

Efecto de la combinación de bases nutritivas con el inhibidor sobre la recuperación de salmonelas

Effect of combining nutrient bases and inhibitor on recovery of *Salmonella*

Yudisleidy López Ricardo, Raisa Zhurbenko, Claudio Rodríguez Martínez

Centro Nacional de Biopreparados (BioCen). Bejucal, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN

Introducción: las salmonelas son las causantes más frecuentes de enfermedades transmitidas por alimentos a nivel mundial. El caldo selenito cistina es un medio de enriquecimiento selectivo utilizado para la recuperación de especies de salmonelas en muestras de alimentos, aguas, heces y otros materiales de importancia sanitaria.

Objetivo: evaluar la combinación de bases nutritivas obtenidas por métodos originales con el selenito de sodio para garantizar la adecuada recuperación de especies de salmonelas en el caldo selenito cistina.

Métodos: se realizó un estudio comparativo con diferentes bases nutritivas, que evaluó la promoción de crecimiento bacteriano de seis cepas de *Salmonella* y *Shigella*. Se prepararon dos variantes y se inocularon los microorganismos seleccionados a una concentración aproximada de 3×10^8 unidades formadoras de colonia por mililitro. El incremento de la biomasa se determinó a través de la medición de la absorbancia en un espectrofotómetro a 640 nanómetros cada una hora. Se comparó el comportamiento del medio caldo selenito cistina formulado por ingredientes con el caldo selenito cistina de Merck frente a los microorganismos de interés. Se determinó productividad y selectividad del medio de cultivo.

Resultados: la variante que contiene la mezcla de bases nutritivas (peptona bacteriológica Z, peptona de soya e hidrolizado enzimático de caseína) facilitó una mejor recuperación de las cepas ensayadas, mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a la variante que contiene solo hidrolizado enzimático de caseína. El medio experimental que contenía la mezcla de bases nutritivas con el selenito de sodio, mostró una recuperación de *Salmonella* a bajas concentraciones, similar al de referencia e inhibió mejor *Escherichia coli* a bajas concentraciones. A altas concentraciones ninguno de los dos medios pudo inhibir el crecimiento de *E. coli*. La

productividad para ambos medios, resultó satisfactoria en el intervalo de 0,1 a 1, al igual que la selectividad con un valor aproximado de 3.

Conclusiones: la combinación de bases nutritivas originales con el selenito de sodio permitió una adecuada recuperación de las especies de salmonelas.

Palabras clave: caldo selenito cistina; *Salmonella*; bases nutritivas; selenito de sodio; productividad; selectividad.

ABSTRACT

Introduction: *Salmonella* are the most common causes of food-borne disease worldwide. Selenite cystine broth is a selective enrichment medium used for the recovery of *Salmonella* species in samples of food, water, feces and other materials of clinical importance.

Objective: Evaluate the combination of nutrition bases obtained by original methods and sodium selenite to ensure appropriate recovery of *Salmonella* species in selenite cystine broth.

Methods: A comparative study was conducted with various nutrition bases to evaluate the fostering of bacterial growth in six strains of *Salmonella* and *Shigella*. Two variants were prepared and the microorganisms selected were inoculated at an approximate concentration of 3×10^8 colony-forming units per milliliter. Absorbance was measured with a 640 nanometer spectrophotometer every hour to determine biomass increase. Behavior of the selenite cystine broth medium formulated by ingredients was compared with that of Merck cystine selenite broth in the presence of the microorganisms of interest. Determination was performed of the productivity and selectivity of the culture medium.

Results: The variant containing the mixture of nutrient bases (bacteriological peptone Z, soybean peptone and casein enzymatic hydrolysate) facilitated better recovery of the strains tested, with significant differences ($p < 0.05$) with respect to the variant containing casein enzymatic hydrolysate alone. The experimental medium containing the mixture of nutrient bases and sodium selenite displayed *Salmonella* recovery at low concentrations in a manner similar to the reference medium and inhibited *Escherichia coli* more efficiently at low concentrations. At high concentrations neither medium was able to inhibit the growth of *E. coli*. Productivity was satisfactory in both media, ranging between 0.1 and 1, and so was selectivity, which reached an approximate value of 3.

Conclusions: The combination of original nutrition bases and sodium selenite allowed appropriate recovery of *Salmonella* species.

Key words: Selenite cystine broth; *Salmonella*; nutrition bases; sodium selenite; productivity; selectivity.

INTRODUCCIÓN

Las salmonelas son un grupo de microorganismos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. Estas son muy dañinas para la salud humana y animal. Son causantes de numerosas enfermedades gastrointestinales, en especial la salmonelosis, caracterizada por fiebre, diarrea y calambres abdominales, en

personas con defensas bajas puede invadir el torrente sanguíneo y ocasionar infecciones que ponen en peligro la vida,¹ llega en algunos casos a causar la muerte del enfermo.² Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) representan a nivel mundial una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad, tanto en países subdesarrollados como en los desarrollados.³ Los estudios publicados en el año 2013 refieren un ascenso del número de muertes por enfermedades diarreicas en niños mayores de cinco años y adultos a 48,1 millones, en el período entre 1980 y 2008.⁴

El 70 % de las diarreas se originan por la ingestión de alimentos contaminados con microorganismos y sus toxinas.⁵ *Salmonella* es el agente causal de ETA más frecuente a nivel mundial. En América Latina la salmonelosis está entre las tres primeras ETA,^{6,7} en Estados Unidos las salmonelas son las causantes del 11 %, ^{8,9} de forma similar ocurre en Europa.^{10,11} Cuba no está exenta de este mal, ya que, en los últimos años, se han reportado algunos casos aislados y varios brotes de salmonelosis.¹²⁻¹⁴

Estos microorganismos también son causantes de numerosas enfermedades en los animales de interés económico para el hombre, lo que repercute de forma negativa en el rendimiento y la viabilidad de las producciones.¹⁵ Por lo antes dicho se hace necesario contar en la red de laboratorios clínicos y de control de calidad de los alimentos y aguas, con los medios de cultivo necesarios para detectar la salmonelosis y diagnosticarla a tiempo y así poder tomar las medidas para minimizar los daños que causa esta enfermedad tanto a la salud humana como a la economía.

En especial el caldo selenito cistina es un medio de enriquecimiento selectivo utilizado para la recuperación de especies de salmonelas en muestras de alimentos,^{16,17} aguas,¹⁸ heces^{19,20} y otros materiales de importancia sanitaria. El objetivo de esta investigación consistió en evaluar la combinación de bases nutritivas de producción nacional para garantizar la adecuada recuperación de especies de salmonelas del caldo selenito cistina.

MÉTODOS

Se utilizaron bases nutritivas producidas en BioCen (Cuba): hidrolizado enzimático de caseína (HEC) y una mezcla de peptonas compuesta por peptona bacteriológica Z (PBZ), peptona de soya (PS) e HEC.

Se usaron los medios de cultivo producidos en BioCen (Cuba):²¹ caldo cerebro corazón (CCC), agar triptona soya (ATS), caldo triptona soya (CTS), agar de MacConkey. Como medio de referencia se empleó caldo selenito cistina (CSCM) (Merck, Alemania).

En este estudio se evaluaron las cepas microbianas de la *American Type Culture Collection* (ATCC): *Salmonella* Typhimurium 14028, *Salmonella* Enteritidis 13076, *Salmonella* Typhi 19430, *Salmonella* Paratyphi A 8005, *Salmonella* Abony 6017, *Shigella sonnei* 25931 y *Escherichia coli* 25922. Las mismas se obtuvieron del cepario central de BioCen, almacenadas en cuñas de ATS a temperatura de 2 a 8 °C.

Se realizó un estudio de promoción de crecimiento bacteriano para comparar el desempeño de las bases nutritivas frente a los microorganismos de interés (las seis cepas de *Salmonella* y *Shigella* antes mencionadas), se midió el incremento de la

densidad óptica (DO) en el tiempo en un espectrofotómetro (T70/T70+UV-VIS, Inglaterra).

Se evaluaron dos variantes: V1 con la mezcla de peptonas (HEC 2,17 g/L, PBZ 2,11 g/L y PS 0,72 g/L) y V2 con 5 g/L de HEC. A estas variantes se le añadió 0,5 g/L de cloruro de sodio (Merck, Alemania) y 0,1 g/L de sodio hidrógenofosfato anhidro (Merck, Alemania) y se ajustó el pH a 7,0-7,2, según el método propuesto por SIGMA.²²

En los cultivos puros, provenientes de CCC, incubados por 24 h, se realizó la preparación de los microorganismos al 50 % de transmitancia por la escala McFarland, para alcanzar una concentración microbiana aproximada de $3,0 \times 10^8$ UFC/mL. Detrás se inocularon 4 mL de esa suspensión en 250 mL de los medios según la V1 y V2, se incubaron por 12 h a 35 ± 2 °C en aerobiosis y se midió la DO cada una hora a 640 nm.

El procesamiento de los datos durante el estudio de promoción de crecimiento bacteriano a través del aumento de la DO en el tiempo, se realizó según el programa estadístico *STATISTICA* (versión 8; Copyright, Statsoft, Inc. 2008). Se determinó la existencia de diferencia significativa entre los valores de la DO correspondiente a cada combinación de bases nutritivas, se empleó la prueba de *Tukey*, para un 95 % de confianza. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Se evaluó el comportamiento del medio caldo selenito cistina (CSC), formulado por ingredientes (0,01 g/L de L- cistina (AppliChem, Alemania); 4 g/L de lactosa (AppliChem, Alemania); 4 g/L de selenito de sodio (Merck, Alemania); 10 g/L de fosfato trisódico (Sigma-Aldrich, EE. UU.); 2,17 g/L de HEC; 2,11 g/L de PBZ y 0,72 g/L de PS) frente a los microorganismos de interés. Para ello se realizó un estudio comparativo entre el medio experimental (CSC) y el medio de referencia (CSCM), con el objetivo de observar el comportamiento de ambos medios en el tiempo frente a *S. Typhimurium* como microorganismo diana y *E. coli* como microorganismo no diana. Los medios fueron esterilizados en un régimen de vapor fluyente por 10 min en una autoclave (Lequeux, Francia).

Con las cepas de interés se realizó un ajuste de la suspensión microbiana a 70 % de transmitancia a 550 nm. Seguido se prepararon diluciones seriadas hasta 10^{-6} en solución salina estéril al 0,9 % (p/v) y posterior se sembró 1 mL de suspensión microbiana, correspondiente a 10-100 UFC/mL para *Salmonella* y para *E. coli* los inóculos correspondieron a 10-100 UFC/mL y 1000-10000 UFC/mL con el objetivo de estudiar el efecto inhibitorio de los medios de cultivo frente a bajas y altas concentraciones del microorganismo no diana. Se incubaron a 35 ± 2 °C y cada 1 h se tomaron los valores de DO (espectrofotómetro GENESYS 10S-UV-VIS, EE. UU.) a 580 nm desde las 14 hasta las 22 h.

La productividad de los medios CSC y CSCM se calcularon para las mismas seis cepas referidas en el primer experimento. Se tuvo en cuenta el criterio propuesto por la ISO 11133-2 del 2003²³ en la que la productividad (P_R) para el medio experimental deber ser $\geq 0,1$. La misma se calculó según la siguiente fórmula:

$$P_R = N_S / N_0$$

Donde:

N_S - es el recuento total de colonias obtenido en el medio de cultivo sometido al ensayo.

N_0 - es el recuento total de colonias obtenido en el medio de cultivo control definido (CTS) (≥ 100 UFC).

Para el cálculo de la selectividad se utilizó *E. coli*, de acuerdo al criterio de la ISO 11133-2 en el cual la selectividad (S) debe ser ≥ 2 , calculada de la siguiente manera:

$$S = D_0 - D_s$$

Donde:

D_0 - dilución más alta que muestra un crecimiento de al menos 10 UFC en el medio control (CTS).

D_s - dilución más alta que muestra un crecimiento comparable en el medio que se evalúa.

El medio preparado fue dispensado en tubos de cultivo con tapa de rosca (150 × 20 mm) a razón de 10 mL por tubo y posterior un esterilizado a vapor fluyente por 10 min en la autoclave (Lequeux, Francia). El CTS se dispensó de igual forma y se esterilizó a 121 °C por 15 min en la misma autoclave.

Las cepas utilizadas se ajustaron a 70 % de transmitancia a 550 nm y se prepararon diluciones seriadas hasta 10^{-7} . Los tubos fueron inoculados con concentraciones de entre 10 y 100 UFC para el cálculo de la productividad y de entre 1000 y 10 000 UFC para el cálculo de la selectividad. Todos los tubos se incubaron por 24 h a 35 ± 2 °C. Pasado ese tiempo se extrajo 1 mL de los cultivos, a partir de los cuales se prepararon diluciones seriadas hasta 10^{-7} y se sembraron 0,1 mL de las últimas tres diluciones por duplicado en placas de agar MacConkey.

RESULTADOS

Las cepas ensayadas de *Salmonella* y *Shigella* mostraron crecimiento favorable ante la combinación de bases nutritivas (V1) e HEC (V2) (Figs. 1 y 2). Sin embargo, V1 facilitó una mejor recuperación en todas las cepas ensayadas con respecto a V2, reflejado en el aumento significativo de la DO, que llegó a alcanzar a las 12 h de incubación valor de 0,182 para *S. Typhimurium* y de 0,175 para *S. sonnei* en V1, mientras que en V2 fue de 0,130 y 0,107, al respecto. El análisis del crecimiento de los microorganismos de interés mostró diferencias significativas entre la variante que contiene la mezcla de peptonas y la que contiene solo HEC. La primera resultó la más eficiente en la promoción de crecimiento bacteriano.

La comparación de la eficiencia de CSC y CSCM ante la recuperación de *S. Typhimurium* (Fig. 3A) demostró que ambos medios la enriquecen de forma satisfactoria a bajas concentraciones de la misma. Pero el CSC de BioCen recupera *Salmonella* mejor que el medio de referencia, ya que el valor de $DO_{580\text{ nm}}$ a las 22 h de incubación resultó 0,459, mientras para el CSCM este valor se enmarcó en 0,374. El CSC frente a *E. coli* en bajas concentraciones (Fig. 3B) inhibió su crecimiento en comparación con el medio de referencia ya que el valor de $DO_{580\text{ nm}}$ fue 0,331 para el CSC (inferior al valor para *Salmonella* en la misma concentración del inóculo inicial) y de 1,139 para el CSCM. A altas concentraciones ninguno de los dos medios inhibió *E. coli* (Fig. 3C) ya que se observaron valores muy elevados de $DO_{580\text{ nm}}$ en ambos: 1,513 en CSC y 1,451 en CSCM.

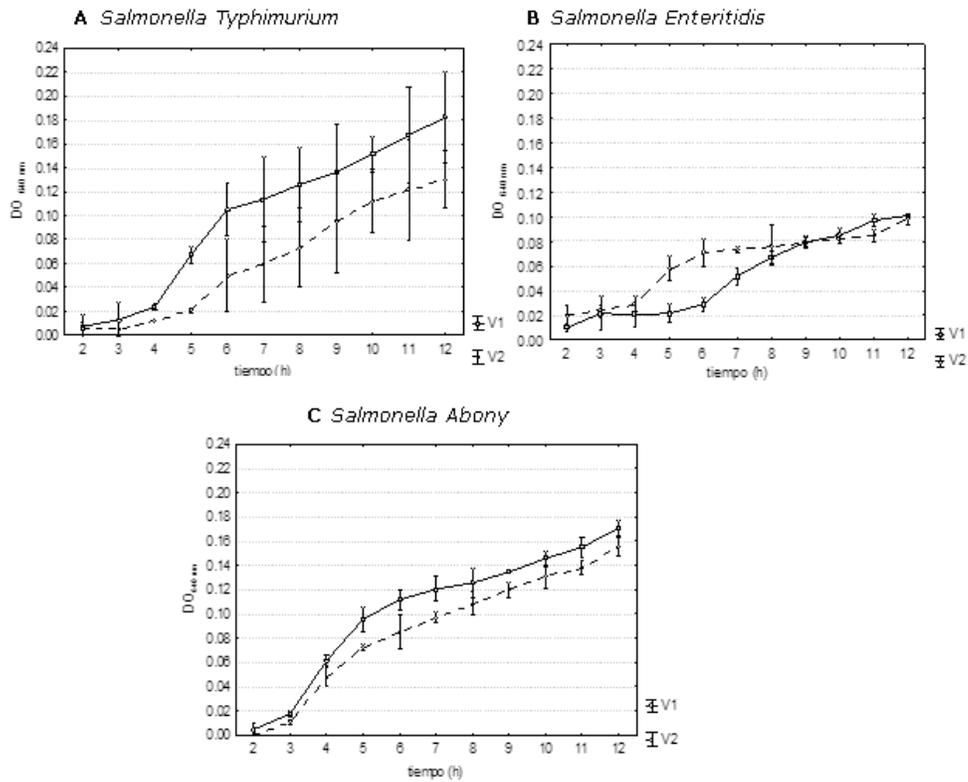


Fig. 1. Efecto de las bases nutritivas sobre el crecimiento de las especies de *Salmonella*. V1 (g/L): peptona bacteriológica Z - 2,11; peptona de soya - 0,72 e hidrolizado enzimático de caseína - 2,17 y V2 (g/L): hidrolizado enzimático de caseína - 5.

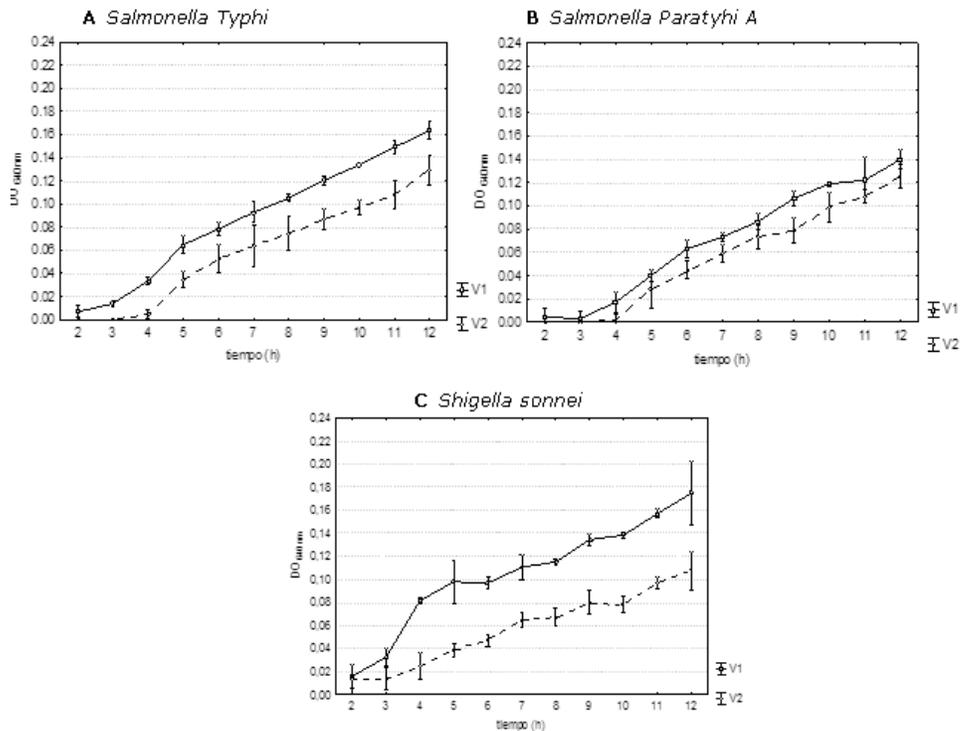


Fig. 2. Efecto de las bases nutritivas sobre el crecimiento de las especies de *salmonelast ifoideas* y *Shigella*. V1 (g/L): peptona bacteriológica Z - 2,11; peptona de soya - 0,72 e hidrolizado enzimático de caseína - 2,17 y V2 (g/L): hidrolizado enzimático de caseína - 5.

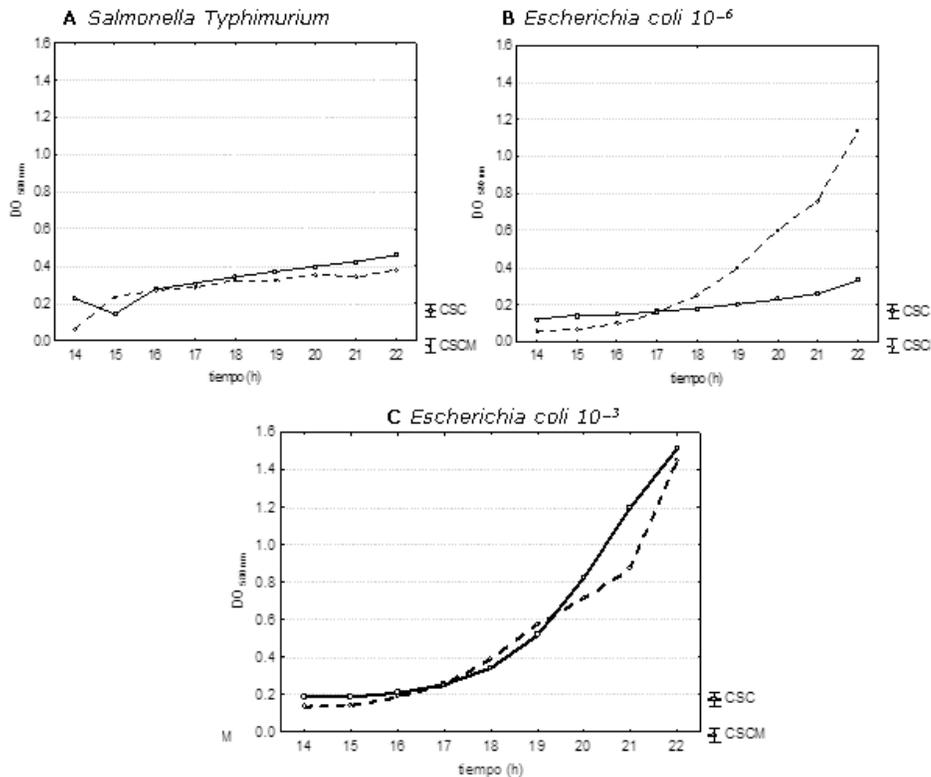


Fig. 3. Efecto sobre la recuperación e inhibición microbiana de la composición experimental de caldo selenito cistina (CSC) en comparación con el medio de referencia caldo selenito cistina, Merck, Alemania (CSCM). **A).** *S. Typhimurium* a bajas concentraciones (10-100 UFC); **B).** *E. coli* a bajas concentraciones (10-100 UFC) y **C).** *E. coli* a altas concentraciones (1000-10000 UFC).

La productividad del medio CSC frente a los seis microorganismos diana ensayados (tabla) osciló entre 0,1 y 1, cumplió con el requisito establecido, es *S. Typhimurium* el microorganismo con el mayor valor de productividad en comparación con los demás microorganismos ensayados. En el medio CSCM los valores de productividad para las especies de *Salmonella* resultaron ser de 0,4 a 1 y para *S. sonnei* no se alcanzó el valor establecido como requisito.

Tabla. Productividad de la composición experimental de caldo selenito cistina (CSC) en comparación con el medio de referencia caldo selenito cistina, Merck, Alemania (CSCM)

Microorganismo	Productividad	
	CSC	CSCM
<i>Salmonella Typhimurium</i>	1	1
<i>Shigella sonnei</i>	0,2	0,07
<i>Salmonella Abony</i>	0,2	0,7
<i>Salmonella Typhi</i>	0,3	1
<i>Salmonella Enteritidis</i>	0,1	1
<i>Salmonella Paratyphi A</i>	0,2	0,4

La selectividad del CSC para el microorganismo no diana ensayado, específicamente *E. coli*, fue cerca de tres, valor que está por encima del parámetro establecido. La selectividad del CSCM se comportó de forma similar al CSC.

DISCUSIÓN

Como es conocido, las salmonelas son las causantes fundamentales de las ETA mediante diferentes vías de contaminación de los alimentos y las aguas. La contaminación de los alimentos por salmonela puede ocurrir por múltiples causas, tales como, durante su manipulación sobre la superficie de trabajo,²⁴ por el medio ambiente, por los propios seres vivos y sus productos derivados. El primer reservorio de las salmonelas es el intestino de los vertebrados, las cuales son expulsadas al medio a través de las heces y al ponerse en contacto con los alimentos los contaminan.²⁵ Los alimentos en los que con mayor frecuencia se detecta salmonelas son las carnes sin procesar o provenientes de animales infectados, incluyen cerdos,^{24,26} aves,¹ huevos,^{16,27} leche sin pasteurizar y sus productos,^{17,28} pero también aparecen en frutas, vegetales,²⁹ y productos del mar.^{30,31}

Es por ello que el control de la calidad de los alimentos juega un papel primordial en la disminución de las posibles contaminaciones de seres vivos por salmonelas. La seguridad en el control de la calidad se garantiza por el uso de los medios de diagnósticos eficientes, capaces de recuperar los microorganismos, incluso aquellos que sufrieron deterioros en su metabolismo debido a los tratamientos térmicos de los alimentos, con posterior detección de manera segura.

La capacidad de recuperación eficiente de estos microorganismos se debe a la combinación de los agentes nutritivos en las composiciones de medios de cultivo destinados a estos fines.

La mayor recuperación de V1 frente a los microorganismos de interés está dada por la combinación de bases nutritivas que esta tiene incorporada, ya que V2 solo contiene HEC, mientras que la mezcla de peptonas (V1) está compuesta por PBZ, HEC y PS. Es sabido que estas bases nutritivas juegan un importante papel en la recuperación de organismos exigentes desde el punto de vista nutricional.³² También se ha de tener en cuenta que la mayoría de los microorganismos no suelen utilizar de forma directa las proteínas naturales, sino que tienen la capacidad de metabolizar los aminoácidos y otros compuestos más simples de nitrógeno presentes en las peptonas. Al hacer un análisis de la composición de aminoácidos presentes en la mezcla de peptonas de V1, se evidencia la elevada concentración de algunos de ellos. Tal es el caso del HEC que suministra a la composición nutritiva un contenido superior de aminoácidos como arginina (Arg) y treonina (Thr). En la PBZ también resulta elevado el contenido de Arg, cistina (Cys), histidina (His), metionina (Met), fenilalanina (Phe) y tirosina (Tyr).³² La peptona de soya se obtiene a partir de hidrolizados del grano de la soya, el cual tiene un alto contenido de proteínas (40-50 %), además de vitaminas del grupo B, hierro, potasio, vitamina K y calcio. Por lo que la peptona que se deriva de este sustrato proteico tiene un alto contenido de péptidos de un peso molecular superior, lo que hace que constituya una excelente base nutritiva para el cultivo de microorganismos exigentes.^{33,34} Además de los aminoácidos y péptidos, las peptonas contienen macro y micronutrientes que también son necesarios para el metabolismo celular, en las cantidades adecuadas inciden de forma favorable en la formación del material genético, la síntesis de enzimas y otros metabolitos fundamentales, garantizan

además los procesos de intercambio de la célula con el medio exterior, como por ejemplo el cinc que se encuentra en gran cantidad en el HEC.³²

Estos hallazgos coinciden con los estudios realizados por otros autores en demostrar las ventajas de utilizar las mezclas de las bases nutritivas para estimular un rápido y profuso crecimiento de los microorganismos.³⁵⁻³⁷ Todo esto influye de forma positiva en la promoción del crecimiento de los microorganismos de interés por lo que la variante que contiene solo HEC no puede actuar de igual forma que la compuesta por la mezcla de peptonas, debido a que esta última favorece en mayor medida la multiplicación celular y, por tanto, el aumento de la concentración de la población microbiana.

El medio formulado por ingredientes recupera mejor salmonela que el medio de referencia. Esto puede estar dado por la composición de bases nutritivas ya que CSC contiene HEC, PBZ y PS mientras que CSCM solo contiene peptona de caseína. En su composición CSC contiene bases nutritivas, fosfatos, lactosa, L-cistina y selenito de sodio. Las bases nutritivas compuestas por peptonas suministran el carbono, nitrógeno, minerales y otros factores necesarios para el crecimiento microbiano y los procesos metabólicos de las células, promueve la proliferación y producción de las mismas. Las peptonas son una mezcla soluble en agua de polipéptidos y aminoácidos los cuales son usados en muchas aplicaciones biológicas y biotecnológicas.³⁸

El fosfato tiene efecto regulador del pH ya que funciona como sustancia tampón, la lactosa es el glúcido utilizado como fuente de energía, la L-cistina funciona como agente reductor al mismo tiempo que favorece el desarrollo de las salmonelas, pues se conoce que el medio funciona mejor en una atmósfera reducida de CO₂, el selenito de sodio inhibe el desarrollo de los microorganismos grampositivos, además de la mayoría de las enterobacterias, en especial coliformes, durante las primeras 8 a 12 h de incubación.³⁹ Se ha demostrado que afecta la dinámica de crecimiento y el metabolismo bacteriano,⁴⁰ se debe su efecto tóxico a dos posibles mecanismos: reacción con el grupo sulfhidrilo enzimático o formación de aminoácidos análogos en los que el selenito ha tomado el lugar del azufre.⁴¹ A esto se debe la acción selectiva del medio ya que este impide la multiplicación de la microbiota asociada en la muestras mientras favorece el crecimiento de *Salmonella*.

Los valores de productividad obtenidos han demostrado la capacidad del caldo selenito cistina de favorecer el desarrollo de un microorganismo que tenga una reacción "positiva" (especies de *Salmonella*) en dicho medio.

A su vez, la selectividad ha permitido evaluar la capacidad de este caldo de enriquecimiento selectivo de inhibir el crecimiento de un microorganismo (*E. coli*) que no tenga una reacción "positiva" en dicho medio.²⁷

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Uribe C, Suárez MC. Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. Colombia Médica. 2006;37:151-8.
2. Shahunja KM, Leung DT, Ahmed T, Bardhan PK, Ahmed D, Qadri F, et al. Factors Associated with Non-typhoidal Salmonella Bacteremia versus Typhoidal Salmonella Bacteremia in Patients Presenting for Care in an Urban Diarrheal Disease Hospital in Bangladesh. PLoS Negl Trop Dis [Versión electrónica]. 2015 [citado octubre 2015];9. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004066>

3. Newman KL, Leon JS, Rebolledo PA, Scallan E. The impact of socioeconomic status on foodborne illness in high-income countries: a systematic review. *Epidemiology and Infection*. 2015;143:2473-85.
4. WHO Fourth formal meeting of the Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group (FERG). World Health Organization, Geneva, Switzerland; 2014.
5. WHO. Consultation to develop a strategy to estimate the global burden of foodborne diseases. World Health Organization, Geneva, Switzerland; 2007.
6. Kopper G, Calderón G, Schneider Sh, Domínguez W, Gutiérrez G. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto económico. Estudios de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua. Informe técnico sobre ingeniería agrícola y alimentaria. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO); 2009.
7. Alerte V, Cortés AS, Díaz TJ, Voltaire ZJ, Espinoza MME, Solari GV, et al. Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos y agua en la Región Metropolitana, Chile (2005-2010). *Rev Chil Infectol*. 2012;29:26-31.
8. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, et al. Foodborne Illness Acquired in the United States - Major Pathogens. *Emerg Infect Dis*. 2011;17:7-15.
9. Whitney BM, Mainero C, Humes E, Hurd Sh, Nicolai L, Hadler JL, et al. Socioeconomic Status and Foodborne Pathogens in Connecticut, USA, 2000-2011. *Emerg Infect Dis*. 2015;21:1617-24.
10. De Jong B, Ekdahl K. The comparative burden of salmonellosis in the European Union member states, associated and candidate countries. *Bmc Public Health* [Versión electrónica]. 2006 [citado en octubre 2015];6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1352352/#>
11. Sundström K, Wahlström H, Ivarsson S, Lewerin SS. Economic effects of introducing alternative salmonella control strategies in Sweden. *Plos One* [Versión electrónica]. 2014 [citado octubre 2015];9. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0096446>
12. Bernal KSHS, Iglesias EJB. Salmonellosis extraintestinal: Reporte de caso. *Investigaciones Médicoquirúrgicas*. 2015;6:305-11.
13. Puig Peña Y, Robert Maceo BA, Leyva Castillo V. Epidemiological factors of interest in outbreaks of food-borne diseases in Havana. *Rev Cubana Hig Epidemiol*. 2013;51:262-8.
14. Puig Peña Y, Espino Hernández M, Leyva Castillo V, Aportela López N, Machín Díaz M, Soto Rodríguez P, et al. Serovariedades y patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos de cepas de Salmonella aisladas de alimentos en Cuba. *Rev Panam Salud Pública*. 2011;30:561-5.
15. Agren ECC, Johansson J, Frössling J, Wahlström H, Emanuelson U, Sternberg-Lewerin S, et al. Factors affecting costs for on-farm control of salmonella in Swedish dairy herds. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2015;57:28.
16. Ramírez-Rueda RY, Rincón DP, Vargas J. Salmonella Enteritidis en huevos de gallina comercializados en Tunja (Colombia). *Salud Soc Uptc*. 2014;12:22-7.

17. Morales PR, Avalos de la Cruz DA, Leyva-Ruelas G, Ybarra Moncada MaC. Calidad bacteriológica de leche cruda de cabra producida en Miravalles, Puebla. *Revista mexicana de ingeniería química*. 2012;11:45-54.
18. Barrera-Escorcia G, Fernández-Rendón CL, Wong-Chang I, Ramírez Romero P. La sensibilidad del grupo coliforme como indicador de la presencia de enterobacterias patógenas en cuatro cuerpos acuáticos de México. *Hidrobiológica*. 2013;23:87-96.
19. Sharath K, Archana D, Dhanashree B. Comparison of culture media for the isolation of salmonella spp. from stool samples. *Jarbs*. 2012;4:30-4.
20. Cuartas Trujillo MC, Molina Upegui OL, Restrepo Ceballos AC, Maya Carmona CY, Jaramillo Velázquez S, Donado Gómez JH, et al. Sensibilidad y especificidad del recuento de leucocitos en las materias fecales para predecir la presencia de Salmonella o Shigella en pacientes con enfermedad diarreica aguda. *Iatreia*. 2008;21:5-12.
21. Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R, Quesada Muñoz VdJ, Lobaina Rodríguez T, Tsoraeva A, Díaz Pérez M, et al. Manual de Medios de Cultivo. 3ra ed. BioCen ISBN 959-7160-25-0. La Habana, Cuba; 2004. p. 265.
22. SIGMA. Biochemicals and Reagents for Life Science Research; 2000. p. 1534.
23. ISO 11133-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media - Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media. ISSO. Geneva; 2003.
24. Arcos-Ávila EC, Mora-Cardona L, Fandiño-de Rubio LC, Rondón-Barragán Iang S. Prevalencia de Salmonella spp. en carne porcina, plantas de beneficio y expendios del Tolima. *Orinoquia*. 2013;17:59-68.
25. Miller S, Zieger U, Ganser C, Satterlee SA, Bankovich B, Amadi V, et al. Influence of land use and climate on Salmonella carrier status in the small Indian mongoose (*Herpestes auro-punctatus*) in Grenada, West Indies. *Journal of Wildlife Diseases*. 2015;51:60-8.
26. Rodríguez Torrens H, Barreto Argilagos G, Sedrés Cabrera M, Bertot Valdés J, Martínez Sáez S, Guevara Viera G, et al. Los alimentos de origen porcino: vehículos predominantes en las salmonelosis camagüeyanas. *Rev Prod Anim*. 2011;23:109-12.
27. Rodríguez R, Fandiño C, Donado P, Guzmán L, Verjan N. Characterization of Salmonella from commercial egg-laying hen farms in a central region of Colombia. *Avian Dis*. 2015;59:57-63.
28. Martínez Vasallo A, Villoch Cambas A, Ribot Enriquez A, Montes de Oca N, Riverón Alemán Y, Ponce Ceballos P. Calidad e inocuidad en la leche cruda de una cadena de producción de una provincia occidental de Cuba. *Rev Salud Anim*. 2015;37:79-85.
29. Muñoz S, Vilca L, Ramos D, Lucas J. Frecuencia de enterobacterias en verduras frescas de consumo crudo expendidas en cuatro mercados de Lima, Perú. *Rev Investig Vet*. 2013;24:300-6.
30. Noor Uddin GM, Larsen MH, Barco L, Minh Phu T, Dalsgaard A. Clonal Occurrence of Salmonella Weltevreden in Cultured Shrimp in the Mekong Delta, Vietnam. *Plos one*. 2015 [citado octubre 2015];10. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0134252>

31. Rahimi E, Shakerian A, Falavarjani AG. Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella isolated from fish, shrimp, lobster, and crab in Iran. *Comp Clin Pathol.* 2013;22:59-62.
32. Zhurbenko R. Metodología para el aprovechamiento de los subproductos de la industria alimenticia y otras proteínas en la evaluación de la calidad sanitaria de los alimentos [Tesis doctoral]. Habana: Universidad de La Habana; 2005.
33. Bridson EY. *The OXOID Manual*. 8th ed. OXOID Limited. U.K.: Wade Road, Basingstoke; 1998.
34. Zhurbenko R, Rodríguez Martínez C, Díaz Pérez M, Durán Vila A, López Hernández OD, Viera Oramas DR, et al. Caracterización de la peptona de soya para el cultivo de microorganismos. *Rev Cubana Med Trop.* 2006 [citado octubre 2015];58. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602006000200003&lng=es
35. Murray PR, Rosenthal KS, Faüer MA. *Microbiología médica*. 5ta ed. Madrid: Elsevier; 2009.
36. Tsoraeva A, Zhurbenko R. Development and characterization of a mixed nutrient base for the culture of a wide range of microorganisms. *Rev Latinoam Microbiol.* 2000;42:155-61.
37. Khan H, Flint SH, Yu PL. Development of a chemically defined medium for the production of enterolysin A from *Enterococcus faecalis* B9510. *J Appl Microbiol.* 2013;114:1092-102.
38. Fallah M, Bahram S, Javadian SR. Fish peptone development using enzymatic hydrolysis of silver carp by-products as a nitrogen source in *Staphylococcus aureus* media. *Food Science & Nutrition.* 2015;3:153-7.
39. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Wenn WC. *Color Atlas Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th ed. Philadelphia, New York: Lippincott; 1997.
40. Vasic S, Radojevic I, Pešic N, Comic L. Influence of sodium selenite on the growth of selected bacteria species and their sensitivity to antibiotics. *Kragujevac J. Sci.* 2011;33:55-61.
41. Merck. *Manual de medios de cultivo*. Darmstadt, Alemania: Editorial Merck; 1982.

Recibido: 25 de noviembre de 2015.

Aprobado: 10 de diciembre de 2015.

Yudisleidy López Ricardo. Centro Nacional de Biopreparados (BioCen). Mayabeque, Cuba.

Correo: yudisleidy.lopez@biocen.cu