



**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**

EVALUACIÓN DE CHROMagar SALMONELLA PLUS PARA SU  
IMPLEMENTACIÓN COMO MEDIO DE RUTINA EN LA DETECCIÓN DE  
Salmonella spp. A PARTIR DE MUESTRAS DE HECES

**Línea de investigación:**

**Microbiología, parasitología e inmunología**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

**Autor:**

Ramos Torricelli, Diego Gianmarco

**Asesora:**

Yupanqui Siccha, Gisela Francisca  
(ORCID: 0000-0003-3950-3943)

**Jurado:**

Rodrigo Rojas, María Elena  
Velarde Vílchez, Mónica Margarita  
Mayanga Herrera, Ana Lucía

**Lima - Perú**

**2022**

**Referencia:**

Ramos, D. (2022). *Evaluación de CHROMagar salmonella plus para su implementación como medio de rutina en la detección de Salmonella spp. a partir de muestras de heces*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Federico Villarreal]. Repositorio Institucional UNFV. <http://repositorio.unfv.edu.pe/handle/UNFV/5893>



**Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada (CC BY-NC-ND)**

El autor sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede generar obras derivadas ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

EVALUACIÓN DE CHROMagar SALMONELLA PLUS PARA SU IMPLEMENTACIÓN  
COMO MEDIO DE RUTINA EN LA DETECCIÓN DE *Salmonella* spp. A PARTIR DE  
MUESTRAS DE HECES

Línea de investigación:

Microbiología, parasitología e inmunología

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

**Autor (a):**

Ramos Torricelli, Diego Gianmarco

**Asesor (a):**

Yupanqui Siccha, Gisella Francisca

(ORCID: 0000-0003-3950-3943)

**Jurado:**

Rodrigo Rojas, María E.

Velarde Vílchez, Mónica M.

Mayanga Herrera, Ana L.

**Lima - Perú**

**2022**

## ÍNDICE

Índice de tablas.....	iv
Índice de figuras.....	vi
Resumen.....	vii
Abstract.....	viii
<b>I. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Descripción y formulación del problema.....	2
1.2 Antecedentes.....	7
1.3 Objetivos.....	12
1.3.1 Objetivo general .....	12
1.3.2 Objetivos específicos.....	12
1.4 Justificación .....	12
1.5 Hipótesis .....	13
<b>II. Marco Teórico.....</b>	<b>15</b>
2.1 Bases teóricas de la investigación.....	15
2.1.1 Salmonella: Ubicación Taxonómica y Nomenclatura.....	15
2.1.1.1 Ubicación Taxonómica.....	15
2.1.1.2 Nomenclatura.....	18
2.1.2 Características morfológicas y bioquímicas.....	22
2.1.3 Detección y/o Diagnóstico de Salmonella spp.....	27
2.1.3.1. Aislamiento e Identificación (Cultivos Bacteriológicos) .....	28
2.1.3.2 Pruebas Bioquímicas Diferenciales para Caracterización de <i>Salmonella</i> spp.....	36
2.1.3.3 Serotipificación para caracterización de <i>Salmonella</i> spp.....	40
2.1.4 Validez del diagnóstico y detección de Salmonella spp.: sensibilidad y especificidad.....	43

III. Método.....	48
3.1 Tipo de investigación.....	48
3.2 Ámbito temporal y ambiental.....	48
3.3 Variables.....	48
3.4 Población y muestras .....	49
3.5 Instrumentos.....	50
3.6 Procedimiento.....	51
3.6.1 Recolección y manejo de muestras.....	51
3.6.2 Aislamiento primario.....	52
3.6.3 Prueba serológica.....	55
3.6.4. Aglutinación en lámina.....	55
3.7 Análisis de datos.....	56
IV. Resultados.....	57
4.1. Sensibilidad y especificidad del medio de cultivo CHROMagar Salmonella Plus.....	57
4.2. Sensibilidad y especificidad de los medios de cultivo XLD y HEA.....	59
4.3. Comparación de la sensibilidad y especificidad del medio CHROMagar Salmonella plus con los medios de cultivo XLD y HEA.....	63
V. Discusión de resultados.....	68
VI. Conclusiones.....	73
VII. Recomendaciones.....	74
VIII. Referencias.....	75
IX. Anexos.....	85

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Salmonella: especies, subespecies, serotipos y su hábitat usual. Sistema de Kauffman– White.....	17
<b>Tabla 2:</b> Ejemplos de nomenclatura de Salmonella que se observan actualmente en la literatura.....	21
<b>Tabla 3:</b> Características bioquímicas de especies y subespecies de Salmonella.....	24
<b>Tabla 4:</b> Condiciones de crecimiento de Salmonella.....	27
<b>Tabla 5:</b> Características bioquímicas de la familia Enterobacteriaceae.....	33
<b>Tabla 6:</b> Fórmula por litro de agua purificada de CAS.....	35
<b>Tabla 7:</b> Cepas de prueba para control de calidad para empleo y manejo de CAS...	36
<b>Tabla 8:</b> Pruebas bioquímicas claves para la identificación de microorganismos pertenecientes al género Salmonella.....	39
<b>Tabla 9:</b> Sensibilidad del medio de cultivo CHROMagar Salmonella Plus pre-enriquecimiento.....	57
<b>Tabla 10:</b> Sensibilidad del medio de cultivo CHROMagar Salmonella Plus post-enriquecimiento.....	58
<b>Tabla 11:</b> Especificidad del medio de cultivo CHROMagar Salmonella plus antes del enriquecimiento.....	58
<b>Tabla 12:</b> Especificidad del medio de cultivo CHROMagar Salmonella plus posterior al enriquecimiento.....	59
<b>Tabla 13:</b> Sensibilidad del medio de cultivo XLD antes de enriquecimiento.....	59
<b>Tabla 14:</b> Sensibilidad del medio de cultivo XLD después de enriquecimiento.....	60
<b>Tabla 15:</b> Especificidad del medio de cultivo XLD antes de enriquecimiento.....	60
<b>Tabla 16:</b> Especificidad del medio de cultivo XLD después de enriquecimiento.....	61
<b>Tabla 17:</b> Sensibilidad del medio de cultivo HE antes de enriquecimiento.....	61
<b>Tabla 18:</b> Sensibilidad del medio de cultivo HE después de enriquecimiento.....	62
<b>Tabla 19:</b> Especificidad del medio de cultivo HEA antes de enriquecimiento.....	62

<b>Tabla 20:</b> Especificidad del medio de cultivo HEA después de enriquecimiento.....	63
<b>Tabla 21:</b> Tasa de falsos positivos y falsos negativos de los tres medios antes y después de enriquecimiento.....	64
<b>Tabla 22:</b> Comparación de sensibilidad y especificidad de CHROMagar con los medios de cultivo XLD y HEA (pre-enriquecimiento) .....	65
<b>Tabla 23:</b> Comparación de sensibilidad y especificidad de CHROMagar con los medios de cultivo XLD y HEA (post-enriquecimiento).....	65
<b>Tabla 24:</b> Resultado de la prueba Chi Cuadrado McNemar CHROMagar/XLD.....	67
<b>Tabla 25:</b> Resultado de la prueba Chi Cuadrado McNemar CHROMagar/HEA.....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Imagen de Salmonella.....	23
<b>Figura 2:</b> Colonias típicas de Salmonella en agar XLD (A) y agar He (B).....	24
<b>Figura 3:</b> Flujograma de trabajo del area de microbiologia.....	86
<b>Figura 4:</b> Colonias de salmonella en CHROMagar Salmonella plus.....	87
<b>Figura 5:</b> Colonias de salmonella en XLD.....	87
<b>Figura 6:</b> Colonias de salmonella en agar entérico Hektoen.....	87
<b>Figura 7:</b> Lectura de pruebas bioquímicas para <i>Salmonella</i> spp.....	88
<b>Figura 8:</b> Confirmación de Salmonella por prueba de aglutinación con antisueros O y H.....	89

## RESUMEN

Hace unas décadas se han realizado avances en los medios de cultivo cromogénicos considerados idóneos para conseguir una mejor discriminación entre distintos géneros de microorganismos provenientes de cultivos mixtos, logrando como resultado un alto grado de eficacia en la detección de *Salmonella*. Igualmente, se ha determinado que el uso de estos medios presenta mayor especificidad y sensibilidad en comparación con los medios convencionales utilizados en detección de *Salmonella*, permitiendo disminuir así la identificación de crecimientos falsos positivos (*Proteus* spp.). En esta investigación se evaluó el CHROMagar *Salmonella* plus para su implementación como medio de rutina para la detección de *Salmonella* spp. proveniente de muestras de heces, comparándolo con los medios XLD y HEA, utilizando para ello 367 muestras de heces. Los resultados del estudio reflejaron que luego del enriquecimiento el medio de cultivo CHROMagar *Salmonella* Plus presentó una sensibilidad de 95,6% y una especificidad de 98,8%, evidenciándose un incremento en la capacidad para el aislamiento de *Salmonella* spp. y como para la detección de individuos sanos respectivamente. La comparación de proporciones de presuntivos confirmados a través del medio CHROMagar *Salmonella* y XLD y HEA utilizando la prueba de McNemar con Excel 16, arrojó un chi cuadrado de McNemar igual a 16,00 en la comparación con el medio XLD y 4,00 al compararlo con el medio HEA. En función de estos resultados, se concluye que existen diferencias significativas favorables al medio CHROMagar *Salmonella* con relación a los medios XLD y HEA en la detección de *Salmonella* spp. proveniente de muestras de heces.

**Palabras clave:** Medios de cultivo, detección, *Salmonella*, CHROMagar.

## ABSTRACT

A few decades ago, advances have been made in chromogenic culture media considered suitable to achieve better discrimination between different genera of microorganisms from mixed cultures, resulting in a high degree of efficiency in the detection of Salmonella. Likewise, it has been determined that the use of these media has greater specificity and sensitivity compared to the conventional media used to detect Salmonella, thus reducing the identification of false positive growths (*Proteus* spp.). In this investigation, CHROMagar Salmonella plus was evaluated for its implementation as a routine means for the detection of Salmonella spp. from stool samples, comparing it with XLD and HEA media, using 367 stool samples. The results of the study reflected that after enrichment of the culture medium CHROMagar Salmonella Plus, a sensitivity of 95.6% and a specificity of 98.8% were revealed, showing an increase in the capacity for the isolation of Salmonella spp. and as for the detection of healthy individuals respectively. Comparison of the proportions of presumptive confirmed through the CHROMagar Salmonella medium and XLD and HEA using the McNemar test with Excel 16, yielded a McNemar chi square equal to 16.00 in the comparison with the XLD medium and 4.00 when compared with HEA medium. Based on these results, it is concluded that there are significant differences favorable to the CHROMagar Salmonella medium in relation to the XLD and HEA media in the detection of Salmonella spp. from stool samples.

**Keywords:** Chrom media, detection, Salmonella, CHROMagar.

## I. INTRODUCCIÓN

La realidad sanitaria del mundo de hoy evidencia una tendencia creciente y preocupante de las diferentes modalidades y tipos de enfermedades, tanto las ya conocidas como las que han irrumpido en forma reciente y rompiendo los límites entre los países, lo que lleva a enfocar los problemas de salud desde una perspectiva dirigida a abordarlos como una realidad propia del ámbito internacional. En ese marco, es necesario y pertinente que en los diferentes países del orbe se puedan manejar y aplicar las innovaciones en materia de detección de enfermedades, a fin de favorecer el desarrollo de planes de atención ajustados a la realidad y dar respuestas apropiadas a las situaciones de salud que puedan hacerse presente.

La realidad sanitaria del Perú no es ajena a lo antes planteado y en ese sentido, en los últimos 10 años desde el Ministerio de Salud (MINSA) se han desarrollado planes dirigidos a reforzar la vigilancia epidemiológica para detectar a tiempo las infecciones que puedan poner en peligro la salud y la vida de los diferentes sectores de la población, sobre todo los más vulnerables como niños, mujeres y ancianos. En ese marco, se debe resaltar entre las acciones llevadas a cabo por el MINSA la relacionada con la detección de la salmonelosis generadora principal de trastornos en el aparato gastrointestinal. Ello, debido su incremento en diferentes zonas del país, haciendo necesario mejorar continuamente los medios que faciliten su mejor detección.

Por lo antes expuesto, el trabajo que se desarrolla a continuación tiene como objetivo principal evaluar el CHROMagar Salmonella plus para su implementación como medio de rutina para la detección de *Salmonella* spp. a partir de muestras de heces en el período de enero-mayo 2021.

A fin de tener una mejor comprensión, esta investigación se ha dividido en varios capítulos que se describen a continuación:

Introducción, que abarca los aspectos referidos a la descripción y formulación del problema, antecedentes, objetivos, justificación e hipótesis; Marco teórico, donde se desarrollan los fundamentos teóricos del estudio; Metodología, parte de la investigación que comprende el tipo de investigación, ámbito temporal y ambiental, población y muestra, variables, recolección de datos, procedimiento y procesamiento y análisis de los datos; Resultados, donde se expresa con tablas lo obtenido en la recolección de los datos; Discusión de los resultados, capítulo donde se analizan y examinan los datos; Conclusiones; Recomendaciones; Referencia y los anexos.

### **1.1 Descripción y formulación del problema**

La salmonelosis es una infección bacteriana causada por el género *Salmonella*. Es una de las causas con mayor frecuencia que producen problemas gastrointestinales en los seres humanos. (Sánchez, 2013). Esta infección, presenta una distribución cosmopolita y ataca a todos los grupos etarios, tanto en países desarrollados como en subdesarrollados, (Brito et al., 2010), produce la mayor cantidad de toxiinfecciones alimentarias y conforma la segunda causa principal de enfermedad en países subdesarrollados (Robledo, 2015).

Para la Organización Mundial de la Salud (OMS), es considerado una de las principales problemáticas en salud pública (Kennedy et al., 2011). Dado que se calcula que el número de infecciones humanas causadas por *Salmonella* spp. supera los 93 800 000 de casos al año, con 155.000 muertes anuales alrededor del mundo (Campioni et al., 2012), estando relacionado con enfermedades diarreicas, siendo esta, una causa importante de morbilidad y mortalidad, especialmente en los recién nacidos, niños y ancianos. (Vásquez y Soto, 2014). De acuerdo a

los datos epidemiológicos, la infección gastrointestinal generada por *Salmonella* spp. es considerada como la segunda causa de muerte en niños con edad menor a cinco años. (OMS, 2017, 2018).

En Europa *Salmonella* es considerada la segunda causante de gastroenteritis bacteriana después de *Campylobacter* y es responsable de más de seis millones de infecciones humanas en los 27 estados miembros de la UE anualmente (Havelaar et al., 2013). Por otra parte, se informa de que la salmonelosis tiene una incidencia anual de 200 a 500 casos por cada 100.000 habitantes de América Latina, Asia y África. (Cardona et al., 2007). También se han reportado casos aislados de *Salmonella* Typhi en países como: Canadá y Estados Unidos de América, con resistencia extendida a antibióticos utilizados en el tratamiento, generando esto un riesgo para la salud pública (OPS, 2018).

A partir del año 2010, por intermedio de la vigilancia bacteriológica de la Red Nacional de Laboratorios en el Perú, se llegó a identificar un incremento inesperado de casos de *Salmonella enterica* en aislamientos de origen humano, mayormente pediátricos, en una gran variedad de hospitales de Lima y aislamiento de alimentos; y en el año 2011, por una ingesta de alimentos contaminados, se reportó dos brotes de salmonelosis: el primero en Trujillo, relacionado a la ingesta de mayonesa con una cantidad de 38 pacientes infectados y otro en la ciudad de Bagua (Zamudio et al., 2011). En 2016 se informaron de un total de 56 brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) en el mes setiembre (14,3%) y abril (12,5%) principalmente, identificándose a *Salmonella* en 4 brotes (Bada y Raymundo, 2018).

En el año 2018, se fortaleció la vigilancia de *Salmonella* en el Perú por un nuevo brote de *Salmonella* Typhi resistente a fluroquinolonas y cefalosporinas de 3ª generación en África y Sureste Asiático, recomendando la Organización Panamericana de la Salud y la Organización

Mundial de la Salud (OPS/OMS) implementar acciones para una rápida identificación de esta bacteria e igualmente determinar su perfil de resistencia antimicrobiana. (MINSA, 2018).

En el Perú es considerado una enfermedad endémica que está asociado originalmente con defectos en el área de saneamiento ambiental, ubicándose dentro de las seis causas más frecuentes y notables de morbilidad infecciosa. Según los casos informados al Ministerio de salud, la tasa de incidencia es anual con 40-60 casos por cada 100.000 habitantes. En aquellos distritos con bajo grado socioeconómico se presenta la cifra más elevada en adultos jóvenes: 300-500 casos por cada 100.000 habitantes; el 35% en niños con edad inferior a 14 años y la mayor parte dentro del rango entre de 58-79 años de edad (Bada y Raymundo, 2018).

El género *Salmonella* perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, incluye miembros que están conformados por bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, no esporulados, comúnmente móviles por flagelos peritricos, usan como única fuente de carbono el citrato y disponen de un metabolismo de tipo oxidativo y fermentativo (Pedraza et al., 2014). *Salmonella* se encuentra agrupado en las especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori* y una presunta tercera especie: *Salmonella subterranea*, cepa ambiental poco usual aislada en marzo del 2005 y cuyo descubrimiento fue aceptado por el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (OIE, 2015). El género *Salmonella* también se encuentra diferenciado según su serología en una cantidad mayor de 2579 serovares, a través del esquema de Kauffman-White según la composición de los antígenos somáticos (O) y antígenos flagelares (H), que en combinación permiten reconocer los diferentes serotipos. (Tillier & Collins, 2000; McQuinston et al., 2008).

*S. enterica* subespecie *enterica* encierra el 99% de los serotipos aislados a partir de muestras clínicas (Grimont & Weill, 2007). *S. bongori* es una especie valorada como no

patógena respecto al ser humano, siendo aislada principalmente de animales poiquiloterms, especialmente en reptiles; no obstante, se han hecho reportes de casos de la enfermedad en el hombre. La especie *S. enterica* puede subdividirse en 6 subespecies distintas: subespecie *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI). Sin embargo, *S. enterica* subespecie *enterica*, es aislada principalmente de aves y mamíferos, llegando a afectar gran parte de la cadena alimenticia dando cabida a infectar al hombre accidentalmente. Se llegó a evaluar que el 99% de casos de salmonelosis en el hombre son debido a cepas de la subespecie *enterica* (I) (Betancor y Yim. 2012), así también por una cantidad aproximada de 2.600 serotipos que han sido expuestos en la actualidad (CDC, 2013).

Los diferentes serotipos de Salmonella, se encuentran relacionados con brotes a nivel mundial asociados con la resistencia bacteriana (*Salmonella* Typhi resistente a la fluroquinolonas y cefalosporinas de 3era generación) (OPS, 2018), a la presencia de serotipos en alimentos (*Salmonella* Uganda) (CDC, 2019), lo que resalta la necesidad de aplicación de medidas tempranas para su aislamiento (Rahman et al., 2014), que lleven a acciones adecuadas para su rápida identificación como género, para su posterior serotipificación y así realizar una buena capacidad de diagnóstico por parte del laboratorio, permitiendo la detección temprana de casos, de tal forma que se pueda proporcionar una vigilancia y tratamiento adecuados que permita la delimitación de la fuente infectiva (OPS, 2018).

De acuerdo con la mayoría de estudios realizados, el cultivo bacteriano y las pruebas bioquímicas se consideran procedimientos rutinarios en el aislamiento de la bacteria proveniente de materia fecal (Ruiz et al., 2018). El método estándar utilizado en clínica es el coprocultivo, debido a que es muy útil en estudios epidemiológicos, sin embargo, presenta varias desventajas para el diagnóstico clínico, debido a su gran carga de trabajo, su prolongado tiempo de proceso y su baja sensibilidad (Urrutia et al., 2006). Así mismo, basándose en el

porcentaje de restauración de los medios de cultivos convencionales, como el agar de xilosa, lisina, desoxicolato (XLD) y el agar entérico Hektoen (HEA) presentan una sensibilidad disminuida por la escasa cantidad de microorganismos observados en las muestras de heces y a la competencia con distintos microorganismos propios de la microbiota intestinal (González et al., 2014).

Existen también metodologías con fundamentos en Biología Molecular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), capaz de hallar una cantidad pequeña de bacterias  $10^2$  a  $10^4$  UFC/ml (Ward et al., 2005) confiriéndole mayor sensibilidad y especificidad, además, un menor tiempo de proceso; pero dicha metodología presenta un nivel elevado de costos, impidiendo llevarla a la práctica de identificación de rutinaria.

En las últimas décadas se han desarrollado medios de cultivo cromogénicos y fluorogénicos. Estos tipos de medios de cultivo detectan la actividad enzimática bacteriana incorporando sustratos adheridos a marcadores especiales, siendo específicos para género o especie. Además, otorgan un alto grado de eficacia para la detección de *Salmonella*, en cuanto a los medios convencionales, debido a que conceden mayor diferenciación entre los distintos géneros de microorganismos presentes en cultivos mixtos (Perry, 2017).

Igualmente, se ha determinado que el uso de medios cromogénicos presenta mayor especificidad y sensibilidad en comparación con los medios convencionales utilizados en detección de *Salmonella*, permitiendo disminuir la identificación de crecimientos falsos positivos (*Proteus* spp.) (Gaillot et al., 1999) y detectar serotipos de *Salmonella* que no producen o producen baja concentración de sulfuro de hidrógeno (*Salmonella* Typhi) evitando así el error de identificación como se daría en los medios de cultivo convencionales (agar *Salmonella* – Shiguella) (Kuijpers et al., 2018).

Dentro de las propuestas de medios cromogénicos, se tiene el CHROMagar salmonella plus (CAS), el cual es un medio selectivo registrado y empleado para detectar a *Salmonella* spp., mediante el crecimiento de colonias de color malva, convexas y con bordes regulares a las 18 a 24 horas de incubación, a diferencia de otros miembros de la familia Enterobacteriaceae que presentan colonias azules o incoloras (CHROMagar, 2017).

La aplicación de esta nueva metodología en el laboratorio de microbiología podría contribuir a una mejora de los procesos convencionales ya establecidos, obteniendo así resultados en menor tiempo. Debido a ello, en el actual proyecto de investigación se evaluará el rendimiento del CHROMagar Salmonella plus en comparación con los medios selectivos tradicionales XLD y HEA usando marcadores como sensibilidad y especificidad, para su implementación como medio de cultivo para la detección de *Salmonella* spp. partiendo de muestras de heces.

## **1.2 Antecedentes**

Cassar & Cuschieri (2003) realizaron un estudio comparativo entre el medio cromogénico de Salmonella (SCM:Oxoid) con agar DCLS (Agar sacarosa, desoxicolato, citrato, lactosa) para el aislamiento de *Salmonella* spp. partiendo de muestras de heces. Se evaluaron una suma de 500 muestras de heces, las cuales se sembraron antes y después del enriquecimiento selectivo en caldo selenito en agar DCLS y SCM. Se aislaron un total de 44 cepas de Salmonella en al menos uno de los dos medios evaluados. La sensibilidad para el aislamiento primario para el agar DCLS y SCM fue de 22.7% y 34.1% respectivamente, mientras que la sensibilidad post enriquecimiento selectivo en caldo selenito para el agar DCLS y SCM fue de 81.8% y 100% respectivamente, aumentando de forma significativa. Por otro lado, la evaluación de la especificidad para el agar DCLS y SCM en el aislamiento primario fue de 82.5% y 98.5%, mientras que la especificidad post enriquecimiento selectivo en caldo

selenito para el agar DCLS y SCM fue de 72.8 % y 95.8% respectivamente. Se obtuvieron resultados falsos positivos de la siembra primaria en el agar DCLS y SCM con un total de 80 y 7 aislamientos respectivamente y de la siembra post enriquecimiento en el agar DCLS y SCM un total de 124 y 19 aislamientos respectivamente, encontrándose un aumento significativo de los falsos negativos después del enriquecimiento selectivo. El número de aislamientos falsos positivos tanto antes como después del enriquecimiento selectivo obtenidos en el medio SCM correspondieron a *Enterobacter intermedius* (1 aislado), *Enterobacter amnigenus* (3 aislados), *Pseudomonas aeruginosa* (16 aislados), *Enterobacter cloacae* (1 aislado), *Pseudomonas putida* (1 aislado), *Acinetobacter baumannii* (1 aislado), *Aeromonas sobria* (1 aislado) *Escherichia coli* (1 aislado) y *especies de Pantoea* (1 aislado). El uso de urea en los presuntos aislamientos positivos en el agar DCLS eliminó 136 de 204 colonias falsas positivas detectadas en este medio, tanto antes como después del enriquecimiento. Se requirió un total de 114 tiras ATB ID 32E para identificar más las colonias con ureasa negativa. Los resultados mostraron que el 69.4% de las presuntas colonias de Salmonella en SCM se encontraron positivas en comparación con solo el 18.4% que se encontró positivo en agar DCLS.

Eigner et al. (2001) trabajaron en el Departamento de Microbiología, Im Breitspiel, Heidelberg, Alemania, donde se evaluó un nuevo medio cromogénico BBL CHROMagar Salmonella modificado de su fórmula original con la adición novobiacina, cefsulodina y anfotericina B, aumentando así la selectividad en el aislamiento e identificación de especies de este microorganismo partiendo de muestras de heces. Para la identificación de *Salmonella* spp. se usaron pruebas bioquímicas convencionales y antisueros polivalentes. El medio BBL CHROMagar Salmonella fue evaluado con 107 muestras de heces positivas obtenidas por aislamiento e identificación rutinaria y 332 muestras de heces con resultados desconocidos, las cuales también se sembraron en agar entérico Hektoen y Mac Conkey. De las muestras de heces positivas, se obtuvieron 92 aislamientos para Salmonella en BBL CHROMagar Salmonella y

89 en agar entérico Hektoen, con una sensibilidad de 86% y 83%, respectivamente. Por otra parte, de las 332 muestras de heces desconocidas se obtuvieron 27 aislamientos presuntivos para *Salmonella*, donde 23 aislamientos fueron identificados para BBL CHROMagar *Salmonella* y 16 para el agar entérico Hektoen con una sensibilidad de 85% y 56 % respectivamente, revelando una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). El número de aislamientos falsos positivos obtenidos de las 332 muestras de heces con resultados desconocidos fue menor en BBL CHROMagar *Salmonella* que en agar entérico Hektoen presentando una especificidad de 99.7% y 97% respectivamente. La identificación de los aislamientos falsos positivos para el agar entérico Hektoen fueron: *Proteus mirabilis* (1 aislado), *Proteus vulgaris* (7 aislados) y *Citrobacter freundii* (1 aislado), mientras que para BBL CHROMagar *Salmonella* fueron: *Aeromonas hydrophila* (2 aislados), *Pseudomonas putida* (1 aislado), *Stenotrophomonas maltophilia* (1 aislado). Los aislados falsos positivos de ambos medios se detectaron por antisueros polivalentes y se identificaron con pruebas bioquímicas.

Gaillot et al. (1999) realizó un estudio comparativo de muestras fecales para el aislamiento de *Salmonella* entre los medios CHROMagar *Salmonella* (CAS) al cual se le adicionó cefsulodina para una mejor selectividad y el agar entérico de Hektoen (HEA). Se evaluaron 508 muestras de heces de pacientes hospitalizados, las cuales se sembraron en CHROMagar *Salmonella* y agar entérico Hektoen. Se utilizó caldo Tetracionato Muller – Kauffmann como medio de enriquecimiento. De las 508 muestras evaluadas se pudieron identificar un total de 20 *Salmonella* spp. en al menos un medio, las cuales fueron identificadas con pruebas serológicas y bioquímicas. En referencia a la siembra primaria, se pudieron obtener 19 y 16 aislamientos de *Salmonella* para los medios CAS y HEA respectivamente, presentado una sensibilidad de 95% y 80 % para cada medio. Por otra parte, después del enriquecimiento selectivo aumento el número de aislamientos tanto para CAS y HEA respectivamente, presentado una sensibilidad de 100% para cada medio. Los 20 aislamientos

fueron lactosa negativa y H<sub>2</sub>S positivo y presentaron colonias de color malva características en el medio CAS. La evaluación de la especificidad para la siembra primaria en medio CAS y HEA fue de 88.9% y 78,5 % respectivamente, con un total de 54 y 105 aislamientos falsos positivos para cada medio y después del enriquecimiento en caldo selectivo esta especificidad aumentó de forma significativa a 96,7 % y 88,7 % para CAS y HEA respectivamente. La identificación de los aislamientos falsos positivos en la siembra primaria para el medio CAS fue: *Candida albicans* (30 aislados), *P. aeruginosa* (23 aislados), *A. hydrophila* (1 aislado) en el medio HEA fueron: *Proteus mirabilis* (88 aislados), *C. freuddii* (14 aislados), *E. coli* (2 aislados) y *Shewanella putrefaciens* (1 aislado) en HEA. Por otro lado, para la siembra post enriquecimiento selectivo los falsos positivos fueron: *Candida albicans* (2 aislados), *P. aeruginosa* (16 aislados) en CAS y *Proteus mirabilis* (45 aislados), *C. freuddii* (10 aislados), en HEA.

Maddocks et al. (2002) realizaron un análisis de comparación de CHROMagar Salmonella con Agar xilosa-lisina-desoxicolato y Agar Salmonella-Shigella para el aislamiento de Salmonella en muestras fecales. Evaluándose 500 muestras de heces en pacientes hospitalizados y no hospitalizados con diarrea. Las muestras se cultivaron directamente en CAS, XLD y SS a 37°C durante 24 horas. Tras el enriquecimiento selectivo en el medio caldo selenito se cultivó sobre el SS y XLD, no se realizó cultivo post enriquecimiento cuando se usó el medio CAS. La especificidad para la detección de salmonella después de la siembra primaria en medio CAS fue de 83%, siendo mayor que el obtenido usando SS y XLD que fue de 55%. Veintinueve organismos distintos de Salmonella produjeron colonias de color malva en medio CAS, incluyendo 17 *Cándida* spp. (59%) y 8 *Pseudomonas* spp. (28%), estos fueron excluidos fácilmente como salmonella por morfología de la colonia, el examen microscópico de una preparación húmeda o por test de oxidasa.

Pérez et al. (2003) realizaron una investigación comparativa de 4 medios cromogénicos (agar COMPASS, agar, CHROMagar Salmonella y SM ID) y agar entérico Hektoen donde se hizo la identificación de Salmonella a partir de muestras fecales de pacientes hospitalizados, las cuales se sembraron de forma directa y post enriquecimiento selectivo en caldo selenito en los 5 medios a evaluar. Se evaluaron 916 muestras de heces, de donde se aislaron 64 cepas de Salmonella en al menos un medio de cultivo. Se evaluó la sensibilidad de la siembra primaria y post enriquecimiento selectivo en caldo selenito, donde el CHROMagar Salmonella presentó una sensibilidad de 45,8% y 89,1% respectivamente y el agar entérico Hektoen fue de 62.5% y 98.4 % respectivamente, lo que reveló que en ambos casos la sensibilidad mejoró posterior al enriquecimiento. Por otro lado, la especificidad del CHROMagar salmonella en la siembra primaria y posterior al enriquecimiento selectivo fue de 96,5% y 84,7% respectivamente y para el Agar Hektoen fue de 85,1 % y 74,8% respectivamente, disminuyendo con el enriquecimiento. Se reportó un total de 130 falsos positivos para el CHROMagar salmonella y 215 para el agar entérico Hektoen para la siembra post enriquecimiento. De los falsos positivos aislados en los medios CHROMagar Salmonella y agar entérico Hektoen, se identificaron: 43% de *Pseudomonas* spp, 39,2% levaduras, 0.76% *Citrobacter* spp., 2,3 % de Klebsiella, Serratia y Enterobacter, 1.5% de *E. coli*, 1 % de Proteus, para el CHROMagar salmonella y para el agar entérico Hektoen se identificaron: 29.3% de *Pseudomonas* spp, 0,46 % levaduras, 20,9 % de *Citrobacter* spp., 7,9% de Klebsiella, Serratia y Enterobacter, 3,7% de *E. coli*, 35,8 % de *Proteus* spp. para el agar entérico Hektoen. Para la exclusión de los géneros con más aislados falsos positivos, se utilizó el test de la oxidasa para *Pseudomonas* spp. y el examen directo para *Candida* spp.

## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1 Objetivo General**

Evaluar el CHROMagar Salmonella plus para su implementación como medio de rutina para la detección de *Salmonella* spp. a partir de muestras de heces en el período de enero-mayo 2021.

### **1.3.2 Objetivos Específicos**

- Determinar la sensibilidad y especificidad del medio de cultivo CHROMagar Salmonella plus.
- Determinar la sensibilidad y especificidad de los medios de cultivo XLD y HEA.
- Comparar la sensibilidad y especificidad del medio CHROMagar Salmonella plus con la sensibilidad y especificidad de los medios de cultivo XLD y HEA.

## **1.4 Justificación**

La infección por *Salmonella* constituye una gran problemática respecto a la sanidad pública en todo el mundo (Crump & Mintz, 2010). En cuanto a países con bajo nivel socioeconómico el número de episodios de fiebre tifoidea generado por *Salmonella* Typhi, fue estimado en 12 millones con 129.000 resultados fatales (Mogasale et al., 2014 & Crump, 2014). En ese sentido, es importante optimizar su detección temprana y rápida a fin de dar prontas y certeras respuestas a este microorganismo patógeno responsable de infecciones intestinales tal como la salmonelosis, siendo una de las más comunes y más adquiridas, a través de los alimentos (Robledo, 2015).

Este estudio tiene pertinencia con lo anteriormente planteado, en el sentido de que el mismo estará dirigido a profundizar en un proceso de investigación a través del cual se lleguen a aportar datos de importancia con los cuales se pueda determinar la eficacia de un medio de detección de *Salmonella* spp. como lo es el medio cromogénico CHROMagar plus mediante su comparación con dos medios convencionales como el XLD y el HEA y de esa manera asegurar la pertinencia del empleo del medio cromogénico señalado.

En ese mismo orden de ideas, la investigación se abocará a verificar si CHROMagar Salmonella plus presenta mayor sensibilidad y especificidad por la presencia de antibióticos como inhibidores de la microbiota acompañante y la identificación de enzimas específicas del género *Salmonella*, disminuyendo así de forma considerable los falsos positivos, reduciendo el tiempo del proceso y la cantidad de pruebas utilizadas para su identificación en muestras de heces, siempre mediante la comparación con los medios convencionales mencionados (XLD y HEKTOEN), constituyendo un aporte para la disminución del tiempo y los costos relacionados con el proceso de identificación y diagnóstico del microorganismo mediante coprocultivos.

Finalmente, la investigación representa una contribución de importancia para sustentar u orientar los planteamientos teórico-conceptuales relacionados con los medios cromogénicos de aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. y un aporte en la metodología de investigación, en cuanto a que tipo y diseño del estudio utilizar, el instrumental para recaudación de datos, la evaluación y proceso de los datos a desarrollar. Estos aspectos podrán servir en la orientación de investigaciones futuras relacionadas con el tema de este trabajo.

## **1.5 Hipótesis**

A partir de los aspectos planteados en la discusión y formulación del problema, los antecedentes y los objetivos de la investigación, se consideraron las siguientes hipótesis para

orientar a forma de iniciar la labor de verificación o comprobación a través de la recolección de los datos:

- Hipótesis de investigación (Hi): el CHROMagar Salmonella plus presenta mayor eficacia que los medios XLD y HEA en la detección de *Salmonella* spp. a partir de muestras de heces.
- Hipótesis nula (Ho): el CHROMagar Salmonella plus no presenta mayor eficacia que los medios XLD y HEA en la detección de *Salmonella* spp. a partir de muestras de heces.
- Hipótesis estadística: no existen diferencias significativas entre el medio CHROMagar Salmonella y los medios XLD y HEA en la detección de *Salmonella* spp. a partir de muestras de heces.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Bases teóricas de la investigación

#### 2.1.1. *Salmonella*: Ubicación Taxonómica y Nomenclatura

**2.1.1.1 Ubicación Taxonómica.** El género *Salmonella* pertenece a la división Bacteria, phylum Proteobacteria, clase Gamma-proteobacteria, orden XIII Enterobacteriales, familia Enterobacteriaceae (Betancor y Yim. 2012; Quinn et. al. 2002). La última incluye géneros que son críticos a nivel epidemiológico, como: *Escherichia coli*, *Shigella* sp., *Salmonella* sp., *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Serratia* sp., *Proteus* sp., *Citrobacter* sp., *Edwardsiella* sp., *Yersinia* sp., *Morganella* sp., y *Arizona* sp. y otros (Carroll et. al., 2016).

Primeramente, se estimaba que el género abarcaba un número superior a dos mil especies, haciendo uso de nombres característicos con el fin de designarlas, tal como, los referentes a la ubicación geográfica en el cual se aisló por primera vez el agente (*Salmonella* Montevideo). Tiempo después, se demostró mediante estudios que solo hay dos especies de *Salmonella*: *S. enterica* y *S. bongori*; siendo los otros, serotipos. La clasificación taxonómica del género *Salmonella* se basa en investigaciones efectuadas mediante técnicas de hibridación del DNA bacteriano, en base a ello se realizó la clasificación de las dos especies de interés médico ya mencionadas (Terragno y Caffer, 2001; Grimont & Weill, 2007).

Es pertinente señalar que debido a los avances más recientes en la taxonomía se ha podido determinar una presunta tercera especie, la *S. subterránea*, aislada en marzo de 2005 como una cepa ambiental poco frecuente, tal como lo señala la séptima edición del año 2012 del Manual de la Organización Internacional de Epizootiología. Este descubrimiento se aprobó en poco tiempo por el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (OIE, 2015).

No obstante, también se ha advertido que a esta especie se le asocia frecuentemente con *Escherichia hermannii* y que, por ende, es ajeno al género *Salmonella* (Su & Chiu, 2007).

*Salmonella enterica* está dividido en seis subespecies diferenciadas según sus características bioquímicas, correspondiéndose ciertas de ellas con subgéneros precedentes. Aquellas subespecies con numeración romana son: I enterica; II salamae; IIIa arizonae; IIIb diarizonae; IV houtenae y VI indica. El símbolo romano V está limitado a serotipos de *S. bongori* (Tindall et al., 2005). Las subespecies están subdivididas el serovares o serotipos, los cuales se diferencian según la reacción entre los antisueros específicos que entran en contacto con los dos antígenos ubicados en la superficie de la bacteria, siendo estos considerablemente variables: el antígeno O es el que revela la variación de las externas regiones del Lipopolisacárido ubicado en la superficie de la bacteria y el antígeno H quien revela la variabilidad de la flagelina, siendo esta una proteína que conforma el flagelo de la bacteria, así también, tienen 46 y 115 estructuras antigénicas distintas respectivamente (Betancor y Yim, 2012). Por otra parte, la *Salmonella bongori* es una especie que se le ha considerado como no patógena para el ser humano, siendo aislada principalmente en animales poiquiloterms, sobre todo reptiles, pero han sido reportado ciertos casos donde causa enfermedad humana (Rodríguez, 2015).

Mayormente, en las cepas de *Salmonella* se disponen de dos tipos de genes los cuales codifican para flagelina, estas son variantes del antígeno H y se caracterizan por ser dos, siendo denominadas como H1 y H2; de tal forma, todos los serotipos (serovariedades o serovares) son una conjugación exclusiva de los antígenos O, H1 y H2. El modelo antigénico de cada uno de los serotipos de *Salmonella*, están determinados, condensados y conservados por el Instituto Pasteur de Paris, en el Centro Colaborador de la Organización Mundial de la salud de Referencia e Investigación de *Salmonella*, mientras que aquellos serotipos recientes se alistan

anualmente en suplementos del esquema de Kauffmann – White (Grimont & Weill, 2007; Popoff *et al.*, 2001). Según este esquema existen más de 2500 serotipos identificados. Se puede observar en la tabla 1 la cantidad de serotipos identificados en cada especie y subespecie, además de sus hábitats originales.

**Tabla 1**

*Salmonella: especies, subespecies, serotipos y su hábitat usual. Sistema de Kauffman– White*

<b>Especie y sub especie de Salmonella</b>	<b>Números de serotipos dentro de la especie</b>	<b>Hábitat usual</b>
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	1531	Animales de sangre caliente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	505	Animales de sangre fría/caliente y ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	99	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	336	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (VI)	73	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (IV)	13	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. bongori</i> (V)	22	Animales de sangre fría y ambiente
<b>Total</b>	<b>2579</b>	

*Nota.* Clasificación de *Salmonella* spp. en especies, sub especies y serotipos. Adaptada de “*Antigenic formulas of the Salmonella serovars*” por Grimont, P., 2007, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*.

Según lo observado dentro del cuadro 1 acerca de las dos especies más importantes de Salmonella (*S. enterica* y *S. bongori*) y sus respectivas subespecies identificadas, existen 2.579 variedades serológicas determinadas por medio del análisis de la organización antigénica de dichas bacterias en base a los antígenos: flagelar H, capsular Vi y somático O (Terragno y Caffer, 2001; Stanchi, 2007).

**2.1.1.2. Nomenclatura.** El nombre del género Salmonella surge a partir de los estudios de Theobald Smith bajo la dirección de Daniel Elmer Salmon (este último médico veterinario de quien nace el nombre) y desde ese momento la nomenclatura de este género ha sido controvertida y ha estado en permanente proceso de evolución. Se debe destacar el hecho de que previo al sistema actual realizado por Kauffman-White existían muchas complicaciones, utilizándose criterios basados, entre otros, en su morbilidad (ejemplo de ello, *S. Typhi* y *S. Typhimurium*) o su lugar de descubrimiento (ejemplo de ello, *S. London* y *S. Panamá*) (Su & Chiu, 2007; Delgado, 2014).

Se obtuvo una evolución significativa en la nomenclatura para el género Salmonella tiempo después de la designación de la idea original de una especie de serotipo la cual fue propuesta por Kauffmann en 1966, dicha evolución se basó en la detección serológica de aquellos antígenos O (somáticos) y H (flagelares), donde estos serotipos fueron considerados como especies separadas (ejemplo de ello, *S. Paratyphi*, A, *S. Newport* y *S. Enteritidis*); que en la actualidad permitiría el establecimiento de 2.463 especies de Salmonella. Existen otras sugerencias taxonómicas que se basaron en función al rol clínico de la cepa, así también, en las características bioquímicas las cuales separan serotipos por subgéneros y, por último, según el vínculo genómico (Brenner et al., 2000).

Aplicando la técnica de hibridación de ADN-ADN realizada en 1973, mediante la cual se demostró que la totalidad de serotipos y subgéneros I, II y IV de Salmonella y la totalidad

de serotipos de “*Arizona*” se encontraban en relación respecto a la especie y, por tanto, pertenecían a una sola especie, se llega al desarrollo definitorio de la taxonomía de este género, quedando como única excepción descrita posteriormente, *S. bongori*. (Crossa et al., 1973; Reeves et al., 1989).

Basado en los estudios de ADN y mediante el empleo de la taxonomía numérica, en 1982 se realizó la propuesta de una sola especie, *S. choleraesuis*, la cual incluía seis subespecies, subtipificación seguida de la subespecie en ausencia del uso de itálicas. Ejemplo de ello: *Salmonella choleraeuis* subsp. *Choleraeuis* ser. Typhimurium. Para el XIV Congreso Internacional de Microbiología realizado en 1986, el Subcomité de Enterobacteriaceae del Comité Internacional de Bacteriología Sistemática recomendó de forma unánime que la especie tipo de Salmonella, *S. Choleraeuis*, cambiara, a *S. enterica* de tal forma que se evite confusión debido a que una especie y serotipo llevaban nombres idénticos (Su & Chiu, 2007; Brenner et al., 2000).

En 1987, Le Minor y Popoff del Centro Colaborador de la OMS presentaron formalmente una propuesta como “Solicitud de opinión” a la Comisión Judicial del Comité Internacional de Bacteriología Sistemática, quien había sido adoptada por los CDC, por Ewing en 1986 en la cuarta edición de *Edward y Ewing's Identification of Enterobacteriaceae* y por otros laboratorios. Igualmente, estos investigadores propusieron que los siete subgéneros de Salmonella se denominaran subespecies (subespecies I, II, IIIa, IIIb, IV, V y VI). El subgénero III se dividió en IIIa y IIIb por parentesco genómico y reacciones bioquímicas. La subespecie IIIa (*S. enterica* subsp. *Arizonae*) incluye los serotipos monofásicos “*Arizona*” y la subespecie IIIb (*S. enterica* subsp. *Diarizonae*) contiene los serotipos difásicos. (Brenner et al., 2000).

A un cuando la Comisión Judicial estuvo en general a favor de *S. enterica* como especie tipo de Salmonella, sin embargo, la solicitud fue denegada, argumentando sus miembros que el estado de *Salmonella* serotipo Typhi, agente causal de fiebre tifoidea, no fue planteada adecuadamente en la solicitud de opinión y manifestando preocupación por el hecho de que si se adoptaba *S. enterica* como especie tipo, la *Salmonella* serotipo Typhi se denominaría *S. enterica* subsp. *enterica* serotipo Typhi, corriéndose el riesgo que los médicos lo pasaran por alto de la misma manera que *S. choleraesuis* subsp. *Choleraesuis* el serotipo Typhi. Por ello, la Comisión Judicial dictaminó que *S. choleraesuis* se mantendría como especie tipo legítima en espera de una solicitud enmendada de dictamen (Brenner et al., 2000).

En 1989, por la técnica de hibridación ADN-ADN, se determinó que *S. bongori*, conocida antes como subespecie V, es una especie distinta por su ADN no relacionado. En 1999 se realiza una modificación de la propuesta de 1987, que consistía en adoptar *S. enterica* como especie tipo de Salmonella, manteniendo la especie “*S. typhi*” como excepción o especie aparte, concretando a partir del año 2005 que la especie *S. choleraesuis* sería reemplazada por la especie *S. enterica*, siendo esta última su principal denominación. A partir de ello pudo establecerse dos especies: *S. enterica*, la original, con seis subespecies y *S. bongori* (Reeves et al., 1989; Brenner et al., 2000; Barreto y Rodríguez, 2012).

En consonancia con los recientes cambios en la taxonomía de Salmonella, también se han realizado variaciones significativas en su nomenclatura; conservando aquellos apelativos que serán aplicados a serovares de la subespecie *enterica*. Debido a que no son especies y sus apelativos inician en mayúscula, se debe evitar escribir en itálica (cursiva) para destacar dicha característica. De acuerdo con lo anteriormente descrito y en base a las normas vigentes es correcto designarlos como *Salmonella* Typhi, abreviadamente, y *Salmonella enterica*, subespecie *enterica* serovariedad Typhi, como una denominación completa para dicho

patógeno. Las dos escrituras son acertadas sin embargo esta duplicidad conformada por apelativos extensos, provocó gran confusión a lo largo del tiempo para diversos investigadores, inclusive actualmente; y un gran número de profesionales utilizan designaciones que competen a la anterior consideración de especies, escribiendo *Salmonella enteritidis* o *Salmonella typhi*, correspondiendo a una escritura errónea al aplicar ambas palabras en itálica, debido a que se les puede confundir por especies (Delgado, 2014).

Existe complejidad en la nomenclatura de *Salmonella* y, en ese sentido, en la comunidad científica se acude a distintos métodos para aludir e informar acerca de dicho género. No obstante, es necesaria la uniformidad en su nomenclatura para facilitar el habla entre científicos, funcionarios de salud y la comunidad. Actualmente se combina una gran cantidad de modalidades en la nomenclatura, los cuales fraccionan inconscientemente el género dando lugar a especies, subespecies, subgéneros, grupos, subgrupos y serotipos (serovares), provocando confusión, instigando que los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) reciban muchas consultas sobre la nomenclatura adecuada para la presentación de informes de resultados y para su uso en publicaciones científicas. De todo esto se deduce la necesidad de mantener una correcta actualización profesional que se ajuste a los pasos agigantados de la ciencia moderna. (Brenner et al., 2000; Ross et al., 2013; Ajene et al., 2013; Delgado, 2014). En la tabla 2 se observan algunos ejemplos sobre la nomenclatura de *Salmonella* que se observan actualmente en la literatura.

**Tabla 2**

*Ejemplos de nomenclatura de Salmonella que se observan actualmente en la literatura*

<b>Nombre completo</b>	<b>Designación CDC</b>	<b>Otras designaciones</b>
<i>S. enterica</i> <sup>una</sup> <i>subsp. enterica</i> ser. Typhi	<i>Salmonella</i> ser. Typhi	<i>Salmonella typhi</i>
<i>S. enterica</i> <sup>una</sup> <i>subsp. enterica</i> ser. Typhimurium	<i>S.</i> ser. Typhimurium	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>S. enterica</i> <sup>una</sup> <i>subsp. salamae</i> ser. Greenseide	<i>S.</i> ser. Greenseide	S. II 50: z: e, n, x, <i>S. lado verde</i>

<i>S. enterica</i> <sup>una</sup> subsp. <i>arizonae</i> ser. 18: z <sub>4</sub> , z <sub>23</sub> : -	S. IIIa 18: z <sub>4</sub> , z <sub>23</sub> : -	Ser “Arizona <i>hinshawii</i> ”. 7a, 7b: 1,2,5: -
<i>S. enterica</i> <sup>una</sup> subsp. <i>diarizonae</i> ser. 60: k: z	S. IIIb 60: k: z	“A. <i>hinshawii</i> ” ser. 24:29:31
<i>S. enterica</i> <sup>una</sup> subsp. <i>houtenae</i> ser. Puerto pequeño	S. ser. Puerto pequeño	S. IV 48: g, z <sub>51</sub> : -, S. <i>marina</i>
<i>S. bongori</i> ser. Brookfield	S. ser. Brookfield	S. V 66: z <sub>41</sub> : -, S. <i>brookfield</i>
<i>S. enterica</i> <sup>una</sup> subsp. <i>indica</i> ser. Srinagar	S. ser. Srinagar	S. VI 11: b: e, n, x, S. <i>srinagar</i>

*Nota:* Nomenclatura de los diferentes serotipos de *Salmonella* spp., Tomado de “*Salmonella*. Nomenclature”, Grimont, P. et al., 2000, *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (7), 2465–2467.

### 2.1.2. Características morfológicas y bioquímicas

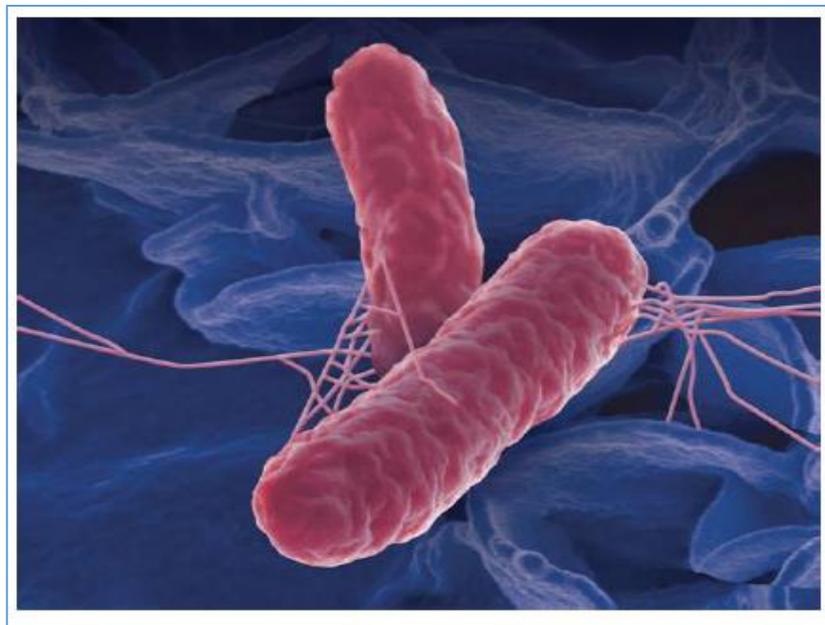
Las bacterias de la familia Enterobacteriaceae presentan semejanza en su morfología y caracteres de tinción por ser bacilos que presentan pleomorfismo, ser Gram-negativos y asporógenos que en cuanto a su tamaño poseen 2 - 3 µm. por 0,4 – 0,6 µm, son catalasa positiva y oxidasa negativa debido a la carencia de citocromo c, propiedad bioquímica de utilidad para el diagnóstico de la familia. Son anaerobios facultativos, fermentadores de lactosa y no esporulados (Stanchi, 2007; Biberstein y Chung Zee, 1990).

Morfológica y bioquímicamente, los microorganismos del género *Salmonella* se identifican por lo siguiente: bacilos gramnegativos, tienen 0,7-1,5 x 2,0-5µm de tamaño, presentan motilidad por poseer flagelos peritricos (a excepción de *Salmonella Gallinarum* y *Salmonella Pullorum*), anaeróbicos facultativos, que no son esporulados, no fermentadores de lactosa (excepto *Salmonella arizonae* y *Salmonella diarizonae*), fermentadores de glucosa; además producen gas (a excepción de *Salmonella Typhi*), el ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) es producido por la gran mayoría, son oxidasa negativas, catalasa positivas; indol, urea y Voges Proskauer negativos; citrato de Simmons positivo y descarboxilan la lisina y la ornitina. Gran

parte de ellos son agentes patógenos para el ser humano, no obstante, pueden actuar como patógenos frente a otros huéspedes como aves, anfibios, mamíferos, reptiles, e incluso plantas y por ello se conocen como “patógenos universales”, debido a su rango extenso de huéspedes (Edwards & Edwing, 1972; Grimont & Weill, 2007; Terragno et al., 2003; Koneman et al., 2008; Pedraza, et. al., 2014). En la figura 1 se aprecia una imagen de Salmonella.

### **Figura 1**

*Imagen de Salmonella*



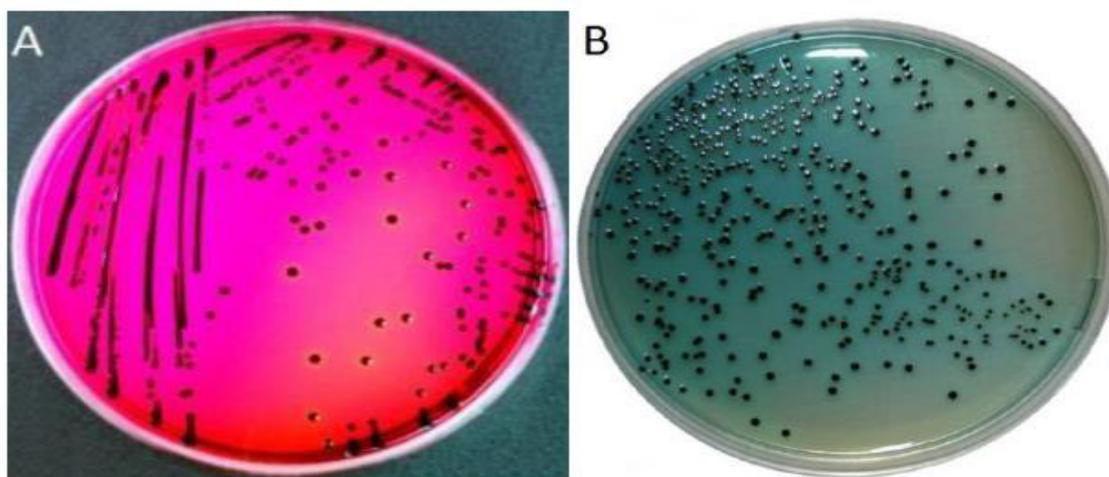
*Nota.* Tomada de Robledo (2015).

Para llegar a identificar y confirmar las colonias que se presumen ser de Salmonella se utilizan medios diferenciales y pruebas bioquímicas. Los medios diferenciales que se utilizan con mayor frecuencia son el agar entérico Hektoen (HE) y el agar xilosa lisina desoxicolato (XLD). En la figura 2 se puede observar cómo se muestran las típicas colonias de esta bacteria en los medios diferenciales mencionados (HE y XLD). Para confirmar las colonias de Salmonella se utilizan como pruebas bioquímicas principales el agar triple hierro (TSI) y el

agar lisina hierro (LIA), sirviendo además como pruebas bioquímicas de complementariedad las de úrea, producción de indol, crecimiento en caldo KCN, fermentación de dulcitol o el uso de malonato de sodio, entre otras (González et al., 2014).

## Figura 2

Colonias típicas de *Salmonella* en agar XLD (A) y agar HE (B).



Nota. Tomada de (Robledo, 2015).

A la confirmación bioquímica para identificar el género *Salmonella*, se le suma la confirmación serológica, dependiendo cada prueba de las características del laboratorio donde se realicen (Terragno y Caffer, 2001). En el cuadro 3 se observan las propiedades bioquímicas de la especie *S. enterica* y subespecies y la especie *S. bongori*.

## Tabla 3

Características bioquímicas de especies y subespecies de *Salmonella*

Especies	<i>S. enterica</i>						<i>S. bongori</i> (V)
	Subespecies <i>enterica</i> (I)	<i>salamae</i> (II)	<i>arizonae</i> (IIIa)	<i>diarizonae</i> (IIIb)	<i>houtenae</i> (IV)	<i>indica</i> (VI)	
Dulcitol	+	+	-	-	-	D	+
ONPG (2hrs)	-	-	+	+	-	D	+
Malonato	-	+	+	+	-	-	-
Gelatina	-	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	-/+	-	+
KCN	-	-	-	-	+	-	+

D-tartrato	+	-	-	-	-	-	-
B-glucoronidasa	D	D	-	+	-	D	-
Mucato	+	+	+	-0,7	-	+	+
Salicina	-	-	-	-	+	-	-
Lactosa	-	-	-0,75	0,75	-	D	-

*Nota.* D, diferentes reacciones por serovars distintos. +,90% o más cepas positivas. -,90% o menos cepas negativas. Tomada de “Aislamiento microbiológico de Salmonella spp. y herramientas moleculares para su detección” por González et al., 2014, Salud Uninorter, (p.73-94).

En medios ordinarios Salmonella logra multiplicarse bien, las colonias crecen en un tiempo de 16-24 horas con una óptima temperatura de crecimiento de 32-37°C, aun cuando pueden llegar a producirse en un rango mayor de 6-46°C. Respecto a las temperaturas menores a 10°C se produce un retardo importante, mientras que a temperaturas menores a 7°C se evita el crecimiento de la mayor parte de salmonelas. Debido a ello, se recomienda mantener a los alimentos que perecen por debajo de la temperatura mínima de crecimiento de la bacteria. También se debe destacar que este microorganismo se encuentra en el medio ambiente, que proviene del tracto intestinal animal, sea doméstico o salvaje, en el que se puede hallar sin causar algún tipo de patología evidente (Robledo, 2015).

Se realizó un reporte en donde se aislaron de forma ocurrente, algunos serotipos de Salmonella fermentadora de lactosa, como es el caso de serotipos *S. Virchow*, *S. Tennessee*, *S. Indiana*, *S. Angona*, *S. Typhimurium*, *S. Oranienburg*, *S. Tuebingen*, *S. Newport*, *S. Typhi*, *S. Java* y *S. Toulon* en humanos, y los serotipos *S. Typhimurium* y *S. Anatum* en productos lácteos. Asimismo, se aislaron Salmonella lactosa positiva de animales, como cepas de *S. Typhimurium* en aves, bovino, canina y cerdo, que dieron lugar a una alta tasa de mortalidad y morbilidad. La presencia de estos inusuales casos de Salmonella lactosa positiva, podría deberse a que no solamente se presentan Salmonelas en las heces acumuladas en el ambiente,

sino además diferentes bacterias entéricas tales como *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus*, *Proteus* y *Serratia*, que logran el transporte del operon Lac en plásmidos, pudiendo ser adquiridas por *Salmonella* (McDonough et al., 2000).

Las probabilidades de muerte del microorganismo aumentan a lo largo del proceso de congelación teniendo el intervalo más efectivo de 0°C y -10°C que el que se encuentra entre -17°C a -20°C. Cabe señalar, sin embargo, que aun cuando dicho proceso puede ocasionar daños considerables al estado de la bacteria, no asegura su completa desaparición en los alimentos. Debería superar la temperatura máxima de 49,5°C para garantizar su muerte (Trepát i Quílez, 2002).

El crecimiento y rendimiento de *Salmonella* se afecta por la actividad de agua, desarrollándose bien a valores de actividad de agua ( $a_w$ ) de 0,93 a 0,999 y logran subsistir durante un largo periodo de tiempo en alimentos con  $a_w$  baja (Robledo, 2015). Se destaca también que esta bacteria presenta una determinada sensibilidad al calor con una resistencia extraña, aspecto tiene influencia por la actividad de agua (cuando la actividad de agua del substrato disminuye, ocurre una elevación), a causa de la esencia de los solutos y el pH que se encuentra en el medio, porque cuando este se reduce, la resistencia al calor disminuye (Trepát i Quílez, 2002).

Finalmente, se debe destacar que estos microorganismos pueden soportar un pH entre 3 y 9 con un valor óptimo de 7 a 7,5, siendo la presencia de ciertos ácidos, como el ácido clorhídrico y el ácido cítrico importantes para la bacteria, permitiéndole su desarrollo a Ph cercanos a 4, mientras que otros ácidos como el acético, ácido propiónico o ácido butírico inhiben su crecimiento a pH menores a 5. Por otro lado, el potencial de óxido-reducción altera el crecimiento de *Salmonella* debido a que se ve inhibido por potenciales de óxido-reducción

inferiores a -30mV (Trepal i Quílez, 2002). En el cuadro 4 se reflejan las condiciones de crecimiento del microorganismo.

**Tabla 4**

*Condiciones de crecimiento de Salmonella*

	<b>Mínimo</b>	<b>Óptimo</b>	<b>Máximo</b>
Temperatura (°C)	5,2	35-43	46,2
pH	3,8	7-7,5	9,5
Actividad de agua	0,93	0,99	>0,99

*Nota:* En esta tabla se observan las condiciones de crecimiento tanto en T°, pH y Actividad de agua para *Salmonella* spp. Tomada de “Investigación de *Salmonella* spp. en alimentos mediante el método tradicional ISO 6579 y dos métodos de inmunoenzimático” por Robledo, A. 2015, Tesis de pregrado, Universidad Politécnica de Catalunya.

**2.1.3. Detección y/o Diagnóstico de *Salmonella* spp.**

Como una de las más importantes generadoras de ETA (enfermedades de transmisión por alimentos), *Salmonella* requiere junto a la realización de las actividades preventivas, terapéuticas y de pronósticos, las referidas a la detección y diagnóstico, estas dos últimas con énfasis en especificidad, sensibilidad y rapidez para afrontar eficazmente la incertidumbre y manejar las probabilidades en el ámbito de las ciencias biomédicas, aspecto que se expresa en la disminución de la tasa de mortalidad, incremento de las posibilidades de éxito del tratamiento y disminución de las complicaciones y secuelas, entre otras (Fernández y Díaz, 2004; Ruiz et al., 2018). Para llevar a cabo el diagnóstico y/o detección referidos a *Salmonella* es necesario realizar la plena y segura identificación de la bacteria basándose en aislamientos (cultivos bacteriológicos), pruebas bioquímicas y serotipificación, es decir el uso de medios de cultivos

y posterior caracterización de las colonias por medio del uso de pruebas químicas y serológicas. (Matsuura, 2008; González et al., 2014).

**2.1.3.1. Aislamiento e Identificación (Cultivos Bacteriológicos).** En términos generales, el aislamiento en cultivos bacteriológico se basa en el hecho de que la totalidad de bacterias poseen ciertos requisitos nutricionales indispensables para su crecimiento, necesitando fuentes de energía, carbono, nitrógeno, como también de algunas sales, oligoelementos y agua. En ese sentido, el total de medios de cultivo deben cumplir por lo menos con dichos requerimientos; sin embargo, en diversas circunstancias es necesario el uso de otras sustancias adicionales tales como vitaminas, factores o aminoácidos esenciales, lo que exige de los medios de cultivo líquidos y sólidos el contar con las sustancias y elementos nutricionales necesarios (Bou, et al., 2011).

Para realizar el aislamiento por cultivo bacteriológico de *Salmonella* se han desarrollado muchas variedades de medios líquidos y sólidos selectivos a lo que se le agrega la amplia experiencia de los laboratorios en el desarrollo y adaptación de los procedimientos más adecuados para este fin. En ese marco, el coprocultivo es considerado el método estándar o prueba de oro y el más usado en el área clínica para el aislamiento y la identificación de *Salmonella* spp. (Gonzalez et al, 2014).

En este método se utilizan: medios líquidos de enriquecimiento selectivo (Ej.: caldo de selenito), medios poco selectivos (Ej.: agar Mac Conkey) o medios de cultivo con selectividad media (Ej.: agar SS, agar Hektoen o agar XLD) para el aislamiento (Koneman et al., 2008). En general, el aislamiento e identificación por cultivo bacteriológico de *Salmonella* spp. consiste en tres etapas continuas: a. pre-enriquecimiento o enriquecimiento no selectivo; b. enriquecimiento selectivo y c. etapa de aislamiento en medios selectivos (RENALOA, 2011; Grimont y Weill, 2007; González, et al., 2014; Luna, 1991).

**A. Pre-enriquecimiento o enriquecimiento no selectivo.** Esta etapa presenta como finalidad la normalización metabólica de *Salmonella* spp. que, a fin de lograr un perfecto crecimiento y rivalidad por los nutrientes frente a diferentes microorganismos, se encuentra en una matriz establecida. El medio de elección para llevar a cabo el pre-enriquecimiento es el agua peptonada fosfatada (APF). También se utiliza caldo nutritivo, caldo lactosado o agua destilada estéril de manera adicional incluyendo una solución de verde brillante al 0,1% cuando se prepara el polvo de leche (González, et al., 2014; López, 2004)

**B. Etapa de Enriquecimiento Selectivo.** Como el nombre lo dice, esta etapa se encarga de estimular y favorecer el desarrollo respecto a *Salmonella* spp. impidiendo el desarrollo en cuanto a la flora que acompaña y es competitiva por medio del uso de un medio líquido, que posee nutrientes y agentes selectivos que van a permitir inhibir o retardar que se produzcan bacterias no deseadas. Los medios de enriquecimiento selectivo se usan en muestras que presentan una flora bacteriana mixta como se encuentra en las heces, tejidos, alimentos o muestras ambientales; para facilitar la multiplicación de *Salmonella* (González, et al., 2014; López, 2004).

Existe un alto grado de variación respecto a caldos selectivos, siendo los que mayormente resaltan: el caldo Rappaport – Vassiliadis (RVS), caldo Tetrionato (TTO) y el caldo Selenito (SC). El caldo RVS se propuso por Vassiliadis, modificándose posteriormente por Rappaport caracterizado por su alta selectividad, principalmente con temperaturas de 41-43°C enriqueciendo previamente y el porcentaje de concentrado de verde de malaquita y cloruro de magnesio inhibe todo tipo de desarrollo de flora presente, favoreciendo el incremento de *Salmonella* en número. Debido a su toxicidad en determinados laboratorios el caldo selenito fue sustituido por el caldo de Rappaport-Vasiliadis (RV). Así mismo, la norma

ISO 6579 establece el uso del caldo RV para el aislamiento de *Salmonella* spp. (López, 2004; ISO, 2017).

El caldo TTO, posee tiosulfato que inhibe coliformes, así como demás bacterias presentes. Por el contrario, la totalidad de bacterias crecen en ausencia de dificultades, debido a que reducen el tetrionato, siendo ejemplo de ello la *Salmonella* y *Proteus*. Todos los microorganismos no esenciales del intestino están significativamente inhibidos por las sales biliares. El SC tiene como característica impedir un desarrollo en bacterias intestinales coliformes, incluyendo *Enterococcus*, de manera principal las 6 - 12 horas iniciales de incubación. Sin embargo, no puede inhibir a *Salmonella*, *Proteus* y *Pseudomonas*. Su incubación está dada a 42°C en RVS, y a 37°C en SC. Incubándose en un rango de 41- 43°C durante 1 día (Salvatierra, 2014).

**C. Etapa de Aislamiento en medios selectivos y diferenciales.** Dicha etapa permite diferenciar entre colonias de *Salmonella* de otro tipo de bacterias poniendo de manifiesto características distintivas de las colonias en función casi siempre de su color. Se basa en reacciones bioquímicas y/o enzimáticas que facilitan un óptimo desarrollo en el caso de colonias de apariencia fenotípicas peculiar. En cuanto a el aislamiento de colonias de *Salmonella*, los medios de cultivo presentan componentes inhibitorios, siendo estos: las sales biliares, el desoxicolato, el verde brillante, el bismuto de sulfito, entre otros; así también, para su diferenciación presentan sustratos como: carbohidratos (Ej.: Lactosa), tiosulfato de sodio (Ej.: Producción de H<sub>2</sub>S), etc. Los medios más empleados en el área clínica son: agar Bismuto Sulfito (BS), agar *Salmonella*-*Shigella* (SS), agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) y agar Hektoen (HE) (Bou et al., 2011; Koneman et al. 2008; González, et al., 2014). Se presentan, a continuación, las características de cada uno de estos medios y la forma como se aprecian las colonias típicas de *Salmonella* en ellos:

- **Agar BS (Bismuto sulfito):** el medio es usualmente marrón, tornándose negro al principio según aumente el tiempo de incubación y se produzca un efecto llamado "halo". En este medio las colonias de *Salmonella* son marrones, grises o negras, a veces con brillo metálico. (González, et al., 2014).
- **Agar SS (Salmonella - Shigella):** caracterizado por ser de alta selectividad y permitir la diferenciación y selectividad, siendo este último el que se da debido a las sales biliares y el verde brillante, quienes inhiben el crecimiento bacteriano de Gram-positivas, de gran variedad de coliformes y el crecimiento invasivo de *Proteus* sp. Es considerado un medio de diferenciación porque fermenta lactosa y forma ácido sulfhídrico en base al tiosulfato de sodio. En este medio *Salmonella* spp. produce colonias transparentes, de manera ocasional opacas, en ciertos casos con una mancha negra en el centro por la producción de ácido sulfhídrico, indicando lactosa negativa. Las colonias con sospecha de *Shigella* se observan transparentes, translúcidas u opacas y habitualmente tienen aspecto liso (Murray et al., 2004).
- **Agar XLD (Xilosa, lisina, desoxicolato):** se emplea para aislar y diferenciar enterobacterias, específicamente entre especies de *Salmonella* y *Shigella*. Al degradar xilosa, lactosa y sacarosa a ácido, se generan cambios de color a amarillo en el indicador de pH rojo de fenol. El tiosulfato y las sales de hierro integran el sulfuro de hidrógeno, porque en las colonias ocurre una precipitación de color negro. Este medio de cultivo tiene un efecto inhibitor débil, el desoxicolato de sodio inhibe el crecimiento de microbiota Gram-positiva. Mayormente aquellas enterobacterias patógenas, salvo *Shigella*, son fermentadoras de Xilosa. Como resultado de la Xilosa fermentada, el ácido que se obtiene genera un cambio a amarillo del Rojo de Fenol presente en dicho medio. A fin de poder diferenciar el grupo *Salmonella* entre aquellos organismos

inocuos, se incluye a la lisina, ya que, sin ella, *Salmonella* fermentaría de manera rápida la xilosa, produciéndose acidez en el medio de tal forma que tornaría complicado distinguir entre las especies inocuas. Aquellos microorganismos capaces de descarboxilar lisina, tal es el caso de *Salmonella*, tienen la característica de poseer colonias de color rojo-anaranjadas a causa del incremento de pH el cual ha sido generado dentro del medio ocasionando un viraje del Rojo de Fenol. Las colonias de *Salmonella* presentan una pigmentación rosada o rojo, en algunas ocasiones transparentes, en ausencia o presencia de centro azabache y/o color absolutamente negro (Hurtado, 2001; Murray et al., 2004; González, et al., 2014).

- **Agar HE (Entérico Hektoen):** es un medio selectivo para aislar bacterias intestinales patógenas, incluso *Shigella* tomando en cuenta diferentes materiales y de muestras fecales. Las colonias pertenecientes a bacterias lactosa positivas se distinguen de otras colonias de bacterias lactosa negativas debido a dos indicadores presentes: el azul bromotimol y el ácido fucsina, que dan al primero un color naranja amarillento y al último un color azul verdoso. Los microorganismos que se encargan de fermentar la sacarosa y la salicina además adquieren un color amarillo anaranjado. Gracias a la sacarosa y salicina presentes, se evita la selección de patógenos falsos positivos. Con la ayuda del Sodio Tiosulfato y el hierro, se identifican los productores de sulfuro de hidrógeno por el precipitado negro que presentan en el centro de las colonias. Las sales biliares presentes inhiben el crecimiento de una parte importante de la flora asociada. Las colonias de *salmonella* son de color azul o verde y pueden o no tener un centro negro. Numerosos cultivos de *Salmonella* spp. pueden producir colonias azules o verdes con un gran centro negro brillante o casi completamente negras (Koneman et al., 2008; González et al., 2014).

Las características fenotípicas generales de las colonias sospechosas de *Salmonella* pertenecientes a medios con característica selectiva se deben a su comportamiento bioquímico como: la ausencia correspondiente a la fermentación de lactosa y la obtención de H<sub>2</sub>S. Existen géneros bacterianos que presentan crecimiento similar o poco diferenciable con las cepas de *Salmonella*, obteniéndose resultados falsos positivos por la baja sensibilidad del medio de cultivo tradicional (García, 2011; Koneman et al., 2008). Por tal motivo, la ISO 6579:1-2017, sugiere la selección de cuatro colonias sospechosas de *Salmonella* para la identificación diferencial por pruebas bioquímicas, y posterior confirmación serológica con antisueros O y H. En el cuadro 5 se observan los géneros bacterianos que presentan similar o poco diferenciable crecimiento con *Salmonella*.

**Tabla 5**

*Características bioquímicas de la familia Enterobacteriaceae*

<b>Bacteria</b>	<b>Lactosa Neg.</b>	<b>H<sub>2</sub>S Positiva</b>	<b>Lisina</b>
<i>Salmonella</i> spp.	100%	100%	100%
<i>Edwardsiella tarda</i>	100%	100%	100%
<i>Morganella morganni</i>	100%	20%	V
<i>Proteus penneri</i>	99%	30%	0%
<i>Proteus mirabilis</i>	98%	98%	0%
<i>Proteus vulgaris</i>	98%	95%	0%
<i>Citrobacter werkmanii</i>	83%	100%	0%
<i>Citrobacter youngae</i>	75%	75%	0%
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	65%	95%	0%
<i>Citrobacter diversus</i>	50%	99%	0%
<i>Citrobacter freundii</i>	22%	78%	0%

*Nota:* Características bioquímica de las diferentes enterobacterias que presentan comportamiento similar con *Salmonella* spp. Adatada de Diagnostico microbiológico, por Konenam et al., 2008, libro.

Aparte de los medios selectivos y diferenciales ya mencionados y descritos, es pertinente referirse e incluir los medios cromogénicos, donde la incorporación de sustancias

cromógenas permite la detección de una variedad de enzimas que se producen gracias a los microorganismos. En estos medios, la enzima que es producida por la bacteria, se encarga de hidrolizar el sustrato, liberando un compuesto cromogénico de color intenso, que produce coloración en la colonia. Estas enzimas podrían ser esencialmente de género, de especie o restringidas a una pequeña agrupación de especies. La supuesta identificación de las bacterias aisladas en algunos casos, es tan específica que los ensayos de confirmación son innecesarios. (Bou et al., 2011).

La mayoría de los medios cromogénicos para la identificación de *Salmonella* utilizados actualmente dependen de la detección de la enzima esterasa C8 producida por *Salmonella*, que se detecta mediante la inclusión de un cromógeno unido al ácido caprílico (octanoico). Los sustratos para la  $\beta$ -glucosidasa y/o la  $\beta$ -galactosidasa se incluyen para que otros coliformes generen un color diferente. Se pueden incluir antibióticos como cefsulodina y novobiocina para la inhibición de *Pseudomonas spp.* y *Proteus spp.*, respectivamente otros componentes como la peptona y extracto de levadura, suelen servir de nutrientes para el crecimiento de las bacterias (Perry, 2017).

Entre los medios cromogénicos utilizados para *Salmonella*, se encuentra el CHROMagar *Salmonella* (CAS), medio cromogénico selectivo y de diferenciación para el aislamiento y la presunta identificación y detección de esta bacteria, partiendo de muestras fecales clínicas con presencia de colonias de color malva después de 18 a 24 horas de incubación, diferenciándose de otros miembros de la familia Enterobacteriaceae que crecen presentando colonias azules o incoloras, permitiendo así, una mejor identificación de *Salmonella* en las muestras (CHROMagar, 2017). Sin embargo, *Pseudomonas spp.* y *Candida spp.* presentan colonias similares al crecimiento de *Salmonella*, es por eso que para su exclusión

se utiliza el test de la oxidasa para *Pseudomonas* spp. y el examen directo para *Candida* spp. (Perez *et al.*, 2003; AOAC, 2013).

CAS es un sistema especializado para aislar y diferenciar las especies de *Salmonella*. Al suplementar el medio con sustratos cromógenos, se pueden distinguir las especies de *Salmonella* de la flora restante. Está diseñado especialmente para aislar y diferenciar especies de *Salmonella*. Añadir sustratos cromógenos al medio favorece diferenciar las especies de *Salmonella* de la flora que resta. En este medio cromogénico algunas peptonas seleccionadas son particularmente suministradoras de nutrientes. Los microorganismos gramnegativos como resultado de la base selectiva del medio, se ven inhibidos. Añadir un agente antifúngico inhibe el crecimiento de especies de *Cándida* y se hace uso de otros agentes antimicrobianos para evitar el crecimiento de bacterias gramnegativas que no fermentan a la glucosa y demás especies de *Proteus*, que son fuertemente capaces de sobrepasar en cuanto al crecimiento de las colonias de *Salmonella*. En el medio se incorpora una mezcla cromogénica. A causa de las desigualdades metabólicas en presencia de algunos cromógenos, las colonias que presentan un color malva (rosado a morado) son especies de *Salmonella*, en tanto que se van a ver inhibidas las bacterias que no deseadas o producirán colonias verdes azuladas o incoloras (AOAC, 2013). En el cuadro 6 se aprecia la fórmula del CAS.

### Tabla 6

*Fórmula por litro de agua purificada de CAS.*

Cromopeptona	22,0 g.
Mezcla cromógena	0,34 g.
Agentes inhibidores	0,02 g.
Agar	15,0 g.

*Nota.* Composición de CAS por litro de agua, considerar el pH.  $7,7 \pm 0,2$ . Tomado de CHROMagar *Salmonella*. <http://www.bd.com/europe/regulatory/>.

Con relación al control de calidad en los medios de cultivo, es importante destacar que en el área de microbiología este proceso es de gran importancia ya que permite asegurar condiciones óptimas de los medios de cultivo a utilizar. En tal sentido, la ISO 6579-1:2017 recomienda el uso de cepas control para la evaluación de los medios utilizados, mediante el uso de cuatro cepas ATCC de Salmonella, pudiendo ser estas: *S. arizonae* ATCC 13314. *S. Choleraesuis* ATCC 10708, *S. Paratyphi* ATCC 11511 y *S. Typhimurium* ATCC 14028.

Para el control de calidad en el manejo de CAS se recomienda realizar una evaluación del rendimiento inoculando una muestra típica de placas con cultivos puros de microorganismos de control permanentes que realizan reacciones estimadas y conocidas, por lo que se propone la utilización de cepas de prueba (AOAC, 2013). En el cuadro 7 se aprecian las cepas recomendadas.

**Tabla 7**

*Cepas de prueba para control de calidad para empleo y manejo de CAS*

<b>Cepas</b>	<b>Resultados de crecimiento</b>
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	Crecimiento mediano a denso de colonias de color malva claro a malva (rosado a morado)
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	Crecimiento; colonias de color malva (= rosado a morado)
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	Crecimiento mediano a denso de colonias de color verde azulado claro a verde azulado.
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Inhibición parcial a completa; colonias de color verde azulado
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 33495	Inhibición parcial; colonias de color verde azulado
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 43071	Inhibición parcial a completa

*Nota.* Características de crecimiento de cepas ATCC. Tomado de CHROMagar Salmonella. <http://www.bd.com/europe/regulatory/>.

**2.1.3.2. Pruebas Bioquímicas Diferenciales para Caracterización de *Salmonella* spp.** En esta etapa cada colonia sospechosa debe confirmarse como *Salmonella*, diferenciando las bacterias mediante pruebas bioquímicas que determinen las características fenotípicas y

metabólicas que representan el código genético y la identidad única del organismo que se está estudiando. La identificación diferencial bioquímica va a permitir la confirmación de la identidad de *Salmonella* en relación con otras enterobacterias aisladas en los mismos medios selectivos. Para identificar o confirmar las colonias presuntivas de *Salmonella* se emplean de forma simultánea dos medios diferenciales como el agar triple azúcar hierro (TSI) y el agar Lisina hierro (LIA). Como pruebas bioquímicas de complementariedad se utilizan citrato, hidrólisis de urea y prueba de motilidad, entre otras (López, 2004; González et al., 2014).

- **Agar TSI:** agar diferencial que se basa en fermentar de diferentes tipos de azúcar y producir gas y H<sub>2</sub>S. Está conformado por glucosa, sacarosa y lactosa; las dos últimas tienen una concentración 10 veces más que la glucosa. En el caso del rojo de fenol, actúa como indicador de pH que cambia a amarillo como consecuencia de la formación de ácido partiendo del carbohidrato. Quien detecta la producción de ácido sulfhídrico es el sulfato ferroso. Generalmente *Salmonella* spp. como consecuencia de esta prueba se presenta una reacción alcalina/ácido que produce H<sub>2</sub>S y se confirma porque en el tubo se observa un fondo negro (K/A H<sub>2</sub>S<sup>++</sup>); a veces, también ocurre la producción de gas producto de la fermentación de glucosa (MacFaddin, 2000).
- **Agar LIA:** el fundamento de esta prueba se encuentra en que los procedimientos de descarboxilación y desaminación dentro del medio de cultivo se llevan a cabo con una fermentación previa del carbohidrato que posee el medio (glucosa) y la acidez que se produce como consecuencia de esta reacción. En el caso que el microorganismo necesite descarboxilasas, se producirá la descarboxilación de manera que el producto final serán aminos, las cuales van a alcalinizar el medio de cultivo y si presenta las desaminasas se lleva a cabo la desaminación y como producto final se obtienen ácidos orgánicos que se encargan de acidificar el medio de cultivo. *Salmonella* spp.

Generalmente como resultado se obtiene un tendido y fondo púrpura, (KIK), se produce H<sub>2</sub>S y gas, lo que significa, que contiene la enzima lisina-descarboxilasa (MacFaddin, 2000).

- **Hidrólisis de urea:** como compuesto orgánico nitrogenado la urea puede ser transformada por algunos microorganismos, produciendo la enzima ureasa. Esta actividad microbiana da como resultado la liberación de nitrógeno en forma inorgánica como moléculas de amoníaco. Como consecuencia de dicha reacción se produce la alcalinización del medio de cultivo. El medio de cultivo se va a alcalinizar cuando esta reacción se lleva a cabo, lo que puede observarse visualmente en el cambio de coloración del medio a través del indicador de pH debido a la acidificación que se produce en el mismo. La prueba es negativa porque *Salmonella* spp. no posee la capacidad de hidrolizar la urea (MacFaddin, 2000).
- **Citrato:** se basa en establecer la facultad que poseen los microorganismos para utilizar como fuente de carbono al citrato de sodio para el metabolismo y el crecimiento. Este medio está compuesto por fosfato sódico de amonio, fosfato de monopotasio, sulfato de magnesio, citrato de sodio y azul de bromotimol como indicador de pH. Si se utiliza el carbono citrato de sodio, también se extraerá nitrógeno del fosfato de amoníaco presente en el medio, lo que provocará la liberación de amoníaco, que se encarga de alcalinizar el medio cambiándolo de verde a azul. *Salmonella* spp. Generalmente utiliza como fuente de carbono al citrato, lo que provoca un cambio en la coloración del medio. (Koneman et al., 2008).
- **Prueba de motilidad (MIO):** se usa para establecer si un microorganismo tiene motilidad o no. Se cultiva en un medio semisólido. (MIO), dentro del cual a la par se realiza la evaluación de la producción de indol y de H<sub>2</sub>S por los microorganismos. Las

bacterias que son móviles se encargarán de producir turbidez homogénea del medio a causa de la división al azar de los microorganismos. Caso opuesto, las bacterias que no son móviles se mantendrán en la misma perforación donde fueron sembradas. Excepto *S. Pullorum* y *S. Gallinarum*, que son hospedadores propios de aves, la mayoría de salmonella son motiles (MacFaddin, 2000; Koneman et al. 2008).

Las reacciones mostradas en la Tabla 8 son típicas de la batería de pruebas bioquímicas que se utilizan habitualmente para identificar enterobacterias pertenecientes al género *Salmonella*.

**Tabla 8**

*Pruebas bioquímicas fundamentales para la identificación de microorganismos que pertenecen al género Salmonella*

MEDIO	FORMULA	REACCIÓN Y FUNDAMENTO	RESULTADO PARA <i>Salmonella spp.</i>
<b>TRIPLE AZUCAR HIERRO (TSI)</b>	Extracto de carne, pluripeptona, glucosa, lactosa. Sacarosa, Tiosulfato de sodio, agar y rojo de fenol como indicador.	Detecta la fermentación glucosa, lactosa y/o sacarosa, con un viraje del medio de color rojo a color amarillo, así como también la producción de HS <sub>2</sub> y gas.	K/A H <sub>2</sub> S ++
<b>AGAR LISINA HIERRO (LIA)</b>	Peptona, extracto de levadura, glucosa, lisina, citrato de hierro, tiosulfato de sodio, agar y purpura de bromocresol como indicador.	Detecta la capacidad de descarboxilar la lisina, generando un color morado del medio más intenso con crecimiento en el pico de flauta.	K/K/ H <sub>2</sub> S ++
<b>AGAR UREA</b>	Tripteina, glucosa, indicador rojo de fenol y solución de urea al 40 %	Detecta la capacidad de hidrolizar la Urea, presentando un cambio del medio de amarillo a rosado con crecimiento en el pico de flauta.	Negativo
<b>AGAR MIO (Movilidad/indol/ornitina)</b>	Glucosa, extracto de levadura, peptona, tripteina, ornitina, agar y purpura de bromocresol como indicador.	Detecta la capacidad de descarboxilar la ornitina, la movilidad bacteriana y la producción de indol, cual es detectada con ayuda del reactivo de kovacs.	Positivo*
<b>AGAR CITRATO DE SIMMONS</b>	Citrato de sodio, fosfato dipotasico, fosfato monoamónico, sulfato de magnesio, agar y azul de bromotimol como indicador.	Detecta la capacidad del uso de citrato como única fuente de carbono, con un cambio del medio de verde a color azul con crecimiento en el pico de flauta	Positivo

K= ALCALINO, A= ACIDO, H<sub>2</sub>S= SULFURO DE HIDROGENO. += POSITIVO y -= NEGATIVO

\*Excepción *S. Pullorum* y *S. Gallinarum* que son negativas para esta prueba.

*Nota:* Características bioquímica de *Salmonella* spp. Adaptada de Diagnostico microbiológico, por Konenam et al., 2008, libro.

El hecho de que la mayor parte de las serovariedades aisladas en el ser humano y los animales pertenezcan a *S. enterica* subespecie *enterica* y posean propiedades bioquímicas similares, ayuda a contribuir con su identificación. En cambio, el serotipo señalado como *S. Typhi*, posee características bioquímicas singulares que permiten diferenciarlo de otros serotipos, resaltándose un metabolismo demasiado lento comparándolo con los demás, una producción inferior de H<sub>2</sub>S, y reacciones no positivas para el citrato y otras pruebas bioquímicas como las de ornitina descarboxilasa; gas de glucosa; fermentación del dulcitol, arabinosa y rhamnosa y el uso de mucato y acetato (Koneman et al., 2008).

**2.1.3.3. Serotipificación para caracterización de *Salmonella* spp.** Se le considera a la serotipificación como un método simple y estable el cual permite la observación de serotipos significativos, debido a su extensa aplicación. Incluyendo algunas restricciones, la serotipificación puede ser aplicada para serotipos específicos de *Salmonella*, atribuyendo diferentes modelos de distribución, resistencia y virulencia, dando lugar a un componente fundamental que puede ser aplicado en la investigación epidemiológica. Concede la oportunidad de realizar una caracterización e identificación en aislamientos del género *Salmonella* mediante localización de antígenos variados. En el género *Salmonella*, se descubren especies, originalmente de acuerdo a sus características bioquímicas, empero, especies y grupos son detectados por medio de exámenes antigénicos (Mejía, 2003; Terragno et al., 2003).

La confirmación serológica de *Salmonella* por antisueros polivalentes y su serotipificación, son la consecuencia de la conjugación entre las características bioquímicas y

de los antígenos somáticos O y flagelares H definidos mediante la serología teniendo en cuenta la norma ISO 6579 (Grimont y Weill, 2007; González, et al., 2014; Luna, 1991; ISO, 2017). Así como otras enterobacterias, *Salmonella* incluye dos tipos de antígenos principales y uno complementario: los de pared, los cuales son los antígenos O (somáticos), que dan lugar al serogrupo, los flagelares o H (flagelares) y los de cápsula o Vi, estos dos últimos acaban de definir el serogrupo (Koneman et al., 2008; Mejía, 2003). Clasificar serovares o serotipos se basa en la conjugación de los antígenos O, antígenos H y, ocasionalmente, del antígeno capsular (Vi) (Grimont & Weill, 2007). La identificación de aquellos antígenos se da por medio de técnicas como la microaglutinación donde se incluyen sueros específicos, mayormente comerciales, para todos ellos. Según ello, se logra caracterizar las cepas según su conformación antigénica.

**A. Antígenos Somáticos (O).** Dichos antígenos se encuentran conformados de polisacáridos y fosfolípidos; con un aproximado de: 60% polisacáridos, 20-30% lípidos y 3,5-4% hexosamina. Se caracteriza por ser cadenas laterales de polisacáridos del lipopolisacárido de envoltura (LPS) hallado en la totalidad de microorganismos Gram negativos. Aquella cadena de polisacáridos que conforma el antígeno O tiene la naturaleza de un polímero de unidades repetitivas de oligosacáridos (3-5 azúcares) ya sean lineales o distribuidos por ramificación. La esencia de acuerdo a los grupos terminales y la disposición en la cual se hallan las unidades repetitivas de la cadena establecen el carácter específico antigénico somático de la bacteria. Existen divergencias en el carácter específico antigénico O, debido a que dicha organización se distingue extensamente de las diferentes serovariedades. Aquellos antígenos se caracterizan por ser estables al calor (termoestables) así también, tienen alta resistencia al alcohol y los ácidos en dilución. Respecto a la organización somática, se encuentra denominada por la letra O seguido de número arábigos apartado mediante comas, correspondiente a sus factores, ejemplo de ellos son *S. Typhimurium* O: 1, 4, 5, 12; *S. Enteritidis* O: 1, 9, 12. Se han

realizado un gran número de estudios que detectaron un elevado número de factores antigénicos O, siendo 67 aplicados en la detección serológica (Terragno y Caffer, 2001; Stanchi, 2007).

**B. Antígenos flagelares (H).** Se considera como aquellas proteínas identificadas como termolábiles de las cuales en conjunto con antisueros específicos flagelares y células de bacterias, causan un tipo de aglutinación en particular. El flagelo se caracteriza por poseer una organización con alto grado de complejidad, conteniendo un cuerpo basal, segmento de unión y filamento. El denominado cuerpo basal fija el flagelo en la envoltura celular, por otro lado, el segmento de unión enlaza el filamento al cuerpo basal. Respecto a la serotipificación de flagelo de *Salmonella*, se emplea únicamente la especificidad del antígeno del filamento. Las variaciones en la estructura primaria (englobado en aminoácidos y orden de lugar) encontradas en diferentes moléculas de flagelina, se manifiestan gracias a las alteraciones de éstas. Existen escasas serovariedades de *Salmonella*, las cuales incluyen solamente la fase flagelar, dándole la denominación de monofásicas, ejemplo de ello es la *Salmonella* Enteritidis (9,12:g,m:-), *Salmonella* Typhi (9,12 [VI]:d:- ); aun así, mayormente estas serovariedades poseen dos especificaciones respecto a su antígeno flagelar, dándole la denominación de cepas difásicas, ejemplo de ello son la *Salmonella* Typhimurium (1,4,5,12:i:1,2) y *Salmonella* Hadar (6,8:z10:e,n,x), las cuales tienen expresión en la fase 1 (definido en las ejemplificaciones mediante las fases: i ó z10) y la fase 2 (mediante las fases: 1,2 y e, n, x correspondientemente) (Terragno y Caffer, 2001).

**C. Antígeno capsular (Vi).** Los antígenos de este tipo (de superficie o capsulares) se observan con frecuencia en otros géneros que son propios de la familia *Enterobacteriaceae* (*E. coli* y *Klebsiella* sp.). No obstante, este antígeno está presente sólo en tres serovariedades: *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* y en ciertas cepas de *S. Dublin*. Los antígenos Vi tienen la capacidad de

ocultar el antígeno O con lo que se produciría la ausencia de aglutinación por los antisueros O (Terragno y Caffer, 2001).

Dentro del género *Salmonella* se presenta un solo tipo capsular, el tipo Vi (de virulencia) pese a que la mayor parte de las bacterias del género *Salmonella* no producen cápsulas. La composición antigénica de la fracción polisacárida precisa en gran medida la especie, mientras que la clase y el número de azúcares, así como los enlaces entre ellos, definen los determinantes antigénicos que contienen los antígenos O de un aislamiento determinado. Estos antígenos, a la vez con los determinantes antigénicos que se encuentran en la superficie de los flagelos (antígenos H) que posee la mayor parte de las salmonellas, ayudan a definir el aislamiento de una especie de otras desde el punto de vista serológico. (Biberstein y Chung Zee, 1990)

#### ***2.1.4. Validez del diagnóstico y detección de *Salmonella* spp.: sensibilidad y especificidad***

Cada proceso de diagnóstico clínico y prueba de laboratorio se basan en un modelo probabilístico, con cada paso modificando el grado de seguridad con el cual se realiza el diagnóstico. En este sentido, debe mostrar un conjunto de características que correspondan a los datos esperados respecto a un paciente sobre el que se desea averiguar si tiene o no una enfermedad determinada. A partir de esa necesidad se plantean como interrogantes: a) ¿Cuál es la probabilidad de que el resultado de la prueba de diagnóstico sea positivo si la enfermedad está presente? b) ¿Cuál es la probabilidad de que el resultado sea negativo si la enfermedad no está presente?

La primera pregunta identifica o define el concepto de sensibilidad de las pruebas de diagnóstico, mientras que la segunda identifica o define el concepto de especificidad de las pruebas de diagnóstico. Por lo tanto, estos conceptos permiten la evaluación de la validez de

una prueba de diagnóstico y poseen una ventaja añadida, la de ser características propias de la prueba de diagnóstico que definen su validez. (Ochoa y Orejas, 1999; Vizcaíno-Salazar, 2017; Fernández y Díaz, 2004).

Complementando lo anterior, la utilidad de una prueba de diagnóstico es dependiente de su fiabilidad, o de su capacidad para producir resultados coherentes en condiciones similares, y del hecho de que sus mediciones reflejan con precisión el fenómeno que se miden, o de su validez; este último concepto hace referencia a la compatibilidad del valor de la prueba con un determinado patrón de referencia que califica la presencia o no de la enfermedad. Dicha conformidad se refleja en los indicadores fundamentales de validez: la sensibilidad y la especificidad, que indican la validez de la prueba. Cuanto mayor sean estos indicadores, más válida es la prueba. (Ochoa, 2015).

En términos más concretos, la sensibilidad se refiere al porcentaje de individuos enfermos que tienen un resultado de prueba positivo, a la posibilidad de clasificar de manera correcta a una persona enferma o a la posibilidad de que un individuo enfermo obtenga como resultado una prueba positiva. Igualmente, la sensibilidad se refiere a la capacidad de una prueba para detectar una enfermedad. (Vizcaíno-Salazar, 2002; Fernández y Díaz, 2004).

La especificidad se refiere a la proporción de individuos sanos que tienen un resultado de prueba negativo o normal, la posibilidad de clasificar de manera correcta a una persona sana, en otras palabras, la posibilidad de que para un individuo sano de negativo como resultado. Asimismo, la especificidad puede definirse como la capacidad de distinguir entre individuos sanos y no sanos. En resumen, la sensibilidad detecta casos verdaderamente positivos, mientras que la especificidad detecta casos verdaderamente negativos. (Vizcaíno-Salazar, 2002; Fernández y Díaz, 2004).

Estos conceptos están representados matemáticamente: Para determinar la sensibilidad, se divide el número de enfermos que presentan un resultado positivo debido a la suma de personas enfermas que poseen un resultado de prueba positivo y enfermos que presentan un resultado de prueba negativo:  $a/(a+c)$ ; o  $VP/VP + FN$ , donde VP= verdaderos positivos y FN= falsos negativos. Una prueba de diagnóstico muy sensible tendrá una tasa inferior de falsos positivos negativos, mientras que una prueba menos sensible poseerá una tasa elevada de falsos positivos negativos.

Al emplear una prueba con mucha sensibilidad, se garantiza que un resultado negativo es más probable que sea preciso. La especificidad se calcula dividiendo el número de individuos “no enfermos” que presentan un resultado positivo por la suma total de los individuos “no enfermos” que presentan resultado positivo y los individuos “no enfermos” que presentan prueba negativa:  $b/(b+d)$ ; o  $FP/FP + VN$ , donde FP= falsos positivos y VN= verdaderos negativos. El aspecto crítico de la especificidad es que el examen tiene la capacidad de clasificar de manera correcta a un paciente sano como sano; dicho de otro modo, puede generar un verdadero negativo. Cuando el resultado es positivo, una prueba muy específica es extremadamente útil, ya que la tasa de falsos positivos es extremadamente inferior. (Medina, 2011; Ruiz, 2008; Bravo-Grau y Cruz, 2015).

Los planteamientos sobre validez de las pruebas diagnósticas a través de la sensibilidad y la especificidad como indicadores cumplen los requerimientos de la microbiología, por lo que es de fundamental importancia la correcta evaluación de los riesgos de contaminación por *Salmonella* spp. a través del diagnóstico y detección utilizando pruebas con alto grado de especificidad y sensibilidad, aplicables a un gran número de muestras, económicas y de resultados rápidos (López, 2004; Ruiz et al., 2018).

El esquema de diagnóstico y detección para aislar e identificar *Salmonella*, comprende el enriquecimiento no selectivo, enriquecimiento selectivo y aislamiento por medios de cultivo con características selectivas y diferenciales. En esta última etapa se distinguen colonias de *Salmonella* y otro tipo de bacterias poniendo de manifiesto características de unas colonias respecto a otras (Bou et al., 2011; Koneman et al. 2008; González, et al., 2014).

La importancia que tiene el aislamiento como etapa clave y determinante en el diagnóstico y detección de *Salmonella* para garantizar una debida diferenciación de la bacteria con relación a otros microorganismos, exige la validez de los resultados de esta etapa en términos de sensibilidad y especificidad para garantizar la eficacia y exactitud diagnóstica, es decir la concordancia entre los datos resultantes de la prueba más el estándar de referencia de la cual, en consecuencia, se expresarán en una evaluación que arroje resultados confiables y válidos en relación con los medios utilizados para el aislamiento selectivo (Pozo, 1988; Bravo-Grau y Cruz, 2015; Ruiz et al., 2018). En ese sentido, se han desarrollado estudios evaluativos para determinar la eficacia de los medios selectivos en la identificación y selección de *Salmonella* y otros microorganismos, resaltándose que los medios cromogénicos:

1) arrojan altos indicadores de calidad diagnóstica, pues no se evidencian datos falsos negativos (colonias positivas de *Salmonella enterica* de rasgo distintivo cultural típico), inclusive falsos positivos (colonias pertenecientes a otro tipo de bacteria de rasgo distintivo típico de *Salmonella enterica*) o presentan eficiencias altas (96% y 97%) (Tsoraeva et al., 2008; Londoño, 2018; Pérez et al., 2003);

2) presentan muchas menos colonias falsas positivas con relación a medios selectivos como HEA, SS y Mac Conkey con un mínimo de pruebas de confirmación rápidas y económicas (la prueba de oxidasa de disco o la microscopía directa), demostrándose también

que presentan buena sensibilidad, calificándolos para el uso en el recubrimiento primario de muestras de heces cuando se busca *Salmonella* (Gaillot, et al., 1999);

3) permiten la óptima diferencia de distintos géneros propios de cultivos mixtos, otorgando un resultado de alta eficiencia en su diagnóstico en el hallazgo del mismo y se recomiendan como medios de elección de placa única con el fin de identificar y detectar presuntas salmonelas presentes en las heces. (Tsoraeva et al., 2008; Pérez et al., 2003).

A partir de estos resultados, es pertinente evaluar la validez de los resultados obtenidos del aislamiento selectivo en cuanto a diferenciación de las colonias de *Salmonella* respecto a colonias de otros microorganismos y su identificación por medio de medios cromogénicos como el CHROMagar, determinando su sensibilidad y especificidad con relación a otros medios como serían el agar HEA y XLD, medios de aislamiento selectivo mayormente utilizados en las pruebas de laboratorio y calificados como medios de selectividad media (Koneman et al., 2008).

### III. MÉTODO

#### 3.1. Tipo de investigación

La realización de esta investigación se ubicó dentro de los parámetros de una investigación descriptiva, ya que trató de especificar de modo diferencial el medio de aislamiento CHROMagar Salmonella plus, evaluando su eficacia para su implementación como medio de rutina para la detección de *Salmonella* spp. a partir de muestras de heces. Asimismo, el presente trabajo investigativo fue de tipo transversal, prospectivo y experimental debido a que se llevó a cabo a través de la manipulación de una variable experimental, representada en el medio de aislamiento ya mencionado, en condiciones rigurosamente controladas.

#### 3.2. Ámbito temporal y ambiental

Para llevar a cabo este estudio, se realizó una evaluación de muestras de heces que fueron destinadas al proceso de coprocultivo y referidas al área de microbiología de Multilab laboratorio clínico, en el período de enero a mayo de 2021.

#### 3.3 Variables

En atención a lo formulado en las hipótesis de esta investigación, se determinaron como variables del estudio, las siguientes:

**A. Variable independiente:** Medio de cultivo CHROMagar Samonella plus.

**B. Variables dependientes:**

- **Sensibilidad:** sensibilidad del aislamiento de Salmonella, usando los medios convencionales (XLD y Hektoen) y CHROMagar Salmonella plus base, respectivamente. Esta variable se midió mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

Donde:

VP: Verdaderos positivos

FN: Falsos negativos

- **Especificidad:** La especificidad del aislamiento de Salmonella, usando los medios convencionales (XLD y Hektoen) y CHROMagar Salmonella plus respectivamente. Esta variable se midió mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$$

Donde:

VN: Verdaderos negativos

FP: Falsos positivo

### 3.4 Población y muestras

La población en estudio no fue sometida a ninguna exclusión demográfica. Sin embargo, las muestras de heces que fueron derivadas al área de microbiología para el examen de coprocultivo debieron presentar las condiciones pre analíticas establecidas en el manual de toma de muestra ML-TN-02. Ver. 5 de Multilab laboratorio clínico. Dichas condiciones son las siguientes: suspensión de antibióticos 72 horas antes de la recolección de la muestra, muestras no contaminadas y transporte de la muestra en un tiempo no mayor a las 2 horas próximas de su recolección. Las muestras que no cumplieran con las condiciones referidas, fueron excluidas del trabajo de investigación.

### 3.5 Instrumentos

Para la recolección de los datos referidos a las variables de esta investigación, se utilizaron los siguientes materiales, equipos, reactivos, medios y cepas de control:

- **Materiales para la recolección de muestra:** frascos estériles de boca ancha, fondo plano y tapa rosca y medio de transporte Cary Blair.
- **Materiales de laboratorio:** asa bacteriológica, portaobjetos y cubreobjetos, guantes de látex, mascarilla, mechero de Bunsen, placas Petri 100 x 15 mm estériles, tubos de vidrio tapa rosca estériles y gradillas.
- **Equipos:** estufa con temperaturas entre 36,5 y 37,5° C y estufa con temperaturas entre 41,2 y 42,2°C.
- **Reactivos:** reactivo de Kovacs, y antisueros polivalentes O y H.
- **Medios de cultivo:** agar XLD, agar Hektoen, caldo selenito y CHROMagar Salmonella Plus, agar citrato de Simmons, agar lisina descarboxilasa (LIA), agar triple azúcar hierro (TSI), agar Urea y agar movilidad, indol, ornitina (MIO).
- **Cepas control:** Se probó la esterilidad, la respuesta del cultivo y las reacciones cromogénicas de cada lote de medios con las siguientes cepas de referencia: *Salmonella Choleraesuis* ATCC 10708 y *Salmonella Paratyphi A* ATCC 11511 y *Eschericia coli* ATCC 25922.

### **3.6 Procedimiento**

El procedimiento desarrollado para obtener los datos referidos a las variables de la investigación abarcó la recolección y manejo de las muestras, aislamiento primario y prueba serológica.

#### ***3.6.1. Recolección y manejo de muestras***

a) Las muestras para la evaluación macroscópica y microscópica se colectaron en frasco estéril de boca ancha, fondo plano y tapa rosca y fueron rotuladas con tres datos de identificación (nombres, apellidos y edad) y el código interno de laboratorio.

b) Las muestras de heces destinadas para el cultivo (coprocultivo), se traspasaron al medio de transporte Cary – Blair y se mantuvieron a temperatura ambiente para su posterior siembra.

c) En el primer día se realizó el examen macroscópico de las heces para la determinación del aspecto, color, consistencia y la búsqueda de moco y/o sangre y el examen microscópico, empleando azul de metileno para la visualización e identificación, y clasificación de leucocitos en polimorfonucleares (PMN) y mononucleares (MN) (reacción inflamatoria), así como también la presencia de hematíes. Se consideró una reacción inflamatoria positiva en aquellas muestras que presenten  $> 5$  leucocitos por campos, parámetro establecido en el manual ML-MB-05. Ver. 10 de Multilab laboratorio clínico.

d) Posteriormente, una vez realizado el estudio macroscópico y microscópico, se pasó a tomar una pequeña muestra de heces con ayuda del medio de transporte Cary - Blair,

para el proceso microbiológico (coprocultivo), siguiendo el protocolo establecido por el área de microbiología de Multilab laboratorio clínico (Anexo A).

### **3.6.2. Aislamiento primario**

- Primer día:

- ✓ Las muestras procedentes de los medios de transporte Cary – Blair se sembraron empleando la técnica de agotamiento en los siguientes medios selectivos: agar XLD, agar entérico Hektoen y CHROMagar Salmonella plus y se incubaron a 36,5 – 37,5°C por 18 - 24 horas en condiciones aeróbicas.

- ✓ Se efectuó la siembra en caldo de enriquecimiento selenito, incubándose a temperaturas entre 41,2 – 42,2 °C durante 12 horas.

- Segundo día:

- ✓ La resiembra a partir del caldo de enriquecimiento selenito se realizó sobre el agar XLD, agar entérico Hektoen y CHROMagar Salmonella plus, colocando una asada de 10 µl del caldo de enriquecimiento sobre los medios respectivamente indicados. Se estriaron por agotamiento y se pasaron a incubar a 36,5 – 37,5 °C por 18 - 24 horas en atmósfera aerobia.

- ✓ Para la búsqueda de colonias sospechosas de *Salmonella* spp., se realizó la lectura de los medios selectivos sembrados en el primer día (agar XLD, agar entérico Hektoen y CHROMagar Salmonella plus).

- ✓ En el agar XLD para el aislamiento de Salmonella, se buscaron colonias incoloras con centro negro (Anexo B. Figura 4).

✓ En el agar entérico Hektoen para el aislamiento de *Salmonella spp.*, se buscaron colonias verdes azuladas con centro negro (Anexo B. Figura 5).

✓ En el CHROMagar Salmonella plus para el aislamiento de *Salmonella spp.*, se consideró a las 24 horas, colonias color malva claro de bordes definidos, presentando a las 48 horas un color malva más intenso (Anexo B. Figura 5).

✓ Considerar que a las 24 horas de incubación la apariencia de las colonias de *Salmonella spp.* podrá ser similar a *Pseudomonas aeruginosa*, por lo que se debe correlacionar con la morfología presente en el medio XLD. Se puede realizar la prueba de oxidasa para descartar *Pseudomonas aeruginosa* o dejar 24 horas más de incubación para la diferenciación de colonias.

✓ Para la identificación diferencial de las colonias sospechosas de *Salmonella spp.* se tomaron 3 – 4 colonias a partir del agar XLD y agar entérico Hektoen con las siguientes características: colonias incoloras con centro negro y colonias verdes azuladas con centro negro, respectivamente. Estas colonias se sembraron en los medios diferenciales TSI, LIA y urea.

✓ Para la identificación diferencial de las colonias sospechas de *Salmonella spp.*, se tomó 1 colonia del medio CHROMagar Salmonella plus con las siguientes características: colonias color malva, convexas y con bordes regulares, que fueron sembradas en los medios diferenciales: TSI, LIA, urea.

- Tercer día:

En esta etapa se realizó la lectura del agar XLD, Agar entérico Hektoen y CHROMagar Salmonella plus, sembrados en caldo de enriquecimiento selenito, así como también la lectura de los medios diferenciales para la presunta identificación de *Salmonella spp.*

✓ Para la lectura en el agar XLD empleado para el aislamiento de *Salmonella* spp. se buscaron colonias incoloras con centro negro (Anexo B. Figura 4).

✓ En el agar entérico Hektoen para el aislamiento de *Salmonella* spp. se buscaron colonias verdes azuladas con centro negro (Anexo B. Figura 4).

✓ En el CHROMagar Salmonella plus para el aislamiento de *Salmonella* spp. se consideró, a las 24 horas colonias color malva claro de bordes definidos, presentando a las 48 horas un color malva más intenso (Anexo B. Figura 3).

✓ Se debe tener en cuenta que a las 24 horas de incubación la apariencia de las colonias de *Salmonella* spp. podrá ser similar a *Pseudomonas aeruginosa*, por lo que se debe correlacionar con la morfología presente en el medio XLD. Se puede realizar la prueba de oxidasa para descartar *Pseudomonas aeruginosa* rápidamente o dejar 24 horas más de incubación para la diferenciación de colonias.

✓ Para la identificación diferencial de las colonias sospechosas de *Salmonella* spp. se tomaron 3 – 4 colonias a partir del agar XLD y agar entérico Hektoen con las siguientes características: colonias incoloras con centro negro y colonias verdes azuladas con centro negro, respectivamente. Estas colonias se sembraron en los medios diferenciales: TSI, LIA, urea, MIO y citrato.

✓ Para la identificación diferencial de las colonias sospechas de *Salmonella* spp., se tomó 1 colonia del CHROMagar Salmonella plus con las siguientes características: Colonias color malva, convexas y con bordes regulares, las cuales se sembraron en los medios diferenciales: TSI, LIA, urea, MIO y citrato.

- Cuarto día:
  - ✓ Se realizó la lectura de los medios diferenciales: TSI, LIA, MIO, urea y citrato (Anexo C).
  - ✓ Ejecución de pruebas serológicas para la confirmación de *Salmonella* spp. (Anexo D).

### **3.6.3. Prueba serológica**

- ✓ La identificación de *Salmonella* spp. se determinó mediante el uso de antisueros polivalentes para la identificación del antígeno O y H del género salmonella.
- ✓ Se realizó la identificación por serología a partir de los medios diferenciales identificados como *Salmonella* spp., usando como muestras colonias del medio TSI (Anexo D).

### **3.6.4. Aglutinación en lámina**

- ✓ Se preparó una suspensión bacteriana homogénea, tomando una asada del medio TSI y se disolvió en una gota de solución salina. Si se observaba autoaglutinación no se proseguía con la prueba.
- ✓ Colocar frente a la suspensión una gota (0,02 ml) de antisuero polivalente O y una gota de antisuero polivalente H, ambas por separadas.
- ✓ Mezclar ambas gotas, moviendo la lámina en vaivén aproximadamente por 15 veces para una mezcla optima y realizar la lectura.

- ✓ Si se aprecia la reacción de aglutinación para ambos antígenos, se considerará positivo y quedará determinada la identificación de *Salmonella* spp.
  
- ✓ Si se observa solo la reacción de aglutinación para un antígeno, se considerará negativo y se descartará la identificación de *Salmonella* spp.

### **3.7 Análisis de los datos**

El procesamiento y análisis de los datos comprendió, primeramente, los cálculos de la sensibilidad y especificidad de los medios CHROMagar Salmonella, XLD y Hektoen, determinando las tasas de falsos positivos y falsos negativos y aplicando las fórmulas respectivas a cada uno de estos medios. Seguidamente, se utilizó la prueba estadística Chi cuadrada ( $\chi^2$ ) descrita por McNemar con un nivel de significancia de 0,05 a fin de determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre la proporción de positivos confirmados por el medio CHROMagar Salmonella y la proporción de positivos confirmados por los medios XLD y Hektoen. Los datos fueron procesados y analizados a través del programa Excel 2016.

## IV. RESULTADOS

De un total de 367 muestras de heces, se aisló antes del enriquecimiento con caldo selenito un total de 30 aislados de *Salmonella* spp. y después del enriquecimiento con caldo selenito, se obtuvieron 46 aislados de *Salmonella* spp. en al menos un medio de cultivo evaluado, considerando una sensibilidad del 100 % respectivamente.

### 4.1. Sensibilidad y especificidad del medio de cultivo CHROMagar Salmonella Plus

Los resultados obtenidos sobre un total de 367 muestras en el medio de cultivo CHROMagar Salmonella Plus antes del enriquecimiento con caldo selenito arrojaron 23 verdaderos positivos, 10 falsos positivos, 327 verdaderos negativos y 07 falsos negativos, obteniendo una sensibilidad del 76,7 % (Tabla 9).

En cuanto a los resultados post-enriquecimiento con caldo selenito en las 367 muestras, se obtuvieron 44 verdaderos positivos, 04 falsos positivos, 317 verdaderos negativos y 02 falsos negativos, evidenciando un incremento en los verdaderos positivos y una sensibilidad de 95,6% lo cual viene a mostrar que luego del enriquecimiento el medio de cultivo CHROMagar Salmonella Plus, incrementó la capacidad de detección de *Salmonella* spp. (Tabla 10).

**Tabla 9**

*Sensibilidad del medio de cultivo CHROMagar Salmonella Plus pre-enriquecimiento*

<b>CHROMagar</b>	<b>Verdaderos</b>	<b>Falsos</b>	<b>Sensibilidad</b>
<b>Positivos</b>	23	10	76,7%
<b>Negativos</b>	327	07	

Se recuperaron un total de 30 aislamientos en al menos un medio antes del enriquecimiento (sensibilidad, 100%)

**Tabla 10**

*Sensibilidad del medio de cultivo CHROMagar Salmonella Plus post-enriquecimiento*

<b>CHROMagar</b>	<b>Verdaderos</b>	<b>Falsos</b>	<b>Sensibilidad</b>
<b>Positivos</b>	44	04	95,6%
<b>Negativos</b>	317	02	

Se recuperaron un total de 46 aislamientos en al menos un medio antes del enriquecimiento (sensibilidad, 100%)

Respecto a los resultados referidos a la especificidad del medio de cultivo CHROMagar antes del enriquecimiento con caldo selenito, estos arrojaron 23 verdaderos positivos, 10 falsos positivos, 327 verdaderos negativos y 7 falsos negativos, obteniendo una especificidad del 97.1%, confirmándose una alta eficacia en la capacidad de la prueba para la detección de los individuos sanos (Tabla 11).

**Tabla 11**

*Especificidad del medio de cultivo CHROMagar Salmonella plus antes del enriquecimiento*

<b>CHROMagar</b>	<b>Verdaderos</b>	<b>Falsos</b>	<b>Especificidad</b>
<b>Positivos</b>	23	10	97,1%
<b>Negativos</b>	327	07	

Referente a los resultados obtenidos post- enriquecimiento con caldo selenito, se obtuvieron 44 verdaderos positivos, 04 falsos positivos, 317 verdaderos negativos y 02 falsos negativos, obteniendo una especificidad de 98,8%, lo que evidencia un incremento en la eficacia de la prueba para la detección de individuos sanos (Tabla 12).

De los falsos positivos aislados en el CHROMagar Salmonella plus antes del enriquecimiento, se identificaron: 1.9 % de *Pseudomonas spp.* y 0.81 % de *Candida spp.* y después del enriquecimiento, se identificaron: 0.81 % de *Pseudomonas spp.* y 0.27 % de *Candida spp.* Para la exclusión de los géneros *Pseudomonas spp.* y *Candida spp.* se utilizó el test de oxidasa y examen directo, respectivamente.

**Tabla 12**

*Especificidad del medio de cultivo CHROMagar Salmonella plus posterior al enriquecimiento*

<b>CHROMagar</b>	<b>Verdaderos</b>	<b>Falsos</b>	<b>Especificidad</b>
<b>Positivos</b>	44	04	98,8%
<b>Negativos</b>	317	02	

#### **4.2. Sensibilidad y especificidad de los medios de cultivo XLD y HEA**

Al observar los resultados de la sensibilidad del medio de cultivo XLD antes del enriquecimiento con caldo selenito, se puede apreciar que su valor es de 43,3%, reflejándose 13 verdaderos positivos, 51 falsos positivos, 286 verdaderos negativos y 17 falsos negativos (Tabla 13).

**Tabla 13**

*Sensibilidad del medio de cultivo XLD antes de enriquecimiento*

<b>XLD</b>	<b>Verdaderos</b>	<b>Falsos</b>	<b>Sensibilidad</b>
<b>Positivos</b>	13	51	43,3%
<b>Negativos</b>	286	17	

Se recuperaron un total de 30 aislamientos en al menos un medio antes del enriquecimiento (sensibilidad, 100%)

Posterior al enriquecimiento con caldo selenito, se pudo evidenciar un incremento en la sensibilidad expresado en 67,4%. También es importante señalar que los valores para los positivos fueron: 31 verdaderos positivos, 35 falsos positivos, mientras que para los negativos fue de: 286 verdaderos negativos y 15 falsos negativos, pudiéndose observar una mejora en la sensibilidad del medio de cultivo XLD para detecta *Salmonella* spp. luego del enriquecimiento (Tabla 14).

**Tabla 14**

*Sensibilidad del medio de cultivo XLD después de enriquecimiento*

<b>XLD</b>	<b>Verdaderos</b>	<b>Falsos</b>	<b>Sensibilidad</b>
<b>Positivos</b>	31	35	67,4%
<b>Negativos</b>	286	15	

Se recuperaron un total de 48 aislamientos en al menos un medio antes del enriquecimiento (sensibilidad, 100%)

Antes de ser sometido al enriquecimiento con caldo de selenito, el medio de cultivo XLD mostró una especificidad 85 % con los siguientes valores positivos y negativos: 13 verdaderos positivos, 51 falsos positivos, 286 verdaderos negativos y 17 falsos negativos, evidenciando estos resultados una buena capacidad del medio para detectar ausencia de enfermedad (Tabla 15).

**Tabla 15**

*Especificidad del medio de cultivo XLD antes de enriquecimiento*

<b>XLD</b>	<b>Verdaderos</b>	<b>Falsos</b>	<b>Sensibilidad</b>
<b>Positivos</b>	13	51	85 %
<b>Negativos</b>	286	17	

Esta capacidad se elevó después del enriquecimiento y se expresó en 89,1% de especificidad con los siguientes valores positivos y negativos: 31 verdaderos positivos, 35 falsos positivos, 286 verdaderos negativos y 15 falsos negativos (Tabla 16). De los falsos positivos aislados en el agar XLD antes del enriquecimiento, se identificaron: 12,8 % de *Proteus* spp, 1,09 % *Citrobacter* spp. y después del enriquecimiento: 8.7 % de *Proteus* spp., 0.54 % de *Citrobacter* spp. y 0.27 % de *Edwardsiella tarda*.

**Tabla 16**

*Especificidad del medio de cultivo XLD después de enriquecimiento*

<b>XLD</b>	<b>Verdaderos</b>	<b>Falsos</b>	<b>Sensibilidad</b>
<b>Positivos</b>	31	35	89,1%
<b>Negativos</b>	286	15	

En cuanto a los resultados de sensibilidad del medio de cultivo Hektoen (HE) antes del enriquecimiento con caldo selenito, se puede observar que los valores positivos fueron: 16 verdaderos positivos, 20 falsos positivos y los valores negativos fueron: 317 verdaderos negativos y 14 falsos negativos, presentando una sensibilidad del 53,3% (Tabla 17).

**Tabla 17**

*Sensibilidad del medio de cultivo HE antes de enriquecimiento*

<b>XLD</b>	<b>Verdaderos</b>	<b>Falsos</b>	<b>Sensibilidad</b>
<b>Positivos</b>	16	20	53,3%
<b>Negativos</b>	317	14	

Se recuperaron un total de 30 aislamientos en al menos un medio antes del enriquecimiento (sensibilidad, 100%)

Referente a la sensibilidad post – enriquecimiento con caldo selenito fue de 73.9 %, apreciándose un aumento de esta y en donde se obtuvieron los siguientes resultados: 34 verdaderos positivos, 11 falsos positivos, 310 verdaderos negativos y 12 falsos negativos, pudiéndose observar una mejora en la sensibilidad del medio de cultivo HE luego enriquecimiento (Tabla 18).

**Tabla 18**

*Sensibilidad del medio de cultivo HE después de enriquecimiento*

<b>XLD</b>	<b>Verdaderos</b>	<b>Falsos</b>	<b>Sensibilidad</b>
<b>Positivos</b>	34	11	73,9%
<b>Negativos</b>	310	12	

Se recuperaron un total de 48 aislamientos en al menos un medio antes del enriquecimiento (sensibilidad, 100%)

En relación a los valores de la especificidad del medio de cultivo HEA, antes del enriquecimiento con caldo de selenito, este arrojó un valor de 94,2 %, con 16 verdaderos positivos, 20 falsos positivos, 317 verdaderos negativos y 14 falsos negativos (Tabla 19).

**Tabla 19**

*Especificidad del medio de cultivo HEA antes de enriquecimiento*

<b>XLD</b>	<b>Verdaderos</b>	<b>Falsos</b>	<b>Sensibilidad</b>
<b>Positivos</b>	16	20	94,2 %
<b>Negativos</b>	317	14	

Luego de haberse realizado el enriquecimiento la especificidad se elevó a 96,6% con los siguientes valores de positivos y negativos: 34 verdaderos positivos, 11 falsos positivos, 309 verdaderos negativos y 12 falsos negativos (Tabla 20). De los falsos positivos aislados en

el agar HE antes del enriquecimiento se identificó: 5.44 % de *Proteus* spp y después del enriquecimiento: 2.72 % de *Proteus* spp. y 0.27 % de *Citrobacter* spp.

**Tabla 20**

*Especificidad del medio de cultivo HEA después de enriquecimiento*

<b>XLD</b>	<b>Verdaderos</b>	<b>Falsos</b>	<b>Sensibilidad</b>
<b>Positivos</b>	34	11	
<b>Negativos</b>	310	12	96,6%

#### **4.3. Comparación de la sensibilidad y especificidad del medio CHROMagar Salmonella plus con los medios de cultivo XLD y HEA**

La comparación de los tres medios CHROMagar Salmonella plus, XLD y HEA se realizó antes y después del enriquecimiento. Con relación a la tasa de falsos positivos y falsos negativos, datos claves en la medición de la sensibilidad y la especificidad de los tres medios, se pudo determinar que el CHROMagar Salmonella plus presenta las mejores mediciones de estas variables antes y después del enriquecimiento. Antes del enriquecimiento, en el aislamiento primario, CHROMagar Salmonella plus presenta una tasa de 30% de falsos positivos y 2,1% de falsos negativos. Estos valores se reducen en el post-enriquecimiento, expresándose en tasas de falsos positivos y falsos negativos de 8,3% y 0,6% respectivamente. Al comparar estos datos de falsos positivos y negativos antes y después del enriquecimiento con el medio XLD, se puede notar que este medio presenta tasas mucho más elevadas que la del medio CHROMagar Salmonella plus, ya que estas tasas de falsos positivos y falsos negativos antes del enriquecimiento fueron 79% y 5.6% respectivamente, mientras que después del enriquecimiento se expresaron en valores de 53,03% de falsos positivos y 4,9% de falsos

negativos. Cuando se comparan los datos de falsos positivos y negativos de CHROMagar Salmonella plus con el de medio de cultivo HEA, las diferencias son menores, ya que los resultados de este medio reportan 55,6% de falsos positivos y 4,2% de falsos negativos antes del enriquecimiento y de 24,4% de falsos positivos y 3,7% de falsos negativos posterior al enriquecimiento (Tabla 21).

**Tabla 21**

*Tasa de falsos positivos y falsos negativos de los tres medios antes y después de enriquecimiento*

Medios	Antes de enriquecimiento		Después de enriquecimiento	
	Tasa de F.P	Tasa de F.N	Tasa de F.P	Tasa de F.N
<b>CHROMagar</b>	30%	2,1%	8,3%	0,6%
<b>XLD</b>	79%	5,6%	53,03%	4,9%
<b>XEA</b>	55,6%	4,2%	24,4%	3,7%

Respecto a la comparación de la sensibilidad y especificidad de CHROMagar Salmonella plus con los medios XLD y HEA antes del enriquecimiento, CHROMagar Salmonella plus presenta el mayor nivel de sensibilidad con 76,7% frente a 43,3% del medio XLD y 53,3% del medio HEA. Los valores referidos a la especificidad muestran igualmente un mayor porcentaje para el CHROMagar Salmonella plus en comparación con los medios de cultivo XLD y HEA reflejado en 97,1%, 85% y 94,2% respectivamente (Tabla 22). Estos resultados muestran que, tanto en la sensibilidad como en la especificidad el medio de cultivo CHROMagar Salmonella plus presenta un mayor nivel cuantitativo sobre todo cuando se compara con el medio de cultivo XLD.

**Tabla 22**

*Comparación de sensibilidad y especificidad de CHROMagar con los medios de cultivo XLD y HEA (pre-enriquecimiento)*

	<b>CHROMagar</b>	<b>XLD</b>	<b>HEA</b>
<b>Sensibilidad</b>	76,7%	43,3%	53,3%
<b>Especificidad</b>	97,1%	85 %	94,2%

Respecto a los valores de los tres medios de cultivo post enriquecimiento con caldo selenito, se puede observar que el medio CHROMagar Salmonella plus presenta un 95,6% de sensibilidad contra 67,4% del medio XLD y 73,9% del HEA, evidenciando con ello que el primero de los medios señalados presenta mejores niveles de sensibilidad con relación a los medios XLD y HEA, En cuanto a la especificidad se aprecia que CHROMagar Salmonella plus presenta el valor más alto expresado en un 98,8% seguido muy de cerca por el medio HEA con 96,6% y 89,1% de XLD (Tabla 23). Con estos resultados se muestra que el medio CHROMagar Salmonella plus presenta un mejor nivel de especificidad que el medio HEA seguido del XLD.

**Tabla 23**

*Comparación de sensibilidad y especificidad de CHROMagar con los medios de cultivo XLD y HEA (post-enriquecimiento)*

	<b>CHROMagar</b>	<b>XLD</b>	<b>HEA</b>
<b>Sensibilidad</b>	95,6%	67,4%	73,9%
<b>Especificidad</b>	98,8%	89,1%	96,6%

A fin de determinar y precisar si las diferencias entre el medio CHROMagar Salmonella plus y los medios de cultivo XLD y HEA son significativas, se procedió a aplicar una medición estadística al respecto. Dicha medición se sustentó en el estadístico de McNemar, que

constituye una prueba no paramétrica de comparación de proporciones para dos muestras relacionadas, ajustándose a la distribución chi cuadrado ( $\chi^2_{MN}$ ) y en un nivel nominal. La aplicación de esta prueba permitió comprobar las hipótesis del estudio sobre la existencia de diferencias significativas entre el medio CHROMagar Salmonella y los medios XLD y HEA en la detección de *Salmonella* spp. a partir de muestras de heces, estableciendo si la proporción de presuntivos confirmados por el medio CHROMagar Salmonella es o no estadísticamente diferente a la proporción de positivos confirmados por los medios XLD y HEA.

Los resultados sobre si existen diferencias significativas entre el medio CHROMagar Salmonella y los medios XLD y HEA en la detección de *Salmonella* spp., se obtuvieron comparando el primero de los medios mencionados con cada uno los medios (XLD y HEA), determinando la mayor eficacia entre el medio CHROMagar Salmonella en comparación particular con cada uno de los medios en cuestión. Al comparar las proporciones de presuntivos confirmados a través del medio CHROMagar Salmonella y XLD, utilizando McNemar con Excel 16, se obtuvo un chi cuadrado de McNemar igual a 16.00 ( $\chi^2_{MNC} = 16,00$ ), mayor que el chi cuadrado esperado igual a 3,8415 ( $\chi_e^2 = 3,8415$ ) para 0,05 de valor crítico ( $\alpha = 0,05$ ), 1 grado de libertad ( $gl = 1$ ) y con  $P < 0,05$  (Tabla 24). Con base en la regla de decisión de la prueba chi cuadrado, donde se establece que si el chi cuadrado calculado ( $\chi^2_{MNC}$ ) es mayor que el chi cuadrado esperado, se rechaza la hipótesis nula, se puede afirmar que en esta investigación se determinó que existen diferencias significativas entre el medio CHROMagar Salmonella y el medio XLD y que, por lo tanto, el CHROMagar Salmonella plus presenta mayor eficacia que el medio XLD en la detección de *Salmonella* spp. con un nivel de confianza de 95%.

**Tabla 24**

*Resultado de la prueba Chi Cuadrado McNemar CHROMagar/XLD*

		CHROMAG		Totales
		V. POSIT.(2)	F. POSIT. (1)	
XLD	V.POSIT(2)	21	2	23
	F.POSIT(1)	23	2	25
	Totales	44	4	<b>48</b>
$\chi^2_{MNC} = 16,00 > \chi_e^2 = 3,8415$ ( $\alpha=0,05$ y $gl=1$ ) $P < 0,05$				

La comparación entre el medio CHROMagar Salmonella plus mediante la prueba chi cuadrado de McNemar arrojó un chi cuadrado calculado de 4,00 ( $\chi^2_{MNC} = 4,00$ ), mayor que el chi cuadrado esperado o de la tabla que es igual a 3,8415 ( $\chi_e^2 = 3,8415$ ) para 0,05 de valor crítico ( $\alpha=0,05$ ), 1 grado de libertad ( $gl=1$ ), y con  $P < 0,05$  (Tabla 25). Partiendo de la regla de decisión de la prueba utilizada en la que se señala que si el chi cuadrado calculado ( $\chi^2_{MNC}$ ) es mayor o igual al chi cuadrado esperado ( $\chi_e^2$ ), se rechaza la hipótesis nula, se puede afirmar que en esta investigación se determinó que existen diferencias significativas entre el medio CHROMagar Salmonella y el medio HEA y que, por lo tanto, el CHROMagar Salmonella plus y HEA presentan una leve mayor eficacia en la detección de *Salmonella* spp. con un nivel de confianza de 95%.

**Tabla 25**

*Resultado de la prueba Chi Cuadrado McNemar CHROMagar/HEA*

		CHROMAG		Totales
		V. POSIT.(2)	F. POSIT. (1)	
XLD	V.POSIT(2)	33	1	34
	F.POSIT(1)	8	3	11
	Totales	41	4	<b>45</b>
$\chi^2_{MNC} = 4,00 > \chi_e^2 = 3,8415$ ( $\alpha=0,05$ y $gl=1$ )				

## V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos para conocer los niveles de sensibilidad y especificidad del medio de cultivo CHROMagar Salmonella Plus y los medios XLD y HEA se inscriben dentro de lo que viene a ser la validez del diagnóstico y detección de Salmonella, en el sentido que, tal como señalan diversos autores, permite dar respuestas a dos interrogantes claves como: a) si la enfermedad está presente ¿Cuál es la posibilidad de que el resultado de la prueba diagnóstica sea positivo y b) si la enfermedad no está presente ¿Cuál es la probabilidad de que el resultado sea negativo? (Ochoa y Orejas, 1999; Vizcaíno-Salazar, 2017; Fernández y Díaz, 2004). En ese sentido, el abordaje de los conceptos de sensibilidad y especificidad fue clave en este estudio a efectos de determinar en qué medida los medios estudiados responden con eficacia a las dos interrogantes planteadas.

Con relación a los datos de la sensibilidad y especificidad reportados en el medio de cultivo CHROMagar Salmonella Plus, estos muestran un mejoramiento significativo de antes del enriquecimiento (Sensibilidad:76,7% - Especificidad: 97,1%) a después del enriquecimiento (Sensibilidad: 95,6% - Especificidad: 98,8%). Trabajos realizados muestran resultados congruentes con estos, donde la sensibilidad en medios cromogénicos de Salmonella (SCM:Oxoid) se incrementó de antes del enriquecimiento (Sensibilidad: 34,1%) a después del enriquecimiento (Sensibilidad: 100%), aun cuando la especificidad disminuyó levemente después del enriquecimiento (Especificidad antes del enriquecimiento: 98,5% - Especificidad después del enriquecimiento:95,8%) (Cassar & Cuschieri, 2003). Otros estudios comparativos con el medio CHROMagar Samonella muestran incrementos en la sensibilidad antes y después, de 95% a 100% y de la especificidad antes y después de 88,9% a 96,7 % (Gaillot et al., 1999).

De acuerdo con los resultados obtenidos y los datos de otros estudios, se puede afirmar que la validez de la prueba del medio de cultivo CHROMagar Salmonella Plus reafirma la

eficacia de dicho medio en lo relativo a la sensibilidad y especificidad para el diagnóstico y detección de *Salmonella*. Esto se reafirma con lo que señalan otros estudios previos donde se refiere que la medición de la sensibilidad y especificidad es plenamente aplicable a investigaciones donde se maneja un gran número de muestras a bajo costo y se pretende obtener resultados rápidos que garanticen una medición lo más exacta posible de presuntivos positivos y negativos (López, 2004; Ruiz et al., 2018). Igualmente, la verificación de la alta sensibilidad y especificidad del medio en estudio es coherente con lo que reportan otras investigaciones en las que se señala que los medios cromogénicos facilitan la mejor distinción de diferentes géneros de microorganismos en cultivos mixtos, garantizando una mayor eficacia diagnóstica en la detección y, por lo tanto, su mejor estatus como medio para la detección e identificación presuntiva de salmonelas en heces. (Tsoraeva et al., 2008; Pérez et al., 2003).

En la determinación de la sensibilidad y especificidad de los medios de cultivo XLD y HEA, se pudo observar que estos medios presentaban baja sensibilidad (XLD=43,3%; HEA=53,3%) y una alta especificidad (XLD= 85%; HEA= 94,2%) antes del enriquecimiento. Luego del enriquecimiento ambos cultivos presentaron incrementos en la sensibilidad (XLD= 67,4%; HEA= 73,9%) y en la especificidad (XLD= 89,1%; HEA=96,6%). En los porcentajes mostrados se aprecia que el medio HEA presenta una mayor sensibilidad y especificidad antes y después de realizado el enriquecimiento. A dichos resultados se debe agregar que las tasas de falsos positivos y falsos negativos fueron superiores en el medio XLD respecto al medio HEA, hecho este que se asocia a las diferencias favorables a HEA en cuanto a sensibilidad y especificidad.

Se debe destacar que en investigaciones previas sobre estos medios se muestra que se aplican, en el caso del agar XLD, para el aislamiento y diferenciación de Enterobacterias, específicamente de especies de *Salmonella* y *Shigella* (Hurtado, 2001; Murray et al., 2004;

González, et al., 2014), mientras que el medio de cultivo HEA es empleado para el aislamiento de bacterias intestinales patógenas, inclusive *Shigella* a partir de diversos materiales y de muestras fecales (APHA, 1984; González et al., 2014). En ese sentido, estos dos medios de tipo convencional son utilizados en el desarrollo de la etapa de aislamiento en medios selectivos y diferenciales, por lo que son considerados una alternativa para la identificación y detección de *Salmonella*, evaluándolos con otros medios como CHROMagar *Salmonella* plus.

La comparación de la sensibilidad y especificidad del medio CHROMagar *Salmonella* plus con la sensibilidad y especificidad de los medios de cultivo XLD y HEA evidenció que ese medio presentó mejores porcentajes para estas variables, sobre todo cuando se hizo la comparación entre el CHROMagar y el medio XLD, donde detectó una mayor capacidad del primero respecto al segundo. Asimismo, el estudio reflejó que la tasa porcentual de falsos positivos y falsos negativos de CHROMagar *Salmonella* plus fue menor que la de los otros dos medios, presentándose mayor diferenciación a favor de este cuando se le comparó con XLD.

En estudios realizados se logró determinar que la utilización de medios cromogénicos evidenciaban mayor especificidad y sensibilidad cuando se les comparaba con medios convencionales empleados para la identificación y detección de *Salmonella*, aspecto que se reflejó en una disminución en la identificación de crecimientos falsos positivos como *Proteus* spp., así como en la detección de serotipos de *Salmonella* que no producen o producen una baja concentración de sulfuro de hidrogeno, como el caso de *Salmonella* Typhi, lo que evita el error de identificación en el que frecuentemente se incurre en medios de cultivo convencionales (Gaillot et al., 1999; Kuijpers et al., 2018).

Los resultados presentados respecto a la comparación entre el medio CHROMagar *Salmonella* plus y el agar XLD confirman lo que arrojan estudios previos donde al establecer la comparación entre estos dos medios, se pudo determinar que la especificidad para la

detección de *Salmonella* después de la siembra primaria en el medio CHROMagar fue de 83%, y la de SS y XLD de 55%, evidenciando el medio CHROMagar una mayor facilidad para la exclusión de falsos positivos, entre los que se encontraron *Cándida* spp. (59%) y *Pseudomonas* spp. (28%). (Maddocks et al., 2002).

En esta investigación se determinó que entre CHROMagar *Salmonella* plus y el agar XLD existían diferencias importantes respecto a la sensibilidad y especificidad favorables al primero. Se comprobó que las tasas de falsos positivos y falsos negativos fueron mayores en el medio XLD. Al aplicar la prueba McNemar con distribución de chi cuadrado, se pudo rechazar la hipótesis nula y confirmar que estas diferencias eran significativas y, por lo tanto, que el CHROMagar *Salmonella* plus presenta una mayor eficacia que el medio XLD en la detección de *Salmonella* spp. a partir de muestras de heces.

En cuanto a la comparación de CHROMagar con agar Hektoen (HEA), los resultados presentados tienen relación con estudios donde se estableció comparación entre estos dos medios (BBL CHROMagar *Salmonella* y agar entérico Hektoen), en los que se observó que el primero de estos medios presentó una mayor sensibilidad y especificidad, donde el número de aislamientos falsos positivos obtenidos de las muestras de heces con resultados desconocidos, fue menor en BBL CHROMagar *Salmonella* que en HEA (Eigner et al., 2001).

Así también, otra investigación donde se realizó la comparación entre el medio CHROMagar *Salmonella* y el agar HE tiene congruencia con los hallazgos realizados en este trabajo indagatorio, en el sentido de que ambos medios presentan leves diferencias en la sensibilidad antes del enriquecimiento con caldo Tetrionato Muller – Kauffmann (95% y 80 % respectivamente) y el mismo porcentaje de sensibilidad (100%) para ambos medios luego del enriquecimiento. Asimismo, se determinó que ambos medios presentaban pocas diferencias en la especificidad antes del enriquecimiento (CHROMagar=88,9%; HEA=78,5%) y después

del enriquecimiento (CHROMagar=96,7%; HEA=88,7%), pudiéndose evidenciar que ambos medios incrementaron sensibilidad y especificidad luego del enriquecimiento, tal como se mostró en esta investigación, con una similar eficacia en la detección de presuntivamente positivos y negativos (Gaillot et al., 1999).

Se debe señalar que el resultado de esta investigación en la comparación realizada entre CHROMagar y HEA también presenta divergencias con otra investigación, sobre todo en lo que se refiere a la sensibilidad, donde el medio HEA presentó mejores niveles en esta variable al compararlo con CHROMagar en la siembra primaria y en el post enriquecimiento, mientras que en la especificidad CHROMagar salmonella presentó mejores valores en la siembra primaria y posterior al enriquecimiento selectivo que el agar HEA. A ello se debe agregar que en la investigación de referencia se verificaron mayores porcentajes de falsos positivos en el medio de cultivo CHROMagar con relación al Hektoen (Pérez et al., 2003), indicando la poca diferencia entre los dos medios en cuanto a su capacidad para la detección de presuntos positivos y negativos.

Los estudios de comparación entre CHROMagar y HEA que sirven de referencia tienen congruencia con los resultados de esta investigación, en cuanto al hecho de que aun cuando existen diferencias en la sensibilidad y especificidad entre los medios mencionados, dichas diferencias no se consideran de alta significación, lo que permite afirmar que los dos medios presentan capacidades equivalentes en la detección de casos positivos y negativos relacionados con Salmonella. Sin embargo, su rapidez y seguridad que presenta el medio CHROMagar en la identificación y detección de Salmonella, llevan a considerarlo como una opción de primer orden en los estudios bacteriológicos, como medio que facilita la diferenciación de las especies de Salmonella del resto de la microbiota (AOAC, 2013).

## VI. CONCLUSIONES

1. Los valores de la sensibilidad y especificidad del medio de cultivo CHROMagar Salmonella plus muestran niveles importantes que muestran su eficacia para la detección y diagnóstico de *Salmonella* spp. Los datos arrojados antes y después del enriquecimiento muestran que este agar permite identificar y detectar este microorganismo, favoreciendo una fácil exclusión de falsos positivos, mostrando una elevada tasa de verdaderos positivos y negativos, lo que asegura su utilización en los estudios bacteriológicos dirigidos a comprobar la presencia o no de *Salmonella*.
2. Los datos sensibilidad y especificidad de los medios de cultivo XLD y HEA presentan niveles menores que los mostrados por el CHROMagar Salmonella plus, pudiéndose determinar que, de los dos medios analizados, el HEA presentó mejores porcentajes de sensibilidad y especificidad que el medio XLD. Igualmente, en cuanto a falsos positivos tanto en el pre-enriquecimiento como en el post-enriquecimiento, el medio HEA presentó porcentajes menores que el XLD.
3. La comparación de la sensibilidad y especificidad de CHROMagar Salmonella plus con la de XLD y HEA, reflejó que el primero presenta mejores porcentajes, apreciándose una mayor diferencia porcentual respecto al medio XLD, comprobándose que las diferencias entre el CHROMagar Salmonella plus y XLD son marcadamente significativas, mientras que las diferencias entre CHROMagar y HEA eran significativas, aun cuando no con el grado que había con el medio XLD, lo que permitió afirmar que, en esta investigación, estos dos medios presentaron capacidades medianamente similares para la identificación y detección de *Salmonella* spp.

## VII. RECOMENDACIONES

- Realizar mayor cantidad de investigaciones donde se efectúen pruebas de comprobación de la eficacia del medio CHROMagar al compararlo no solamente con medios como XLD y HEA, sino con otros medios, a fin de solidificar el basamento investigativo científico mediante el cual se pueda determinar con precisión y seguridad la capacidad de este medio para la identificación y detección de Salmonella.
- Continuar en la realización de estudios que permitan comparar la eficacia de los medios XLD y HEA con el propósito de determinar si las diferencias observadas en ésta y otras investigaciones son significativas estadísticamente o responden a situaciones aleatorias no controladas durante la aplicación de un determinado diseño de investigación.
- Hacer seguimiento a otros estudios donde se evalúe la sensibilidad y especificidad del medio CHROMagar antes y después de enriquecimiento, de tal manera que se pueda asegurar su recomendación como medio idóneo para detectar Salmonella en conjunto con otros medios utilizados para tal fin.

## VIII. REFERENCIAS

- Ajene A, Fischer C. & Black R. (2013). Enteric pathogens and reactive arthritis: a systematic review of *Campylobacter*, *Salmonella* and *Shigella* associated reactive arthritis. *Journal of Health Population and Nutrition*, 31(3), 299-307. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmmc/articles/PMC3805878>.
- AOAC (2013). *CHROMagar Salmonella*. <http://www.bd.com/europe/regulatory/>
- Bada, C. & Raymundo, E. (2018). *Incidencia de fiebre tifoidea, fiebre paratifoidea y fiebre de malta en pobladores del AAHH. Villa María del Triunfo*. [Tesis de pregrado]. Universidad Norbert Wiener.
- Barreto, G. y Rodríguez, H. (2012). Acerca de la nomenclatura científica en el caso particular de *Salmonella*. *Revista de Producción Animal*, 24(2), 37-38.
- Betancor, L y Yim, L., (2012). *Salmonella y Salmonelosis*. [http://higiene1.higiene.edu.uy/DByV/Salmonella\\_y\\_salmonelosis.pdf](http://higiene1.higiene.edu.uy/DByV/Salmonella_y_salmonelosis.pdf).
- Biberstein, E. y Chung Zee, Y. (1990). *Tratado de microbiología*. (1ª edición). Acribia.
- Bou, G., Fernández, A., García C., Sáez, J. y Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601-508. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>.
- Bravo-Grau, G. y Cruz, J.P. (2015). Estudios de exactitud diagnóstica: Herramientas para su Interpretación. *Revista Chilena de Radiología*, 21(4), 158-164. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-9308015000400007>.
- Brenner, F.W., Villar, R.J., Ángulo, F.J., Tauxe, R. y Swaminathan, B. (2000). *Salmonella*. Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (7), 2465–2467. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.7.2465-2467.2000>.
- Brito, C., Marques, Borges, N., Ramos, F., Reis, Falavina, E., Rodrigues, D. & Hofer, E. (2010). Serotipos de *Salmonella* de origen humano identificados en el Estado de Pará

- (Brasil) entre 1991 y 2008. *Revista PanAmazonica de Saúde*, 1(1), 93-100. <https://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232010000100014>.
- Campioni, F., Moratto, A. & Falcão, J. (2012). Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella enteritidis* isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. *Food Microbiology*, 32(2), 254-64. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.06.008>.
- Cardona, N., Sánchez, M., Usuga, L., Arboleda, M., Garzón, E., Vélez, A., Wiesner, M., Muñoz, N. & Agudelo, C. (2007). *Caracterización de dos brotes de fiebre tifoidea en Apartadó, Antioquia*. *Biomedica*, 27(2):236-43. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v27i2.219>.
- Carrol, K., Morse, S., Mietznerr, T. & Miller, S. (2016). *Jawetz, Melnick & Adelberg. Microbiología médica*. (27<sup>a</sup> ed.). McGraw-Hill-Interamericana.
- Cassar, R y Cuschieri, P. (2003). Comparisson of *Salmonella* Chromogenic Medium with DCLS for Isolation of *Salmonella* from Stool Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (7), 3229-3232. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.7.3229-3232.2003>.
- CDC (2013). *Surveillance for foodborne disease outbreaks--United States, 2009-2010*. *MMWR Morb Mortal Wkly*. 41-47. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6203a1.htm>.
- CDC (2019). *Brote de infecciones por Salmonella vinculado a papayas frescas enteras de la marca Cavi*. <https://www.cdc.gov/salmonella/uganda-06-19/index-esp.html>.
- CHROMagar. (2017). *Clinical microbiology chromagar salmonella focus on salmonella species*. <http://www.chromagar.com/clinical-microbiology-chromagar-salmonella-focus-on-salmonella-species-27.html#.XeKMHZnKjIU>.

- Crosa, J.H., Brenner, D.J., Ewing, W.H. y Falkow, S. (1973). Molecular relationships among the Salmonellae. *Journal of Bacteriology*, 115,307–315. <https://doi.org/10.1128/jb.115.1.307-315.1973>.
- Crump, J.A. (2014). Updating and refining estimates of typhoid fever burden for public health action. *Lancet Global Health*. 2(10), 551-553. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4404498/>
- Crump, J.A, & Mintz E.D. (2010). Global trends in typhoid and paratyphoid fever. (2010). *Clinical Infectious Diseases*, 50, 241-246. <https://doi.org/10.1086/649541>.
- Delgado, R. (2014). Acerca de la nomenclatura en el caso particular de Salmonella. *MediCiego*, 20(2), 1-3. <http://www.revmediciego.sld.cu/index.php/mediciego/article/view/12>.
- Edwards, P. & Edwing, W. (1972). *Identification of Enterobacteriaceae*. (3<sup>rd</sup> Ed.).Elsevier Science Publishing Co. Inc.
- Eigner, U., Reissbrodt, R., Hammann, R. & Fahr. (2001). Evaluation of a New Chromogenic Medium for the Isolation and Presumptive Identification of Salmonella Species from Stool Specimens. *European Jouurnal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 20, 558–565. <https://doi.org/10.1007/s100960100546>.
- Fernández, P. y Díaz, P. (2004). Cálculo de probabilidades. Nociones básicas. *Cadernos de Atención Primaria*, 11, 176-179. [https://www.agamfec.com/pdf/CADERNOS/VOL11/VOL11\\_3/14\\_Invest\\_N11\\_3.pdf](https://www.agamfec.com/pdf/CADERNOS/VOL11/VOL11_3/14_Invest_N11_3.pdf).
- Gaillot, O., Di Camillo, P., Berche, P., Courcol, R. y Savage, C. (1999). Comparison of CHROMagar Salmonella medium and Hektoen enteric agar or isolation of salmonellae from stool samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(3), 762-765. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.3.762-765.1999>.
- García, F. (2011). *Salmonelosis porcina en España: Prevalencia, factores de riesgo y resistencia antimicrobiana*. Tesis Doctoral. España: Univ. de León. 197 p.

- González, J., Pereira, N., Soto, Z., Hernández, E. y Villarreal, J. (2014). Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección. *Salud Uninorte*, 30 (1), 73-94.
- Grimont, P. & Weill, F. (2007). *Antigenic formulas of the Salmonella serovars*. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. [https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng\\_0.pdf](https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng_0.pdf)
- Havelaar, A.H, Ivarsson S., Löfdahl M., Nauta M.J. (2013). Estimating the true incidence of campylobacteriosis and salmonellosis in European Union, 2009. *Epidemiology & Infection*: 141, 293-302. <https://doi.org/10.1017/S0950268812000568>.
- Hurtado, F. (2001). *Obtención de un hidrolizado proteico utilizando excedentes de la industria pesquera y agrícola. Ingeniero de alimentos*. [Tesis de pregrado]. Escuela Superior Politécnica del Litoral.
- International Organization of Standardization 6579. (2017) *Microbiology of food and animal feeding stuffs horizontal method for the detection of Salmonella spp*. <https://www.iso.org/standard/29315.html#:~:text=ISO%206579%3A2002%20specifies%20a,food%20production%20and%20food%20handling>.
- Keddy, K., Sooka, A., Letsoalo, M., Hoyland, G., Chaignat, C., Morrissey, A. y Crump J. (2011). Sensitivity and specificity of typhoid fever rapid antibody tests for laboratory diagnosis at two sub-Saharan African sites. *Bulletin of the World Health Organization*, 89(9), 640–647. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21897484/>.
- Koneman, E., Allen, S., V., Dowel, V. y Sommers, H. (2008). *Diagnóstico microbiológico*. (6ª ed.). Médica Panamericana.
- Kuijpers, L., Post, A. y Jacobs, J. (2018). Chromogenic media for the detection of *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A in human stool samples: evaluation in a reference setting.

*European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases*, 37(11), 2181-2190.

<https://doi.org/10.1007/s10096-018-3360-1>.

- Londoño, J. (2018). Usos e interpretación clínica de la línea de medios de cultivo cromogénicos. En: *17º Congreso Internacional del Colegio Nacional de Bacteriología CNB*. <https://mdmcientifica.com/medios-cultivo-cromogenicos/>
- López, C. (2004). *Comparación de PCR de tiempo real y el cultivo bacteriológico, en la detección de Salmonella typhimurium*. [Tesis de pregrado]. Universidad de Chile.
- Luna, G. (1991). *Manual Operativo de Análisis Microbiológico Para Alimentos*. (1ª ed.). Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano.
- Maddocks, S., Olma, T. & Chen, S. (2002). Comparison of CHROMagar Salmonella medium and xylose-lysine-desoxycholate and Salmonella-Shigella agars for isolation of Salmonella strains from stool samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(8), 2999-3003. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.8.2999-3003.2002>.
- Matsuura, S. (2008). *Susceptibilidad a antibacterianos in vitro de Salmonella entérica*. [Tesis de pregrado]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- McDonough, P., Shin, S. y Lein, D. (2000). Diagnostic and public health dilemma of lactose-fermenting Salmonella enterica serotype typhimurium in cattle in the Northeastern United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (3), 1221-1226. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.3.1221-1226.2000>.
- McFaddin, J. (2000). *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de bacterias de importancia Clínica*. (3ª ed.). Panamericana.
- MacQuinston, J.R., Fields, P., Tauxe, R.V. y Logsdon, J. (2008). Molecular phylogeny of the Salmonellae: relationship among Salmonella species and subspecies determined from four housekeeping genes and evidence of lateral gene transfer events. *Journal of Bacteriology*, 190(21), 7060-7. <https://doi.org/10.1128/JB.01552-07>.

- Medina, M.C. (2011). Generalidades de las pruebas diagnósticas y su utilidad en la toma de decisiones médicas. *Revista Colombiana de Psiquiatría*, 40(4), 787-797.
- Mejía, W. (2003). *Epidemiología de la Salmonellosis porcina*. [Tesis doctoral]. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Ministerio de salud (MINSA). (2018). *Boletín epidemiológico del Perú*.  
<http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2018/41.pdf>
- Mogasale V, Maskery B, Ochiai RL, Lee JS, Mogasale VV, Ramani E, Kim YE, Park JK, Wierzba TF. (2014). Burden of typhoid fever in low-income and middle-income countries: a systematic, literature-based update with risk-factor adjustment. *Lancet Global Health*, 2(10), 570-580. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(14\)70301-8](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(14)70301-8).
- Murray, P., Shea, E., Pfaller, M., Tenover, F. & Tenover, R. (2004). *Manual on Clinical microbiology*. (7ª ed.). American society for microbiology.
- Ochoa, C. (2015). Aprender a entender e interpretar las pruebas diagnósticas. Herramientas y aplicaciones. En: *AEPap ed. Curso de Actualización Pediatría 2015* (pp. 255-263). Lua Ediciones 3.0.
- Ochoa, C. y Orejas, G. (1999). Epidemiología y metodología científica aplicada a la pediatría (IV): Pruebas diagnósticas. *Anales Españoles de Pediatría*, 50, 301-314.
- Organización Mundial de la Salud. OMS (2017). *Enfermedades diarreicas*.  
<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>.
- Organización Mundial de la Salud (2018). *Alerta epidemiológica. Salmonella entérica serovar Typhi haplotipo H58*.  
[https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&view=download&category\\_slug=2018-9582&alias=46631-10-de-octubre-de-2018-salmonella-enterica-serovar-typhi-alerta-epidemiologica&Itemid=270&lang=es](https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=2018-9582&alias=46631-10-de-octubre-de-2018-salmonella-enterica-serovar-typhi-alerta-epidemiologica&Itemid=270&lang=es).

- Pedraza, J., Sanandres, N., Varela, Z., Aguirre, E. y Camacho, J. (2014). Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección. *Salud Uninorte*; 30 (1), 73-94.
- Pérez, J., Cavalli, P., Roure, C., Renac, R., Gille, Y. y Freydiere, A. (2003). Comparación de cuatro medios cromogénicos y agar Hektoen para la detección e identificación presunta de cepas de *Salmonella* en heces humanas. *Revista de microbiología clínica*; 41 (3), 1130-1134. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.3.1130-1134.2003>.
- Perry, J. (2017). Una década de desarrollo de medios de cultivo cromogénicos para microbiología clínica en una era de diagnósticos moleculares. *Revisiones clínicas de microbiología*; 30 (2), 449–479. <https://doi.org/10.1128 / CMR.00097-16>.
- Popoff, M., Bockemuhl, J., Brenner, F. & Gheesling, L. (2001). Supplement 2000 (n° 44) to the Kauffmann and White scheme. *Research in Microbiology*, 152, 907-909. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(01\)01274-8](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(01)01274-8).
- Pozo, F. (1988). La eficacia de las pruebas diagnósticas (I). *Medicina Clínica*, 90, 779-785.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J. y Leonard, F.C. (2002). *Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias*. (1ª ed.). Acribia.
- Rahman, BA., Wasfy, MO., Maksoud, MA., Hanna, N., Dueger, E. y House, B. (2014). Multi-drug resistance and reduced susceptibility to ciprofloxacin among *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates from the Middle East and Central Asia. *New Microbes New Infect.* 2 (4), 88-92. <https://doi.org/10.1002/nmi2.46>.
- Reeves, M.W., Evins, G.M., Heiba, A.A., Plikaytis, B.D. y Farmer, J.J. III (1989). Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori*. *Journal of Clinical Microbiology*, 27, 313–320. <https://doi.org/10.1128/jcm.27.2.313-320.1989>.

- REENALOA. La Red Nacional de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos (s.f). Análisis microbiológico de los alimentos, metodología analítica oficial, microorganismos patógenos, Volumen 1 [internet]. Argentina: RENALOA; Versión 1. 2011 diciembre. [Citado 2020 Julio 23]. 173p. [http://www.anmat.gov.ar/renaloa/docs/analisis\\_microbiologico\\_de\\_los\\_alimentos\\_vol\\_i.pdf](http://www.anmat.gov.ar/renaloa/docs/analisis_microbiologico_de_los_alimentos_vol_i.pdf)
- Robledo, A. (2015). *Investigación de Salmonella spp. en alimentos mediante el método tradicional ISO 6579 y dos métodos inmunoenzimáticos*. [Tesis de pregrado, Universidad Politècnica de Catalunya]. <https://upcommons.upc.edu/handle/2099.1/26111?locale-attribute=es>.
- Rodríguez, G. (2015). *Aislamiento de Salmonella sp.* [Tesis de pregrado, Universidad Javeriana]. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/20886/AngelRodriguezGeraldinLorena2015.pdf?sequence=1>.
- Ross A., Olds G., Cripps A., Farrar J., & McManus D. (2013). Enteropathogens and chronic illness in returning travelers. *The New England Journal of Medicine*, 368(19), 1817-1825. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1207777>.
- Ruiz, A. (2008). Pruebas diagnósticas, generalidades de su interpretación. *Revista Colombiana de Neumonología*, 20, 98-105.
- Ruiz, M., Ramallo, G., Colello, R., Villalobo, C., Monteavaro, C., Etcheverría, A. y Padola, N. (2018). Diferentes métodos para aislamiento y detección de *Salmonella*, spp. en canales porcinos. *Revista Colombiana de Biotecnología*.20(2), 117-123. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.71680>.
- Salmonelosis. (2015) En: Manual de la OIE sobre animales terrestres. (2008). OIE. (Citado 20 JUNIO 2019). (aprox. 18 p.). [http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf\\_es\\_2008/2.09.09.%20Salmonelosis.pdf](http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.09.09.%20Salmonelosis.pdf).

- Salvatierra, G. (2014). *Detección de Salmonella spp. En muestras de carcasas porcinas obtenidas en camales de Lima*. [Tesis de pregrado]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Sánchez, M. (2013). *Determinación de la prevalencia de enterobacterias del género Salmonella spp. en huevos frescos de gallina de empresas avícolas de la provincia de Tungurahua*. [Tesis de pregrado]. Universidad Central del Ecuador.
- Stanchi, O. (2007). *Microbiología veterinaria*. (1ª ed.). Intermédica.
- Su, L. & Chiu, Ch. (2007). Salmonella: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung medical journal*, 30 (3), 210-219. <http://cgmj.cgu.edu.tw/3003/300302.pdf>.
- Terragno, R. y Caffer, M.I. (2001) *Manual de procedimientos para la caracterización de Salmonella*. Globam Salm.
- Terragno, R., Caffer, M.I., Bruna, S. y Binzenstein, N. (2003). *Manual de procedimientos. Salmonella Parte I*. Global Sam.
- Tillier, E. & Collins, R. (2000). Genome Rearrangement by replication directed translocation. *Nature Genetics*, 26, 195-197. <https://doi.org/10.1038/79918>.
- Tindall, B., Grimond, P., Garrity, G. & Euzéby J. (2005). Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 55, 521-524. <https://doi.org/>.
- Trepal i Quílez, M. (2002). *Incidencia y comportamiento de Salmonella y Listeria en pechugas de pavo curadas*. [Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Barcelona]. <https://www.tesisenred.net/handle/10803/5634>.
- Tsoraeva, A., Muñoz, J., Zhurbenko, R., Rodríguez, C. y Ortega, M. (2008). Evaluación del nuevo medio CromoCen ECCS para la detección e identificación de bacterias enteropatógenas. *Revista Cubana de Medicina Tropical*; 60(2), 1-10.

- Urrutia, M., Reyes, E., Melo, C., Henríquez, M., Pineda, J. y Sakurada, A. (2006) Estandarización de una Técnica para la Detección de *Salmonella* spp. Útil para Manipuladores de Alimentos Mediante Técnica de Amplificación Molecular. *Ciencia & Trabajo*, 8(22), 164- 166.
- Vásquez, O. y Soto, J. (2014). Bacteremia primaria por *Salmonella* no *tiphy*. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*, 27(107), 405-407. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revenfinfped/eip-2014/eip141d.pdf>.
- Vizcaíno-Salazar, G. (2002). *Medicina basada en la evidencia y análisis de diseños de investigación*. (1ª ed.). Ediluz
- Vizcaíno-Salazar, G. (2017). Importancia del cálculo de la sensibilidad, la especificidad y otros parámetros estadísticos en el uso de las pruebas de diagnóstico clínico y de laboratorio. *Medicina & Laboratorio*, 23(7-8), 365-386. <https://doi.org/10.36384/01232576.34>.
- Ward, M., Alinovi, C., Couëtil, L. & Wu, Ch. (2005). Evaluation of a PCR to detect *Salmonella* in fecal samples of horses admitted to a veterinary teaching hospital. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17(2), 118-123. <https://doi.org/10.1177/104063870501700204>.
- Zamudio, ML., Meza, A., Bailón, H., Martínez-Urtaza, J. & Campos, J. (2011). Experiencias en la vigilancia epidemiológica de agentes patógenos transmitidos por alimentos a través de electroforesis en campo pulsado (PFGE) en el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental de Salud Pública*, 28(1), 3-6.

**IX ANEXOS**

**Anexo A**

Flujograma de trabajo

Figura 3

Flujograma de trabajo

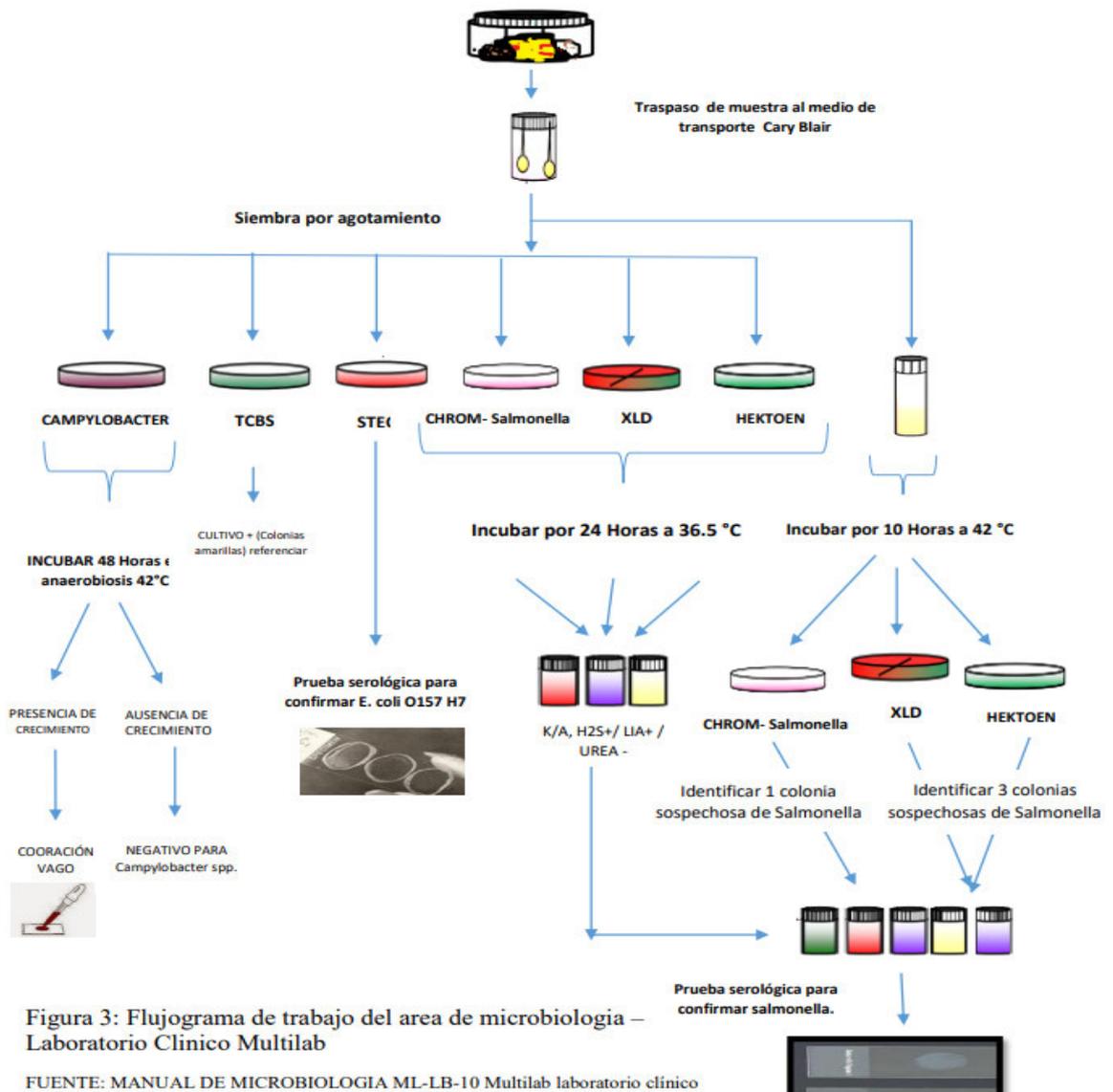
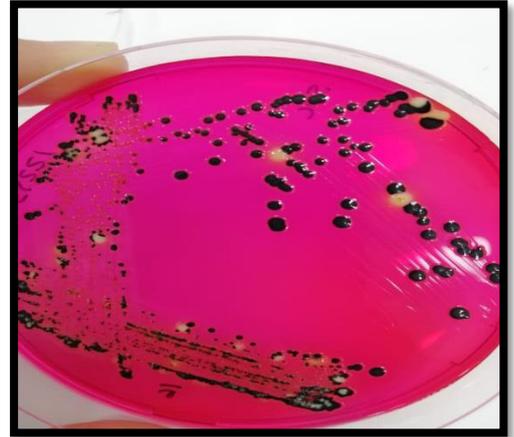
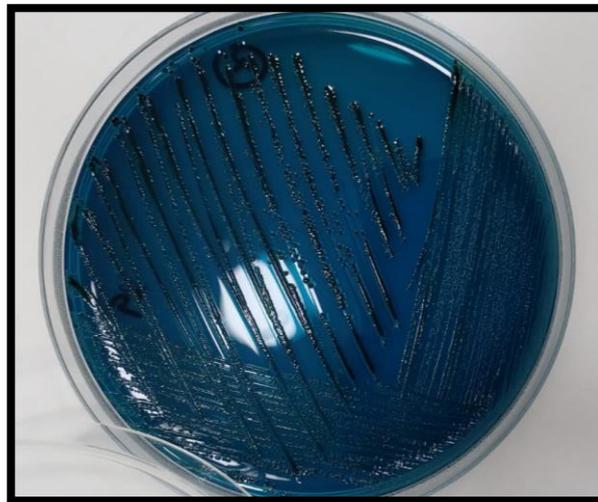


Figura 3: Flujograma de trabajo del area de microbiologia – Laboratorio Clinico Multilab

FUENTE: MANUAL DE MICROBIOLOGIA ML-LB-10 Multilab laboratorio clínico

**Anexo B**

Aislamiento primario

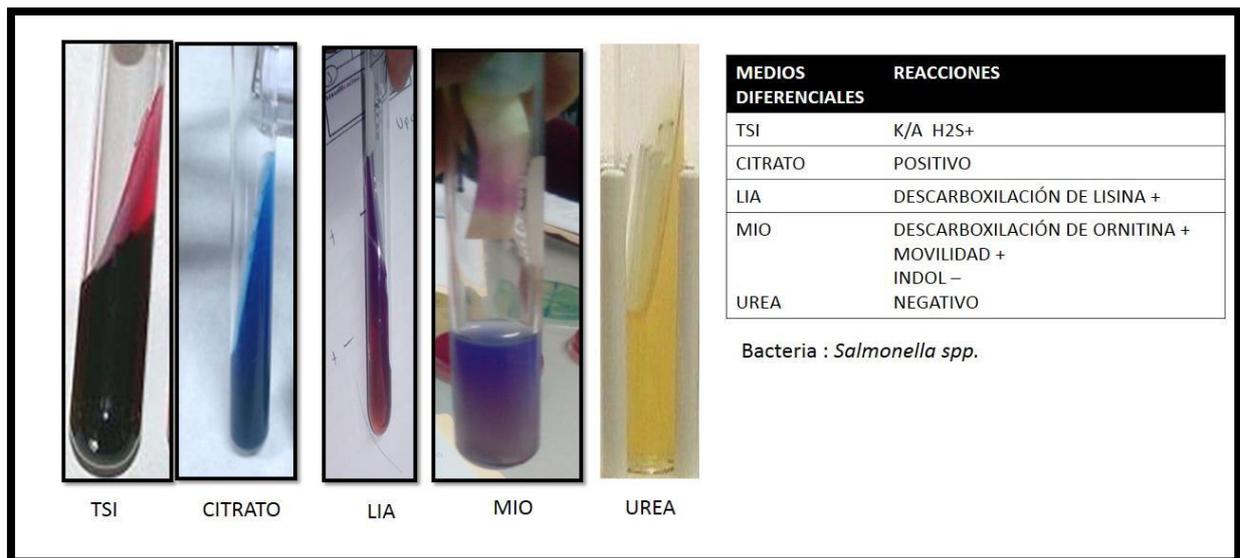
**Figura 4***Colonias de salmonella en CHROMagar Salmonella***Figura 5***Colonias de salmonella en XLD***Figura 6***Colonias de salmonella en agar entérico Hektoen*

## Anexo C

### Identificación bacteriana

#### Figura 7

*Lectura de pruebas bioquímicas para Salmonella spp.*

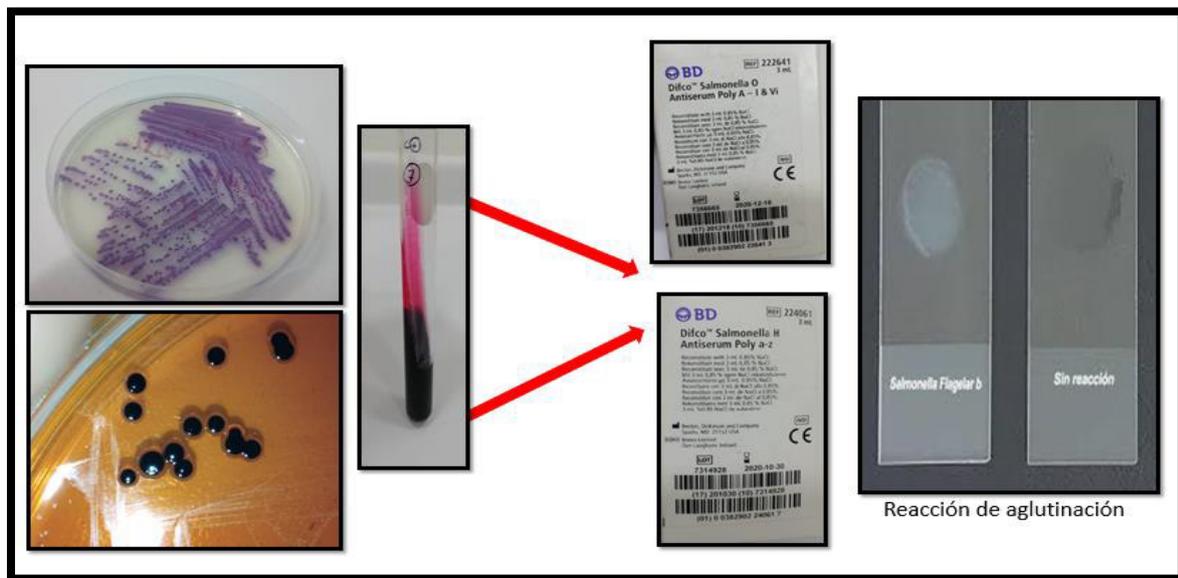


**Anexo D**

## Confirmación serológica

**Figura 8**

*Confirmación de Salmonella por prueba de aglutinación con antisuero O y H*



## Anexo E

## Matriz de consistencia

Problema	Hipótesis	Objetivos	Variables	Dimensiones
¿Qué eficacia presenta el CHROMagar Salmonella plus en la detección de <i>Salmonella</i> ?	El CHROMagar Salmonella plus presenta mayor eficacia que los medios XLD y HEA en la detección de <i>Salmonella</i> spp. a partir de muestras de heces.	<p><b>General:</b> Evaluar el CHROMagar Salmonella plus para su implementación como medio de rutina para la detección de <i>Salmonella</i> spp. a partir de muestras de heces en el período de enero-mayo 2021.</p> <p><b>Específicos:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Determinar la sensibilidad y especificidad del medio de cultivo CHROMagar Salmonella plus.</li> <li>- Determinar la sensibilidad y especificidad de los medios de cultivo XLD y HEA.</li> <li>- Comparar la sensibilidad y especificidad del medio CHROMagar Salmonella plus con la sensibilidad y especificidad de los medios de cultivo XLD y HEA.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensibilidad.</li> <li>- Especificidad.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Verdaderos positivos.</li> <li>- Falsos negativos</li> <li>- Verdaderos negativos</li> <li>- Falsos positivos.</li> </ul>