



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**

*La Universidad Católica de Loja*

**ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA**

**TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO**

**Detección y aislamiento de cepas presuntivas de *E. coli* productor de toxina shiga en ensaladas de lechuga listas para el consumo**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**AUTOR:** Pauta Maza Richard Xavier

**DIRECTORA:** Salinas Hualpa Diana Inés, Mgtr

**LOJA-ECUADOR**

**2016**

## APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Magister.

Diana Inés Hualpa Salinas

**DOCENTE DE LA TITULACIÓN**

De mi consideración:

Que el presente trabajo, denominado: “**Detección y aislamiento de cepas presuntivas de *E. coli* productor de toxina shiga en ensaladas de lechuga listas para el consumo**” realizado por Pauta Maza Richard Xavier ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, septiembre de 2016

f).....

Mgtr. Diana Hualpa S.

**Directora**

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Pauta Maza Richard Xavier declaro ser autor del presente trabajo de titulación: **Detección y aislamiento de cepas presuntivas de *E. coli* productor de toxina shiga en ensaladas de lechuga lista para el consumo**, de la Titulación Bioquímica y Farmacia, siendo Diana Inés Hualpa Salinas director (a) del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f.....

Pauta Maza Richard Xavier

C.I. 1104230220

## **DEDICATORIA**

A todas las personas que ayudaron directa e indirectamente en la realización de este proyecto

## **AGRADECIMIENTO**

A todos quienes han formado parte de mi vida profesional, agradezco su amistad y apoyo

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA .....	i
APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN .....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS .....	iii
DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTO .....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCION.....	3
CAPITULO I.....	5
MARCO TEÓRICO.....	5
1.1. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA).....	6
1.1.1. Infección alimentaria.....	7
1.1.2. Intoxicación alimentaria.....	7
1.1.3. Toxiinfección.....	7
1.2. <i>Escherichia coli</i> .....	8
1.2.1. <i>Escherichia coli</i> O157:H7 productor de toxina Shiga.....	8
1.2.1.1. Fuentes y transmisión.....	9
1.2.1.2. Toxina Shiga.....	9
1.3. Vegetales listos para el consumo .....	9
CAPITULO II .....	11
OBJETIVOS .....	11
2.1. Objetivo general.....	12
2.2. Objetivo específico.....	12
CAPITULO III .....	13
MATERIALES Y MÉTODOS .....	13
3.1. Muestreo y preparación de la muestra .....	14
3.2. Enriquecimiento en medio selectivo.....	14
3.3. Aislamiento en medio diferencial .....	15

3.4. Criocongelación .....	16
CAPITULO IV .....	17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
CONCLUSIONES.....	21
RECOMENDACIONES.....	22
BIBLIOGRAFÍA .....	23
ANEXOS .....	28
ANEXO A: Enriquecimiento de muestras .....	29
ANEXO B: Aislamiento de especies bacterianas .....	30
ANEXO C: Colonias aisladas y controles usados en la etapa de siembra .....	31
ANEXO D: Especificaciones del medio de cultivo MacConkey Sorbitol.....	32
ANEXO E: Criocongelación .....	34
ANEXO F: Resultados para muestras presuntivas de <i>E. coli</i> O157:H7 .....	35
ANEXO G: Amplificación de DNA mediante PCR múltiple: Cepa control <i>E. coli</i> O157:H7 .....	36

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número de muestras y unidades analizadas .....	14
Tabla 2. Ensaladas de lechuga listas para consumo: Porcentaje de muestras presuntivas .....	18

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Pesaje y enriquecimiento de muestras .....	15
<b>Figura 2.</b> Aislamiento en medio diferencial SMAC .....	16
<b>Figura 3.</b> Agar MacConkey Sorbitol (SMAC) .....	30
<b>Figura 4.</b> Aislamiento de colonias <i>E. coli</i> O157:H7 en agar SMAC .....	31
<b>Figura 5.</b> Control positivo: cepa de referencia <i>E.coli</i> O157:H7 .....	31
<b>Figura 6.</b> Colonias típicas de <i>E. coli</i> fermentadoras de sorbitol.....	31
<b>Figura 7.</b> Criocongelación de cepas presuntivas de <i>E. coli</i> O157:H7.....	34



## ABREVIATURAS

<b>SMAC:</b>	MacConkey Sorbitol
<b>ADN:</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>mEC+n:</b>	Medio <i>E. coli</i> modificado con novobiocina
<b>ETA:</b>	Enfermedades Transmitidas por Alimentos
<b>°C:</b>	Grados Celsius
<b>g:</b>	Gramo
<b>CH:</b>	Colitis Hemorrágica
<b>BPM:</b>	Buenas Prácticas de Manufactura
<b>BPMP:</b>	Buenas Prácticas de Manejo Postcosecha
<b>STEC:</b>	<i>Escherichia coli</i> productor de toxina shiga
<b>SUH:</b>	Síndrome Urémico Hemolítico
<b>stx:</b>	Toxina tipo shiga
<b>FDA:</b>	Administración de Alimentos y Medicamentos
<b>VLC:</b>	Vegetales listos para el consumo
<b>EHEC:</b>	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica
<b>TNF:</b>	Factor de Necrosis Tumoral
<b>ETEC:</b>	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénic

## RESUMEN

*Escherichia coli* O157:H7 productor de toxina shiga (STEC) es considerando un patógeno emergente transmitido por alimentos, que últimamente ha sido vinculado a brotes infecciosos asociados con la ingesta de vegetales mínimamente procesados. Teniendo en cuenta estos antecedentes la presente investigación tuvo como objetivo conocer la prevalencia de cepas presuntivas de *E. coli* O157:H7 aisladas de ensaladas de lechuga listas para el consumo. En total se analizaron 15 muestras de tres tipos de ensaladas de lechuga listas para consumir, las cuales fueron enriquecidas en caldo *E. coli* modificado con novobiocina (0.02g/L) y posteriormente sembradas en agar SMAC para el aislamiento de colonias presuntivas, los cultivos fueron purificados hasta obtener colonias típicas de *E. coli* O157:H7 y luego fueron criocongeladas a -80°C. De acuerdo a normativas de referencia el 93.3 % (14) no cumplieron con los límites permitidos siendo presuntivas para el serotipo *E. coli* O157:H7, debido a la presencia del patógeno en este tipo de alimentos, se debe considerar a los vegetales de estudio como posibles factores de riesgo en la transmisión de enfermedades alimentarias, hasta su posterior validación mediante técnicas serológicas o moleculares.

**PALABRAS CLAVE:** *E. coli* O157:H7, toxina shiga, vegetales

## ABSTRACT

*Escherichia coli* O157:H7 producing shiga toxin (STEC) is considering an emerging foodborne pathogen, which has recently been linked to infectious outbreaks associated with intake of minimally processed vegetables. Given this background the present study aimed to determine the prevalence of presumptive strains of *E. coli* O157: H7 isolated lettuce salad ready for consumption. In total 15 samples of three types of salad ready to eat lettuce, which were enriched broth with novobiocin modified *E. coli* (0.02g/L) and then seeded in SMAC agar for isolation of presumptive colonies were analyzed, the cultures were purified to obtain typical colonies of *E. coli* O157:H7 and then were cryopreserved at -80 °C. According to reference standards 93.3 % (14) did not meet the allowable limits being presumptive serotype *E. coli* O157:H7 were analyzed, because the presence of the pathogen in this type of food should be considered as plant study possible risk factors in the transmission of foodborne illness, until further validation by serological or molecular techniques.

**KEYWORDS:** *E. coli* O157:H7, shiga toxin, vegetables

## INTRODUCCION

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), constituyen a nivel mundial un creciente problema de salud pública, debido al consumo de agua y alimentos contaminados por microorganismos patógenos o por sustancias tóxicas que los mismos producen y que provocan manifestaciones clínicas en el consumidor (WHO, 2011). Un gran número de enfermedades alimentarias son provocadas por bacterias, siendo los géneros *Salmonella*, *Campylobacter* y la cepa O157:H7 de *Escherichia coli* las más representativas como causantes de ETA, esta cepa enterohemorrágica de *E. coli* con frecuencia se halla en diversidad de alimentos como carnes, agua, leche y en vegetales que han sido contaminados con heces de animales infectados (González & Rojas, 2005; Anmat, 2015). La gran demanda por el consumo de alimentos saludables y nutritivos como frutas y vegetales frescos o en ensaladas, ha incentivado a la Agroindustria al desarrollo de productos de cuarta gama los cuales se distribuyen empacados, troceados, y listos para su consumo (García, 2008).

Las ensaladas frescas son procesadas en instalaciones con adecuadas condiciones de refrigeración, con la finalidad de conservar las características propias del producto (Valero, 2008). Sin embargo, por sus características físicas y de cultivo, algunos de estos productos vegetales están expuestos a contaminación de tipo biológico y químico, situación que genera un riesgo para la salud humana (Quilliam *et al.*, 2012). Según afirma Puig *et al.* (2013) muchos de los riesgos biológicos asociados a los productos vegetales están relacionados con deficientes prácticas de producción, como el uso de agua de riego contaminada, uso de fertilizantes a base de desechos biológicos e inclusive la presencia de animales en los espacios de cultivo, que provocan un aumento en el riesgo microbiológico del producto, es así que los vegetales han sido asociados en repetidas ocasiones con enfermedades transmitidas por alimentos. García, (2008) señala que en los vegetales, dicho riesgo se relaciona con enterobacterias, coliformes totales y fecales además del género *Listeria*, las cuales indican una higiene deficiente en la cadena de producción del alimento por lo cual se debe cumplir con Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y Buenas Prácticas de Manejo Postcosecha (BPMP) para asegurar un producto con una adecuada calidad alimentaria.

Las ensaladas, y en general los productos de cuarta gama, son muy perecederos incluso más que las hortalizas crudas no procesadas, ya que durante la etapa de corte, se da un aumento de la respiración y transpiración en el tejido vegetal que conduce a un rápido

deterioro del producto (Valero, 2008). Además, la formación de exudados ricos en minerales, azúcares, vitaminas y otros nutrientes puede apoyar el crecimiento de microorganismos patógenos (Oliveira *et al.*, 2011). Durante los últimos años se han realizado algunos estudios en vegetales frescos, con la finalidad de determinar la prevalencia de *E. coli* O157:H7 productor de toxina Shiga, según Somayeh *et al.* (2014) y Saeed *et al.* (2013) la presencia de este patógeno es nula en vegetales como lechuga y espinaca, encontrándose únicamente otras variantes de *E. coli* en estas muestras vegetales. Sin embargo en una investigación realizada por Reuben & Makut (2014) la incidencia de *E. coli* O157:H7 en algunos vegetales frescos, si es considerable al encontrar que el 17.5 % de las muestras examinadas, presentó dicho serotipo. Así también Feng & Reddy (2013) mencionan que muchos de los productos listos para el consumo especialmente lechuga, espinaca, brotes de soja, cilantro y tomate contienen cepas de *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC). Las cuales causan infecciones que afectan al tracto gastrointestinal provocando brotes de diarrea, colitis hemorrágica (CH) y síndrome hemolítico-urémico (SUH) o bien pueden localizarse a nivel extra intestinal (Gómez *et al.*, 2002).

La determinación de este microorganismo en una muestra alimentaria inicia con una etapa de enriquecimiento para promover el crecimiento de las especies bacterianas presentes en el alimento, el uso de agares de cultivo tanto selectivos y diferenciales permite aislar el patógeno en estudio y obtener así un buen número de colonias para la posterior identificación molecular en PCR Múltiple (Feng *et al.*, 2011). Esta investigación en sí se plantea evaluar posibles factores de riesgo, asociados al consumo de alimentos contaminados que pueden derivar en enfermedades de transmisión alimentaria.

## **CAPITULO I**

### **MARCO TEÓRICO**

## 1.1. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)

Las ETA incluyen todos aquellos síndromes originados por el consumo de alimentos y agua que contienen microorganismos patógenos los cuales afectan en gran medida la salud de los consumidores (Hernandez, 2010). Las fuentes de contaminación asociadas con los alimentos son variadas, pueden provenir del mismo alimento, medio ambiente, superficies de contacto y principalmente de seres vivos infectados que actúan como reservorios para las agentes patógenos (Díaz *et al.*, 2012). En el año 2000 cerca de dos millones de personas presentaron enfermedades diarreicas graves de las cuales un número alarmante corresponde a niños menores de cinco años que debido a falta de atención y tratamiento adecuado terminaron en muerte (Barreto *et al.*, 2010).

La ingesta de alimentos contaminados con patógenos infectivos o incluso que presenten toxinas producidas por algunos microorganismos, tales como *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, conllevan al desarrollo de enfermedades alimentarias, las cuales en la actualidad son poco comprendidas dado que el uso de herramientas de diagnóstico fiables para identificar a los agentes microbianos causantes de estas enfermedades aún son limitadas (Newell *et al.*, 2010).

El aumento de brotes, la aparición de nuevos mecanismos de transmisión así como el incremento de la resistencia de los microorganismos patógenos a los agentes antimicrobianos ha sido determinante para considerar a las ETA como un problema de salud pública emergente y de alto impacto socioeconómico (González & Rojas, 2005).

Los alimentos que comemos muy raramente son estériles, una gran mayoría de estos representan un ambiente ideal para que se desarrollen y se multipliquen diversos agentes microbianos, derivados a partir de la microflora natural de la materia prima con la cual se elaboró el producto o inclusive ser introducidos durante las etapas de cosecha y procesamiento (Bezirtzoglou *et al.*, 2000). Más de 250 enfermedades transmitidas por alimentos se han descrito actualmente presentando una gran variedad de síntomas clínicos, siendo las alteraciones gastrointestinales las de mayor recurrencia, las buenas prácticas de producción de alimentos y adecuados hábitos de consumo son necesarios para disminuir el riesgo de infección y de brotes de ETA (Lösch, 2010).

Como consecuencia del consumo de alimentos contaminados el desarrollo de enfermedades alimentarias se dividen en tres categorías:

### **1.1.1. Infección alimentaria.**

Se produce por la ingestión de alimentos que presenten patógenos perjudiciales en una cantidad determinada, los cuales oportunamente se han desarrollado y proliferado en el alimento ingerido, de esta manera las bacterias con propiedades infectivas invaden el organismo del huésped, se alojan por lo general en su tracto intestinal o en cualquier otro órgano y generan un deterioro de los epitelios (Pascual, 2005).

Tal es el caso de microorganismos como *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus* (Domínguez & Ros, 2010).

### **1.1.2. Intoxicación alimentaria.**

Se produce una vez que en aquellos productos contaminados, ciertas bacterias se han desarrollado y multiplicado a tal punto de elaborar sus propias toxinas que una vez ingerido el alimento, estas son absorbidas a través del epitelio intestinal lo que deriva en alteraciones en el huésped, en sí basta con la presencia de la sustancias tóxicas para que se desarrolle una enfermedad, y no de la bacteria como tal (Pascual, 2005). Por lo general se derivan del consumo de alimentos secos como harinas, cereales y alimentos poco ácidos que han sido tratados térmicamente de forma insuficiente, dichas toxinas son generadas por microorganismos como *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* (Domínguez & Ros, 2010).

### **1.1.3. Toxiinfección.**

Es el resultado del consumo de alimentos con cierta cantidad de microorganismos patógenos que son capaces de producir o liberar toxinas una vez que han sido ingeridos (Domínguez & Ros, 2010). Este es el tipo de enfermedad procedente del consumo de alimentos contaminados con *E. coli* O157.H7 productor de toxina Shiga, considerada como la causa principal de diarrea sanguinolenta, la cual puede derivar en un fallo renal agudo (Pascual, 2005).



## **1.2. *Escherichia coli***

*Escherichia coli* es un microorganismo Gram negativo que normalmente coloniza el tracto gastrointestinal, rara vez causa enfermedad, salvo en huéspedes con un sistema inmune comprometido, sin embargo existen varios serotipos de *E. coli* altamente adaptados que han adquirido mecanismos específicos de virulencia, con lo cual presentan una mayor capacidad adaptativa permitiéndoles causar un amplio espectro de enfermedades de este tipo de patógeno intestinal hay seis categorías: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (CEEA), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC ) y *E. coli* difusamente adherentes (DAEC) (Kaper *et al.*, 2004).

A parte de las carnes, las frutas y verduras pueden ser contaminados por agentes patógenos transmitidos por los alimentos, tales como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*, además se ha demostrado que los tratamientos actuales de lavado y desinfección industrial no garantizan la total eliminación del patógeno cuando está presente (Abadias *et al.*, 2012)

### **1.2.1. *Escherichia coli* O157:H7 productor de toxina Shiga.**

Es un importante patógeno perteneciente a la categoría EHEC asociado a enfermedades transmitidas por alimentos o ETA, causa infecciones graves en el hombre, como colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico, algo particular de las cepas de esta categoría de *E. coli* radica en la producción de toxinas Shiga de tipo 1 y 2 por lo cual también se la denomina como *E. coli* STEC o Verotoxigenica, este tipo de toxinas tienen la capacidad de atacar a los ribosomas eucariotas y así inhibir la síntesis de proteínas, manifestando su actividad principalmente con daños al epitelio intestinal (Gómez *et al.*, 2002).

El empleo de restos biológicos durante las etapas de cultivo actúa como una fuente de contaminación para una gran diversidad de alimentos y el medio ambiente (Karmali *et al.*, 2010). Por lo general después del consumo de alimentos contaminados tales como carne picada, verduras, hortalizas, frutas, inclusive agua es cuando se manifiestan los primeros síntomas clínicos, dado que la mayoría de cepas EHEC poseen factores de virulencia distintivos que les facilitan la colonización del tracto gastrointestinal humano y posterior liberación de las toxinas shiga, siendo la *E. coli* O157:H7, el serotipo más común en América (Page & Liles, 2013).

#### **1.2.1.1. Fuentes y transmisión**

Los rumiantes son los principales reservorios para cepas de *E. coli* O157:H7, siendo en especial el ganado bovino, uno de los portadores que con mayor frecuencia transporta este tipo de patógeno, otros rumiantes como ovejas, ciervos y cabras también se consideran reservorios importantes además de otros mamíferos como cerdos y conejos (WHO, 2011).

La transmisión al hombre puede darse por contacto directo con los animales portadores, sus heces, agua, o suelos contaminados con el patógeno, además el consumo de carne picada, carne poco cocida u otros derivados cárnicos también se consideran como fuentes de infecciones, en los últimos años el consumo de frutas y verduras frescas o en ensaladas han sido asociadas a un creciente número de brotes infecciosos relacionados con EHEC O157:H7 (Ferens & Hovde, 2011).

#### **1.2.1.2. Toxina Shiga.**

La familia de las toxina Shiga agrupa tres miembros: la toxina shiga (stx) producida por *Shigella dysenteriae*, y las dos toxinas stx1 y stx2 producidas por la EHEC (Johannes & Römer, 2010). Este tipo de toxinas manifiestan actividad citotóxica ante células Hela, Vero, renales, aórticas, endoteliales de cerebro y células tubulares de riñón, inducen en el epitelio intestinal un aumento en la síntesis de quimioquinas, provocando una elevación de la respuesta inflamatoria de la mucosa, con la liberación de interleucinas, tales como IL-8, IL-1 y del Factor de Necrosis Tumoral (TNF), esta liberación provoca un aumento en la síntesis de los receptores de la toxina con lo cual la sensibilidad de las células se incrementa finalizando en la muerte celular (Padola & Etcheverria, 2014).

### **1.3. Vegetales listos para el consumo**

Los vegetales listos para el consumo (VLC) son verduras y hortalizas frescas que no incorporan ningún tipo de conservante ni aditivo por lo cual deben mantenerse en refrigeración, con un tiempo máximo de consumo de 7 días, además pertenecen al grupo de los productos de cuarta gama dado que no han sufrido ningún tipo de tratamiento térmico, se encuentran preparados, lavados, envasados y listos para consumir o cocinar (Elika, 2014). Dentro de este grupo de hortalizas las ensaladas de cuarta gama, duran más

tiempo entre 7 a 10 días empacadas, los productos que más se comercializan son las lechugas en diversas variedades, espinacas y zanahorias (Galván, 2008). Acorde a la preferencia del consumidor los productos ya vienen troceados, listas para consumir directamente, sin desperdiciar nada ni generar resto alguno, además de ser accesibles en cualquier centro de venta, la comodidad y facilidad para su consumo hacen que sean productos cada vez más demandados (Ainia, 2012). La seguridad alimentaria en productos listos para el consumo, especialmente en los alimentos crudos se han visto asociados principalmente con microorganismos patógenos, varios brotes de gastroenteritis se relacionan con el consumo de verduras frescas contaminadas al igual que algunos reportes de toxiinfecciones asociados con la ingestión de verduras, que revelan una falta de higiene durante la manipulación (Da Silva *et al.*, 2007).

La lechuga cultivada (*Lactuca sativa*) es uno de los principales alimentos de consumo en la población, al ser verduras habitualmente frescas, sus hojas se encuentran en diversos productos de consumo, como mezclas de ensaladas y sándwiches producidos en gran cantidad debido a las numerosas tendencias alimenticias por consumir alimentos frescos y de gran valor nutricional, motivo por el cual la demanda de este producto en el mercado se ha incrementado substancialmente en los últimos años, la calidad nutricional de la lechuga puede estar influenciada por factores ambientales como la luz, la temperatura, la aplicación de fertilizantes, condiciones de almacenamiento además del contenido de humedad de la planta también afecta a la concentración de nutrientes (Mou, 2008). Recientemente se ha evidenciado que la ingesta de diversos alimentos principalmente aquellos de consumo directo que no necesitan ser cocidos, presentan un nivel de riesgo preocupante para la población, ya que microbiológicamente y en base a normativas de control de calidad de alimentos estos derivan frecuentemente en casos y brotes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (García, 2008; Mou, 2009).

La preocupación por los riesgos microbiológicos es evidente, ya que en la mayoría de los casos, los productos mínimamente procesados se consumen crudos y la incorrecta manipulación humana además de inadecuadas normas de seguridad en algunas etapas de las operaciones aumentan el riesgo de contaminación por microorganismos patógenos (Bachelli *et al.*, 2013).

## **CAPITULO II**

### **OBJETIVOS**

## **2.1. Objetivo general**

Conocer la prevalencia de cepas presuntivas de *Escherichia coli* O157:H7, aisladas de ensaladas de lechuga listos para el consumo.

## **2.2. Objetivo específico**

Detección, aislamiento y criocongelación de cepas presuntivas de *E.coli* O157:H7

### **CAPITULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3.1. Muestreo y preparación de la muestra

El presente estudio se realizó con vegetales empacados en bolsas de polipropileno listos para el consumo, en total se analizaron 3 tipos de ensaladas de lechuga (Ensalada Americana, Ensalada Mexicana, Ensalada César) y se realizaron 5 muestreos de cada tipo correspondientes a distintos lotes de producción. Las muestras fueron recolectadas de supermercados de la localidad, y posteriormente se trasladaron asépticamente al laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad Técnica Particular de Loja, con la finalidad de no alterar la microflora y las características de la muestra.

La obtención de las muestras se realizó en función de la cantidad de productos disponibles en el sitio de expendio, basándose en la norma: muestreo de hortalizas y frutas frescas (INEN 1750:1994), se seleccionaron 3 unidades al azar de cada tipo de vegetal, de un lote no mayor a 50 unidades (**Tabla 1**). Para la preparación de la submuestra de 200 gramos, se aplicaron las recomendaciones establecidas por la norma: control microbiológico de los alimentos, toma, envío y preparación de muestras (INEN 1529-2:2013), la cual indica que si el alimento está formado por capas o extractos, separar en partes y tomar asépticamente muestras de cada una.

**Tabla 1.** Número de muestras y unidades analizadas

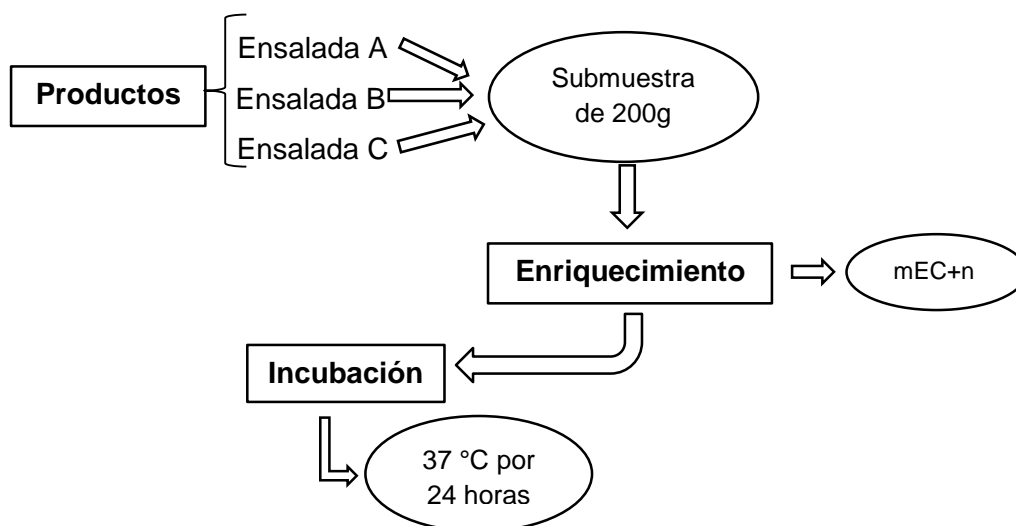
Producto	N° de muestras	N° de lotes	Total unidades
Ensalada A	5	3	15
Ensalada B	5	3	15
Ensalada C	5	3	15
<b>TOTAL</b>	<b>15</b>		<b>45</b>

Fuente: El Autor

### 3.2. Enriquecimiento en medio selectivo

La etapa de enriquecimiento se utilizó con la finalidad de promover el crecimiento de una gran variedad de microorganismos que pueden encontrarse en pequeñas cantidades en la muestra y cuyo desarrollo es lento, junto a otras especies de microorganismos no tan exigentes, algunos de estos medios también pueden contener agentes que inhiben el desarrollo de un determinado microorganismo frente al resto de la población (Casado et al., 2012). Para lo cual la muestra vegetal se colocó en caldo *E. coli* modificado con novobiocina

(mEC+n) (**Anexo A**) y se incubó a 37 °C por 24 horas (**Figura 1**). Posterior al tiempo de incubación se apreció un cambio en la turbidez del medio además de presencia de gas.



**Figura 1.** Pesaje y enriquecimiento de muestras  
**Fuente:** El Autor

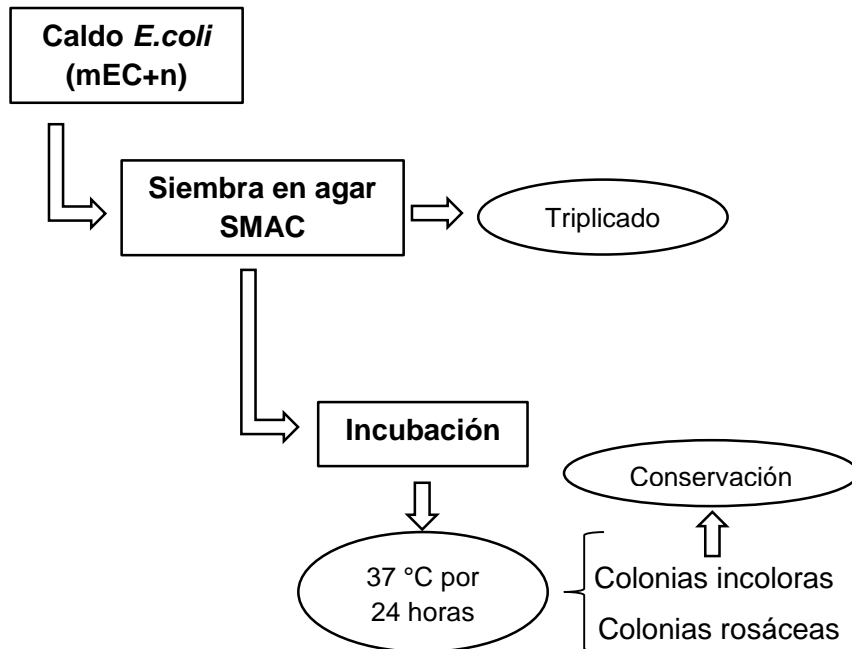
### 3.3. Aislamiento en medio diferencial

La técnica permitió aislar la bacteria de acuerdo a la capacidad de esta para fermentar o no un determinado azúcar, obteniendo así un determinado tipo de microorganismo (Casado et al., 2012). De cada caldo se sembró una asada en medio de cultivo MacConkey SMAC OXOID® (**Anexo B**), el cual contiene sorbitol en lugar de lactosa para la identificación de microorganismos fermentadores y no fermentadores de sorbitol y se incubó a 37°C durante 24 horas en atmósfera aeróbica (**Figura 2**). Transcurrido este lapso de tiempo se apreció el crecimiento de dos tipos de colonias (**Anexo C**), incoloras-redondas indicativo de cepas no fermentadoras de sorbitol, presuntivas para el serotipo *E. coli* O157:H7, además de colonias rosáceas-pequeñas típico de cepas fermentadoras de sorbitol que según Feng *et al.*, (2011) corresponde a otros serogrupos de *E. coli* en vista de que el medio empleado de acuerdo a su composición inhibe el desarrollo de otras bacterias (**Anexo D**).

Con la finalidad de obtener un mejor aislamiento, se resembró estas colonias en nuevas placas de agar SMAC, y ya purificadas se conservó para posteriores análisis. Las colonias obtenidas además fueron contrastadas con un control positivo correspondiente a una cepa



de referencia de *Escherichia coli* O157:H7 productor de toxina shiga. Proporcionada por el Instituto de Microbiología Clínica de la Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile.



**Figura 2.** Aislamiento en medio diferencial SMAC  
**Fuente:** El Autor

### 3.4. Criocongelación

A partir de placas con cultivos frescos y purificados (máximo 18 horas), se tomó una muestra representativa y se colocó en criotubos con esferas de cerámica de Microbank™ que luego fueron puestos en congelación a -80°C (**Anexo E**).

## **CAPITULO IV**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Se analizaron un total de 15 muestras de las cuales el 93.3 %, es decir 14 muestras (**Tabla 2**) (**Anexo F**) presentaron crecimiento bacteriano presuntivo para el serotipo O157:H7 productor de toxina shiga, ya que según Feng *et al.* (2011) luego de incubar por 24 horas las placas de SMAC, las colonias típicas de este serotipo se presentan como incoloras, con un diámetro de 1-2 mm, por lo cual se procedió a catalogar las cepas como presuntivas para *E. coli* O157:H7. Según Rappaport & Henig, (1952) el agar MacConkey con sorbitol (SMAC) se recomienda para el aislamiento de cepas patógenas de *E. coli* O157:H7. La eficiencia del agar SMAC ha sido confirmada por March & Ratnam, (1986) que obtuvieron una sensibilidad del 100%, exactitud 86% y una especificidad del 85%, y lo recomendaron como un medio rápido y fiable para la detección de *E. coli* O157:H7.

**Tabla 2.** Ensaladas de lechuga listas para consumo: Porcentaje de muestras presuntivas

Vegetales	N° de muestras analizadas	Presencia presuntiva de STEC	
		n°	%
Ensalada de lechuga A	5	5	100
Ensalada de lechuga B	5	5	100
Ensalada de lechuga C	5	4	80
Total	<b>15</b>	<b>14</b>	<b>93.3</b>

**Fuente:** El Autor

De acuerdo a un plan de muestreo simple, se puede establecer la calidad microbiológica de un lote si en la mayoría de muestras analizadas, se aísla algunas variedades de patógenos contaminantes (ICMSF, 2006). Según Centre for Food Safety of Hong Kong, (2014) y lo establecido por la Norma SPRel N° 192/2012 y SAGyP N° 799/2012, el serotipo *E. coli* O157:H7 en alimentos listos para el consumo debe estar totalmente ausente para considerarlo como un parámetro satisfactorio y en caso de encontrar presencia de este patógeno, las muestras se clasifican como inaceptables, potencialmente peligrosas y se prohíbe su consumo. Los resultados del presente estudio indican que el 93.3% de las muestras de ensaladas de lechuga listas para el consumo, mostraron presencia presuntiva de *E. coli* O157:H7 productor de toxina, las mismas que no cumplen con los criterios

microbiológicos previamente citados, ni con lo indicado en otras normativas como (Gilbert *et al.*, 2000), (FSANZ, 2001) y (Bolton, 2009) que establecen la ausencia total de éste patógeno en los alimentos de estudio.

En vista de los múltiples factores que se han asociado a la contaminación de productos vegetales y por ende a un aumento en el riesgo de infecciones de tipo alimentario, a nivel mundial se han realizado algunos estudios en lechuga fresca o en ensaladas lista para consumir, en las cuales se ha reportado prevalencia de *E. coli* O157:H7, tomando como referencia dichos estudios internacionales los resultados obtenidos son semejantes a lo reportado en Irán por Uzeh & Adepoju, (2013) los cuales al analizar diversas ensaladas de vegetales: pepino, col, lechuga, zanahoria, encontraron presencia de *E. coli* O157:H7 en un 100 % de las muestras estudiadas, dichos datos se relacionaron con la falta de tratamiento de abono bovino y avícola que los granjeros usaban frecuentemente en los suelos de sus cultivos, factores que también influirían en el alto porcentaje de muestras contaminadas del presente estudio dado que los productos analizados también fueron cultivados al aire libre en suelos fertilizados orgánicamente, lo que incrementa el riesgo de transferencia de patógenos desde el suelo o agua a las partes comestibles de las plantas (Khandaghi *et al.*, 2010; Ibekwe *et al.*, 2007). En Nigeria el estudio de vegetales frescos producidos en campos agrícolas también reveló un 66.7 % de *E. coli* O157:H7 en muestras de lechuga, en vista que el agua utilizada en los cultivos provenía de efluentes de mataderos y zonas ganaderas (Abakpa *et al.*, 2015).

Valores inferiores a los obtenidos en nuestro estudio se han reportado en Nigeria por Najafi & Bahreini, (2012) quienes indicaron una prevalencia de 11.4 % correspondiente a *E. coli* STEC en ensaladas de vegetales frescos listos para consumir almacenados a 5 °C, variaciones en dicha temperatura según estudios realizados en USA y Turquía, incrementan el desarrollo del serotipo O157:H7 entre 2.0 y 1.5 UFC/g (Luo *et al.*, 2010; Ergönül, 2011), por lo tanto si bien los productos de estudio se elaboraron acorde a las exigencias del mercado, la alta prevalencia de STEC obtenida podríamos atribuirla también a deficiencias en los sistemas de refrigeración durante su distribución a distintas localidades.

Otros porcentajes menores son los encontrados en Líbano donde se reportó un 26.8 % de muestras contaminadas con *E. coli* fecal en vegetales orgánicos frescos, de las cuales el 5.12 % concerniente a lechuga fue consistente con *E. coli* O157:H7 (Khatib *et al.*, 2015) y en Suiza los datos obtenidos por Althaus *et al.* (2012) revelaron una prevalencia de 0.70% de STEC en lechuga lista para el consumo proveniente de plantas productoras de vegetales, además no reportaron presencia de *Salmonella spp* pero si una baja cantidad de *L. monocytogenes*, *Cronobacter*, y EPEC. En Irán el análisis de vegetales frescos como

lechuga, pepino, rábano, obtenidos de granjas donde se usó abono bovino como fertilizante reveló presencia de STEC del 0.35 % (Khandaghi *et al.* 2010), lo cual además se relaciona con estudios realizados en USA y Noruega por Islam *et al.* (2004) y Johannessen *et al.* (2005) quienes evidenciaron que *E. coli* O157:H7 puede persistir por varias semanas en suelos fertilizados con abono bovino contaminado, para luego transferirse a los cultivos.

En Ghana se reportó una prevalencia de STEC de 1.1 % en ensaladas listas para el consumo que incluían lechuga, zanahoria, pepino, repollo, el agua de riego empleado en los cultivos además reveló una concentración de *E. coli* O157:H7 del 13.0 % (Abubakari *et al.*, 2015), datos similares a los obtenidos en Brasil en donde se halló una prevalencia de 3.8 % de *E. coli* O157:H7 en muestras de agua de riego usadas en granjas para producción primaria de lechuga (Ceuppens *et al.*, 2014). Por lo citado anteriormente la calidad de los fertilizantes orgánicos, el agua de riego y la temperatura de los sistemas de transporte y almacenamiento influirían directamente en el alto porcentaje de prevalencia de STEC encontrado en nuestro estudio, a pesar de que los productos analizados se han sometido a procesos de inocuidad, es importante indicar que el serotipo *E.coli* O157:H7 según Solomon *et al.* (2002) puede internalizarse en el tejido vegetal, y así evitar la acción de desinfectantes, con lo que no se garantiza la total eliminación de los agentes infecciosos, siendo esto consistente con las especies bacterianas reportadas.

La prevalencia presuntiva del serotipo patógeno *E. coli* O157:H7 hallada en ensaladas de lechuga listas para el consumo y en otros tipos de vegetales frescos ha permitido establecer que estos alimentos presentan un riesgo alto en la transmisión de ETA, evidenciándose actualmente un número creciente de brotes infecciosos debido al consumo de vegetales crudos mínimamente procesados. Se requieren realizar estudios adicionales para complementar el diagnóstico presuntivo, como PCR multiplex o el uso de antisueros anti-O157 para identificar la presencia de toxinas y factores de virulencia característicos de STEC.

## CONCLUSIONES

- El 93.3 % de las muestras analizadas, mostraron crecimiento bacteriano para el serotipo *E. coli* O157:H7, por lo cual se las catalogó como cepas presuntivas.
- Las 14 cepas de *E. coli* O157:H7 aisladas y purificadas se criocongelaron para futuros análisis moleculares.
- Las muestras analizadas no cumplen con los criterios establecidos en normas internacionales, por lo que pueden ser consideradas como posibles factores de riesgo en la transmisión de ETA.

## RECOMENDACIONES

En posteriores estudios mediante diagnóstico molecular por PCR-Múltiple complementar los resultados obtenidos, para validar la presencia de *E. coli* 0157:H7 productor de toxina shiga a partir de las cepas catalogadas como presuntivas, dado que en un ensayo preliminar se verificó la presencia de las toxinas y algunos factores de virulencia correspondientes a la cepa de referencia usada como control positivo **(ANEXO G)**

Realizar un seguimiento microbiológico similar en otros tipos de productos vegetales, de mucha demanda en la colectividad, incluyendo aquellos productos frescos de venta libre y consumo directo

## BIBLIOGRAFÍA

- Abadias, M., Alegre, I., Oliveira, M., Altisent, R., & Viñas, I. (2012). Growth potential of *Escherichia coli* O157: H7 on fresh-cut fruits (melon and pineapple) and vegetables (carrot and escarole) stored under different conditions. *Food Control*, 27(1), 37–44.
- Abakpa, G. O., Umoh, V. J., Ameh, J. B., Yakubu, S. E., & Ibekwe, A. M. (2015). Prevalence and antimicrobial susceptibility of pathogenic *Escherichia coli* O157 in fresh produce obtained from irrigated fields. *Environmental Technology & Innovation*, 4(12), 1–7.
- Abubakari, A., Amoah, I. D., Essiaw-Quayson, G., Larbi, J. A., Seidu, R., & Abaidoo, R. C. (2015). Presence of pathogenic *E. coli* in ready-to-be-eaten salad food from vendors in the Kumasi Metropolis, Ghana. *African Journal of Microbiology Research*, 9(21), 144–1445.
- Ainia. (2012). Alimentación saludable: ensaladas listas para consumir. Barcelona, España. Ainia Publishing. Recuperado de <https://actualidad.ainia.es>.
- Althaus, D., Hofer, E., Corti, S., Julmi, a., & Stephan, R. (2012). Bacteriological Survey of Ready-to-Eat Lettuce, Fresh-Cut Fruit, and Sprouts Collected from the Swiss Market. *Journal of Food Protection*, 75(7), 1338–1341.
- Anmat. (2015). Prevención de enfermedades transmitidas por alimentos. Buenos Aires, Argentina. ANMAT Publishing. Recuperado de <https://www.anmat.gov.ar>.
- Bachelli, M. L. B., Amaral, R. D. Á., & Benedetti, B. C. (2013). Alternative sanitization methods for minimally processed lettuce in comparison to sodium hypochlorite. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(3), 673–678.
- Barreto, G., Sedrés, M., Rodríguez, H., & Guevara, G. (2010). Agentes bacterianos asociados a brotes de Enfermedades Trasmitidas por Alimentos. *Revista Electronica de Veterinaria*, 11(3), 1-15.
- Bezirtzoglou, E., Maipa, V., Voidarou, C., Tsiotsias, A., & Papapetropoulou, M. (2000). Food-Borne Intestinal Bacterial Pathogens. *Microbial Ecology in Health and Disease Microb Ecol Health Dis*, 12(2), 96–104.
- Bolton, E. (2009). Guidelines for Assessing the Microbiological Safety of Ready-to-Eat Foods Placed on the Market, London, Wellington House Publishing. Recuperado de: <http://www.gov.uk>.
- Casado, M., Torrico, G., Medina, M. (2012). Medios de cultivo en un laboratorio de microbiología. Recuperado de <https://libroslaboratorio.files>.
- Centre for Food Safety of Hong Kong. Microbiological Guidelines for Food: For ready-to-eat food in general and specific food items (2014). Hong Kong. Recuperado de <https://www.cfs.gov.hk/eindex.html>



- Ceuppens, S., Hessel, C. T., De Quadros Rodrigues, R., Bartz, S., Tondo, E. C., & Uyttendaele, M. (2014). Microbiological quality and safety assessment of lettuce production in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 181(7), 67–76.
- Da Silva, S. R. P., Verdin, S. E. F., Pereira, D. C., Schatkoski, A. M., Rott, M. B., & Corção, G. (2007). Microbiological quality of minimally processed vegetables sold in Porto Alegre, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(4), 594–598.
- Díaz, T., Valdés, M., Caballero, A., & Monterrey, P. (2012). Enfermedades transmitidas por alimentos: Causas más frecuentes en los niños. *Revista de Nutrición e Higiene*, 7(44), 42-44.
- Domínguez, L. A., & Ros, C. (2010). *Manipulador de alimentos: La importancia de la higiene en la elaboración y servicio de comidas*. Mexico DF, Mexico. Ideaspropias Editorial S.L.
- Elika. (2014). Frutas y Hortalizas listas para el consumo: IV Gama. Madrid, España. Recuperado de <http://www.elika.eus>.
- Ergönül, B. (2011). Survival characteristics of Salmonella Typhimurium and Escherichia coli O157:H7 in minimally processed lettuce during storage at different temperatures. *Journal Fur Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit*, 6(3), 339–342.
- Feng, P., Reddy, S. (2013). Prevalences of Shiga toxin subtypes and selected other virulence factors among Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains isolated from fresh produce. *Journal of Clinical Microbiology*, 3(11), 1-7
- Feng, P., Weagant, S., & Jinneman, K. (2011). Bacteriological Analytical Manual: Diarrheagenic Escherichia coli. USA. Recuperado de <https://www.fda.gov>.
- Ferens, W. A., & Hovde, C. J. (2011). Escherichia coli O157:H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(4), 465–87.
- FSANZ. (2001). Guidelines for the microbiological examination of ready - to - eat foods: Australia and New Zeland. Melbourne, Australia. Recuperado de <http://foodstandards.gov.au>.
- Galván, G., García, M., & Julio, R. (2008). Lechuga: cultivos de hoja. *Revista de Agronomía y Horticultura Montevideo*, 3(4), 10-14.
- García, A. D. (2008). Aplicación de la técnica de iv gama para la elaboración de ensaladas. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 61(2), 4658–4666.
- Gilbert, R., Louvois, J., Donovan, T., Little, C., Nye, K., Ribeiro, C., & Bolton, F. (2000). Guidelines for the microbiological quality of some ready-to-eat foods sampled at the point of sale. *Communicable Disease and Public Health / PHLIS*, 3(3), 163–167.
- Gómez, D., Miliwebsky, E., Fernández, C., Baschkier, A., Manfredi, E., Zotta, M., Nario, F., Piquin, A., Sanz, M., Etcheverria, A., Padola, N., Parma, A., & Rivas M. (2002).

- Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* productora de verotoxina de hamburguesas congeladas y quesos blandos. *Revista Argentina de Microbiología*, 4(34), 66-71.
- González Flores, T., & Rojas Herrera, R. A. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: Prevención y diagnóstico. *Salud Publica de Mexico*, 47(5), 388–390.
- Hernandez, A. G. D. (2010). *Tratado de Nutrición: Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos*. Medellin, Colombia. Ed Médica Panamericana.
- Ibekwe, a M., Grieve, C. M., & Yang, C.-H. (2007). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on lettuce after soil fumigation. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(5), 1,7
- ICMSF. (2006). Bacteriological Analytical Manual. USA. CFSAN Publisher. Recuperado de <https://www.cfsan.fda.gov>.
- Islam, M., Morgan, J., Doyle, M. P., Phatak, S. C., Millner, P., & Jiang, X. (2004). 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 Pathogens and Disease*, 1(1), 27–35.
- Johannes, L., & Römer, W. (2010). Shiga toxins--from cell biology to biomedical applications. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(2), 105–116.
- Johannessen, G. S., Bengtsson, G. B., Heier, B. T., Bredholt, S., Wasteson, Y., & Rørvik, L. M. (2005). Potential Uptake of *Escherichia coli* O157 : H7 from Organic Manure into Crisphead Lettuce Potential Uptake of *Escherichia coli* O157 : H7 from Organic Manure into Crisphead Lettuce. *Society*, 71(5), 2221–2225.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews. Microbiology*, 2(2), 123–140.
- Karmali, M. a., Gannon, V., & Sargeant, J. M. (2010). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Veterinary Microbiology*, 140(3-4), 360–370.
- Khandaghi, J., Razavilar, V., & Barzgari, A. (2010). Isolation of *Escherichia coli* O157 : H7 from manure fertilized farms and raw vegetables grown on it , in Tabriz city in Iran. *African Journal of Microbiology Research*, 4(9), 891–895.
- Khatib, A., Olama, Z., & Khawaja, G. (2015). Original Research Article Shiga Toxin-Producing *E . coli* ( STEC ) Associated with Lebanese Fresh Produce. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(2), 481–496.
- Lösch, L. S. (2010). Patógenos productores de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). *Revista de Inmunología y Microbiología Argentina*, 3(7), 3-6.
- Luo, Y., He, Q., & McEvoy, J. L. (2010). Effect of storage temperature and duration on the behavior of *Escherichia coli* O157:H7 on packaged fresh-cut salad containing romaine and iceberg lettuce. *Journal of Food Science*, 75(7), 390–39.

- March, S. B., & Ratnam, S. (1986). Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 23(5), 869–872.
- Mou, B. (2008). Lettuce: In *Vegetables I*. USA. Ed Springer Science & Business Media.
- Mou, B. (2009). Nutrient Content of Lettuce and its Improvement. *Current Nutrition & Food Science*. 5(4), 242-248.
- Najafi, M. B. H., & Bahreini, M. (2012). Microbiological Quality of Mixed Fresh-Cut Vegetable Salads and Mixed Ready- to-Eat Fresh Herbs in Mashhad , Iran. *International Conference on Nutrition and Food Sciences IPCBEE*, 39(1), 62–66.
- Newell, D. G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., ... Kruse, H. (2010). Food-borne diseases - The challenges of 20years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*, 139(1), 3–15.
- NTE INEN 1529-2 (2013): Control microbiológico de los alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico
- NTE INEN 1750 (1994): Hortalizas y frutas frescas. Muestreo
- Oliveira, M. A. de, Maciel de Souza, V., Morato Bergamini, A. M., & De Martinis, E. C. P. (2011). Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. *Food Control*, 22(8), 1400–1403.
- Padola, N., & Etcheverria, A. (2014). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in human, cattle and foods: Strategies for detection and control. Ed Frontiers.
- Page, A. V, & Liles, W. C. (2013). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections and the Hemolytic-Uremic Syndrome. *The Medical Clinics of North America*, 97(4), 681–95.
- Pascual, M. del R. (2005). *Enfermedades de origen alimentario: su prevención*. Ed Diaz de Santos.
- Puig, Y., Leyva, V., Rodríguez, A., Suárez, J., Molejón, Pedro., Pérez, Y., Muñoz, O. (2013). Microbiological quality of vegetables and factors associated with contamination in growing areas in Havana. *Nutrición e Higiene de los Alimentos*, 14(4), 2-3.
- Quilliam, R., Prysor, A., Jones, D. (2012). Lettuce Cultivar Mediates Both Phyllosphere and Rhizosphere Activity of *Escherichia coli* 0157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 5(12),1-7.
- Rappaport, F., & Henig, E. (1952). Media for the isolation and differentiation of pathogenic *Esch. coli* (serotypes O111 and O55). *Journal of Clinical Pathology*, 5(4), 361.
- Reuben, C. R., & Makut, M. . (2014). Occurrence of *Escherichia coli* O157 : H7 in vegetables grown and sold in Lafia metropolis , Nigeria. *World Journal of Microbiology*, 1(3), 17–21.

- Saeed, A. Y., Mazin, H., Saadi, A., & Hussein, S. O. (2013). Detection of *Escherichia coli* O157 in vegetables. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 6(2), 16–18.
- Solomon, E. B., Yaron, S., & Matthews, K. R. (2002). Transmission of *Escherichia coli* O157 : H7 from Contaminated Manure and Irrigation Water to Lettuce Plant Tissue and Its Subsequent Internalization Transmission of *Escherichia coli* O157: H7 from Contaminated Manure and Irrigation Water to Lettuce Plant T. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1), 5–9.
- Somayeh, M., Siavosh, S., & Mohammad, M. (2014). Shiga Toxin- Producing *Escherichia coli* isolated from lettuce samples in Theran, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(1), 4-6
- SPReI N° 192/2012 y SAGyP N° 799/2012. Vegetales minimamente procesados: Hortalizas y frutas frescas enteras o cortadas, peladas o no, lavadas, tratadas o no y envasadas listas para consumir.
- Uzeh, R., & Adepoju, A. (2013). Incidence and survival of *Escherichia coli* O157 : H7 and *Listeria monocytogenes* on salad vegetables. *International Food Research Journal*, 20(4), 1921–1925.
- Valero, S. P. (2008). Estudio sobre el comportamiento de compra de ensaladas frescas preparadas (Cuarta gama) en comunas de Santiago. Universidad Central de Santiago. Santiago, Chile.
- WHO. (2011). *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). OMS Publishing. Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre>.

## **ANEXOS**

## ANEXO A: Enriquecimiento de muestras

### A.1 Preparación Caldo *E. Coli* modificado con novobiocina

- Pesar 16.65 g y diluir en 450 ml de agua destilada
- Calentar el medio agitando constantemente hasta obtener una apariencia transparente
- Autoclavar mediante calor húmedo a 121°C y a 1 atmosfera e presión durante 15 minutos
- En recipientes estériles pesar 0,009 g de suplemento novobiocina y en forma aséptica adicionar al caldo *E. coli*.

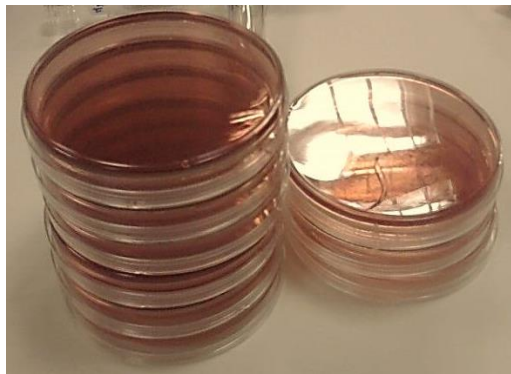
### A.2 Enriquecimiento en el medio

- Para cada muestreo pesar asépticamente 200 g de muestra de vegetal
- Colocar en 450 ml de caldo *E. coli* modificado con novobiocina previamente esterilizado
- Finalmente incubar a 37°C +- 1 °C por 24 horas en condiciones aeróbicas

## ANEXO B: Aislamiento de especies bacterianas

### B.1 Preparación agar MacConkey Sorbitol (SMAC)

- Pesar 51.5 g y diluir en 1000ml de agua destilada,
- Calentar hasta ebullición y agitar hasta disolución completa del medio
- Autoclavar mediante calor húmedo a 121 °C y a 1 atmósfera de presión durante 15 minutos,
- Distribuir aproximadamente 20 ml en cajas Petri plásticas de 94 x 116 mm y esperar a que el medio solidifique
- Guardar en refrigeración a 4°C hasta su uso



**Figura 3.** Agar MacConkey Sorbitol (SMAC)  
**Fuente:** El Autor

### B2. Siembra en medio diferencial SMAC

- Tomar una asada de 50 uL de cada uno de los medios de enriquecimiento
- Sembrar de forma aislada y por triplicado en placas de agar MacConkey Sorbitol (SMAC)
- Rotular las placas adecuadamente según el número de muestreo
- Incubar las placas a 37°C por 24 horas en atmósfera aeróbica
- Pasado el tiempo de incubación identificar colonias rosadas e incoloras, siendo fermentadoras y no fermentadoras de sorbitol respectivamente
- Considerar a aquellas colonias incoloras como <<presuntivas>>
- No se recomienda revisar las cajas después de las 24 horas de incubación
- Resembrar nuevamente las colonias incoloras en nuevas placas de agar e incubar por 24 horas con la finalidad de purificar los cultivos

**ANEXO C: Colonias aisladas y controles usados en la etapa de siembra**



**Figura 4.** Aislamiento de colonias *E. coli* O157:H7 en agar SMAC  
**Fuente:** El Autor



**Figura 5.** Control positivo: Cepa de referencia *E. coli* O157:H7  
**Fuente:** El Autor



**Figura 6.** Colonias típicas de *E. coli* fermentadoras de sorbitol  
**Fuente:** El Autor



## ANEXO D: Especificaciones del medio de cultivo MacConkey Sorbitol



### PRODUCT SPECIFICATION



Product Name	<b>Sorbitol MacConkey Agar</b>
Product Code	<b>PO5069A</b>

Form of Product	Poured plate
Storage	6 – 12°C
Filling weight	17 g ± 5 %
Packaging	10 plates wrapped in foil
pH	7.1 ± 0.2
Colour	Rose, transparent
Shelf life	26 weeks
Intended Usage	A selective and differential medium for the detection of <i>Escherichia coli</i> O157. For professional use only.
Technique	Depends on the different methods. For information see Oxoid CM813.

Typical Formulation*	grams per litre
Peptone	20.0
Sorbitol	10.0
Bile Salts No. 3	1.5
Sodium chloride	5.0
Neutral red	0.03
Crystal violet	0.001
Agar	15.0

\* Adjusted as required to meet performance standards.

#### Quality Control

- Control for general characteristics, labelling and printing
- Control for sterility  
 ≥ 72 h @ 25 ± 1°C, aerobic  
 ≥ 72 h @ 36 ± 1°C, aerobic
- Biological control  
 Inoculum size for productivity: 10 – 100 cfu  
 Inoculum size for selectivity: 10<sup>4</sup> – 10<sup>5</sup> cfu  
 Inoculum size for specificity: < 10 000 cfu

Incubation conditions: 18 – 24 h @ 36 ± 1°C, aerobic

Control Strain	Growth
<i>Escherichia coli</i> O157 NCTC 12900 <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212 <i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	2 – 3 mm, colourless colonies. Complete inhibition (≤ 10 cfu). Good growth, violet colonies with transparent zone.

ATCC® is a registered trademark of American Type Culture Collection.

15.06.11

OXOID Deutschland GmbH · Am Lippegliacis 4-8 · D-46483 Wesel

PS-PO5069Av06

- ❖ Las peptonas son fuentes de nitrógeno.
- ❖ D-Sorbitol es un carbohidrato fermentable.
- ❖ La mayoría de las cepas hemorrágicas de *E. coli* no fermentan D-sorbitol y producen colonias incoloras en agar MacConkey Sorbitol.

- ❖ Las sales biliares y el cristal violeta son agentes selectivos que inhiben el crecimiento de organismos gram positivos.
- ❖ El rojo neutro es un indicador de pH.

## ANEXO E: Criocongelación

- Con un asa estéril tomar de cada una de las placas con cultivo fresco, varias asadas y disolver en el medio compuesto por *trytone soy broth* suplementado con glicerol y sucrosa, contenido en el tubo Cryobank
- Agite repetidamente hasta incorporar la muestra al medio e invierta el tubo durante 30 minutos, para permitir que las bacterias se adhieran a las esferas de cerámica
- Con una pipeta estéril remueva todo el medio de cultivo del tubo Cryobank
- Inmediatamente guarde el tubo Cryobank en congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$

### Recuperación

- Retire el tubo Cryobank del sitio de congelamiento
- Con un asa estéril para inoculación remueva una esfera y estríe sobre placas de agar SMAC
- Incube a  $37^{\circ}\text{C}$  por 18-24 horas e identifique el crecimiento de colonias incoloras
- Regrese el tubo Cryobank con las esferas restantes al congelador para evitar que se descogelen

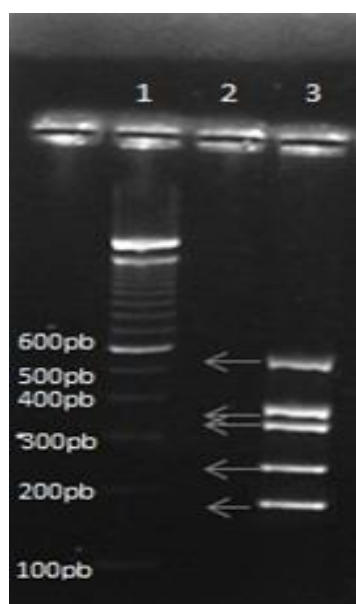


**Figura 7.** Criocongelación de cepas presuntivas de *E. coli* O157:H7  
**Fuente:** El Autor

**ANEXO F: Resultados para muestras presuntivas de *E. coli* O157:H7**

							R: 3 unidades/vegetal	
PRODUCTO	R1	COLONIAS "PRESUNTIVAS"	PRODUCTO	R2	COLONIAS "PRESUNTIVAS"	PRODUCTO	R3	COLONIAS "PRESUNTIVAS"
	R1.1	+		R2.1	+		R3.1	-
	R1.2	+		R2.2	+		R3.2	+
ENSALADA A	R1.3	+	ENSALADA B	R2.3	+	ENSALADA C	R3.3	+
	R1.4	+		R2.4	+		R3.4	+
	R1.5	+		R2.5	+		R3.5	+
Muestras	5			5			5	
			TOTAL MUESTRAS:		15	100%		
			PRESUNTIVAS:		14	93.3 %		

**ANEXO G: Amplificación de DNA mediante PCR múltiple: Cepa control *E. coli* O157:H7**



1: Marcador de peso molecular TrackIt™ 100 pb DNA Ladder Invitrogen; 2: Control negativo; 3: Control Positivo *E. coli* O157:H7. Columna 2: *stx2* (584pb); *eaeA* (397pb); *stx1* (348 pb); *uidA* (252pb) y *ehxA* (158pb). Los tamaños y posiciones de las cinco bandas se indican con las flechas de la izquierda.