

Artículo original

Calidad microbiológica y análisis de patógenos (*Shigella* y *Salmonella*) en lechuga

Kenia Barrantes* y Rosario Achí

Sección Infección-Nutrición, Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), Universidad de Costa Rica.

Recibido 12 de diciembre de 2010; aceptado 10 de mayo de 2011

Resumen: Se analizó la calidad microbiológica en 37 muestras de lechuga variedad criolla (*Lactuca sativa* var. Capitata L.) de distintos intermediarios en las provincias de San José y Cartago, en Costa Rica. Las muestras se recolectaron mediante muestreo no probabilístico por selección intencional. Se cuantificó *Escherichia coli* (NMP/g) como indicador de contaminación fecal y se determinó la presencia de patógenos específicos (*Shigella* y *Salmonella*), por cultivo y por PCR-Múltiple. En el 65% de las muestras analizadas se detectó *E. coli*, aunque no se encontró *Shigella* ni *Salmonella* por PCR-Múltiple o cultivo. Una posible explicación es que los niveles de contaminación de *Shigella* y *Salmonella* están por debajo de los límites de detección de ambos métodos (menos de 10^4 UFC/g para *Shigella* y menos de 10^2 UFC/g para *Salmonella*). Estos resultados establecen una base importante para continuar con este tema de investigación y analizar otras fuentes de transmisión de *Shigella* y *Salmonella*, dado que ambos patógenos son frecuentes en la región.

Palabras clave: *Shigella*, *Salmonella*, PCR, lechuga, *Escherichia coli*.

Microbiological quality and pathogen analysis (*Shigella* and *Salmonella*) of lettuce

Abstract: The microbiological quality of 37 lettuce samples of the creole variety (*Lactuca sativa* var. Capitata L.) obtained from different intermediaries at the provinces of San José and Cartago, in Costa Rica was analyzed. The samples were collected through a non-probabilistic sampling with intentional selection. *Escherichia coli* (NMP/g) was quantified as indicator of fecal contamination and the presence of specific pathogens (*Shigella* and *Salmonella*) was determined by culture and Multiplex-PCR. In 65% of the samples analyzed we detected *E. coli*, even though we did not find *Shigella* or *Salmonella* by Multiplex-PCR or culture. A possible explanation is that the *Shigella* or *Salmonella* contamination levels may have been under the detection limits for both methods (less than 10^4 CFU/g for *Shigella*, and less than 10^2 CFU/g for *Salmonella*). These results establish an important basis for continuing with this research subject and analyzing other sources of transmission of *Shigella* and *Salmonella* contamination, since both pathogens are frequent in the region.

Keywords: *Shigella*, *Salmonella*, PCR, lettuce, *Escherichia coli*.

* Correspondencia:
E-mail: kenia.barrantes@ucr.ac.cr

Introducción

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) han sido catalogadas por expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) como el problema de salud pública más diseminado en el mundo contemporáneo, causa importante del descenso de la productividad económica mundial [1,2]. La OMS estimó que sólo en el año 2005 murieron aproximadamente 1,8 millones de personas debido a enfermedad diarreica, asociada a la ingesta de agua o alimentos contaminados [3].

La shigelosis y la salmonelosis son infecciones de alto impacto para la salud humana, con alta mortalidad en grupos vulnerables de la población [4]. La contaminación

con *Shigella* y *Salmonella* se da no sólo por la vía directa, sino también por aguas y alimentos contaminados.

En EE. UU., en el período 1996-2006, *Salmonella* y *Shigella* fueron patógenos frecuentemente relacionados con ETA, asociándose los brotes de shigelosis al consumo de lechuga, perejil y cebollas y de salmonelosis a tomate, col de Bruselas, sandía y melón [5,6]. En este país, sólo durante el 2005 y 2006 se registraron 4 brotes por consumo de tomate, con 459 casos de salmonelosis confirmados por cultivo, mientras que en el año 2006 se registraron 121 brotes, con más de 3 300 casos [7,8].

En Europa, entre 1990-1992, *Salmonella* fue responsable del 83 al 87% de los brotes de ETA registrados. Su presencia se detectó en vegetales frescos de exportación (lechugas,

mostaza, albahaca, tubérculos, etc), con una frecuencia de 1,9% hasta 8,0% [9]. Se considera que desde la década de los 90 a la fecha, *Salmonella* es uno de los patógenos más persistentes causantes de ETA en el mundo [3].

En Costa Rica, durante el año 2005 se registraron 23 brotes de diarrea, y se observó que *Shigella* y *Salmonella* fueron los patógenos con mayor incidencia durante este período [10]. Para el año 2006, de 1.267 casos de ETA registrados, más de la mitad fueron causados por intoxicaciones alimentarias sin precisar su tipo; *Shigella* fue la segunda causa con una incidencia de 33,4% (423 casos), seguido de *Salmonella* con un 5,2% (66 casos) [10].

Ambas infecciones son de notificación obligatoria en este país, desde el año 2003 [11]. Sin embargo, en este registro no se especifica si la fuente de infección es directa, o por agua o alimentos, por lo que se desconoce que tan frecuentes son estas vías en la transmisión de ambos patógenos, ni cuales alimentos se asocian a los brotes registrados.

Los alimentos de consumo crudo, como la lechuga, presentan un mayor riesgo para la transmisión de éstos y otros enteropatógenos, pues no existe una etapa de procesamiento posterior que elimine las cargas microbianas iniciales [3,12,13].

Tradicionalmente, la detección de bacterias patógenas en alimentos, como *Shigella* y *Salmonella*, se realiza por cultivo convencional, cuya baja sensibilidad, demora la obtención del resultado final y, la complejidad en su procesamiento, es similar al análisis de muestras clínicas [14,15]. La identificación por cultivo se fundamenta en la caracterización fenotípica de reacciones bioquímicas del microorganismo en estudio, sin embargo la caracterización mediante el perfil fenotípico de las bacterias no es infalible dada la posibilidad de variación de los perfiles bioquímicos que presentan las cepas bacterianas *in vitro*.

Actualmente, se cuenta con otras alternativas diagnósticas para la detección de microorganismos patógenos, como las técnicas de biología molecular, fundamentalmente los métodos basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), que no se afectan por cambios en los perfiles bioquímicos; los resultados se obtienen más rápidamente y la sensibilidad es mayor.

En el Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), de la Universidad de Costa Rica (UCR), se cuenta con métodos moleculares (PCR-Múltiple) desarrollados en el laboratorio, para la detección de *Shigella* y *Salmonella* en lechuga variedad criolla (*Lactuca sativa* var. Capitata L.) [16-18]. Para *Shigella*, el método de PCR-Múltiple utilizado es específico de dos regiones de virulencia importantes: la región *ial* (por *invasion associated locus*) presente en el plásmido de invasión, cuyo producto es de 320 pb [10] y está codificado en el operón *mxi-spa* del SSTT (esencial en el fenotipo invasor) y el gen *ipaH*, codificado tanto en el pINV como en el cromosoma, con un producto de 600 pb [19-22]. Ambos métodos fueron desarrollados y validados en el INISA para la detección de estos patógenos en la matriz alimenticia específica [17,18].

Para *Salmonella*, el método molecular utilizado detecta

el gen *invA* por medio de una banda de 389 pb. Este gen está codificado en el cromosoma bacteriano, en la SPI1 y es esencial para la virulencia en modelos celulares y animales [22-26].

El objetivo del presente estudio fue analizar la calidad microbiológica y la presencia de *Shigella* y *Salmonella* por métodos moleculares y cultivo, en 37 muestras de lechuga variedad criolla (*Lactuca sativa* var. Capitata L.). Las lechugas fueron recolectadas en expendios de vegetales y puestos ambulantes, ubicados en las provincias de San José y Cartago (Área Metropolitana), en Costa Rica.

Materiales y métodos

Recolección y transporte de muestras: Se recolectaron 37 lechugas variedad criolla por medio de un muestreo no probabilístico por selección intencional, durante la época seca del año 2009 (meses de enero a mayo). Los sitios de muestreo fueron 14 puestos ambulantes y 23 expendios de vegetales, ubicados en las provincias de San José (cantón central, Goicoechea y Tibás) y Cartago (cantón central). Los sitios de muestreo fueron seleccionados por mala infraestructura (deterioro y suciedad de las instalaciones cuando el local cuenta con techo, pared y piso; en el caso de los puestos ambulantes, los alimentos se venden directamente en la calle, en sitios de alto tránsito de personas y vehículos) y condiciones que propician el riesgo de mala manipulación y contaminación de los alimentos (carencia de lavamanos o servicio sanitario, local atendido por una sola persona, la cual manipula tanto el alimento como el dinero directamente con sus manos, los alimentos se almacenan a temperatura ambiente, en bandejas o anaqueles sucios, en algunos casos estas bandejas están colocadas directamente en el piso).

Los muestreos se realizaron mensualmente, iniciando con lechugas provenientes de puestos ambulantes ubicados en la provincia de San José, durante los meses de enero y febrero. Posteriormente se recolectaron las muestras de expendios de vegetales ubicados en San José (meses de marzo y abril), para finalizar con los expendios ubicados en Cartago (mes de mayo). Las muestras fueron transportadas en frío (hielero con hielo gel) al laboratorio de Microbiología de Alimentos y Aguas del INISA y fueron analizadas el mismo día del muestreo.

Cultivo y bacterias utilizadas: Se utilizaron como control positivo *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076 y *Shigella flexneri* (INISA-01).

En todas las muestras se analizó la presencia de *Shigella* y *Salmonella* en 25 g y se cuantificó *Escherichia coli* (NMP/g). El cultivo de *Shigella*, *Salmonella* y la cuantificación de *E.coli* se realizó conforme al protocolo de referencia de la Asociación Americana de Salud Pública [15,27-29], sin realizar modificación alguna, excepto para el análisis de *Salmonella*, el cual es un ensayo acreditado en el INISA bajo la norma INTE-ISO/IEC 17025:2005 ante el Ente

Costarricense de Acreditación (ECA) (referirse a www.eca.or.cr; alcance LE-059).

Para la cuantificación de *E.coli*, se pesaron 25 g de la muestra, a la cual se le agregaron 225 mL de buffer triptona 0,1% y se homogenizó por 3 min a 230 rpm (Stomacher 400 Circulator Seward). A partir de esta dilución inicial (10^{-1}) se realizaron diluciones seriadas decimales de 10^{-2} y 10^{-3} .

De cada una de estas diluciones se inoculó 1 mL en una serie de 3 tubos con 9 mL de caldo lauril triptosa (OXOID) en campana Durham, incubándose por 48 h a 35 °C. Posteriormente, los tubos que mostraron turbidez y gas, se reinocularon en tubos con caldo EC-MUG (OXOID), que se incubaron a 44,5 °C por 24 h. Se consideraron positivos los tubos que mostraron turbidez, gas y fluorescencia con luz UV.

Para la detección de *Shigella*, se pesaron 25 g de la muestra, la cual se incubó con 225 mL de caldo GN (Hajna-BBL) y se homogenizó por 3 min a 230 rpm (Stomacher 400 Circulator Seward). Luego, muestras y controles se incubaron a 37 °C por un período de 20 h. Posteriormente, se inocularon en agar T7 agar xilosa lisina desoxicolato (XLD) y agar desoxicolato citrato (DC) (OXOID) y se incubaron por 24 horas a 35 °C. La lectura se realizó por presencia de UFC similares o sospechosas de *Shigella*.

Para *Salmonella*, se pesaron porciones de 25 g de lechuga, a las cuales se les agregó 225 mL de caldo lactosado (OXOID). Luego de una incubación por 24 h a 35 °C, se cultivó en caldos tetratonato (T) y Rappaport Vassidialis (RV).

Las muestras y controles se incubaron a 35 °C por 24 h, con posterior inoculación en agar XLD, Hektoen (HK) y sulfito de bismuto (SB) (OXOID). Las placas se incubaron por 24 h a 35 °C y luego se realizó lectura de UFC sospechosas.

Las colonias sospechosas de *Shigella* o *Salmonella* se analizaron por su perfil bioquímico (TSI, LIA, urea, citrato, indol, movilidad, catalasa, oxidasa), confirmado por API 20E (BIOMERIEUX) y serología.

Extracción del ADN: Para la extracción del ADN de controles y muestras se utilizó la técnica de fenol-cloroformo descrita por Wilson [30]. El ADN de las muestras se extrajo a partir del botón celular del caldo de cultivo (GN para *Shigella* y Caldo Lactosado para *Salmonella*) posteriormente a su incubación [17,18]. El ADN fue cuantificado por espectrofotometría utilizando un biofotómetro (Eppendorf 6132) y se almacenó a -70 °C hasta el momento de su utilización.

PCR-Múltiple: Se utilizó el método de PCR-Múltiple *Shigella* (*ipaH*, *ial*) y *Salmonella* (*invA*), previamente estandarizado y validado en el INISA [17,18]. La secuencia de los iniciadores (Innovagen, Suecia) para los genes *ipaH*, *ial* (*Shigella*) e *invA* (*Salmonella*) y el tamaño de los productos de amplificación se detallan en la tabla 1.

Se utilizó un control interno de amplificación (CIA) de 100 pb, cuya secuencia se obtuvo a partir del producto de *ipaH* en *Shigella* [17].

La mezcla de reacción fue la siguiente: buffer 1X, MgCl

Tabla 1. Secuencia de iniciadores para los genes *ipaH*, *ial* en *Shigella* spp. e *invA* en *Salmonella* spp.

Región/ Gen	Iniciadores	Producto de amplificación	Ref.
<i>ipaH</i>	GTTCCCTTGACCGCCTTTCGTACCGTC	600 pb	20
	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC		
<i>ial</i>	CTGGATGGTATGGTGAGG	320pb	16
	GGAGGCCAACAAATTATTTC		
<i>invA</i>	GCTGCGCGC GAACGGCGAAG	389 pb	22
	TCCCGGCAGAGTCCCAAT		

2,0mM, Taq polimerasa 0,5 U (Promega), 0,2 mM de cada dNTP (Applied Biosystems), 0,12 pM de los iniciadores, 0,1 ng del CIA, 5% de DMSO como adyuvante y 5 µl del ADN patrón. Esta mezcla se colocó en el termociclador (Verity, Applied Biosystems) y se utilizó la variante de PCR-towchdown o de gradiente de temperatura. Este protocolo constó de 30 ciclos; 10 ciclos iniciales (1 min a 94 °C, 30 s a 65 °C disminuyendo hasta 55 °C, y 1 min a 72 °C) y los últimos 20 ciclos en PCR estándar (1 min a 94 °C, 30 s a 55 °C y 1 min a 72 °C). Se adicionó un paso de extensión por 5 min a 72 °C al final de la reacción [17,18].

Se utilizaron como controles *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis ATCC 13076, *Shigella flexneri* (INISA-01) y *Escherichia coli* ATCC 25922.

El método molecular tiene una probabilidad de detección del 100% para *Shigella*, en el rango de $2,7 \times 10^4$ hasta $8,0 \times 10^7$ UFC/mL, y para *Salmonella*, de $5,6 \times 10^2$ hasta $5,5 \times 10^7$ UFC/mL, con una probabilidad mayor o igual al 90%. Asimismo, cuenta con una selectividad del 100%, exactitud relativa del 100%, especificidad relativa del 100%, sensibilidad relativa para *Shigella* del 100% (a partir de 10^4 UFC/g) y para *Salmonella* del 68% (a partir de 10 UFC/ml).

El análisis de muestras se realizó a partir del ADN extraído del botón celular del caldo de enriquecimiento (Caldo GN). Los productos de PCR se detectaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio (0,5 µg/mL), por 45 min a 140 mV. Las bandas correspondientes a *ipaH* (600 pb), *ial* (320 pb) e *invA* (389 pb) se visualizaron con un transiluminador UVITEC (Cambridge, UK).

Resultados y discusión

En esta investigación se analizó la contaminación microbiológica de lechuga variedad criolla por medio de cultivo convencional y un método molecular previamente estandarizado y validado en la matriz en estudio [17,18]. Este tipo de lechuga es de amplia distribución y consumo en el país, existiendo zonas productoras en las provincias de Cartago y San José [31].

En la mayoría de las muestras analizadas se detectó contaminación fecal. El 65% (24/37) mostró *E.coli* en un rango desde 4 hasta 460 NMP/g, conforme se detalla en la tabla 2. Los valores más altos ($>10^2$ NMP/g) correspondieron a muestras provenientes de un puesto ambulante y 4 expendios de vegetales, todos ubicados en la provincia de

San José.

Sin embargo, a pesar de estos resultados, en ninguna de las muestras se detectó *Shigella* ni *Salmonella*, tanto por PCR-Múltiple como por cultivo convencional.

Para todas las reacciones el desempeño de los controles (control interno de amplificación o CIA, control de reactivos, control negativo, control positivo y control positivo de extracción) fue el esperado, como se muestra en la figura 1.

Para los alimentos de consumo crudo, como frutas y hortalizas, se mencionan entre las principales causas para la contaminación fecal: la irrigación con aguas de mala calidad (aguas residuales no tratadas), el uso de fertilizantes a base de excremento, el contacto con animales, la mala manipulación y el almacenamiento inadecuado [32,33].

En la región latinoamericana, otros estudios evidencian también la contaminación fecal y con ello, el riesgo de Enfermedad de Transmisión Alimentaria (ETA) por consumo de hortalizas que se venden en mercados y expendios de vegetales [34-36]. Además de constituir un problema para la salud pública, las ETA también son un gasto económico substancial, que afecta a individuos, familia, industria, sistemas de salud y comunidades enteras. En países no desarrollados el problema va en detrimento de la economía nacional, pues una epidemia de ETA afecta negativamente tanto al turismo como al comercio interno. Como ejemplo, sólo para el período 2004-2005, se registraron 3645 rechazos de alimentos provenientes de América Latina y el Caribe con mercado a EEUU, siendo el 77% de los rechazos atribuibles a problemas de inocuidad [37].

Dos condiciones comúnmente observadas en muchos de los expendios muestreados para este estudio fueron la mala manipulación y almacenamiento; por ejemplo, estos alimentos así como otros vegetales de consumo crudo, se mantenían a temperatura ambiente, en bandejas o anaqueles

Tabla 2. Detección de *Escherichia coli* (nmp/g) en 37 muestras de lechuga (*Lactuca sativa* var. Capitata L.) recolectadas durante la época seca de 2009, Costa Rica.

Tipo de intermediario	Ubicación	Rango (NMP/g)	Número de muestras (n=37)
Puestos ambulantes (n = 14)	San José	< 3	6
		3-10	5
		11-10 ²	2
		>10 ²	1
		Total	14
Expendios de vegetales (n = 23)	Cartago	< 3	2
		3-10	4
		11-10 ²	2
		>10 ²	0
		Total	8
	San José	< 3	5
		3-10	2
		11-10 ²	4
		>10 ²	4
		Total	15

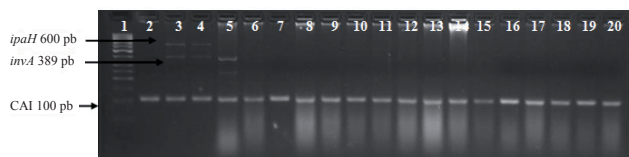


Figura 1. Resultados de análisis de muestras de lechuga de las provincias de San José y Cartago, por PCR Múltiple para *Shigella* (*ipaH*)- *Salmonella* (*invA*). Línea 1: marcador molecular, línea 2: control negativo, línea 3: *Shigella*-*Salmonella* (controles de extracción), línea 4: *Shigella* (130 ng)-*Salmonella* (150 ng), línea 5: *Salmonella* (control de extracción); línea 6: *E. coli* ATCC 25922, líneas 7 a 20: muestras 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23 y 24.

sucios; en algunos casos estas bandejas se encontraban en el piso y el alimento era manipulado con las manos directamente. Este criterio se utilizó para la selección de las muestras con el fin de aumentar la probabilidad de muestras positivas por *Shigella* y/o *Salmonella*, sin embargo no se obtuvieron resultados positivos por ninguno de los métodos utilizados.

Lo anterior sugiere que los niveles de contaminación por *Shigella* y *Salmonella* en lechuga variedad criolla, proveniente de estos puestos ambulantes y expendios, están por debajo de los niveles de detección ya establecidos durante la estandarización y evaluación del desempeño del método molecular (menos de 10⁴ UFC/g para *Shigella* y menos de 10² UFC/g para *Salmonella*). Otro estudio desarrollado en el INISA mostró resultados similares luego del análisis de un mayor número de muestras (n=164) utilizando un diseño de muestreo probabilístico (simple al azar) aplicado a la Gran Área Metropolitana (provincias de San José, Alajuela, Heredia y Cartago) (datos sin publicar). Esta conclusión se respalda dado el óptimo desempeño analítico y diagnóstico de los métodos validados, en los cuales se definió una probabilidad de detección específica para el alimento analizado [17,18].

Sin embargo, una muestra negativa por PCR o cultivo analizada con esta metodología no implica necesariamente una ausencia del riesgo para el caso de *Shigella*, cuya dosis infectante está por debajo del nivel de detección analítico. Para *Salmonella*, la dosis infectante conocida es detectable por ambos métodos, aunque, se ha descrito la replicación de este patógeno a niveles de 10² a 10⁴ UFC/g a partir de un inóculo de menos de 1 NMP/g en vegetales de consumo crudo como la alfalfa, y la persistencia de forma viable en tomate hasta por 49 días y en lechuga y perejil desde el momento de la siembra en el campo hasta algunos días posteriores a su cosecha [32,38]. No se puede descartar tampoco el riesgo de transmisión de otros patógenos, pues la detección de *E. coli* evidencia contaminación fecal. En relación a estos resultados, en investigaciones posteriores se ampliará el tamaño de la muestra, dado que la frecuencia estimada es baja y además se utilizará esta herramienta diagnóstica para el análisis de otro tipo de muestras (alimentos y aguas), que puedan relacionarse con un riesgo mayor para la transmisión de estos y otros enteropatógenos.

La baja frecuencia detectada puede reflejar, en parte, el efecto de estrategias de control de la inocuidad que se

han promocionado en Costa Rica en los últimos años. La promoción de buenas prácticas agrícolas, buenas prácticas de manufactura, exigir que todo manipulador de alimentos que trabaje en el país se capacite en el tema de inocuidad alimentaria y adquiera un carné que lo acredite como tal, por mencionar algunos ejemplos, son parte del código alimentario costarricense, contemplados en decretos y reglamentos técnicos. La implementación de estas políticas relacionadas con la inocuidad alimentaria incide en mejoras sobre la calidad microbiológica y disminuye la probabilidad de la transmisión de patógenos, particularmente en alimentos de consumo crudo como frutas y hortalizas.

Los hallazgos del presente estudio establecen una base importante para continuar con este tema de investigación, dado que a nivel mundial, *Shigella* y *Salmonella* son patógenos frecuentes en brotes de origen alimentario e hídrico [10,39]; sin embargo, no se cuenta con información en Costa Rica sobre su transmisión por alimentos específicos a pesar de los brotes registrados. *Salmonella* se ha aislado de gran variedad de alimentos como huevo, pollo, pavo, cerdo, agua, camarón, culantro coyote, té de limón y alimentos para aves y cerdos [10]. Para *Shigella*, se han publicado trabajos que señalan la posible asociación de esta bacteria a brotes de origen hídrico [10,39,40]. Por lo anterior, se deben desarrollar más investigaciones que establezcan el riesgo asociado al consumo de alimentos específicos y la presencia de estos patógenos.

Referencias

1. Unicef & United Nations. Special session on children. Pollution-related diseases kill millions of children a year. Disponible en: www.unicef.org/specialsession/press/02pr25diseases.htm. Acceso 19 de abril, 2011.
2. World Health Organization. Foodborne diseases. Possibly 350 times more frequent than reported. Press release WHO/58. 13 August 1997. Press Release WHO/58. Disponible en: https://centre.icddr.org/images/jddr152_press-release-who.pdf. Acceso 21 de abril del 2011.
3. Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H. Food-borne diseases - the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *Int J Food Microbiol.* 2010;139 Suppl 1:S3-15.
4. Lanata CF, Mendoza W. Improving diarrhea estimates. Robert Black, editor. World Health Organization. Geneva, Switzerland: 2002. Disponible en: www.who.int/child_adolescent_health/documents/pdfs/improving_diarrhoea_estimates.pdf. Acceso 29 de junio 2010.
5. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food – 10 states, 2006. *MMWR.* 2007; 56: 336-9
6. Frost JA, McEvoy MB, Bentley CA, Anderson Y. An outbreak of *Shigella sonnei* infection associated with consumption of iceberg lettuce. *Emerg Infect Dis.* 1999; 1:26-9.
7. Bidol SA, Daly ER, Rickert RE, Hill TA, Taylor Jr TH, Lynch MF, et al. Multistate outbreaks of *Salmonella* infections associated with raw tomatoes eaten in restaurants, United States, 2005-2006. *MMWR.* 2007; 56:909-11.
8. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Salmonella* Surveillance: Annual Summary, 2006. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2008. Disponible en: www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmtab/2006/salmonellaannualsummary2006.pdf. Acceso 21 de abril 2011.
9. D'Aoust JY. *Salmonella* and the international food trade. *Int. J. Food Microbiol.* 1994; 24:11-31.
10. Kopper G, Calderón G, Schneider S, Domínguez W, Gutiérrez G. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Estudio de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua. Informe técnico sobre ingeniería agrícola y alimentaria. 2009; Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO): 13-39.
11. La Gaceta. Diario oficial. Año CXXV. N18-64 páginas. Lunes 27 de enero de 2003. Disponible en: http://historico.gaceta.go.cr/pub/2003/01/27/COMP_27_01_2003.pdf. Acceso 01 de noviembre 2009.
12. Sivapalasingam S, Friedman CR, Cohen L, Tauxe RV. Fresh produce: a growing cause of outbreaks of food borne illness in the United States, 1973 through 1997. *Food Prot.* 2004; 67:2342-53.
13. Beuchat LR. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microb Infect.* 2002; 4:413-23.
14. Lee MD, Fairchild MS. Sample preparation for PCR. En: Maurer J, editor. *PCR Methods in Foods*. New York: Springer Science + Business Media Inc; 2006. p. 41-9.
15. Sperber WA, Moorman MA, Freier TA. Cultural methods for the enrichment and isolation of microorganisms. In: Pouch Downes F, Ito K, editors. *Compendium of methods for the microbiological examination of food*. Washington: American Public Health Association; 2001. p.45-51.
16. Achí R, Lindberg A. Rapid and sensitive detection of *Shigella sonnei* in feces by the use of an O-specific monoclonal antibody in immunomagnetic separation-polymerase chain reaction combined assay. *Clin Microbiol Infect.* 1996; 2:55-8.
17. Barrantes K, McCoy C, Achí R. Detection of *Shigella* in lettuce by the use of a rapid molecular assay with increased sensitivity. *Braz J Microbiol.* 2010; 41:993-1000.
18. Chacón L, Barrantes K, García C, Achí R. Estandarización de un método de biología molecular (PCR) para la detección del gen *invA* en *Salmonella* sp. en lechuga. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2010, 30:18-23.
19. Schroeder G, Hilbi H. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp: Controlling host cell signalling, invasion, and death by Type III Secretion. *Clin Microbiol Rev.* 2008; 21:134-56.
20. Lampel KA, Orlandi PA, Kornegay L. Improved template preparation for PCR-based assays for detection of food-borne bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 10:4539-42.
21. Thong KL, Hoe SL, Puthuchery SD, Yasin RM. Detection of virulence genes in Malaysian *Shigella* species by multiplex PCR assay. *BMC Infect Dis.* 2005; 5:8.
22. Ferreti R, Mannazu I, Cocolin L, Comi G, Clementi F. Twelve-hour PCR-based method for detection of *Salmonella* spp. in food. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 2:977-8.
23. Ginocchio C, Galán J. Functional conservation among members of the *Salmonella* Typhimurium *InvA* family of proteins. *Infect Immun.* 1995; 63:729-32.
24. Singer RS, Cooke CL, Maddox CW, Isaacson RE, Wallace

- RL. Use of pooled samples for the detection of *Salmonella* in feces by polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest.* 2006; 18:319-25.
25. Bishop A, House D, Perkins T, Baker S, Kingsley RA, Dougan G. Interaction of *Salmonella enterica* serovar Typhi with cultured epithelial cells: roles of surface structures in adhesion and invasion. *Microbiology.* 2008; 154:1914-26.
 26. Perera K, Murray A. Development of a PCR assay for the identification of *Salmonella enterica* serovar Brandenburg. *J Med Microbiol.* 2008; 57:1223-7.
 27. Lampel KA. *Shigella*. In: Pouch Downes F, Ito K editors. *Compendium of methods for the microbiological examination of food.* Washington: American Public Health Association; 2001. p. 381-4.
 28. Andrews WH, Flowers RS, Silliker J, Bailey JS. *Salmonella*. In: Pouch Downes F, Ito K editors. *Compendium of methods for the microbiological examination of food.* Washington: American Public Health Association; 2001. p. 357-76.
 29. Kornacki JL, Johnson JL. *Enterobacteriaceae*, coliforms and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: Pouch Downes F, Ito K editors. *Compendium of methods for the microbiological examination of food.* Washington: American Public Health Association; 2001. p. 69-80.
 30. Chachaty E, Saulnier P. Isolating Chromosomal DNA from bacteria. In: Rapley R, editor. *The Nucleic Acid Protocols Handbook.* Totowa: NJ, Humana Press Inc; 2000. p. 29-31.
 31. Cerdas M, Montero M. Guías técnicas del manejo poscosecha para el apio y la lechuga en el mercado fresco. Ministerio de Agricultura y Ganadería, FITTACORI y Universidad de Costa Rica. Disponible en: http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/manual_apio_lechuga_portada.pdf. Acceso: 01 de diciembre, 2010
 32. Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. *Modern Food Microbiology.* 7th ed. New York: Springer Science + Business Media Inc; 2006.
 33. Steele M, Odumeru J. Irrigation water as source of foodborne pathogens on fruit and vegetables. *Food Prot.* 2004; 67:2839-49.
 34. Martino TK, Lemus D, Leyva V, Tejedor R, de los Reyes, M, Soto P. Incidencia de *Listeria* spp. en hortalizas frescas. *Rev Cub Salud Pública.* 2008, 34:1-11.
 35. Rivera-Jacinto M, Rodríguez-Ulloa C, López Orbegoso J. Contaminación fecal en hortalizas que se expenden en mercados de la ciudad de Cajamarca, Perú. *Rev Per Med Exp Salud Pública.* 2009; 26: 45-8.
 36. Vega M, Jiménez M, Salgado R, Pineda G. Determinación de bacterias de origen fecal en hortalizas cultivadas en Xochimilco en octubre de 2003 a marzo de 2004. *Investigación Universitaria Disciplinaria.* 2005; 4:21-25.
 37. Conferencia regional FAO/OMS sobre Inocuidad de los Alimentos para las Américas y el Caribe. San José, Costa Rica, 6-9 Diciembre, 2005. FAO-OMS. Disponible en: www.rlc.fao.org/es/prioridades/sanidad/inocui.htm. Acceso: 5 de mayo, 2009.
 38. Islam M, Morgan J, Doyle MP, Phatak SC, Millner P, Jiang X. Persistence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on lettuce and parsley and in soils on which they were grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Foodborne Pathog Dis.* 2004; 1:27-35.
 39. Valiente C, Mora D. El papel del agua para consumo humano en los brotes de diarrea reportados en el período 1999-2001 en Costa Rica. *Rev Costarric Salud Pública.* 2002; 11:26-40.
 40. Barrantes K, Veko P, Achí R. Brote de diarrea asociado a *Shigella sonnei* debido a contaminación hídrica. San José, Costa Rica, 2001. *Rev Costarric Cienc Méd.* 2004; 25:15-22.