de crecimiento se halla comprendido entre los valores 4.1 y 9.0, multiplicándose en alimentos de baja acidez.

La probabilidad de infección por ingestión de un alimento que contiene *Salmonella spp.* depende de la resistencia del consumidor, de la infecciosidad de la cepa de *Salmonella spp.* y del número de microorganismos ingeridos ^{(6) (7)}

3.3. ENFERMEDADES ALIMENTARIAS.

El término intoxicación alimentaria aplicado a enfermedades producidas por microorganismos, se utiliza en un sentido muy amplio para designar tanto las enfermedades producidas por la ingestión de toxinas elaboradas por los microorganismos como para designar a aquellas otras debidas a la infección del hospedador a través del tracto intestinal. El conjunto de las enfermedades alimentarias se subdivide en intoxicaciones e infecciones. Las intoxicaciones alimentarias pueden ser consecuencia de un envenenamiento químico o de la ingestión de una toxina (intoxicación). La toxina se puede encontrar de forma natural en determinadas plantas o animales o ser un producto metabólico de naturaleza tóxica excretado por un microorganismo. ⁽⁶⁾

Cuando se habla de una determinada intoxicación alimentaria bacteriana se refiere a las enfermedades alimentarias originadas por la entrada de bacterias en el organismo por ingestión de alimentos contaminados y a la reacción del organismo provocada por su presencia o por sus metabolitos.

Las infecciones alimentarias se pueden dividir en dos tipos:

- Aquéllas en las que los microorganismos patógenos no necesariamente se multiplican en el alimento, sino que el alimento sólo actúa como vehiculador, siendo éste el caso de microorganismos patógenos como los que producen la tuberculosis, la difteria, las disenterías, fiebre tifoidea, cólera, hepatitis infecciosa, fiebre Q. ⁽⁶⁾
- Aquéllas en las que el alimento puede servir de medio de cultivo para que los microorganismos patógenos se multipliquen en él y alcancen cifras que aumentarán la posibilidad de que el consumidor del alimento se infecte; en este tipo se incluyen las producidas por las especies ***Salmonella spp***, por ***Vibrio parahaemolyticus***, y por ***Escherichia coli enteropatógena***. ⁽⁶⁾

3.3.1. SALMONELOSIS.

La salmonelosis puede ser consecuencia de la ingestión de células viables pertenecientes a una especie del género **Salmonella spp**. Se trata de la infección bacteriana de origen alimentario que se presenta con mayor frecuencia y desde hace algunos años es la enfermedad transmitida por alimentos con el mayor número de casos infecciosos. ⁽⁶⁾

Además del síndrome típico de las intoxicaciones salmonelósicas de origen alimentario, tras la ingestión de **Salmonellas spp** se pueden presentar otros dos síndromes de enfermedad (ver anexo N°.4 tabla N°.20)

Las infecciones por **Salmonella spp** a las que se les clasifica de intoxicaciones alimentarias pueden ser producidas por gran número de serovares. Por lo general, la bacteria infectante se ha multiplicado en el alimento hasta alcanzar cifras elevadas, aumentando de esta forma la posibilidad de que se produzca la infección, y con frecuencia originando brotes de enfermedad en familias o en otros grupos de mayor número de personas. ⁽⁶⁾

a) Fuentes de **Salmonella spp**.

Las personas y los animales son directa o indirectamente la fuente de contaminación de los alimentos con **Salmonellas spp**. Los microorganismos pueden proceder de enfermos clínicos o de portadores. Las serovares aisladas con mayor frecuencia como **S. typhimurium**, produce gastroenteritis humana, aunque puede producirla cualquiera de las muchas más serovares existentes. Las **Salmonellas spp** también pueden proceder de los gatos, perros, cerdos y bóvidos, aunque las fuentes más importantes de las **Salmonellas spp** de los alimentos son las aves, huevos y roedores. ⁽⁶⁾

Los pollos, los pavos, los patos y los gansos pueden resultar infectados con cualquiera de los numerosos tipos de ***Salmonella spp***, en caso de infección de estas aves, el microorganismo se encuentra en las heces, en los huevos de gallina, y en la carne de las canales. Aproximadamente la tercera parte de los alimentos implicados en los brotes de salmonelosis son carnes y productos derivados de las aves.

Como fuentes de ***Salmonella spp*** se encuentran tanto huevos provistos de cáscara como huevos líquidos, congelados y desecados. Los roedores infectados, las ratas y los ratones, pueden contaminar con sus heces los alimentos no protegidos y de esta forma, diseminar las ***Salmonellas spp***. Las moscas desempeñan un importante papel en la diseminación, sobre todo por vehicularlas desde heces contaminadas hasta los alimentos, las cucarachas también son capaces de difundir la enfermedad. ⁽⁶⁾

Las modificaciones introducidas en los últimos años en el tratamiento, el envasado y elaboración, tanto por lo que se refiere a los alimentos de consumo humano como por lo que se refiere a los piensos, han dado como resultado un claro aumento de la salmonelosis de origen alimentario.

La manipulación de alimentos a gran escala, como la que se realiza en almacenes y establecimientos, tiende a aumentar la difusión de la enfermedad, también aumentan el riesgo de difusión las máquinas expendedoras de alimentos, lo mismo que los alimentos precocinados.

b) Alimentos relacionados con brotes de salmonellosis.

En la producción de los brotes de infecciones por ***Salmonella spp*** se hallan implicados con mayor frecuencia los distintos tipos de carnes, la carne de aves

y los productos derivados de la misma, sobre todo si se mantienen sin refrigerar durante mucho tiempo.⁽⁶⁾

Las carnes frescas pueden contener bacterias del género ***Salmonella spp*** que produjeron la enfermedad en los animales sacrificados o pueden haber sido contaminadas por manipuladores. Los productos cárnicos, como las empanadas de carne, el picadillo, los embutidos, las carnes curadas (el jamón, el tocino entreverado, y la lengua), los sándwiches con frecuencia se dejan expuestos a temperaturas ambientales que permiten la multiplicación de las ***Salmonellas spp***.

c) La enfermedad.

Las personas tienen distinta sensibilidad a las infecciones por ***Salmonella spp***, la sensibilidad de las personas depende de la especie y de la cepa de ***Salmonella spp*** y del número total de bacterias ingeridas. ⁽⁶⁾

La salmonelosis se suele diferenciar de la intoxicación estafilocócica por su período de incubación más largo: suele ser de 12 a 36 horas para la primera y unas 2 a 4 horas para la última. En algunas infecciones por ***Salmonella spp*** el período de incubación puede ser más corto (de unas 5 horas) o más largo (hasta 72 horas).

Los principales síntomas de toda infección gastrointestinal por ***Salmonella spp*** son: náuseas, vómitos, dolor abdominal y diarrea que suele aparecer súbitamente. La diarrea a veces va precedida de cefalalgia y escalofríos. Otros síntomas de enfermedad son: heces líquidas, verdosas y malolientes, abatimiento, debilidad muscular, lasitud, generalmente fiebre moderada, desasosiego, contracciones nerviosas, y somnolencia. La mortalidad es baja, la gravedad y duración de la enfermedad no sólo dependen de la cantidad de alimento ingerido, y por consiguiente de la cantidad de ***Salmonellas spp***

ingeridas, sino también de la sensibilidad individual. La intensidad de los síntomas puede oscilar desde un ligero malestar y la existencia de diarrea hasta la presentación de la muerte en un plazo de 2 a 6 días. Los síntomas suelen persistir durante 2 a 3 días, transcurridos los cuales, la enfermedad cura sin complicaciones, aunque a veces se pueden prolongar durante semanas e incluso meses. ⁽⁵⁾

3.4. ANTIBIOTICOS.

El empleo de agentes antimicrobianos ha proporcionado resultados espectaculares en el tratamiento y la prevención de numerosas enfermedades. La primera observación fue realizada en el siglo pasado por Pasteur sobre el origen microbiano de algunas enfermedades y la capacidad potencial de los microorganismos como agentes terapéuticos. Erlich ensayó la síntesis de compuestos orgánicos capaces de atacar de manera selectiva a los microorganismos infecciosos sin lesionar al organismo huésped. ⁽²⁵⁾

En 1928 Fleming descubrió el primer antibiótico, la penicilina, cuando por accidente observó en una placa de cultivo que una bacteria no pudo sobrevivir en presencia de un hongo contaminante denominado *Penicillium notatum*. Sin embargo, después de varios ensayos realizados con grandes dificultades para obtener el principio activo, no fue hasta 1940 que la penicilina pudo ser extraída y purificada por Florey y Chain, descubrimiento que permitió el desarrollo de posteriores compuestos antibacterianos producidos por organismos vivos, con el consecuente espectacular incremento de las posibilidades de prevención y tratamiento.

Se denomina antibiótico a cualquier sustancia química producida por un microorganismo, utilizada para eliminar o inhibir el crecimiento de otros microorganismos infecciosos. Una propiedad común a todos los antibióticos es

la toxicidad selectiva: presentan una toxicidad hacia los organismos invasores superior a la que muestran frente a animales o seres humanos. ⁽²⁵⁾

En un principio, el término antibiótico sólo se empleaba para los compuestos de origen biológico, los cuales se obtienen de cultivos de bacterias. En la actualidad también se emplean para denominar compuestos sintéticos, los producidos exclusivamente por síntesis química, o semisintéticos, cuando a partir de un núcleo básico del antibiótico se modifican algunas de sus características químicas para mejorar sus propiedades farmacocinéticas o su espectro o, incluso, para disminuir su toxicidad.

a) CLASIFICACION DE LOS ANTIBIOTICOS. ⁽²⁵⁾

Los criterios de clasificación de los antibióticos son diversos: según su estructura química, espectro de actividad, efecto antimicrobiano y mecanismo de acción.

Por su mecanismo de acción: Antibióticos con estructuras químicas muy diversas pueden tener el mismo mecanismo de acción.

Clasificación de los antibióticos por su mecanismo de acción.

- Inhibición de la síntesis de la pared celular.

β lactámicos.

Todos los β lactámicos tienen un anillo β lactámico en su estructura. Las diferencias existentes en el anillo y en las cadenas laterales de la estructura básica influyen en las propiedades farmacológicas, la actividad y el espectro. Inhiben la síntesis de la pared bacteriana y promueven la activación de enzimas autolíticas que producen la lisis de la bacteria. ⁽²⁵⁾

El núcleo básico es el ácido 6- aminopenicilánico, formado por un anillo β lactámico asociado a otro tiazolidínico, que lleva una cadena lateral de estructura variable con un grupo amino secundario. Las cadenas laterales son las que determinan las características antibacterianas y farmacológicas. Son bactericidas y se fijan a los receptores celulares, que son PBP, localizadas en la membrana citoplasmática, encargadas de producir la transpeptidación, dando lugar a la lisis de la pared bacteriana. ⁽²⁵⁾

- Antimicrobianos que inhiben la síntesis proteica.

Tetraciclinas.

Estos compuestos están constituidos por un núcleo policíclico común formado por cuatro anillos bencénicos unidos. Por sustitución de los diferentes radicales en estos anillos, se desarrollan los diferentes miembros de este grupo, que difieren principalmente en sus propiedades farmacológicas. Actúan inhibiendo la síntesis de proteínas, al unirse de forma reversible a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, por lo que bloquean la fijación del aminoácido ARNt al sitio aceptor en el complejo ribosómico y, de esta manera impiden la adición de nuevos aminoácidos a la cadena peptídica en crecimiento.

Cloranfenicol.

Es una molécula con un núcleo nitrobenzeno; es un antimicrobiano bacteriostático que inhibe la síntesis proteica. Se fija estereoespecíficamente a las subunidades ribosómicas 50S, impidiendo la transpeptidación entre los aminoácidos de la cadena peptídica. La resistencia al cloranfenicol está mediada por la producción de una enzima cloranfenicol acetiltransferasa, que cataliza la adhesión de grupos acetilo a la molécula del antibiótico.

Aminoglucósidos.

Estos fármacos contienen en su estructura una base nitrogenada y dos o más aminoazúcares por medio de enlaces glucosídicos a un grupo hexosa. Los aminoglucósidos clínicamente más utilizados son estreptomicina, neomicina, **gentamicina**, kanamicina y tobramicina. Son agentes bactericidas activos sobre células bacterianas en crecimiento. Su efecto se debe a su unión irreversible a las subunidades ribosómicas 30S y 50S, por lo que inhiben la síntesis proteica y provocando errores de lectura del código genético; sin embargo no se ha establecido cuál es exactamente el mecanismo bacteriano. La resistencia a estos agentes puede presentarse por diferentes mecanismos siendo la más frecuente la inactivación enzimática. ⁽²⁵⁾

- Antimicrobianos que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos:

Quinolonas.

Presentan una estructura básica bicíclica compuesta de un anillo tipo piridona, con un ácido carboxílico libre en posición 3 y un átomo de nitrógeno en posición 1, y un segundo anillo, que puede ser bencénico. Uno de los primeros fue el ácido nalidíxico; la incorporación de un átomo de flúor en posición 6 dio lugar a la aparición de las fluoroquinolonas, permitiendo el desarrollo de nuevos derivados químicos con mejor actividad antimicrobiana, como **ciprofloxacino**, levofloxacino, moxifloxacino, entre otros. Estos agentes interfieren en la síntesis del ADN y producen un efecto bactericida, debido a que inhiben la actividad de la ADN girasa, lo que impide el enrollamiento del cromosoma bacteriano. La resistencia que presentan estos antimicrobianos puede ser producida por cambios en la estructura de las subunidades de ADN girasa, con lo que disminuye la afinidad por el fármaco, o por alteraciones en la permeabilidad de la pared celular.

3.5. METODO DE DIFUSIÓN KIRBY BAUER.

El principio del método involucra la aplicación de una cantidad determinada de antimicrobiano en un reservorio (discos de papel) en la superficie del agar sobre la cual se ha distribuido un inóculo de microorganismo en cuestión; formará así por difusión, un gradiente de concentración de antimicrobiano alrededor del reservorio y la sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano. El diámetro dependerá no solo de la sensibilidad del microorganismo y la carga del disco, sino también de la capa de espesor del agar, pH y composición del medio de cultivo, de la capacidad de difusión de la droga en ese medio, de la temperatura y la atmósfera de incubación, de la velocidad de duplicación bacteriana y el tamaño del inóculo y fase de crecimiento de la bacteria. ^{(11) (34)}

a) FUNDAMENTOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN KIRBY BAUER. (Ver anexo N°.7 tabla N°.23)

Para cada antimicrobiano se establecen concentraciones críticas o puntos de corte que permiten separar a los microorganismos infectados en tres categorías sensibles, resistentes o de sensibilidad intermedia.

Sensibles.

Un microorganismo se considera sensible a un antibiótico cuando se puede esperar que una infección causada por el mismo responda al tratamiento con dicho fármaco a la dosis recomendada.

Resistente.

Este término indica que no es probable que la infección causada por el microorganismo responda al antibiótico en cuestión, cualesquiera que sean las dosis y la localización de la infección.

Sensibilidad intermedia.

Se aplica a dos situaciones. Por un lado se incluyen en ellas las cepas con sensibilidad disminuida a un antibiótico que puede utilizarse con éxito, para el tratamiento en dosis más altas, por ser poco tóxico o porque se concentra en el foco de infección. ⁽¹¹⁾ ⁽³⁴⁾

Esta metodología se encuentra estandarizada para el estudio de ***Enterobacteriaceas, Pseudomonas aeruginosa y Acinetobacter spp, Staphylococcus spp., Enterococcus spp, Vibrio cholerae, Haemophilus spp, Neisseria gonorrhoeae, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus spp, Vibrio cholerae.*** ⁽¹¹⁾

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4. DISEÑO METODOLOGICO

4.1. TIPO DE ESTUDIO:

El estudio es **transversal** ya que esta investigación se realizó en un tiempo determinado. **Campo** porque se estudió el fenómeno en el lugar donde se manifiesta. **Experimental** debido a que las muestras se analizaron en el laboratorio de microbiología de alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD).

4.2. INVESTIGACION BIBLIOGRAFICA:

La recopilación de información bibliográfica se llevó a cabo en las bibliotecas

- Dr. Benjamín Orozco, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.
- Central de la Universidad de El Salvador
- Universidad Alberto Masferrer (USAM)
- Universidad Centro Americana José Simeón Cañas (UCA).
- Internet

4.3. INVESTIGACION DE CAMPO:

Por medio de una lista de chequeo se verificaron las Buenas Prácticas Higiénicas en el área de despacho de carnes de los supermercados (Súper Selectos, La Despensa de Don Juan, Híper Europa) de la zona 2 del distrito 2 del área metropolitana de San Salvador. (Ver anexo 1)

Universo:

Todas las especialidades de carne molida de res (especial, súper especial, premium y extra fina) que se comercializan en los supermercados antes mencionados.

Muestra:

Muestras de Carne molida de res de los supermercados seleccionados en estudio.

Tabla N° 1. Especialidades y número de muestra de carne molida de res seleccionadas por supermercado

Supermercado	Muestra de carnes	Numero de muestras
Súper Selectos (Metro Centro)	Molida Premium	1
	Molida Súper Especial	1
Súper Selectos(Metro Sur)	Molida Especial	1
	Molida Súper Especial	1
	Molida Premium	1
La Despensa de Don Juan(Los Héroes)	Molida Extra fina	1
	Molida Súper Especial	1
	Molida Especial	1
Híper Europa (Av. Bernal)	Molida Premium	1
	Molida Súper Especial	1
	Total	10

Toma de muestra:

Se llevó a cabo un muestreo aleatorio simple en dos semanas; en la primer semana se tomaron 10 muestras, y en la segunda semana otras 10 muestras haciendo un total de 20 muestras, esto con el fin de obtener resultados más representativos del estudio, para cada muestra se compró media libra de carne molida de res según la especialidad.

La toma de muestras se llevó a cabo de la siguiente manera:

Primera Semana

En la cuarta semana de mayo del corriente año se analizaron 10 muestras; se compró media libra de carne molida de res de cada una de las especialidades seleccionadas de los supermercados antes mencionados. (Ver tabla N° 1)

Segunda Semana

Se analizaron otras 10 muestras en la primera semana de junio; se compró media libra de carne molida de res de cada una de las especialidades seleccionadas de los supermercados en estudio. Haciendo un total de 20 muestras para obtener resultados más representativos del estudio. (Ver tabla N° 1)

4.4. PARTE EXPERIMENTAL.

4.4.1. RECOLECCION DE MUESTRAS.

La recolección de muestras se realizó en los supermercados de la zona seleccionada, se compró media libra de carne molida de res de cada calidad en bolsa plástica, se colocaron en hielera y se trasladaron al laboratorio de microbiología de alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) para ser analizadas.

4.4.1.1. PREPARACION DE LAS MUESTRAS PARA EL AISLAMIENTO

DE *Salmonella spp.*⁽⁵⁾

- Pesar asépticamente 25 g de carne dentro de un recipiente estéril de boca ancha (bolsa de plástico)
- Agregar 225mL de Caldo Lactosado y homogenizar por 3 min en Stomacher a 260 rpm.
- Transferir la mezcla a un Erlenmeyer estéril de 500mL de capacidad y tapar con papel Aluminio.

- Incubar por 24 ± 2 horas a 35°C .

4.4.2. AISLAMIENTO DE *Salmonella spp.*

- Agitar suavemente la mezcla incubada
- Transferir 0.1mL de la mezcla a 10mL de Caldo Rappaport-Vasiliadis (RVS) y un 1mL de mezcla a 10mL de Caldo Tetratonato (TT).
- Incubar el Caldo Rappaport-Vasiliadis (RVS) por 24 ± 2 horas a $42 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$
- Incubar el Caldo Tetratonato (TT) por 24 ± 2 horas a $35 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$
- Luego de la incubación agitar los tubos y con asa bacteriológica tomar una porción de Caldo Tetratonato y estriar en Agar XLD, Agar Bismuto Sulfito y Hektoen.
- Tomar una porción de Caldo Rappaport-Vasiliadis (RVS) y estriar en Agar XLD, Agar Bismuto Sulfito y Hektoen.
- Incubar las placas por 24 ± 2 horas a $35 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$
- Examinar las placas buscando colonias sospechosas de *Salmonella spp* de acuerdo a la tabla N° 2.
- Pasar las colonias sospechosas características de *Salmonella spp* con ayuda de un asa bacteriológica a placas de Petri con agar Tripticasa Soya (TSA) e incubarlas por 24 ± 2 horas a $35 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$

Tabla N°2. Colonias características de *Salmonellas spp* en medios selectivos ⁽¹⁸⁾

Medios selectivos	Colonias características
XLD	Colonias rojas con o sin centro negro
Bismuto Sulfito	Colonias transparentes con halo gris con centro negro y brillo metálico
Hektoen	Colonias azul verdosas con o sin centro negro

4.4.3. PRUEBAS BIOQUIMICAS.

De las placas de TSA transferir las colonias con ayuda de un asa bacteriológica a los tubos que contienen los medios de las pruebas bioquímicas, TSI, Agar Citrato, Agar Movilidad, Caldo Indol, Caldo Rojo de Metilo, Voges Proskauer

4.4.3.1. Agar TSI

- Con ayuda de un asa en punta inocular por picadura el agar TSI hasta el fondo del tubo y por estría simple en la superficie.
- Incubar los tubos a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 - 48 horas.
- Posteriormente leer los resultados.

Resultados: Rojo en pico de flauta: alcalino; degradación aeróbica de glucosa.

Amarillo en capa profunda: ácido; degradación anaeróbica de la glucosa.

Amarillo en pico: ácido

Amarillo en capa profunda: ácido.

Rojo en pico de flauta: alcalino; sin cambio de color en capa profunda: alcalina.

Producción de H_2S : precipitado negro.

Producción de gases: producción de burbujas, descomposición del medio, ligera muesca del medio sobre el costado del tubo o desplazamiento del medio del fondo, dejando un espacio libre.

4.4.3.2. Agar Citrato

- Con ayuda de un asa en punta inocular por picadura el agar Citrato hasta el fondo del tubo y por estría simple en la superficie.
- Incubar los tubos a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 - 48 horas.
- Leer los resultados.

Un cambio en la coloración del medio que va del verde a azul indica prueba positiva.

4.4.3.3. Agar Movilidad

- Con ayuda de una asa en punta inocular por picadura el agar Movilidad hasta el fondo del tubo.
- Incubar los tubos a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 - 48 horas.
- Leer los resultados.

La migración de los microorganismos en la línea de siembra del medio provocando turbidez y formación o no de H_2S indica prueba positiva.

4.4.3.4. Caldo Indol.

- Tomar una o dos colonias con asa bacteriológica estéril y formar una suspensión en un tubo con rosca que contiene Caldo Indol y tapar.
- Incubar los tubos a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 - 48 horas.
- Después de la incubación agregar a los tubos 5 gotas de éter etílico y 5 gotas de reactivo de Erlich
- Leer los resultados.

La formación de un anillo violeta en la superficie del medio indica prueba positiva.

4.4.3.5. Caldo Rojo de Metilo.

- Tomar una o dos colonias con asa bacteriológica estéril y formar una suspensión en un tubo con rosca que contiene Caldo Rojo de Metilo y tapar.
- Incubar los tubos a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 - 48 horas.
- Después de la incubación agregar a los tubos 5 gotas de reactivo Rojo de Metilo.
- Leer los resultados.

La formación de una coloración roja difusa en el medio indica prueba positiva.

4.4.3.6. Voges Proskauer.

- Tomar una o dos colonias con asa bacteriológica estéril y formar una suspensión en un tubo con rosca que contiene caldo Voges Proskauer y tapar.
- Incubar los tubos a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 - 48 horas.
- Después de la incubación agregar a los tubos 1mL de KOH más 1mL de Alfa-naftol.
- Leer los resultados.

La formación de una coloración en el medio que va de rosado a rojo indica prueba positiva.

4.4.4. PREPARACION DE TUBO McFARLAND.

ESTÁNDAR DE TURBIDEZ PARA LA PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Para estandarizar la densidad del inóculo para una prueba de susceptibilidad, se utiliza estándar de turbidez de BaSO_4 , equivalente a un estándar 0.5 McFarland o su equivalente óptico. Un estándar de 0.5 McFarland de BaSO_4 se prepara como sigue: (ver anexo N°13)

- Tomar una alícuota de 0,5 mL de 0,048 mol/L de BaCl_2 (1,175% p/v $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) agregar a 99,5 mL de H_2SO_4 de 0,18 mol/L (1% v/v) con agitación constante para mantener la suspensión.
- La densidad correcta del estándar de turbidez debería verificarse usando un espectrofotómetro con una celda de 1 cm de paso de luz con una cubeta de calibración para determinar la absorbancia. La absorbancia a 625 nm debe ser 0,08 a 0,10 para el estándar de 0,5 McFarland.
- Agitar el estándar McFarland en un vortex mecánico para homogenizar la suspensión.
- Estos tubos deben ser bien sellados y almacenados en la obscuridad a temperatura ambiente.

4.4.5. METODO DE DIFUSION KIRBY BAUER. ⁽³⁵⁾

- De las placas TSA tomar con el asa de siembra colonias de la bacteria y hacer una suspensión en solución salina 0.9%. La turbidez del inóculo debe ser equivalente al estándar 0,5 de McFarland. Hacer lo mismo con la cepa de **Salmonella** ATCC 984281.

Nota: este análisis se lleva a cabo por duplicado.

- Inocular la superficie de las placas de agar Mueller Hinton con el hisopo pasándolo uniformemente por toda la superficie en tres direcciones, por último, pasar el hisopo por el reborde de la placa de agar. Luego dejar secar 5 minutos.
- Colocar los discos de antibióticos sobre la superficie del agar utilizando unas pinzas estériles y apretándolos suavemente sobre la superficie del agar. Dejar las placas 15 minutos a temperatura ambiente para que comiencen a difundir los antibióticos.
- Incubar las placas en posición invertida a 37°C durante 18-24 horas.
- Medir los diámetros de los halos de inhibición con una regla graduada.
- Comparar los resultados de acuerdo a la tabla N°. 9
- Comparar los resultados obtenidos de las muestras con los resultados obtenidos de la cepa de **Salmonella** ATCC 984281.

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5. RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

Se realizó la visita a los diferentes supermercados para observar las condiciones higiénicas de los manipuladores seleccionados y las vitrinas donde se mantienen las carnes para ser comercializadas verificando los puntos que se presentan en la lista de chequeo.(ver tabla N° 3)

La recolección de muestras en los supermercados Súper Selectos (Metrocentro), Súper Selectos (Metrosur), La Despensa De Don Juan (Los Héroe) y el Híper Europa (av. Bernal) para la obtención de 20 muestras de carne molida de res distribuidas de acuerdo a la tabla N° 1, y su posterior análisis en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), dio como resultado los datos que se presentan a continuación

Tabla N° 3. Resultados obtenidos de la verificación de las condiciones higiénicas en las salas de venta de los supermercados de la zona 2 del distrito 2 del área metropolitana de San Salvador.

		Súper Selectos (metro centro)		Súper Selectos (metro sur)		La Despensa de Don Juan (Los Héroes)		Híper Europa (av. Bernal)	
Indumentaria adecuada									
N°		si	no	si	no	si	no	si	no
1	¿Utiliza gorro o redecilla?	✓	-	✓	-	✓	-	✓	-
2	¿Utiliza gabacha?	✓	-	✓	-	✓	-	✓	-
3	¿Utiliza guantes?	-	✓	-	✓	-	✓	-	✓
4	¿Utiliza mascarilla?	-	✓	-	✓	-	✓	-	✓
5	La indumentaria de los empleados ¿está limpia y en buen estado de conservación?	✓	-	✓	-	✓	-	✓	-
Higiene personal									
6	¿Usan anillos?	-	✓	-	✓	-	✓	-	✓
7	¿Usan relojes?	-	✓	-	✓	-	✓	-	✓
8	¿Tiene las uñas limpias y recortadas?	✓	-	✓	-	✓	-	✓	-
9	En caso que sea un hombre ¿Usa barba y o bigote?	-	✓	-	✓	-	✓	-	✓
10	En caso que sea una mujer, ¿utiliza maquillaje?	✓	-	✓	-	✓	-	-	✓
Buenas Prácticas Higiénicas en el área de despacho									
11	¿El área de ventas se encuentra limpia y bien mantenida?	✓	-	✓	-	✓	-	✓	-
12	¿Tienen separados los diferentes tipos de carne para evitar la contaminación cruzada?	✓	-	✓	-	✓	-	✓	-
13	Especifica algún rotulo las temperaturas de los cuartos fríos y las vitrinas donde se mantienen las carnes?	-	✓	-	✓	-	✓	-	✓
14	¿El olor, color y textura de la carne molida de res es característico de esta?	✓	-	✓	-	✓	-	✓	-
15	¿La vitrina se mantiene cerrada?	✓	-	✓	-	✓	-	-	✓

Porcentaje de indumentaria adecuada que utilizan los manipuladores seleccionados en los despachos de carne de los supermercados en estudio.

Preguntas de la 1 a la 5

Tabla N° 4. Porcentaje de indumentaria adecuada con la que cumple el personal para la manipulación de la carne.

Indumentaria	Si cumple	No cumple
Uso de gorro o redecilla	100.00%	0.00%
Uso de gabacha	100.00%	0.00%
Uso de guantes	0.00%	100.00%
Uso de mascarilla	0.00%	100.00%
Indumentaria limpia y en buen estado de conservación	100.00%	0.00%

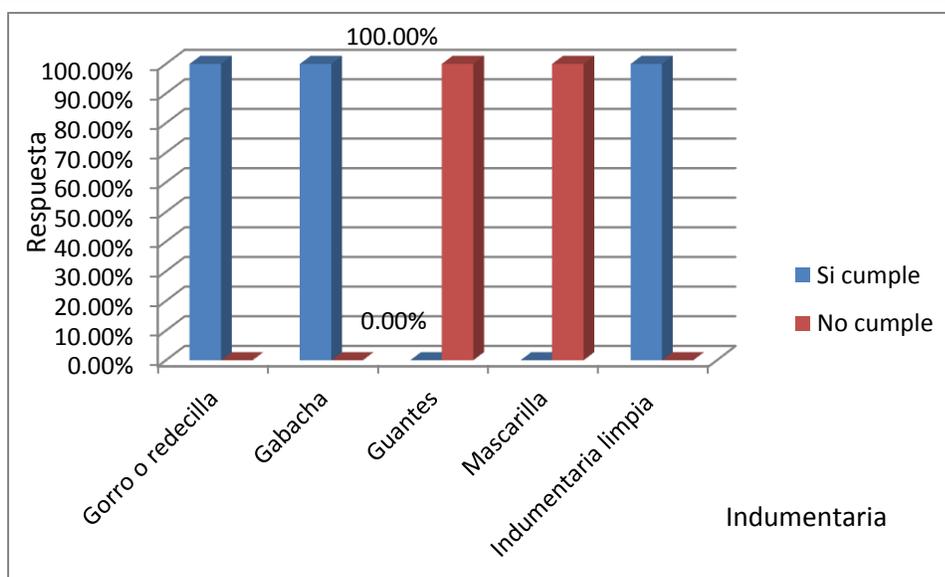


Figura N° 3. Gráfico de porcentaje de indumentaria adecuada con la que cumple el personal para la manipulación de la carne.

En la figura N° 3. Se observa que los manipuladores de carne seleccionados el 100% no utilizan la indumentaria adecuada ya que ninguno utiliza toda la indumentaria completa, algunos de ellos no usa guantes ni mascarilla lo que permite la contaminación del producto, aunque si utilicen gorro, gabacha y además se encuentre limpia y en buen estado de conservación, es decir que

solo utilizan el 60% de la indumentaria adecuada pasando desapercibido el 40% restante que se refiere a guantes y mascarilla por lo cual los 5 puntos verificados representan el 100% y cada respuesta vale 20%

Personal que pone en práctica la higiene personal requerida para la manipulación de la carne:

Preguntas de la 6 a la 10

Tabla N°5. Porcentaje de requisitos higiénicos que deben practicarse para la manipulación de la carne

Higiene personal	Si	No
Usa anillos	0.00%	100.00%
Usa relojes	0.00%	100.00%
Tienen uñas limpias y recortadas	100.00%	0.00%
Hombre no uso de barba y o bigote	0.00%	100.00%
Mujer, no uso de maquillaje	75.00%	25.00%

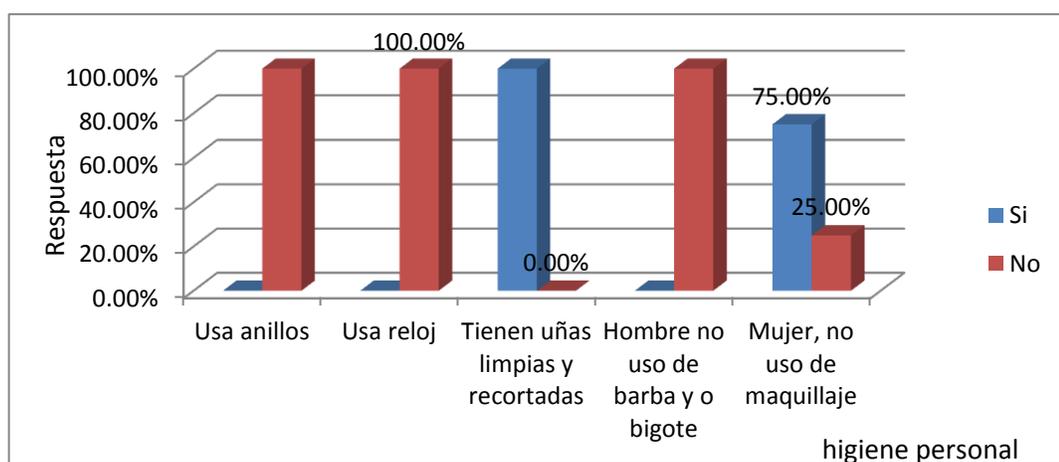


Figura N° 4. Gráfico de porcentaje de requisitos higiénicos para la manipulación de la carne

En la Figura N° 4. Se puede observar que solo un 75% de las mujeres seleccionadas no cumple con las Buenas Prácticas Higiénicas (BPH) para la manipulación de la carne porque utilizan maquillaje y solo un 25% no utiliza. También se puede observar que el 100% de manipuladores seleccionados cumple con las BPH ya que no utilizan anillos ni relojes en el caso de los hombres se pudo observar que no usan bigote ni barba y además sus uñas

estaban limpias y recortadas; por lo tanto solo el personal masculino cumple completamente con los puntos verificados correspondientes a la higiene personal. En general podemos observar que el 85% del personal seleccionado cumple con los requisitos Higiénicos y un 15% no los cumple. en este caso el 20% de cada punto individual representa el 100%.

Porcentaje requerido de Buenas Prácticas Higiénicas que deben cumplir los despachos de carne en los supermercados seleccionados

Preguntas de la 11 a la 15

Tabla N° 6. Porcentaje de Buenas Prácticas Higiénicas en el área de despacho de carnes

Buenas Prácticas Higiénicas en el área de despacho	Si cumple	No cumple
Área limpia y bien mantenida	100.00%	0.00%
Evitan la contaminación cruzada	100.0%	0.00%
Temperaturas de vitrina y cuartos de almacenamiento de carne	0.00%	100.00%
Olor, color y textura característicos de la carne.	100.00%	0.00%
Vitrina cerrada	75.00%	25.00%

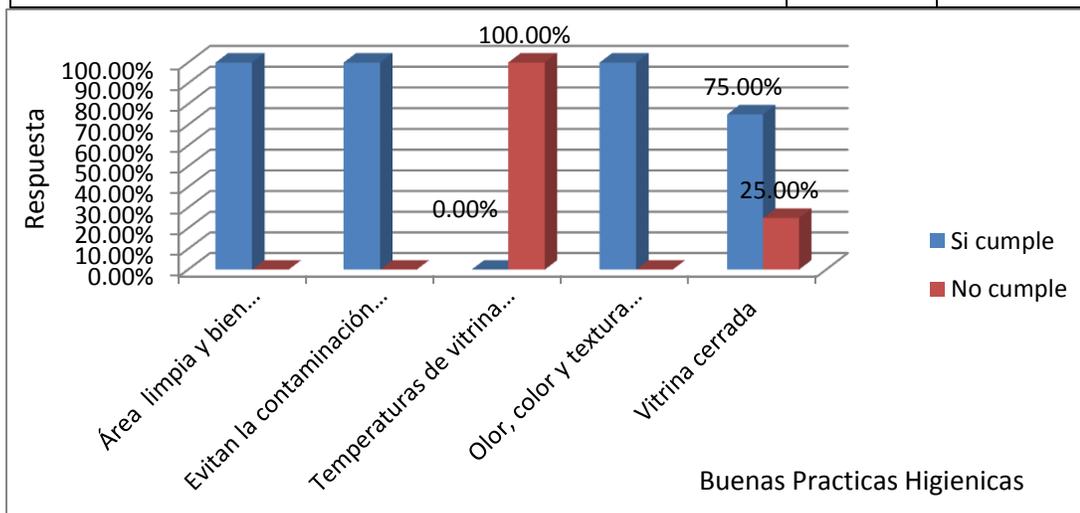


Figura N° 5. Gráfico de porcentaje de Buenas Prácticas Higiénicas que se cumplen en el área de despacho de carnes.

En la figura N° 5. Se puede observar que solo un 75 % de las áreas de despacho de carne de los supermercados mantienen las vitrinas cerradas

cumpliendo con las Buenas Prácticas Higiénicas y un 25% no cumple porque mantienen las vitrinas abiertas exponiendo el producto a contaminación. Además el 100% de las áreas de despacho no tienen un rotulo que especifique la temperatura a la cual se mantienen las vitrinas ni los cuartos donde se almacena la carne. Solo cumplen con mantener el área limpia, evitar la contaminación cruzada, y mantener sus carnes en buen estado de conservación. Podemos apreciar que los supermercados seleccionados cumplen con un 75% de las Buenas Prácticas Higiénicas en el área de despachos de carne pero también incumplen el 25% de estas.

Para llevar a cabo la verificación de las Buenas Prácticas Higiénicas en las áreas de despacho de carnes se elaboro una lista de chequeo que fue dividida en tres aspectos: Indumentaria adecuada, Higiene personal y Buenas Prácticas higiénicas en el área de despacho. Los resultados obtenidos para la indumentaria adecuada dieron a conocer que los manipuladores no visten la indumentaria completa por lo que solo se cumple con el 60% y por tanto no cumple con el 40% restante que se refiere a guantes y mascarillas. En el segundo aspecto que se refiere a higiene personal los resultados mostraron que solo se cumple con el 85% y el 15% no cumple debido a que las mujeres seleccionadas hacen uso de maquillaje. Con respecto a las Buenas Prácticas Higiénicas en el área de despacho de carnes los resultados demuestran que el 75% de los supermercados seleccionados cumplen con los puntos verificados y el 25 % no cumple ya que mantienen las vitrinas abiertas exponiendo el producto a contaminación. En general de los 15 puntos verificados los resultados obtenidos demuestran que solo se cumple con el 73% de las Buenas Prácticas Higiénicas y el 27% no cumple ya que no usan guantes, mascarillas y las mujeres usan maquillaje y además algunas áreas de despacho tienen las vitrinas abiertas, estos porcentajes se obtuvieron tomando en cuenta que los 15 puntos verificados representan el 100% y los resultados individuales para cada supermercado que cumplen o no cumplen representan la variable.

PARTE EXPERIMENTAL.

El análisis de las muestras se llevo a cabo en dos semanas consecutivas tomando 10 muestras por semana.

Semana 1

En la primera semana se analizaron 10 muestras que fueron recolectadas como se indica en la tabla N°7.

En tabla se presentan las diferentes especialidades de carne molida de res seleccionadas y los supermercados en los cuales se comercializan con su respectivo número de muestra.

Tabla N° 7. Código de muestras de carne molida de res por supermercado y sus diferentes especialidades

CODIGO DE MUESTRA	SUPERMERCADO	TIPO DE MUESTRA
1	Despensa de Don Juan(Los Héroes)	Carne molida extra fina
2		Carne molida súper especial
3		Carne molida especial
4	Híper Europa (Av. Bernal)	Carne molida Premium
5		Carne molida súper especial
6	Súper Selectos (Metro sur)	Carne molida especial
7		Carne molida súper especial
8		Carne molida Premium
9	Súper Selectos (Metro centro)	Carne molida Súper especial
10		Carne molida Premium

Tabla N° 8. Resumen de resultados del análisis de aislamiento e identificación de **Salmonella spp** de muestras de carne molida de res.

Control De muestras	TT			RP-VS			PRUEBAS BIOQUIMICAS								
	XLD	BS	HEK	XLD	BS	HEK	TSI				INDOL	RM	VP	CITRATO	MOVILIDAD AD
							K	A	GAS	H ₂ S					
1	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
2	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+
3	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+
4	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
5	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
6	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
7	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-
8	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-
9	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-
10	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-

Positivo: + Negativo: - XLD: Xilosa Lisina Desoxicolato BS: Bismuto Sulfito HEK: Hektoen TT: tetracionato RP-VS: Rappaport Vasiliadis RM: Rojo de Metilo VP Voges-Proskauer

Se examinaron 10 muestras de carne molida de res en la primera semana bajo las mismas condiciones y siguiendo el mismo proceso. La tabla N° 8 muestra los resultados obtenidos en cada una de las determinaciones realizadas, podemos observar que en los medios selectivos y diferenciales como Bismuto sulfito y Hektoen se obtiene el mayor crecimiento de colonias a diferencia del XLD que no presenta ningún crecimiento. Las muestras sombreadas presentan crecimiento microbiano en 2 o más medios selectivos y diferenciales, además los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas coinciden con los resultados teóricos de **Salmonella spp** por lo que fueron seleccionadas para realizarles la prueba de sensibilidad a los antibióticos por el método de difusión Kirby Bauer.

En la siguiente tabla se presentan los rangos de valores de halos en mm para clasificar los datos obtenidos del análisis como resistente, intermedio o sensible.

Tabla N° 9. Interpretación del halo obtenido, basado en Performance Standards for Antimicrobial Disk test, CLSI (formerly NCCLS) ⁽¹⁷⁾

Antibiótico	Código	µg en disco	Símbolo	Resistente	Intermedio	Sensible
				mm o menos	mm	mm o mas
Gentamicina	50517	10	G	12	13-14	15
Ciprofloxacina	231657	5	C	15	16-20	21
Penicilina	230918	10	P	13	14-16	17
Tetraciclina	39562	30	T	14	15-18	19
cloranfenicol	230733	30	Cl	12	13-17	18

Tabla N°.10. Valores de los resultados de diámetro (mm) obtenidos en la prueba de difusión en discos por el método de Kirby Bauer

Antibióticos Muestras	Gentamicina 10 µg	Ciprofloxacina 5 µg	Penicilina 10 µg	Tetraciclina 30 µg	Cloranfenicol 30 µg
Muestra 1	22.0	39.0	6.0	6.0	20.0
Muestra 3	25.0	40.0	6.0	25.0	15.0
Muestra 5	22.0	33.0	6.0	6.0	23.5
Muestra 6	20.0	35.0	6.0	6.0	6.0
Cepa ATCC 984281	15.0	35.0	6.0	20.0	28.0

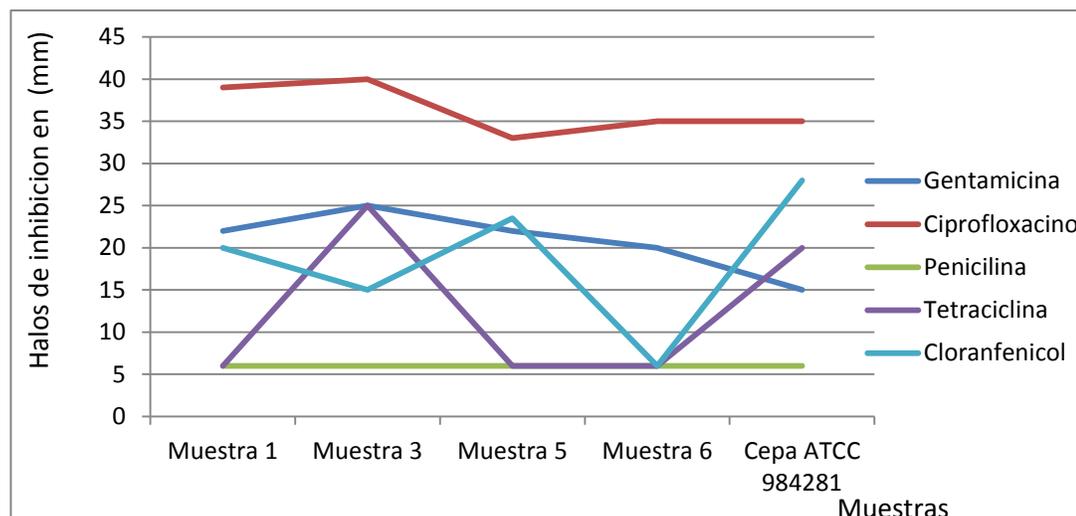


Figura N° 6. Gráfico que muestra de los resultados de diámetro (mm) obtenidos en la prueba de difusión en discos por el método de Kirby Bauer

En la figura N°6 se puede apreciar que las cepas de *Salmonella spp* ensayadas con antibióticos como ciprofloxacina y gentamicina presentaron halos de inhibición con valores similares, como podemos observar en el gráfico los resultados de la ciprofloxacina y gentamicina tienen una tendencia casi lineal con respecto a las muestras, lo que nos indica que estos antibióticos actúan de manera efectiva inhibiendo los diferentes tipos de *Salmonella spp* aislados. Los resultados obtenidos con tetraciclina y cloranfenicol presentaron tendencias diferentes con respecto a las muestras, al contrario de la penicilina que no inhibió ninguna de las muestras analizadas. Se puede observar en el gráfico que los antimicrobianos que presentaron los valores más altos de halo de inhibición fueron ciprofloxacina y gentamicina seguidos del cloranfenicol, siendo más efectivos ante la presencia de las cepas de *Salmonella spp*; en cuanto a tetraciclina y penicilina por los valores de halos obtenidos se puede decir que son de menor efectividad ante la presencia de las cepas de *Salmonella spp* aisladas. Además se puede ver que la cepa de *Salmonella* ATCC 984281 solamente presenta resistencia a la penicilina y es sensible a los demás antibióticos ensayados.

Tabla N°11. Porcentaje de resistencia antimicrobiana y su rango de sensibilidad presentada por ***Salmonella spp.***

Antibiótico /Muestra	Porcentaje de resistencia.		
	Sensible	Intermedio	Resistente
Gentamicina	100.00%	0.00%	0.00%
Ciprofloxacina	100,00%	0.00%	0,00%
Penicilina	0.00%	0.00%	100.00%
Tetraciclina	25.00%	0,00%	75.00%
Cloranfenicol	50.00%	25.00%	25.00%

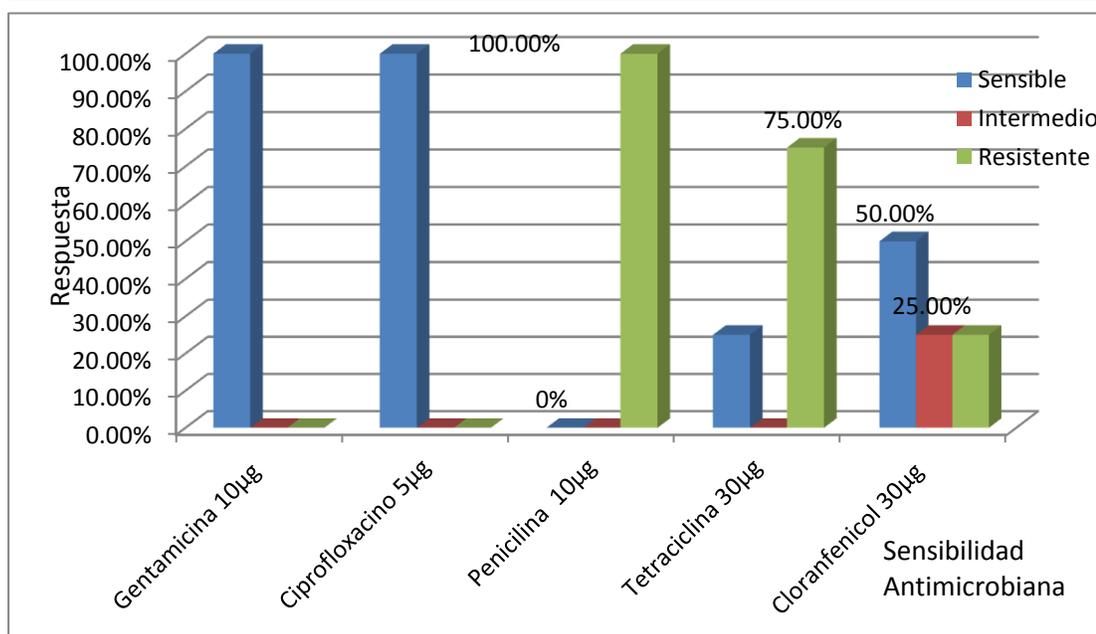


Figura N° 7. Gráfico de porcentaje de cepas de ***Salmonella spp.*** que presentan resistencia a los antibióticos.

En la figura 7 se observa que el 100% de las cepas de ***Salmonella spp.*** aislada fue inhibida por los antibióticos gentamicina y ciprofloxacina, el 25% por tetraciclina y el 50% por cloranfenicol, además un 25% presentó sensibilidad intermedia a este último. Lo contrario con la penicilina que el 100% de las muestras fue resistente seguido de la tetraciclina con un 75% y finalmente el cloranfenicol con un 25% de resistencia.

Semana 2

En la siguiente tabla se presentan las diferentes especialidades de carne molida de res seleccionadas y los supermercados en los cuales se comercializan con su respectivo número de muestra.

Tabla N° 12. Código de muestras de carne molida de res por supermercado y sus diferentes especialidades.

CODIGO DE MUESTRA	SUPERMERCADO	TIPO DE MUESTRA
1	Híper Europa (Av. Bernal)	Carne molida Premium
2		Carne molida súper especial
3	Despensa de Don Juan (Los Héroes)	Carne molida especial
4		Carne molida súper especial
5		Carne molida extra fina
6	Súper Selectos Metrosur	Carne molida especial
7		Carne molida Premium
8		Carne molida súper especial
9	Súper Selectos Metrocentro	Carne molida Premium
10		Carne molida súper especial

Tabla N°13. Resumen de resultados del análisis de aislamiento e identificación de **Salmonella spp** a partir de muestras de carne molida de res

Control de muestras	TT			RP-VS			PRUEBAS BIOQUIMICAS								
	XLD	BS	HEK	XLD	BS	HEK	TSI				INDOL	RM	VP	CITRATO	MOVILIDAD
							K	A	GAS	H ₂ S					
1	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
2	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
3	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
4	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
5	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
6	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
7	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
8	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+
9	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
10	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-

Positivo: + Negativo: - XLD: Xilosa Lisina Desoxicolato BS: Bismuto Sulfito HEK: Hektoen TT: tetrionato RP-VS: Rappaport Vasiliadis RM: Rojo de Metilo VP Voges-Proskauer

Se analizaron 10 muestras de carne molida de res bajo las mismas condiciones y siguiendo el mismo proceso. La tabla N°13 muestra los resultados obtenidos en cada una de las determinaciones realizadas. Se observa el crecimiento microbiano solamente en los medios selectivos y diferenciales como XLD, Bismuto Sulfito y Hektoen provenientes de caldo Tetrionato. Las muestras sombreadas presentaron crecimiento microbiano en más de 2 medios selectivos y diferenciales los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas de las cepas de **Salmonella spp** en estado salvaje son similares a los resultados teóricos de **Salmonella**, por lo que fueron seleccionadas para realizarles la prueba de sensibilidad a los antibióticos por el método de difusión Kirby Bauer obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla N°14. Valores de los resultados de diámetro (mm) obtenidos en la prueba de difusión en discos. (Kirby Bauer).

Muestra /antibiótico	Gentamicina 10µg	Ciprofloxacina 5µg	Penicilina 10 µg	Tetraciclina 30µg	Cloranfenicol 30µg
Muestra 1	18.8	25.5	6.0	6.0	27.0
Muestra 2	20.5	25.0	13.8	6.0	26.2
Muestra 3	20.1	38.7	6.0	23.7	28.2
Muestra 5	20.5	37.8	6.0	19.6	28.0
Muestra 6	17.4	27.6	6.0	20.5	25.8
Muestra 7	21.8	31.8	6.0	27.1	25.2
Muestra 10	19.2	30.3	6.0	17.4	23.5
Cepa ATCC 984281	15.0	35.0	6.0	20.0	28.0

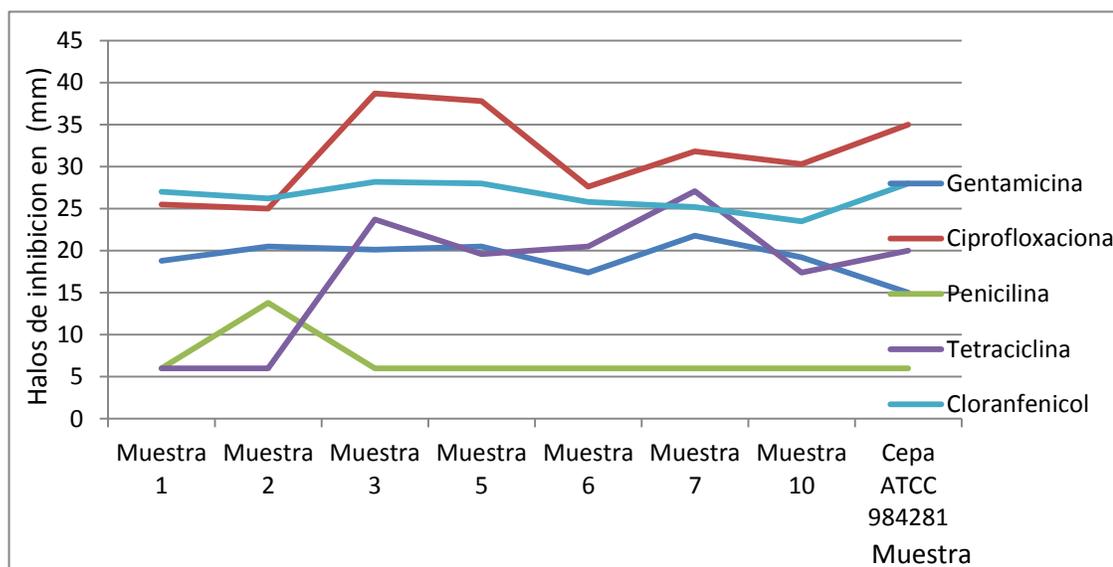


Figura N°8. Gráfico que muestra los resultados de diámetros (mm) obtenidos en la prueba de difusión en discos por el método de Kirby Bauer.

Las cepas de *Salmonella spp* analizadas con los antibióticos establecidos presentaron respuesta similares frente a gentamicina y cloranfenicol con una tendencia casi lineal lo que nos indica que estos antibióticos actúan inhibiendo los diferentes tipos de *Salmonella spp* aislados. En cuanto a tetraciclina y ciprofloxacina las muestras presentaron respuestas diferentes. El gráfico también muestra los antimicrobianos con valores de halo de inhibición mayor siendo ciprofloxacina, cloranfenicol seguido de gentamicina presentando mayor

efectividad ante las cepas de *Salmonella spp* aisladas y los antimicrobianos que presentaron valores de halo menores fueron tetraciclina y penicilina siendo menos efectivos ante las cepas en estado salvaje. La cepa de *Salmonella* ATCC 984281 presentó resistencia a penicilina y sensibilidad a gentamicina, ciprofloxacina, tetraciclina y cloranfenicol.

Tabla N°15. Porcentaje de resistencia microbiana presentada por *Salmonella spp* aislada de carne molida de res

Antibiótico/ muestra	Porcentaje de resistencia		
	Sensible	Intermedio	Resistente
Gentamicina	100.00%	0.00%	0.00%
Ciprofloxacina	100.00%	0.00%	0.00%
Penicilina	0.00%	0.00%	100.00%
Tetraciclina	57.14%	14.29%	28.57%
Cloranfenicol	100.00%	0.00%	0.00%

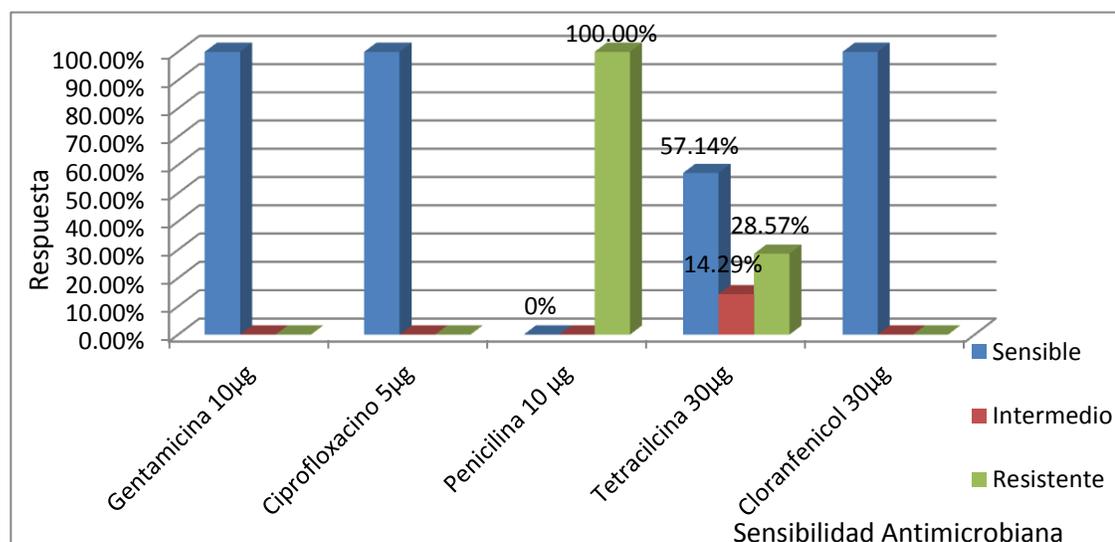


Figura N°9. Gráfico de porcentaje de cepas de *Salmonella spp* que presentan resistencia a los antibióticos.

En la figura N°9 se observó que el 100% de las cepas de *Salmonella spp* aisladas fueron resistentes a penicilina y 28.57% resistentes a tetraciclina. Los cultivos de cepas aislados de carne molida de res fueron 100% sensibles ante

gentamicina, ciprofloxacina y cloranfenicol y 57.14% fue sensible frente a tetraciclina; además el 14.29% presentó sensibilidad intermedia frente a tetraciclina. Estos porcentajes se obtienen de la operación matemática en la cual las 7 muestras representan el 100% y los valores de los diferentes rangos representan la variable.

Tabla N°16. Clasificación de los perfiles de resistencias presentados por la cepa control (ATCC)

Antibiótico	Clasificación de sensibilidad
Gentamicina 10 µg	Sensible
Ciprofloxacina 5 µg	Sensible
Penicilina 10 µg	Resistente
Tetraciclina 30 µg	Sensible
Cloranfenicol 30 µg	Sensible

De acuerdo al estudio realizado, se puede observar que la cepa de **Salmonella** ATCC 984281, presenta sensibilidad ante los antibióticos gentamicina 10µg, ciprofloxacina 5µg, tetraciclina 30µg y cloranfenicol 30µg; por el contrario presenta resistencia ante penicilina 10µg.

Los resultados del análisis realizado en la primera semana en 10 muestras de carne molida de res de las diferentes especialidades dio como resultado que de las 10 muestras analizadas 4 (40%) se les detectó **Salmonella spp** siendo sensibles en un 100% a ciprofloxacina y gentamicina y de estas 4, 2(50%) presentó sensibilidad a cloranfenicol, 1(25%) presentó resistencia intermedia, 1(25%) presentó resistencia a dicho antibiótico; las 4(100%) muestras fueron resistentes a penicilina; de las 4 muestras 1(25%) presentó sensibilidad a tetraciclina y 3(75%) fueron resistentes.

En la segunda semana de análisis se obtuvieron los siguientes resultados:

De las 10 muestras de carne molida de res analizadas 7 (70%) se les detectó **Salmonella spp** las cuales presentaron sensibilidad en un 100% a

cloranfenicol, gentamicina y ciprofloxacina; de las 7 muestras 4(57.14%) fueron sensibles a tetraciclina, 1(14.29%) presentó resistencia intermedia, 2(28.57%) presentaron resistencia a dicho antibiótico; las 7(100%) muestras fueron resistentes a penicilina.

Tabla N°17 Resumen de los resultados del análisis de las 20 muestras de carne molida de res seleccionadas y su porcentaje de resistencia a los antibióticos

Código de muestra	Resultados para <i>Salmonella</i>		Reincidencia	Porcentaje de resistencia de las cepas de <i>Salmonella spp</i> a los Antibióticos														
	Semana 1	Semana 2		P			Cl			C			T			G		
				% S	% I	% R	% S	% I	% R	% S	% I	% R	% S	% I	% R	% S	% I	% R
1	+	+	+	0	0	100	81.81	9.1	9.1	100	0	0	45.45	9.1	45.45	100	0	0
2	-	+	-															
3	+	+	+															
4	-	-	-															
5	+	+	+															
6	+	+	+															
7	-	+	-															
8	-	-	-															
9	-	-	-															
10	-	+	-															

+: positivo -: negativo P: penicilina Cl: cloranfenicol C:ciprofloxacina T: tetraciclina G: gentamicina S: sensible I: intermedio R: resistente.

En la tabla N° 17 se muestran los resultados obtenidos de las 20 muestras de carne molida de res divididas en las dos semanas que se llevo a cabo el análisis y la reincidencia que se obtuvo de algunas muestras, además se observan los porcentajes de resistencia de la *Salmonella spp* a los diferentes antibióticos ensayados.

Como podemos ver las muestras 1,3,5,6, en las dos semanas correspondientes a las especialidades que se muestran en la tabla N° 12 presentaron reincidencia lo cual se debe al incumplimiento de las Buenas Prácticas Higiénicas ya que según la lista de chequeo los manipuladores seleccionados no utilizan guantes ni mascarilla, además también estos resultados se deben a que la carne se contamina en el momento del destazo, por vectores como aves, insectos, roedores, mascotas las cuales tienen contacto directo o indirecto con las carnes

Tabla N° 18. Comparación de resultados obtenidos por el método Kirby Bauer de los cultivos de ***Salmonella spp*** con la cepa de ***Salmonella*** ATCC 984281

Antibiótico/ muestra	Porcentaje de resistencia de <i>Salmonella spp</i> aisladas			Porcentaje de resistencia de <i>Salmonella</i> ATCC 984281		
	Sensibil e	Intermedio	Resistent e	Sensible	intermedio	Resisten te
Gentamicina	100.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.0%
Ciprofloxacino	100.0%	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.0%
Penicilina	0.0%	0.0%	100.0%	0.0%	0.0%	100.0%
Tetraciclina	45.45%	9.1%	45.45%	100.0%	0.0%	0.0%
Cloranfenicol	81.81%	9.1%	9.1%	100.0%	0.0%	0.0%

Al comparar los resultados obtenidos por el método de difusión Kirby Bauer de los cultivos de ***Salmonella spp*** aislados de muestras de carne molida de res con los resultados obtenidos de la ***Salmonella*** ATCC 984281 podemos observar que la Cepa ATCC solamente presenta resistencia a penicilina y sensibilidad a cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina y tetraciclina, a diferencia de las cepas salvajes aisladas de ***Salmonella spp*** estas fueron resistentes a penicilina, cloranfenicol y tetraciclina y solamente presentaron sensibilidad en un 100% a gentamicina y ciprofloxacina lo que indica que la ***Salmonella spp*** en estado salvaje solamente se puede combatir con gentamicina y ciprofloxacina

CAPITULO VI.
CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos al verificar las Buenas Prácticas Higiénicas por medio de la lista de chequeo en las áreas de despacho de carne de los supermercados seleccionados, demuestra que solo se cumple con el 73% de las BPH con respecto a los puntos verificados y que el 27% no cumple ya que no usan guantes, mascarillas y las mujeres usan maquillaje y además algunas áreas de despacho tienen las vitrinas abiertas.
2. De las 20 muestras de carne molida de res comercializadas en los supermercados antes mencionados se detecto ***Salmonella spp*** solamente en 11muestras (55%) muestras, debido al incumplimiento de las Buenas Prácticas Higiénicas directamente desde el momento del destazo hasta la comercialización o indirectamente por vectores o animales.
3. Los cultivos de cepas de ***Salmonella spp*** aislados de muestras de carne molida de res presentaron 100% de sensibilidad a gentamicina 10 µg y ciprofloxacina 5 µg, 81.81% fue sensible a cloranfenicol 30 µg, 45.45% fue sensible a tetraciclina 30 µg estos antibióticos pueden ser utilizados como tratamiento en caso de salmonelosis o infecciones relacionadas con ***Salmonella spp***
4. De los cultivos aislados el 100% fue resistente a penicilina 10 µg, 45.45% presentó resistencia a tetraciclina 30µg, 9.1% fue resistente a cloranfenicol 30µg, 9.1% presentó resistencia intermedia a tetraciclina 30µg y cloranfenicol 30µg. Por lo que se concluye que las cepas de ***Salmonella spp*** aisladas han adquirido resistencia a los antibióticos como el cloranfenicol, tetraciclina y penicilina debido al uso

indiscriminado de los antibióticos al ganado, como promotores de crecimiento y para eliminar organismos destructores de productos agrarios.

5. Los resultados obtenidos en el estudio muestran que no se cumplen completamente las Buenas Prácticas Higiénicas, debido a que en la primera semana del análisis de las 10 muestras ensayadas a 4 se les detectó cepas de ***Salmonella spp***, y en los análisis realizados en la segunda semana, de las 10 muestras ensayadas a 7 se les detectó ***Salmonella spp***, lo que indica que las carnes estuvieron en contacto directo con manipuladores contaminados, con vectores o con animales portadores de ***Salmonella spp***, esto es un indicador de que las cadenas de supermercados no poseen un control microbiológico estricto de la producción.
6. Los resultados obtenidos muestran que las cepas de ***Salmonella spp*** en estado salvaje que fueron aisladas de carne molida de res presentaron mayor resistencia a los antibióticos ensayados en especial a la penicilina al cual también la cepa patrón de ***Salmonella*** ATCC 984281 presentó resistencia debido a que este antibiótico por ser el primero en descubrirse se ha utilizado con mayor frecuencia para tratamiento en el ganado
7. La resistencia que muestran las cepas de ***Salmonella spp*** en estado salvaje fue debido al uso indiscriminado de antibióticos en el ganado, como promotores de crecimiento y como destructores de productos agrarios por lo que al ser ingeridos por las personas representa un riesgo muy grave para la salud, especialmente en niños, ancianos y personas inmunocomprometidas.

CAPITULO VII.
RECOMENDACIONES

7. RECOMENDACIONES.

1. Los manipuladores de productos cárnicos responsables del despacho de carnes en los supermercados deben utilizar la indumentaria adecuada y poner en práctica las Buenas Prácticas Higiénicas.
2. Realizar futuros estudios en todos los tipos de carne comercializados en las cadenas de supermercados del país utilizando un mayor número de muestras, así como métodos de análisis más avanzados como Técnica de Amplificación de la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) para poder tipificar los serotipos de ***Salmonella spp*** y lograr tratamientos con antibióticos más efectivos.
3. Al gremio de médicos junto con el Ministerio de Salud Pública no incluir antibióticos como penicilina, tetraciclina y cloranfenicol para tratar la salmonelosis ya que la cepa salvaje de ***Salmonella spp*** presentaron parcialmente resistencia a tetraciclina y cloranfenicol.
4. Al Ministerio de Salud Pública realizar mayor número de monitoreo de Buenas Prácticas Higiénicas en las salas de ventas de los supermercados periódicamente para garantizar la calidad de los productos cárnicos que se comercializan en el país y de esta manera disminuir las infecciones alimentarias causadas por la ingestión de productos cárnicos contaminados.
5. Al Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) así como veterinarios impartir capacitaciones a los ganaderos a que puedan hacer uso adecuado de los antibióticos para el tratamiento de bovinos enfermos y así evitar la resistencia de los microorganismos patógenos a los antibióticos.

6. A los consumidores cocinar bien las carnes para eliminar los microorganismos que puedan existir y así evitar las intoxicaciones alimentarias

BIBLIOGRAFIA

1. Bailon L., González R., Cervantes A., Atlas de Pruebas Bioquímicas para Identificar Bacterias. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. México 2003. Disponible <http://microbitos.files.wordpress.com/2010/06/atlasmicrobiologia1.pdf>. Consultado el 29 de Mayo de 2012.
2. Bañon M, Blesa J, Zancajo A. GUIA DE BUENAS PRACTICAS HIGIENICO-SANITARIAS EN RESTAURACION COLECTIVA. Dirección General de Salud. Monografías sanitarias 24. Pág. 7 Disponible en www.nutricion.org/publicaciones/pdf/guia_bp_restaur_murcia.pdf consultado el 12 de julio de 2012
3. Calderón G. Estudio de caso – Enfermedades Transmitidas por Alimentos en El Salvador. N°1 (1-50); Consultor FAO, 2002-2006. <http://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0480s/0480s03.pdf> 25.
4. Castro A, Quiterio L, Silva M, Reforma Curricular del Bachillerato Tecnológico. Guía del Alumno de la Carrera en Análisis y Tecnología de los Alimentos. Consultado 12 de julio de 2012
Disponible en: www.cecyc Campeche.edu.mx/analisis/gm3s3.pdf
5. FDA (Food and Drug Administration).1992. Bacteriological analytical manual. 7th edition. Arlington, United States of America. AOAC. International.

6. Frazier. W., Westhoff. D. Microbiología de los alimentos. Intoxicaciones alimentarias. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza España, 4ta Edición Española, 2006, págs. 533-534, 556-564
7. García, M. 2000. Microorganismos de los alimentos, Técnicas de laboratorio microbiológico. v1, 2da edición Zaragoza España. Editorial Acribia.8
8. Gómez P. y otros 2005. Revista de Tecnología e Higiene de Alimentos. ISSN 0300-5755 N° 335:69-74, 14
9. Güerri S. Estudio de la Resistencia a Antibióticos [beta]-lactámicos en Aislamientos Clínicos de "***Salmonella typhimurium***". Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, Departamento de Microbiología. ISBN: 84-669-2031-5. Madrid 2002. Disponible en <http://eprints.ucm.es/tesis/far/ucm-t26284.pdf> consultado el 5 de febrero de 2012.
10. Helen C. 1987, Tecnología de los Alimentos, 1 edición, México, Editorial Limusa, 637,648-649, 661,666p.
11. http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lcf/aguiar_g_ae/apendi ceB.pdf Consultado: 10 Febrero de 2012, Método de difusión en agar según Kirby Bauer
12. <http://es.wikipedia.org/wiki/Ahumado> Consultado el 12 de julio de 2012
13. http://es.wikipedia.org/wiki/Carne#Manipulaci.C3.B3n_de_la_carne Consultado: 9 Febrero de 2012, Procesado de las carnes.

14. <http://es.wikipedia.org/wiki/Microorganismo>. Consultado el 12 de julio de 2012
15. http://es.wikipedia.org/wiki/Propiedad_organoleptica. Consultado el 12 de julio de 2012
16. <http://www.alimentariaonline.com/media/MLC023.curado.pdf>. Consultado el 12 de julio de 2012
17. <http://www.brizuela-lab.com.ar/tablan.htm>Tabla de Interpretación de los Resultados Método de difusión en agar (Normas CLSI - NCCLS Año 2005) consultado el 16 de marzo de 2012.
18. <http://www.ictsl.net/downloads/microbiologia.pdf>. Manual Básico de Microbiología. Instrumentación Científico Técnica. CULTIMED. Págs. 30, 48, 56, 77, 93, 98 y 105
19. <http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesvicen/depart/biolog/.../p2.pdf> Consultado el 12 de julio de 2012
20. <http://www.productoscarnicos.com/?cat=1> Consultado: 9 de Febrero de 2012, Carne y productos cárnicos
21. http://www.who.int/topics/food_safety/es/ Consultado el 12 de julio de 2012
22. Jawetz y otros. 1992. Microbiología Médica 14. Ed. México. Editorial el manual moderno. 229

23. Kopper G., Calderón G., Sheryl S., Domínguez W., Gutiérrez G. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Estudio de casos en Costa Rica El Salvador, Guatemala Honduras, Nicaragua. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. ISSN 1814-1153 Consultores, FAO Roma, 2009 consultado el 8 de febrero de 2012. disponible en:
<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0480s/i0480s.pdf>
24. Libros Virtuales Intramed. Sepsis. Online disponible en:
www.intramed.net/sitios/librovirtual1/pdf/librovirtual1_52.pdf
Consultado el 12 de julio de 2012
25. Lorenzo. P., A. Moreno, J.C. Leza, I. Lizasoain, M.a. Moro. Farmacología Básica y Clínica. Antibióticos y quimioterápicos generalidades, Editorial Medica Panamericana, México, 2005. Págs. 776, 782-784.
26. M.C. José Antonio F. Bacteriemia por **Salmonella** no tifoídica en pacientes inmunocomprometidos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología, vol. 29, núm. 4, octubre-diciembre 2009. Consultado el 18 de febrero de 2012. Disponible en www.amimc.org.mx/revista/2009/29-4/bacteremia.pdf
27. Mantilla J., Pulido M., Jaime J. Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana de cepas de **Salmonella** Grupo D (móviles e inmóviles) aisladas de ponedoras comerciales en Colombia. Revista de la Facultad de Medicina y Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia, 2010, mayo 24. Disponible en
www.revistas.unal.edu.co/index.php/remevez/article/view/18252/19836
consultado: 20- Marzo- 2012.

28. Manual de pruebas de susceptibilidad. Online, disponible en:
<http://grupos.emagister.com/ficheros/dspflashview?idFichero=361731>
Consultado el 12 de julio de 2012
29. Melara S., Salazar B., Determinación de la multirresistencia a los antimicrobianos de **Salmonella sp** aislada a partir de muestras de chorizos comercializados en mercados de Santa Tecla, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, Febrero 2012.
30. OMS-OPS (Organización Mundial de la Salud- Organización Panamericana de la Salud) Sistema de información regional para la vigilancia epidemiológica de enfermedades transmitidas por alimentos (sirve-eta) 1995.
31. Rodríguez Molina, K., Guandique Quintanilla S. Evaluación de la Calidad Sanitaria de Embutidos Crudos (chorizos) conforme a la Norma salvadoreña Obligatoria NSO 67.02.13:98. Facultad de Química y Farmacia- Biología, Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer USAM, San Salvador, 2003.
32. Reglamento Técnico Centro Americano. Alimentos. Criterios Microbiológicos para la inocuidad de alimentos. RTCA 67.04.50:08 pág. 15.
33. Sánchez Jiménez M. Caraballo Guzmán A. Cardona Castro N. Bernal Parra C. Zapata C. Durango Harold. 2002-2003 Determinación del perfil de sensibilidad y resistencia a antibióticos seleccionados, en cepas de **Salmonella spp.** aisladas en Antioquia 2002-2003, volumen 18 N°1 (1-8); Instituto Colombiano de Medicina Tropical. CES. Colombia. Julio 2004

34. Velázquez García M. Evaluación de la resistencia a los antibióticos de las cepas de ***Salmonella spp*** aislada de la carne de pollo que se expende en los principales mercados de la ciudad de Guatemala. N°1 (1-72); Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Escuela de Medicina Veterinaria. Guatemala 2007
35. www.redbioquimicasf.com.ar/redes/whonet/m02_a10_new.pdf Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio. Normas para realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos con discos. Norma aprobada, décima edición. Vol. 29 N°1. Enero 2009. Consultado el 28 de febrero de 2012

GLOSARIO

Asporógenos: Que no esporula y posee flagelos que lo rodean. (4)

Cefalea: (o cefalalgia, jaqueca o dolor de cabeza) es uno de los síntomas que aparecen principalmente en enfermedades del sistema nervioso, más particularmente del cerebro y las meninges que lo cubren. (24)

Cepa de referencia: es un material biológico de referencia certificado. La colección certifica que se suministra una determinada cepa, que es un cultivo puro, y que se han observado las convenientes pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares correspondientes. (28)

Cepa ATCC: (American Type Culture Collection. Rockville, EU)Obtención directa a partir de una colección internacional reconocida, con su respectivo registro y certificado. (28)

Contaminación: presencia de un material indeseable en el producto.(2)

Esplenomegalia: (o hipertrofia del bazo) es un agrandamiento patológico del bazo o estructura esplénica más allá de sus dimensiones. (24)

Inocuidad de alimentos: acciones encaminadas a garantizar la máxima seguridad posible de los alimentos, deberá abarcar toda la cadena alimenticia, desde la producción al consumo. (21)

Manipulador de alimentos: son aquellas personas que, por su actividad laboral, manejan los alimentos durante la preparación, fabricación, transformación, elaboración, envasado, almacenamiento, transporte, distribución, manipulación, venta, suministro y servicio, siempre y cuando sus prácticas de manipulación sean determinantes para la seguridad y salubridad de los alimentos. (2)

Medio diferencial: medio utilizado para aislar microorganismos dentro de una mezcla, por los caracteres diferenciales que presentan. Suelen ser medios sólidos y se basan en la capacidad de fermentación de un determinado azúcar.⁽¹⁹⁾

Medio de enriquecimiento: es un medio de cultivo que contiene los nutrientes necesarios para apoyar el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos, entre ellos algunos de los más exigentes.⁽¹⁹⁾

Medio selectivo: es aquel que permite el crecimiento de determinadas bacterias e inhiben el crecimiento de otras porque poseen una sustancia inhibidora.⁽¹⁹⁾

Método de ahumado: Técnica que consiste en someter alimentos a humo proveniente de fuegos realizados de maderas de poco nivel de resina. Este proceso además de dar sabores ahumados sirve como conservador alargando la vida de los alimentos.⁽¹²⁾

Método de curado: consiste en añadir sal o salmuera, con o sin azúcar, especia, nitritos u otros ingredientes a un producto de carne o ave.⁽¹²⁾

Método de encurtido: es cualquier salmuera, vinagre o solución con especias utilizada para preservar el sabor de un alimento.⁽¹²⁾

Método de escabechado: Método para la conservación de los alimentos en vinagre.⁽¹²⁾

Microorganismos patógenos: son microorganismos capaces de penetrar y multiplicarse en otros seres vivos, a los que perjudican originando una infección.⁽¹⁴⁾

Propiedades organolépticas: conjunto de descripciones de las características físicas según las pueden percibir nuestros sentidos sabor, textura, olor, color.⁽¹⁵⁾

Septicemia: presencia de microorganismos o sus toxinas en sangre. .(24)

ANEXOS



Universidad de El Salvador
Hacia la libertad por la cultura

ANEXO N°1



LISTA DE CHEQUEO PARA VERIFICAR EL AREA DE DESPACHO DE CARNES EN LAS PRINCIPALES CADENAS DE SUPERMERCADOS EN LA ZONA 2 DEL DISTRITO 2 DEL AREA METROPOLITANA DE SAN SALVADOR.

Nombre del supermercado: _____

Sucursal: _____

Fecha de verificación: _____

N°	Higiene personal	Si	No	OBSERVACIONES
1	¿Utiliza gorro o redecilla?			
2	¿Utiliza gabacha?			
3	¿Utiliza guantes?			
4	¿Utiliza mascarilla?			
5	La indumentaria de los empleados ¿está limpia y en buen estado de conservación?			
6	¿Usan anillos?			
7	¿Usan relojes?			
8	¿Tiene las uñas limpias y recortadas?			
9	En caso que sea un hombre ¿Usa barba y o bigote?			
10	En caso que sea una mujer, ¿utiliza maquillaje?			
	Área de venta			
11	¿El área de ventas se encuentra limpia y bien mantenida?			
12	¿Tienen separados los diferentes tipos de carne para evitar la contaminación cruzada?			
13	Especifica algún rotulo las temperaturas de los cuartos fríos y las vitrinas donde se mantienen las carnes?			
14	¿El olor, color y textura de la carne molida de res es característico de esta?			
15	¿La vitrina se mantiene cerrada?			

ANEXO N° 2

Mapa del Distrito 2 del área Metropolitana de San Salvador

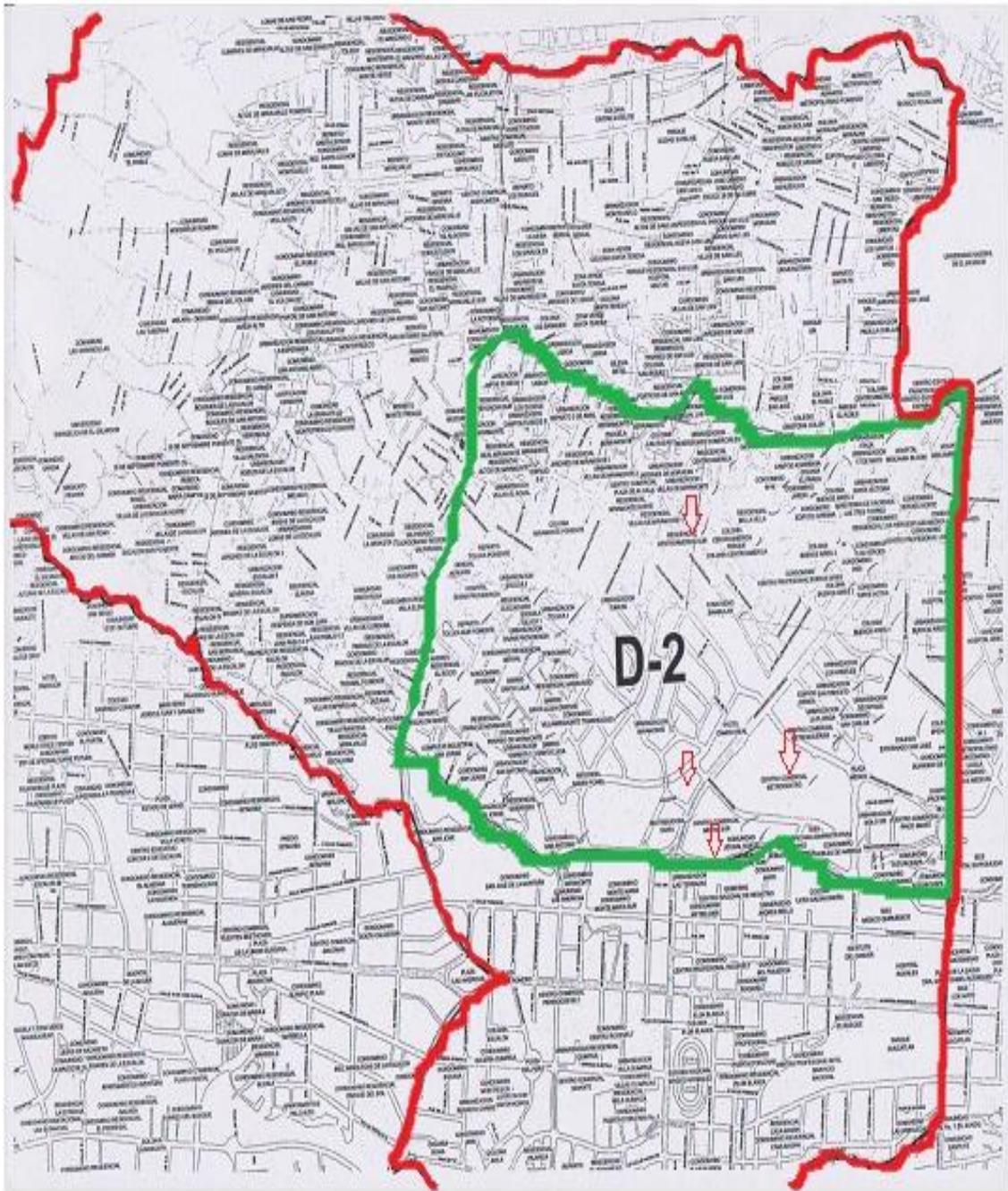


Figura N°10 Zona 2 del Distrito 2 del área metropolitana de San Salvador

● Distrito 2 ↓ Supermercados de la zona 2 ● Zona 2

ANEXO N°3

Tabla N° 19. Supermercados ubicados en la zona 2 del distrito 2 del área metropolitana de San Salvador

SÚPER MERCADO	SUPER SELECTOS	DESPENSA DE DON JUAN	HIPER EUROPA
UBICACION	Metro Sur	Los Héroes	Bernal
	Metro Centro		
CANTIDAD	Total: 2	Total: 1	Total: 1

ANEXO N°4

Tabla N° 20. Síndromes salmonelósicos en las personas.

Anexo N° 4

Tabla N°20 Síndromes salmonelósicos en las personas

Enfermedad	Agente causal	Período de incubación, signos y síntomas	Origen, reservorio y epidemiología
Salmonelosis	<i>Salmonella choleraesuis, enteritidis, typhimurium, Heidelberg, derby, java, infantis, Montevideo, etc.</i>	De 5 a 72 horas, normalmente de 12 a 36 horas; diarrea, dolor abdominal, escalofríos, fiebre, vómitos, deshidratación abatimiento, anorexia, cefalalgia, malestar; varios días de duración; también puede haber enteritis o infección local	Heces infectadas de los animales, domésticos o salvajes, y de las personas; son más sensibles los niños, los ancianos, las personas mal alimentadas y aquellas con enfermedades concomitantes; el estado de portador suele durar desde algunos días a algunas semanas, aunque a veces puede persistir durante meses.
Fiebre tifoidea (fiebre entérica)	<i>Salmonella typhi</i>	De 7 a 28 días, con una media de 14 días; en los brotes de origen alimentario el período de incubación puede ser más corto; hay septicemia y está afectado el tejido linfoide; malestar, cefalalgia, fiebre alta y persistente, tos, anorexia, vómitos, estreñimiento, pulso lento, abdomen sensible, y distendido, esplenomegalia, hemorragias nasales, manchas rosadas en el tórax y en el abdomen, sudoración, escalofríos, delirio, obnubilación del sensorio, diarrea, hemorragias intestinales; tienen lugar recidivas; convalecencia larga	Heces y orina de las personas infectadas; en la transmisión, son importantes los portadores; algunas personas son portadoras durante mucho tiempo; el agua también interviene en la transmisión

Tabla N° 20 continuación

Enfermedad	Agente causal	Período de incubación, signos y síntomas	Origen, reservorio y epidemiología
Fiebre paratifoidea (fiebre entérica)	<i>Salmonella enteritidis, paratyphi A, paratyphi B, paratyphi C, sendai</i>	De 1 a 15 días; infección de la sangre; cefalalgia, fiebre persistente, sudoración abundante, náuseas, vómitos, dolor abdominal, esplenomegalia, diarrea, a veces manchas rosadas; más benigna y de menor duración (1 a 3 semanas) que la fiebre tifoidea.	Heces y orina de las personas infectadas; los portadores son importantes en la transmisión.

Anexo N°5

Tabla N° 21 Especificaciones para lectura de Pruebas Bioquímicas

Sustrato	Reactivos	Resultado positivo	Resultado negativo
Indol	5 gotas de éter etílico + 5 gotas de reactivo de Erlich	Se forma un anillo violeta en la superficie del caldo	Coloración amarilla en superficie.
Rojo de Metilo	Agregar 5 gotas de rojo de metilo	El medio cambia a Rojo difuso	Amarillo difuso
Voges Proskauer	1mL de KOH + 1mL de alfa-naftol	El medio cambia a Rosado – rojo	No cambia de color
Citrato	Medio color verde inicial.	El medio cambia a color azul	No cambia de color
Movilidad	Observar movilidad	Se observa Movilidad en el medio	No hay movilidad
TSI	Ver coloración de Bisel y fondo. Observar producción de gas y H ₂ S	Fondo amarillo con ennegrecimiento y producción de gas en el medio	Fondo rojo sin ennegrecimiento sin producción de gas

Anexo N° 6

Tabla N° 22 Pruebas Bioquímicas para *Salmonella spp*

Microorganismo	TSI				Indol	RM	VP	Citrato	Movilidad
	Bisel	fondo	Gas	H ₂ S					
<i>Salmonella spp</i>	K	A	(+/-)	+	-	+	-	+	+

K= Rojo

A= Amarillo

-= negativo

+= positivo

Anexo N° 7

Tabla N° 23 Antibióticos y Diámetros en mm para Enterobacterias. ⁽³⁵⁾

ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO	DIAMETRO EN mm		
		R	I	S
PENICILINAS				
Ampicilina	10 µg	ε 13	14-16	³17
CEFALOSPORINAS				
Cefalotina	30 µg	ε 14	15-17	³18
Cefuroxima axetil (oral)	30 µg	ε 14	15-22	³23
Cefuroxima sodium (parenteral)	30 µg	ε 14	15-17	³18
Cefoxitina	30 µg	ε 14	15-17	³18
Cefotaxima	30 µg	ε 14	15-22	³23
Ceftriaxona	30 µg	ε 13	14-20	³21
Ceftazidima	30 µg	ε14	15-17	³18
Cefixima	5 µg	ε 15	16-18	³19
Cefpirome *	30 µg	ε 14	15-17	³18
Cefepime	30 µg	ε 14	15-17	³18
β LACTAMICO/ INHIBIDOR DE BETALACTAMASA				
Ampicilina/Sulbactam	10/10 µg	ε 11	12-14	³15
Amoxicilina/Ácido Clavulánico	20/10 µg	ε 13	14-17	³18
Cefoperazona/sulbactam +	75 µg/30 µg	ε 15	16-20	³21
MONOBACTAMS				
Aztreonam	30 µg	ε 15	16-21	³22
CARBAPENEMS				
Imipenem	10 µg	ε 13	14-15	³16
Meropenem	10 µg	ε 13	14-15	³16
AMINOGLUCOSIDOS				
Gentamicina	10 µg	ε 12	13-14	³15
Amikacina	30 µg	ε 14	15-16	³17
QUINOLONAS				
Acido nalidixico	30 µg	ε 13	14-18	³19
Norfloxacin	10 µg	ε 12	13-16	³17
Ciprofloxacina	5 µg	ε 15	16-20	³21
Ofloxacin	5 µg	ε 12	13-15	³16
TETRACICLINA				
Tetraciclina	30 µg	ε 14	15-18	³19
OTROS				
Cloramfenicol	30 µg	ε 12	13-17	³18
Trimetoprim/sulfametoxazol	1,25/23,75µg	ε 10	11-15	³16

R: resistente S: sensible I: intermedio

ANEXO N° 8.

Materiales y equipo de laboratorio para el aislamiento e identificación de *Salmonella spp.*

MATERIALES Y EQUIPO

- Erlenmeyers
- Pipetas de 10 mL
- Pipetas de 5 mL
- Pipetas de 1 mL
- Cuchillos estériles
- Cucharas estériles
- Placas de Petri de plástico estériles
- Placas de Petri de vidrio.
- Tubos con tapón de rosca
- Baño de maría
- Estufa
- Mechero
- Asa de siembra
- Hisopos estériles
- Incubadora
- Balanza
- Regla graduada
- Piseta
- Cámara de flujo laminar
- Pinzas estériles
- Gradillas

MEDIOS DE CULTIVO

- Caldo Lactosado
- Caldo Tetrionato (TT)
- Caldo Rappaport- Vassiliadis (RV)
- Agar TSA
- Agar TSI (triple azúcar hierro)
- Agar motilidad
- Agar Bismuto Sulfato
- Agar Hektoen entérico
- Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD)
- Agar Mueller Hinton

Anexo N° 9

Preparación de las muestras para el aislamiento de *Salmonella spp.*



Pesar asépticamente 25g en un recipiente estéril de boca ancha (bolsa estéril)



Agregar 225 ml de caldo lactosado y homogenizar por 3 min en estomacher a 260 RPM



Incubar por 24 ± 2 h a 35°C



Transferir la mezcla a erlenmeyer estéril de 500 mL de capacidad y cubrir con papel Aluminio.

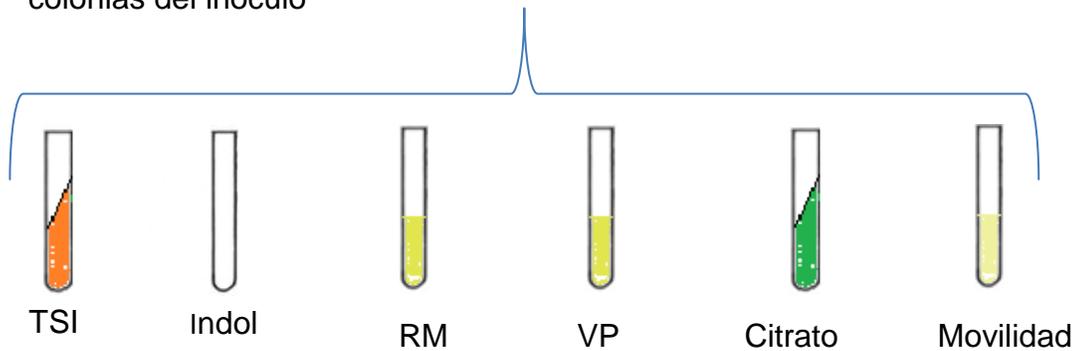
Anexo N°11

Pruebas Bioquímicas

Con una aza bacteriológica en punta inocular los medios sólidos y con una aza con aro inocular los medios líquidos

Inocular los medios tomando una o dos colonias del inoculo

De las placas de TSA

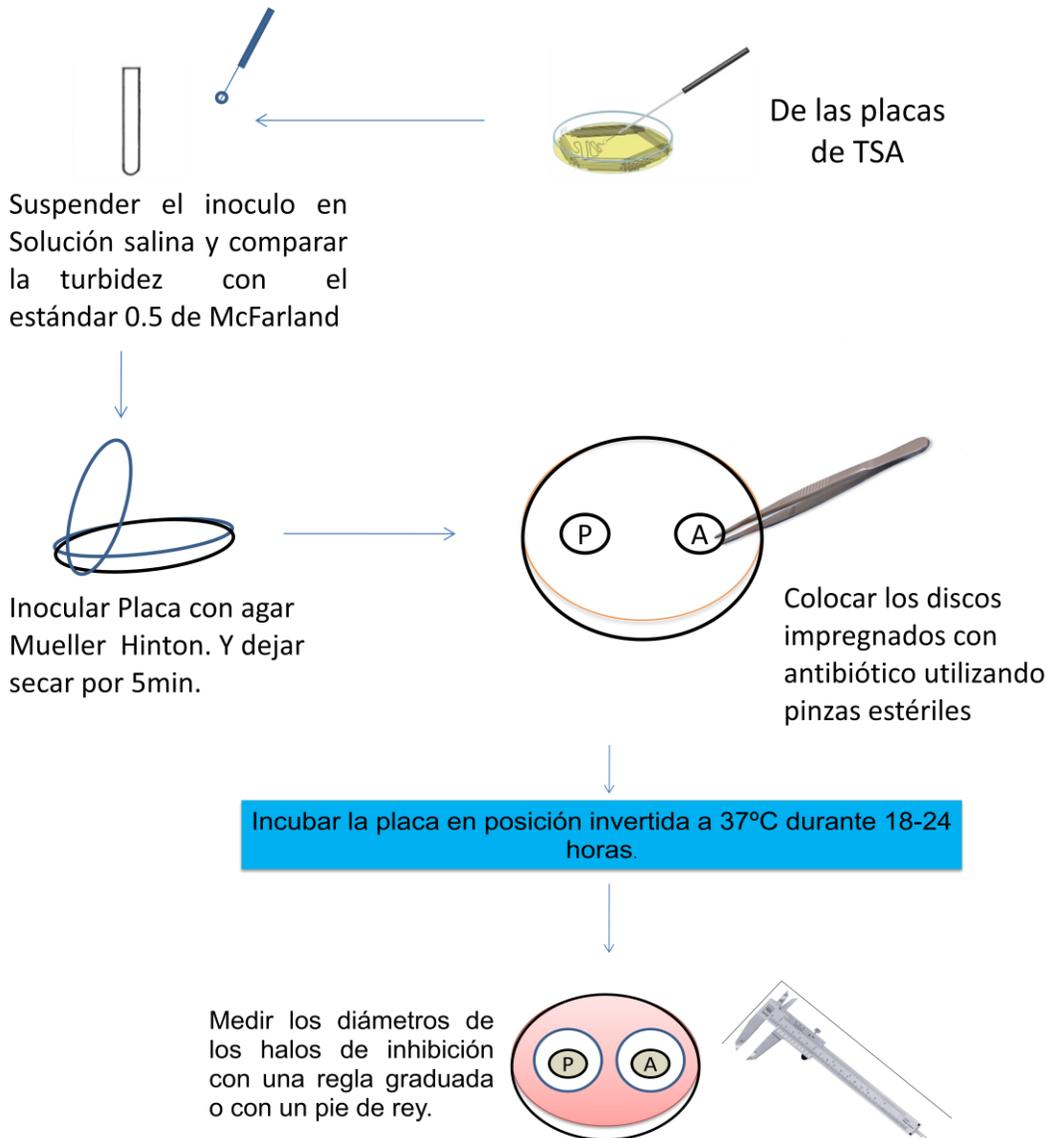


Incubar los tubos a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 - 48 horas.

Utilizar la tabla N° 21 del anexo 5 para leer las pruebas bioquímicas.

Anexo N° 12

Prueba de sensibilidad de antibióticos por el método de difusión kirby Bauer



Anexo N°13

Preparación de tubo 0.5 McFarland. Estándar de turbidez para
preparación del inóculo.

Anexo N° 13.

Preparación de tubo 0.5 McFarland. Estándar de Turbidez para preparación del inóculo.

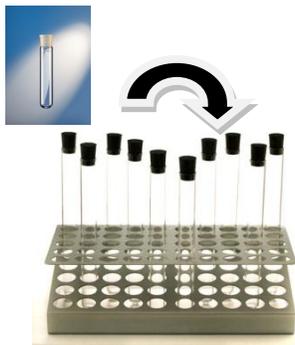
Para estandarizar la densidad del inóculo para una prueba de susceptibilidad se utiliza estándar de turbidez de BaSO_4 equivalente a un estándar 0.5 McFarland o su equivalente óptico.

Se prepara como sigue:



0.5mL de 0.048mL BaCl_2
(1.75% p/v $\text{BaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

99.5 mL de H_2SO_4 de 0.18mol/L
(1% v/v) con agitación constante



Transferir la suspensión de BaSO_4 en alícuotas de 4 a 6 mL en tubos del mismo tamaño que aquellos que se usan para el crecimiento o dilución del inóculo de bacterias y comparar la turbidez

Verificar la densidad correcta del estándar de turbidez. La absorbancia a 625 nm debe ser 0.08 a 0.10 para el estándar 0.5 McFarland

- Estos tubos deben ser bien sellados y almacenados en la oscuridad a temperatura ambiente.
- El estándar de turbidez debe ser bien agitado en un vortex mecánico antes de usar y se debe revisar que haya una apariencia turbia uniforme.
- El estándar de BaSO_4 debe ser reemplazado o verificar su densidad mensualmente.

ANEXO N°14

Imágenes del proceso de aislamiento e identificación de ***Salmonella spp.***

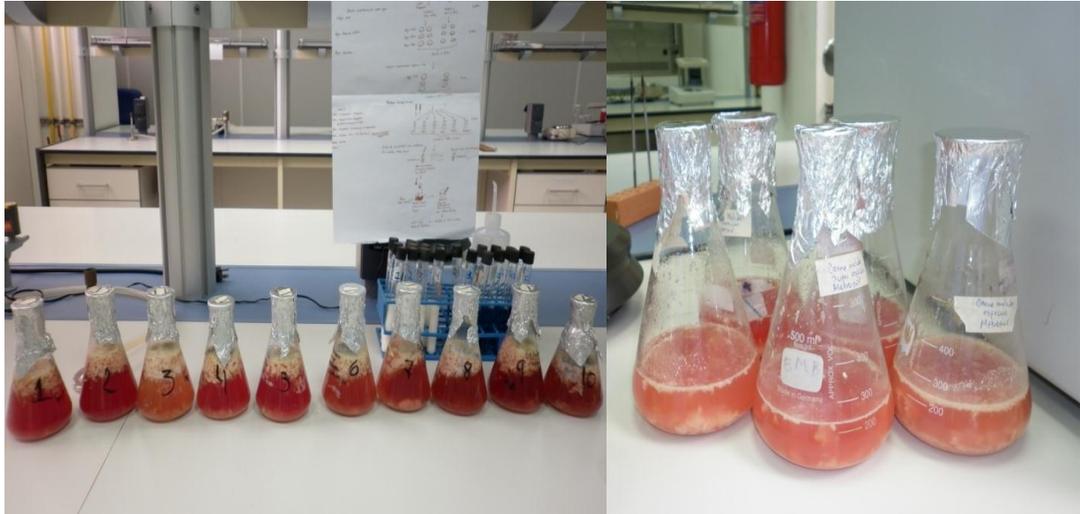


Figura N°10. Etapa de pre- enriquecimiento. Muestras de carne molida previamente pesadas y listas para incubación.

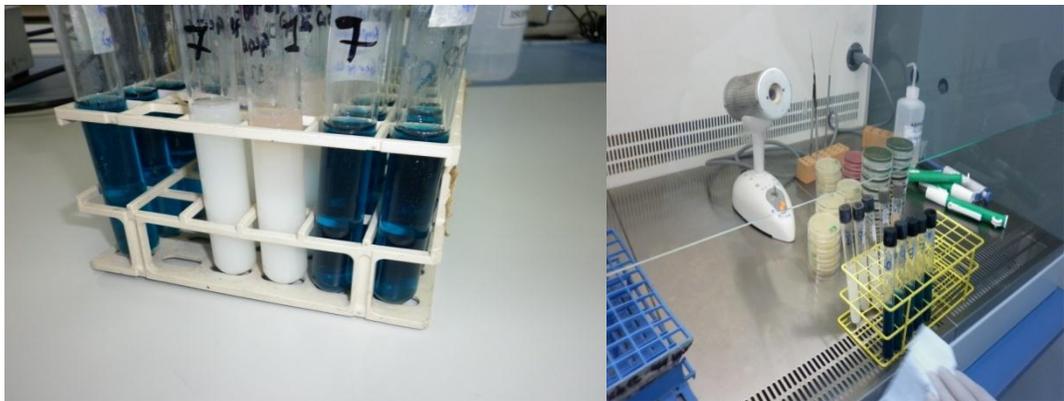


Figura N°11. Etapa de enriquecimiento selectivo. Caldos Tetratonato y Rappaport.



Figura N°12. Etapa de pre- enriquecimiento (Caldo Lactosado incubado a 35°C) a etapa de Enriquecimiento selectivo.

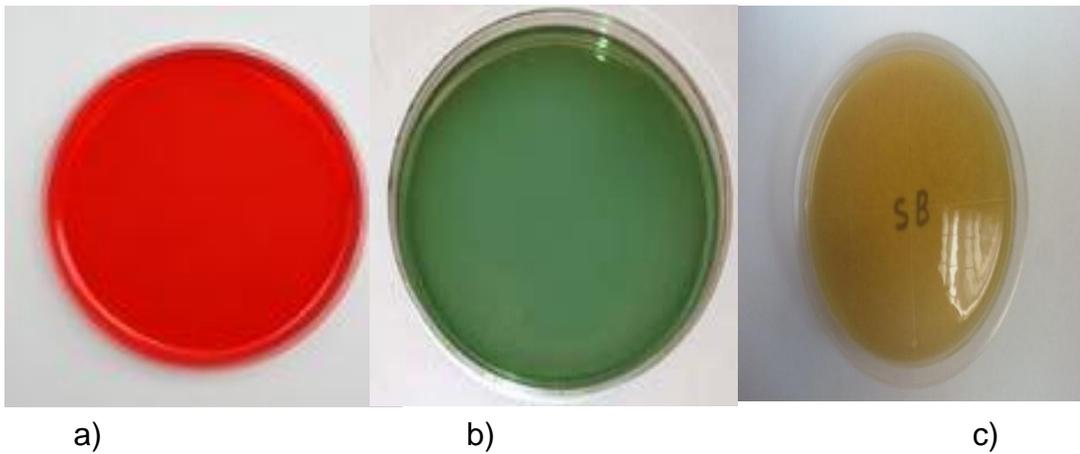


Figura N°13. Controles negativos de Agar a) XLD b) Hektoen c) Bismuto Sulfito.

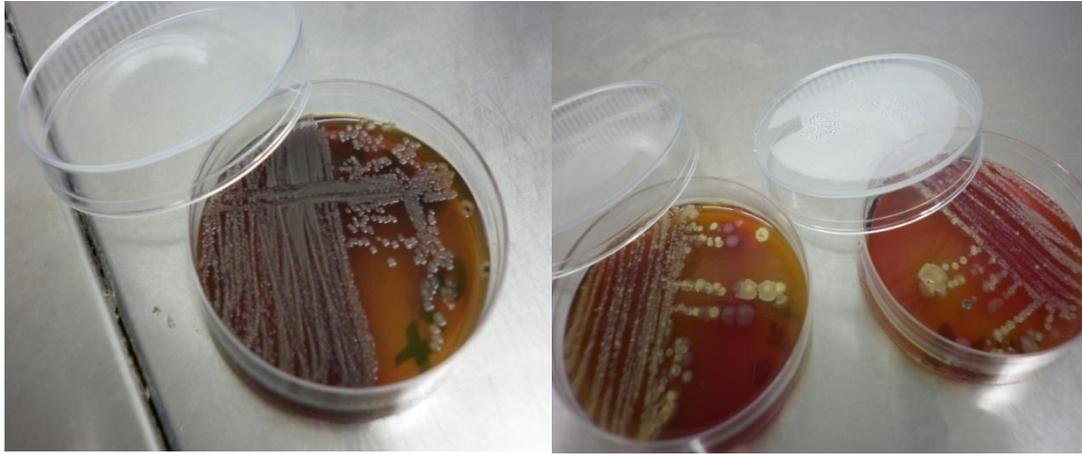


Figura N°14. Etapa de aislamiento en medio diferencial XLD, después de incubación de 35⁰C por 24 horas. Colonias características de *Salmonella spp*: colonias incoloras con o sin centro negro.

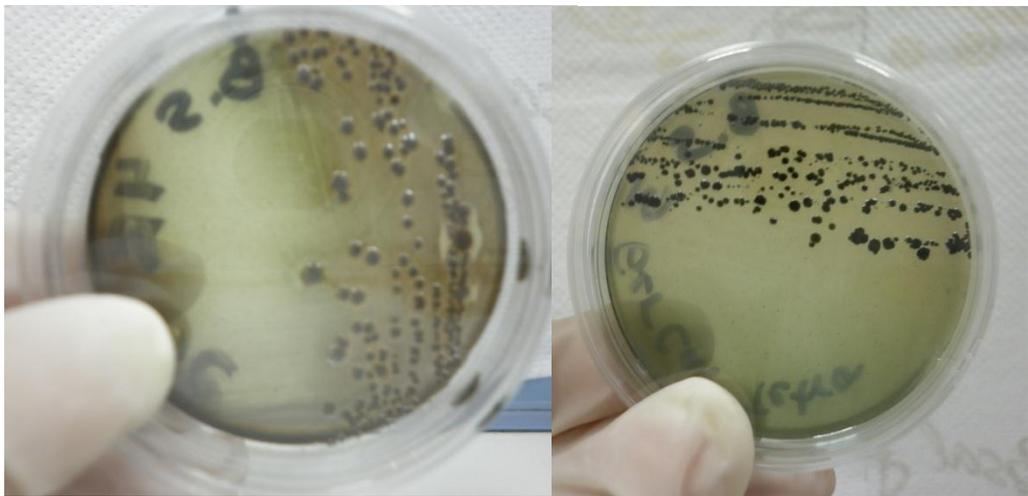


Figura N°15. Etapa de aislamiento en medio diferencial Bismuto Sulfito, después de incubación a 35⁰C por 24 horas. Colonias características de *Salmonella spp*: colonias negras o grises con halo y brillo metálico.



Figura N° 16. Etapa de aislamiento en medio Hektoen, después de incubación a 35° C por 24 horas. Colonias características de **Salmonella spp**: colonias verdes con o sin centro negro.



Figura N°17. Etapa de identificación por pruebas bioquímicas. Tubos con medio Citrato, con presencia típica de **Salmonella spp**



Figura N°18. Etapa de identificación por pruebas bioquímicas, tubos de movilidad con presencia típica de *Salmonella spp*



Figura N°19. Etapa de identificación por pruebas bioquímicas, tubos de TSI con presencia típica de *Salmonella spp*.



Figura N° 20. Etapa de identificación por pruebas bioquímicas, tubos de Indol con presencia típica de *Salmonella spp.*

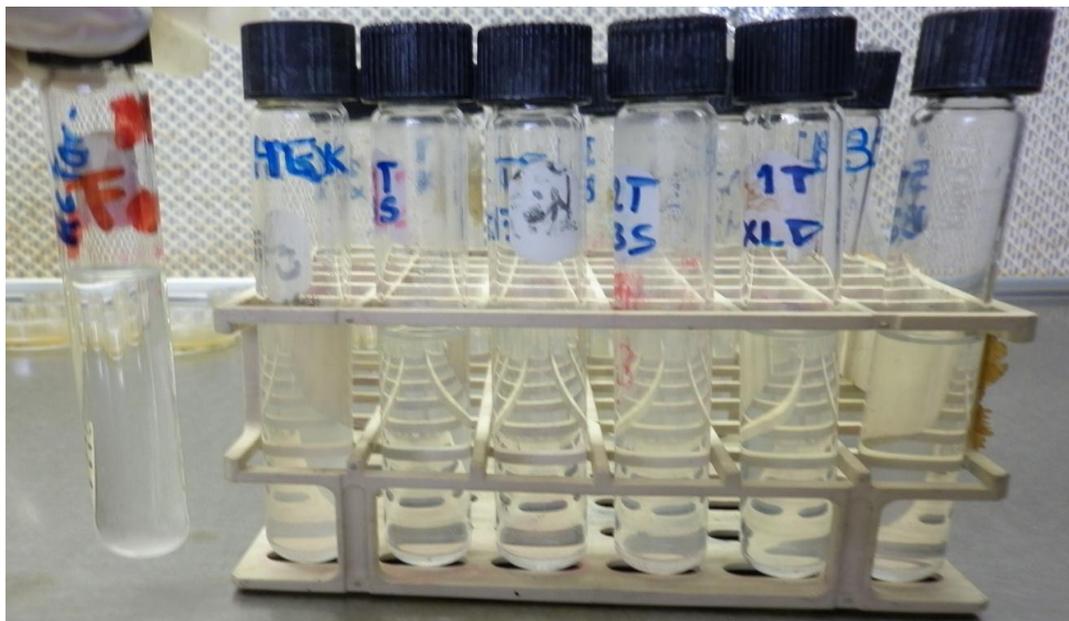


Figura N° 21. Preparación de tubo 0.5 McFarland. Estándar de turbidez para preparación de inóculo.

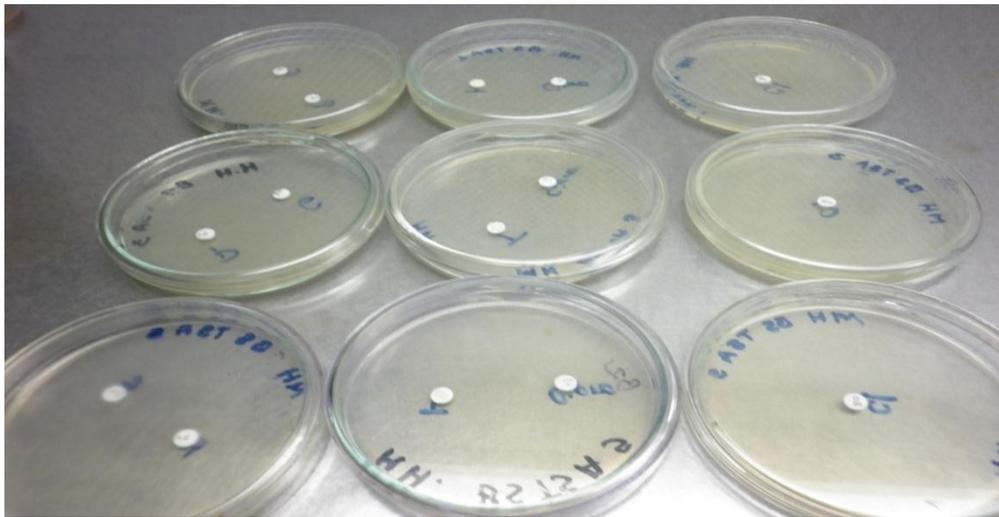


Figura N°22. Discos impregnados con antibióticos en Agar Müller Hinton.



Figura N°23. Halos de inhibición obtenidos con cloranfenicol, penicilina y gentamicina luego de incubación a 37°C durante 24 horas.

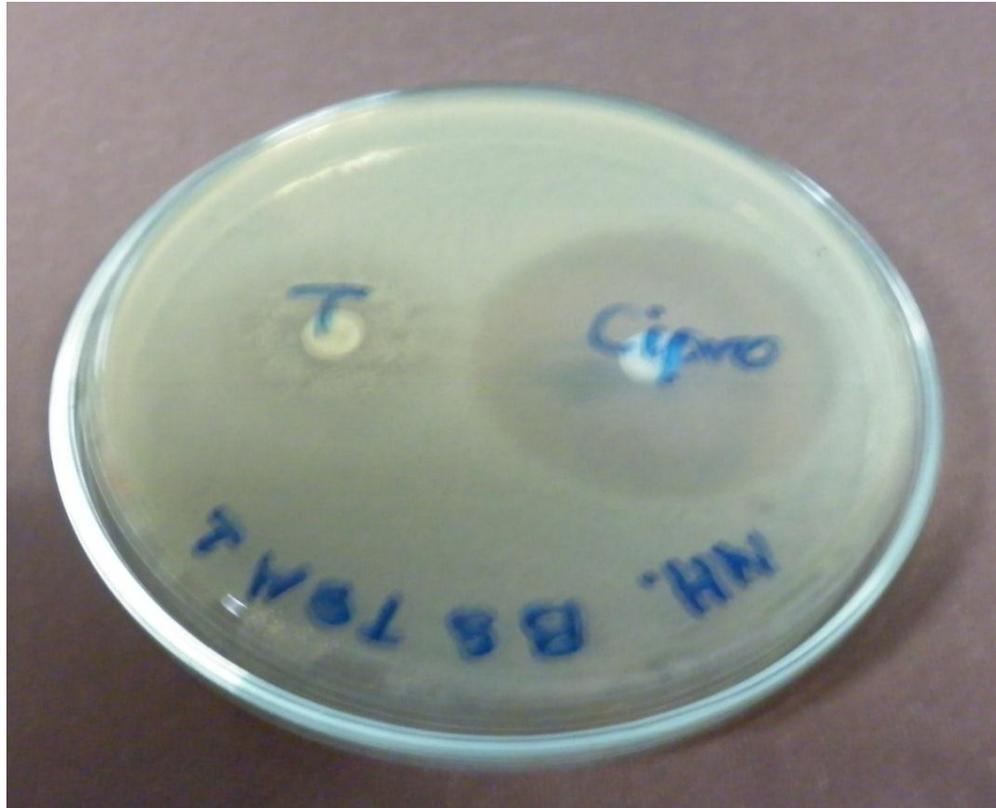


Figura N°24. Halos de inhibición obtenidos con tetraciclina y ciprofloxacina luego de incubación a 37⁰ C durante 24 horas.

Anexo N°15

Medios selectivos y de enriquecimiento utilizados para el aislamiento de
Salmonella spp en muestras de carne de res.

Anexo N° 15

Medios selectivos y de enriquecimiento utilizados para el aislamiento de **Salmonella** en muestras de carne de res. ⁽⁷⁾

Caldo lactosado. ⁽⁷⁾

Se emplea para el estudio de procesos de fermentación de la lactosa y en especial para la investigación de microorganismos Coliformes, especialmente **Escherichia coli** en aguas, leches y productos alimenticios. No contiene indicadores ni inhibidores.

Fundamento.

Por la composición del medio, el contenido en elementos nutritivos y energéticos hace que permita el desarrollo sin restricción de bacterias Coliformes. La fermentación de lactosa producirá desprendimiento de gas que se pondrá de manifiesto en la campana de Durham.

Fórmula (por Litro)

Composición (g/L):

- Lactosa.....5.0
- Peptona de Gelatina.....5.0
- pH: 6.9± 0.2
- Extracto de carne.....3.0

Preparación:

Disolver 13 g en 1L de agua destilada. Distribuir en tubos de ensayo con campana de Durham y esterilizar a 121⁰C durante 15 minutos. Enfriar lo más rápidamente posible.

Caldo Rappaport. ⁽⁷⁾

Se emplea para el enriquecimiento selectivo de **Salmonella** a excepción de **Salmonella typhi** en muestras clínicas, aguas y productos alimenticios en general.

Fundamento.

Por la elevada concentración de Magnesio Cloruro y la presencia de Verde de Malaquita se consigue frenar el crecimiento de los microorganismos que forman parte de la flora acompañante, mientras que la mayoría de **Salmonellas** no ven afectado su desarrollo; generalmente **Salmonella tiphy** y las **Shigellas** son inhibidas por el Verde de Malaquita. El pH ácido del medio refuerza su acción selectiva.

Fórmula (por Litro)

Composición (g/L):

- Extracto de levadura.....1.6
- Potasio di Hidrógeno Fosfato.....0.78
- di- Sodio Hidrógeno Fosfato.....0.26
- Verde de Malaquita.....0.1
- pH: 5,5± 0.2
- Magnesio Cloruro.....30.0
- Sodio Cloruro.....7.0
- Trypticaseína.....4.3

Preparación:

Disolver 44g en 1 L de agua destilada. Distribuir y esterilizar a 115⁰C durante 15 minutos. No sobrecalentar. El medio conservado en la nevera

puede presentar precipitados, ello no influye en sus características selectivas.

Caldo Tetrionato.⁽⁷⁾

Se emplea como medio de enriquecimiento selectivo para aislar **Salmonella** en gran diversidad de muestras.

Fundamento.

Por la presencia de las sales biliares se inhibe el crecimiento de los microorganismos Gram positivos. El Tetrionato se produce a partir de Tiosulfato, cuando después de esterilizar el medio se añade asépticamente la solución Yodo-Yodurada; el tetrionato tiene un efecto inhibitor sobre los Coliformes y la mayor parte de las bacterias intestinales. Los **Proteus** y las **Salmonellas** pueden desarrollarse correctamente. A su vez el Calcio Carbonato mantiene el pH del medio al neutraliza el Ácido Sulfúrico producido por la reducción de Tetrionato, de lo contrario el medio se iría acidificando y se detendría el crecimiento de todos los gérmenes. La mezcla de peptonas constituye el soporte nutritivo. La USP aconseja la adición de Verde Brillante que inhibe principalmente la flora Gram- positiva, sin embargo a veces se desaconseja la adición del Verde porque el medio es muy inhibitor.

Fórmula (por Litro).

Composición (g/L):

- Calcio Carbonato.....10.0
- Sales biliares.....1.0
- pH: 8.4±0.2
- Mezcla de peptonas.....5.0
- Sodio Tiosulfato.....30.0

Preparación:

Suspender 46 g en 1 L de agua destilada; calentar y agitar hasta ebullición. NO ESTERILIZAR EN AUTO CLAVE. Si se va utilizar el medio el mismo día, añadir asepticamente 20 mL de solución yodo-yodurada por Litro de medio, o proporcionalmente a la cantidad usada. Eventualmente puede añadirse 10mL/L de una solución al 0.1% de Verde Brillante, así como Novobiocina a razón de 0.04g/L, ambos esterilizados por filtración. Al distribuir el caldo repartir homogéneamente el precipitado existente. No recalentar el medio.

Agar Bismuto Sulfito. ⁽⁷⁾

Se emplea como medio altamente selectivo para aislamiento de ***Salmonella typhi*** y de otras ***Salmonellas*** en gran diversidad de muestras muy contaminadas.

Fundamento.

El Bismuto Sulfito y el Verde Brillante inhiben conjuntamente a las bacterias Gram positivas y Coliformes, no restringiendo en absoluto el crecimiento de la ***Salmonellas***. A su vez por la presencia de azufre en el medio, los microorganismos capaces de producir Hidrógeno Sulfuro precipitan Hierro (II) Sulfuro que da lugar a tonalidades marrones más o menos oscuras e incluso negras. También se puede reducir el bismuto o metal dando un brillo metálico alrededor de las colonias correspondientes. Es recomendable hacer un enriquecimiento previo en caldo.

Fórmula (por Litro)

Composición (g/L)

- Indicador de bismuto sulfito.....8.0
- D (+)- Glucosa.....5.0
- Peptona bacteriológica.....10.0

- Verde brillante.....0.025
- pH 7.5±0.2
- Extracto de carne.....5.0
- Hierro (II) Sulfato.....0.3
- di- Sodio Hidrógeno Fosfato.....4.0
- Agar.....20.0

Preparación:

Suspender 52 g en 1 L de agua destilada; calentar y agitar hasta ebullición y hervir durante 1 minuto. NO ESTERILIZAR EN AUTO CLAVE. Dejar enfriar hasta 45⁰C y distribuir en placas de Petri estériles sin dejar de agitar. Las placas quedan turbias de color verdoso.



Fig. N° 25 **Salmonella enteritidis** ATCC 13076

Agar Entérico Hektoen⁽⁷⁾

Se emplea como medio selectivo para el aislamiento y diferenciación de Enterobacterias patógenas en gran diversidad de muestras. Esta indicado para la diferenciación de ***Salmonella* y *Shigella***.

Fundamento.

Por la presencia de los dos indicadores se diferencian las colonias de bacterias lactosa positivas de las lactosa negativas, las primeras toman un color amarillo anaranjado y las segundas azul verdoso. Los microorganismos que fermentan, la sacarosa y la salicina también toman un color amarillo anaranjado. La presencia de sacarosa y salicina evita la selección de patógenos falsamente positivos. Con el Sodio Tiosulfato y el Amonio Hierro (III) Citrato se detectan los productores de Hidrógeno Sulfuro por el precipitado de negro de Hierro Sulfuro que presentan en el centro de las colonias. La presencia de sales biliares inhibe el crecimiento de una gran parte de la flora acompañante.

Fórmula (por Litro)

Composición (g/L):

- Amonio Hierro (III) Citrato.....1.5
- Extracto de levadura.....3.0
- Lactosa.....12.0
- Sacarosa.....12.0
- D (-)- Salicina.....2.0
- Sodio Tiosulfato.....5.0
- pH: 7.5± 0.2
- Azul de Bromotimol.....0.064
- Fucsina Acida.....0.1
- Peptona de carne.....12.0
- Sales biliares.....9.0

- Sodio Cloruro.....5.0
- Agar.....14.0

Preparación:

Suspender 76 g en 1L de agua destilada; calentar y agitar hasta ebullición y disolución total. NO ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE. Dejar enfriar a 55 °C y distribuir en placas de Petri estériles.



Fig. N° 26 **Salmonella enteritidis** ATCC 13076, **Shigella flexneri** ATCC 12022

Medio XLD. ⁽⁷⁾

Se emplea para el aislamiento de enterobacterias patógenas, principalmente **Salmonella** y **Shigella**, a partir de muestras biológicas y productos alimenticios.

Fundamento.

El Sodio Desoxicolato inhibe el crecimiento de la flora contaminante Gram positiva. La mayoría de las enterobacterias patógenas, a excepción de la **Shigella**, fermentan la D(+)- Xilosa. El ácido producto de la fermentación de la D(+)- Xilosa, de la lactosa o de sacarosa produce un viraje a amarillo del Rojo de Fenol contenido en el medio. Los microorganismos que descarboxílan la lisina, como **Salmonella**, se reconocen por presentar colonias rojo- anaranjadas debido al aumento de pH que han provocado en el medio y el consecuente viraje del Rojo de Fenol. Además por la presencia de Tiosulfato Sodio y Amonio

Hierro (III) Citrato las bacterias productoras de hidrógeno sulfuro dan colonias ennegrecidas siempre y cuando el pH del medio se mantenga alto.

Fórmula (por Litro)

Composición (g/L):

- Amonio Hierro (III) Citrato.....0.8
- Lactosa.....7.5
- Rojo de Fenol.....0.08
- Sodio Cloruro.....5.0
- Sodio Tiosulfato.....6.8
- Agar.....13.5
- pH: 7.4±0.2
- Extracto de levadura.....3.0
- L-lisina.....5.0
- Sacarosa.....7.5
- Sodio desoxicolato.....2.5
- D (+)- Xilosa.....3.5

Preparación:

Suspender 55.2 g en 1L de agua destilada; calentar y agitar hasta ebullición. NO ESTERILIZAR EN AUTO CLAVE. Transferir a un baño de maría a 50⁰C y dejar enfriar hasta esta temperatura. El medio debe ser prácticamente claro y de color rojizo (una permanencia demasiado prolongada en el baño maría puede dar lugar a precipitaciones, con lo que si bien el comportamiento es satisfactorio, las colonias pueden ser ligeramente menores).



Fig.N° 27 *Salmonella typhimurium* ATCC 14028

Agar Soja Triptona (TSA). ⁽⁷⁾

Se emplea como medio de uso general para el cultivo de todo tipo de microorganismos.

Fundamento.

Se ajusta a la formulación de la USP y a la Ph. Eur. Por el contenido de peptona de soja de caseína resulta una aportación nutritiva que permite el desarrollo óptimo de un gran número de microorganismos, tanto exigentes como no exigentes. Se utilizan como tales o como base para preparar medios especiales (Agar sangre, Agar Proteus).

Formula (por Litro).

Composición (g/L):

- Digerido papaínico de soja.....5.0
- Digerido pancreático de Caseína.....15.0
- Sodio Cloruro.....5.0
- Agar.....15.0
- pH final: 7.3±0.2

Preparación:

Suspender 40 g en 1L de agua destilada; mezclar bien y calentar ligeramente hasta disolución total. Esterilizar a 121⁰C durante 15 minutos.



Fig. N° 28 Placa contaminada con *Escherichia coli* ATCC 25922

IDENTIFICACION BASADA EN CARACTERISTICAS METABOLICAS

La mayor parte de las pruebas usadas para evaluar la actividad bioquímica o metabólica de las bacterias (por medio de la cual puede hacerse una identificación final de especie), se lleva a cabo mediante el subcultivo del aislamiento primario en una serie de medios diferenciales, cuyos resultados pueden interpretarse después de uno o dos días de incubación. ⁽¹⁾

Prueba de Citrato.

Medio: Citrato Simmons

Composición:

- Sulfato de magnesio
- Monofosfato de amonio
- Fosfato dipotasico
- Citrato de sodio
- Cloruro de sodio
- Agar
- Agua destilada
- Indicador de pH: azul de bromotimol (pH=6)
- Alcalino: color azul de Prusia intenso (pH 7.6)

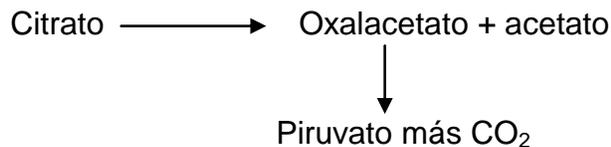
- Medio no inoculado: color verde (pH 6.9)

Fundamento.

Determina si un microorganismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono para el metabolismo y crecimiento, provocando la alcalinidad.

El medio incluye citrato de sodio, un anión como única fuente de carbono y fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno.

Normalmente el metabolismo del citrato comprende una condensación de acetilo con la coenzima A y oxalacetato para entrar en el ciclo de Krebs. El desdoblamiento del citrato comprende un sistema enzimático sin la intervención de la coenzima A. Esta enzima se denomina citritasa o citrato desmolasa.



Los productos obtenidos del metabolismo del citrato dependen del pH del medio.

pH básico:



pH ácido:



Interpretación.

Positivo: crecimiento aunque no exista cambio de color. Crecimiento y el medio es de color azul intenso en el pico de flauta.

Negativo: no se observa crecimiento y medio de color verde.

Si se utiliza carbono a partir de citrato de sodio, también se extrae nitrógeno del fosfato de amonio contenido en el medio, liberándose amoniaco. En ocasiones se detecta un crecimiento visible a lo largo de la línea de siembra antes de la aparición de color. Este crecimiento visible también indica resultado positivo.

Reacción de Voges- Proskauer (VP) ⁽¹⁾

Medio de cultivo: medio de Clark y Lubs (caldo RM/VP)

Composición:

- Polipeptona
- Dextrosa
- Fosfato de potasio
- Agua destilada

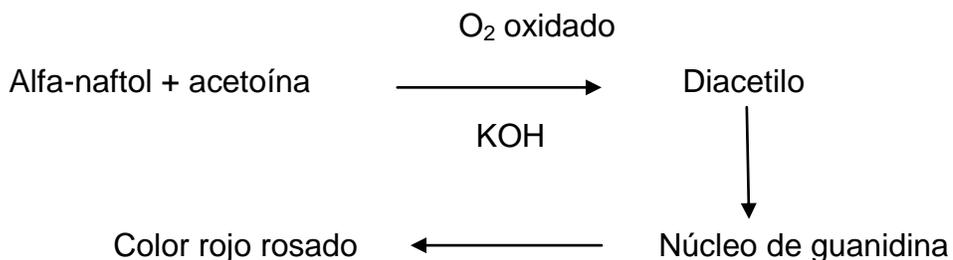
Fundamento.

Determina la capacidad de algunos organismos de producir un producto final neutro, la acetoína a partir de la fermentación de la glucosa.

La reacción de Voges- Proskauer se basa en la detección de acetoína como producto final neutro derivado del metabolismo de la glucosa. Esta es metabolizada en ácido pirúvico, intermediario clave en la glucólisis. A partir del ácido pirúvico, una bacteria puede seguir muchas vías. La producción de acetoína (precursor de la producción 2,3-butanediol) que es uno de los ciclos para la degradación de la glucosa en las bacterias. La formación de acetoína y

butilenglicol es una vía alternativa del metabolismo del ácido pirúvico. Las bacterias que utilizan esta vía producen solo pequeñas cantidades de ácidos mixtos que son insuficientes para disminuir el pH del medio rojo de metilo, lo bastante como para producir un cambio de color. Por este motivo muchas de las especies de Enterobacterias son VP positivas, con pocas excepciones son RM negativas y viceversa.

El primer reactivo agregado a una alícuota incubada es el catalizador alfa-naftol porque este actúa como intensificador del color, lo que aumenta la sensibilidad de la reacción sin pérdida de especificidad. El segundo reactivo es KOH que cuando se agrega al medio de VP contribuye la absorción de CO₂. No debe excederse de un volumen exacto. El KOH reaccionará con la peptona dando un color rosado salmón y con el agregado posterior de alfa-naftol no habrá alteración del color.



Reactivos adicionales:

- Alfa naftol al 5%, intensificador del color.
- Hidróxido de potasio 40%, agente oxidante.

Agregar directamente los reactivos al tubo después de la incubación en el siguiente orden:

0.6mL de alfa naftol

0.2mL de KOH

Agitar el tubo suavemente, dejar reposar de 10 a 15 minutos antes de la interpretación.

Precaución.

El orden de adición de los reactivos es importante, ya que la inversión de incorporación dará como resultado un débil positivo o falso negativo.

No debe excederse un volumen exacto de KOH ya que el exceso puede ocultar una reacción VP débilmente positiva.

Interpretación.

Positivo: rojo rosado en la superficie del medio (presencia de acetoina)

Negativo: Amarillo. Puede formarse un color cobrizo pero aún así la reacción es negativa.

Reacción de Rojo de Metilo (RM) ⁽¹⁾

Medio de cultivo: medio de Clark y Lubs (caldo RM/VP)

Composición:

- Polipeptona
- Dextrosa
- Fosfato de potasio
- Agua destilada
- Indicador: rojo de metilo
- pH inicial: 6.9, medio no inoculado, color rojo.
- Ácido: rojo (pH= 4.4)
- Alcalino: amarillo (pH= 6)

Fundamento.

Comprobar la capacidad de un organismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa y vencer la

capacidad amortiguadora del sistema. Es una prueba cualitativa de la producción de ácido (determinación de pH). Las bacterias que principalmente siguen la vía de fermentación de ácidos mixtos a menudo producen suficiente ácido para mantener un pH menor de 4.4.

La prueba de rojo de metilo se basa en el empleo de un indicador de pH para determinar la concentración de iones hidrógeno presentes cuando un organismo fermenta glucosa. Las bacterias RM positivas producen ácidos estables manteniendo una alta concentración y entonces cesa toda actividad.

Los organismos RM negativo también producen ácidos pero tienen una menor concentración de iones hidrógeno porque hay una reversión hacia la neutralidad debida a la nueva degradación de los ácidos orgánicos en carbonatos.

La validez de la prueba de RM depende de un tiempo de incubación suficiente como para permitir que se produzca la diferencia en el metabolismo de la glucosa. Los organismos en estudio se incubarán por lo menos 2 días, lo que permite que todos los organismos con baja proporción gaseosa muestren su límite en la concentración de iones hidrógeno.

Reactivos adicionales para rojo de metilo

Rojo de metilo adicionar 5 gotas al tubo previamente incubado

Interpretar el resultado del color inmediatamente.

Conservación: guardar el reactivo en refrigeración (4°C) mientras no se usa.

Interpretación de rojo de metilo.

No debe intentarse interpretar un resultado con el rojo de metilo después de menos de 48 horas de incubación.

Positivo: rojo en la superficie del medio (pH= 4.4)

Algunas bacterias pueden producir menores cantidades de ácido a partir del sustrato por ello es posible que aparezca un color naranja. Esto indica una prueba positiva.

Negativo: amarillo (pH=6) ó naranja.

Prueba de sulfuro indol movilidad (SIM)⁽¹⁾

Medio de cultivo: Medio SIM

Composición:

- Extracto de carne
- Peptona
- Hierro peptonizado (indicador de H₂S)
- Tiosulfato de sodio (indicador de H₂S)
- Agar
- Agua destilada
- pH= 7.3

Fundamento.

Determinar si un organismo es móvil o inmóvil, si es capaz de liberar ácido sulfhídrico por acción enzimática de los aminoácidos que contienen azufre produciendo una reacción visible de color negro y por último la capacidad de desdoblar el indol de la molécula del triptófano, además que la consistencia del medio permite la observación de la movilidad de algunas bacterias.

Prueba de la producción de indol.

El triptófano es un aminoácido que puede ser oxidado por ciertas bacterias para formar tres metabolitos principales: indol, escatol e indolacético. Diversas enzimas intracelulares que intervienen en éste proceso reciben el nombre de triptofanasa, lo que implica el sistema completo de enzimas vinculadas con la

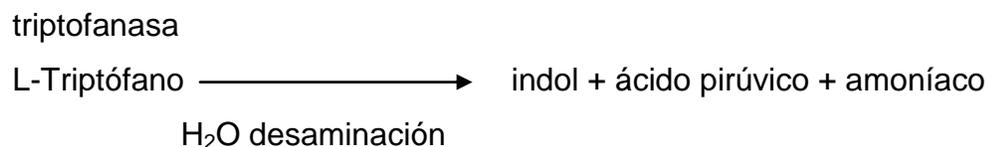
producción del indol. El principal intermediario en la degradación del triptófano es el ácido indolpirúvico.

La degradación del triptófano libera indol, ácido pirúvico, amoníaco y energía. El ácido pirúvico puede ser nuevamente metabolizado por medio del ciclo glucolítico o entrar en el ciclo de Krebs para liberar CO₂ y H₂O y una gran producción de energía. El amoníaco puede ser utilizado para sintetizar nuevos aminoácidos empleando la energía que se encuentra para la reacción anabólica.

La prueba de indol se basó en la formación de un complejo de color rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído de p-dimetilaminobenzaldehído (sustancia activa del reactivo de kovacs).

La formación de indol se produce solamente en aquellos organismos capaces de fermentar los hidratos de carbono. La elevada acidez producida por la fermentación de la glucosa puede impedir el crecimiento del organismo o inhibir la enzima.

El agregado de triptófano estimula la producción de indol mientras que la glucosa lo inhibe.



Movilidad.

Determina si un organismo es móvil o inmóvil. Las bacterias tienen movilidad por medio de flagelos, que se encuentran principalmente entre los bacilos; sin embargo algunas formas de cocos son inmóviles.

Las bacterias móviles pueden contener un solo flagelo o muchos; además su localización varía con su especie bacteriana y las condiciones de cultivo. A veces las bacterias con movilidad producen variantes no móviles que parecen ser estables y raramente se revierten en formas móviles.

Reactivos adicionales.

Prueba de indol

Reactivo de kovacs

Adicionar 5 gotas y agitar suavemente el tubo.

Interpretar inmediatamente

Conservación: los reactivos deberán guardarse en el refrigerador (4⁰C) mientras no se usan, su estabilidad es variable, por lo tanto se hará todas las semanas un control de calidad, desechándolos si muestran una reacción débil o negativa con un organismo positivo conocido.

Interpretación.

Ácido sulfhídrico.

Positivo: ennegrecimiento del medio

Negativo: sin ennegrecimiento

Indol.

Positivo: anillo rojo en la superficie del medio

Negativo: no se produce color

Color naranja en la superficie del medio. Indica desarrollo de escatol, un compuesto metilado que puede ser el precursor de la formación de indol.

La reacción positiva después de 24 horas indica una prueba completa.

Si el cultivo de 24 horas es negativo deberá incubarse otras 24 horas y deberá repetirse la prueba.

Movilidad.

Positiva: los organismos móviles migran de la línea de siembra y se difunden en el medio provocando la turbiedad.

Negativo: crecimiento bacteriano acentuado siguiendo la línea de siembra.

Agar triple azúcar hierro: TSI ⁽¹⁾

Medio de cultivo: agar triple hierro azúcar (agar Hierro de Kligler, AHK).

Composición:

- Extracto de carne
- Extracto de levadura
- Peptona
- Proteasa
- Lactona
- Dextrosa
- Sulfato ferroso
- Cloruro de sodio
- Tiosulfato de sodio
- Agar
- Agua destilada
- Indicador: rojo de fenol
- Ácido: amarillo
- Alcalino: rojo
- Medio no inoculado: naranja rojizo (pH=7.4)

Fundamento.

Determina la capacidad de un organismo de atacar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio de crecimiento básico, con producción o no de gases, junto con la determinación de posible ácido sulfhídrico.

El agar AHK es un medio diferencial que determina tanto la fermentación de los hidratos de carbono y la producción de ácido sulfhídrico. Las bacterias pueden utilizar cualquiera de los sustratos incorporados en el medio y ser

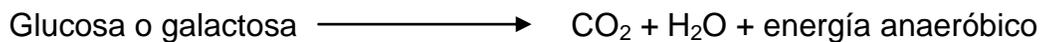
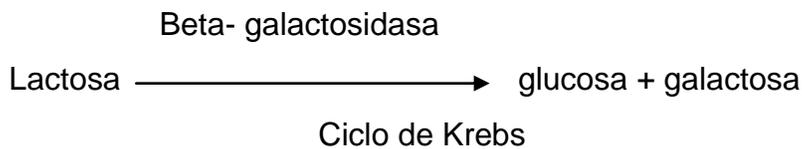
Metabolizados, características que son utilizadas para la diferenciación de éstas, principalmente para las Enterobacterias.

Este medio contiene lactosa con una concentración de 1% y glucosa 0.1%, lo cual permite la observación de la fermentación de uno o de ambos

carbohidratos por parte de las bacterias, además de la producción de gas y de ácido sulfhídrico.

La fermentación es un proceso que se lleva a cabo en condiciones aeróbicas (pico de flauta) y anaeróticamente (capa inferior). En el pico de flauta la glucosa (monosacárido) es catabolizada inicialmente por medio del ciclo de anaeróbico de Embden- Meyerhof, utilizado tanto por los aerobios como por los anaerobios para dar ácido pirúvico, y posteriormente éste será degradado a través del ciclo de Krebs para dar CO_2 , H_2O y energía.

Por otra parte la lactosa (disacárido) será primero degradada a sus monosacáridos correspondientes (glucosa y galactosa)



El medio TSI contiene una cantidad limitante de glucosa y una concentración 10 veces mayor de lactosa. Las enterobacterias y los fermentadores de glucosa comienzan metabolizando este azúcar, ya que las enzimas que utilizan la glucosa están presentes como constituyentes de las bacterias, y éstas pueden obtener mayor energía por utilización del azúcar más simple.

Todos los otros carbohidratos deben ser convertidos en glucosa para entrar en el ciclo de Embden- Meyerhof. La utilización de la glucosa se realiza en forma aerobia sobre la estría, donde el oxígeno presente actúa como aceptor terminal de electrones y en la parte terminal de la columna en condiciones de anaerobiosis. Una vez que una bacteria fermentadora de glucosa ha reducido toda la glucosa disponible a piruvato, comenzará a metabolizar el piruvato a través del ciclo aeróbico de Krebs (sobre la estría) formando productos finales ácidos. El ácido en el medio hace virar el amarillo del indicador de pH, rojo de fenol. Entonces, luego de 6 horas de incubación, la zona de la estría y el fondo del tubo inoculado con un fermentador de glucosa tendrán un color amarillo. Si

el microorganismo no fermenta la glucosa, el fondo permanecerá rojo (indicando que no hay variación del pH) o se alcalinizará (lo que puede visualizarse por un color rojo algo más intenso que del medio original), demostrando que la bacteria no es miembro de la familia Enterobacteriaceae.

Después de haber agotado la cantidad limitada de glucosa, una bacteria con capacidad para utilizar la lactosa o sacarosa comenzará a degradarlas. Como el medio contiene 10 veces más lactosa que glucosa, las bacterias encontrarán sustrato suficiente para continuar la formación de productos finales ácidos. Luego 18-24 horas de incubación todo el medio TSI permanecerá de color amarillo. Esta reacción se denomina ácido sobre ácido (A/A) y el organismo se identifica como un fermentador de lactosa. La producción de gas provocará la ruptura de la columna de agar o la empujará hacia la parte superior, de modo que un fermentador de lactosa que produce gas dará una reacción A/A más gas.

Si el organismo en estudio no es capaz de usar lactosa del medio, debe producir energía en forma menos eficiente al utilizar las proteínas y aminoácidos del medio como fuentes nutritivas.

El metabolismo proteico se produce en la superficie de la zona inclinada donde el oxígeno es abundante. Los productos de la degradación de la peptona (como el amoníaco) son alcalinos y provocan el viraje del indicador rojo de fenol a su color rojo original. Un TSI inoculado con una bacteria que no fermenta la lactosa al cabo de 18-24 horas de incubación presentará la zona inclinada roja y el fondo del agar permanecerá amarillo debido al metabolismo anaerobio de la glucosa durante la primera etapa. Esta reacción se denomina alcalina sobre ácido (K/A).

Las bacterias que fermentan la glucosa también pueden formar productos alcalinos a partir de la utilización de la peptona, sobre la zona inclinada. Estas reacciones serán K/K.

Interpretación.

- Rojo en pico de flauta: alcalino; degradación aeróbica de glucosa.
Amarillo en capa profunda: ácido; degradación anaeróbica de la glucosa.
- Amarillo en pico: ácido
Amarillo en capa profunda: ácido.
- Rojo en pico de flauta: alcalino; sin cambio de color en capa profunda: alcalina.
- Producción de H₂S: precipitado negro.
- Producción de gases: producción de burbujas, descomposición del medio, ligera muesca del medio sobre el costado del tubo o desplazamiento del medio del fondo, dejando un espacio libre.

Observaciones.

Una bacteria productora de H₂S puede dar tal cantidad de precipitado negro de sulfuro ferroso que oculte completamente la acidez producida en la capa profunda. Sin embargo, si se forma H₂S es que existe en la capa profunda una condición ácida, aun cuando no se observe, y debe ser registrada como tal.

Es esencial que se interprete la fermentación al término de 18-24 horas de incubación, ya que una interpretación prematura o demorada dará formas de fermentación no válidas que llevarán a errores en el agrupamiento del género o especie.

Reporte de resultados.

K/A fermentación de glucosa solamente

A/A fermentación de glucosa y lactosa

K/K no fermentación de glucosa y lactosa.

Los resultados se escriben siempre siguiendo un patrón. Primero la reacción del pico de flauta seguida por la reacción de la capa profunda, separadas por una barra.

Reacciones de TSI.

Pico de flauta alcalino/profundidad alcalina (K/K).

No fermentación de hidratos de carbono. Característico de bacterias no fermentadoras.

Pico de flauta alcalino/profundidad ácida (K/A)

Glucosa fermentada, lactosa no fermentada. Característico de bacterias no fermentadoras de lactosa.

Pico de flauta alcalino/profundidad ácida (negra) (K/A/H₂S).

Glucosa fermentada, lactosa no fermentada; producción de H₂S Característico de bacterias no fermentadoras de lactosa y productoras de H₂S.

Pico de flauta ácido/profundidad ácida (A/A).

Glucosa y lactosa fermentadas. Característico de coliformes que fermentan lactosa.

Agar Mueller Hinton

El agar Mueller Hinton deshidratado se prepara de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Después de su esterilización en autoclave se deja enfriar en baño de agua maría a 50°C, se vacía en placas Petri sobre una superficie plana asegurando que la profundidad de 4mm aproximadamente se puede dejar enfriar a temperatura ambiente, si no se utiliza el mismo día se debe guardar en refrigeración a 2-8 °C por no más de 7 días.

Se deja un control de esterilidad de placas incubando un período de 24 horas. El pH debe ser controlado, para este medio de cultivo el pH debe ser entre 7.2-7.4 después de solidificado, por debajo de este valor el antibiótico perderá potencia mientras que otros pueden aumentar su actividad.

También se deberá controlar la humedad, no debe haber agua en la tapa de la placa ni en el agar, si está es grande se debe poner las placas en una estufa a 35°C por 10-30 min.⁽⁶⁾