



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**  
*La Universidad Católica de Loja*

***ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA***

***TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO***

**Detección y aislamiento de cepas presuntivas de *E.coli* productor de toxina *shiga* en vegetales (zanahoria, tomate y manzana) listos para el consumo**

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Ramos Valladolid, Diana del Cisne

DIRECTOR: Castillo Carrión, Maritza Janneth. Mgtr.

LOJA-ECUADOR

2016



*Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>*

Septiembre, 2016

## APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Magister

Maritza Janneth Castillo Carrión

**DOCENTE DE LA TITULACIÓN**

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: “**Detección y aislamiento de cepas presuntivas de *E.coli* productor de toxina shiga en vegetales (zanahoria, tomate y manzana) listos para el consumo**” realizado por: Diana del Cisne Ramos Valladolid; ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, noviembre del 2016

f) \_\_\_\_\_

Mgtr. Maritza Janneth Castillo Carrión

**Director**

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo Ramos Valladolid Diana del Cisne declaro ser autora del presente trabajo de titulación **“Detección y aislamiento de cepas presuntivas de *E.coli* productor de toxina shiga en vegetales (zanahoria, tomate y manzana) listos para el consumo”**, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo la Mgtr. Maritza Janneth Castillo Carrión directora 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 con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

---

Ramos Valladolid Diana del Cisne  
C.I. 1104428659

## **DEDICATORIA**

Quiero dedicar este proyecto de investigación a Dios por permitirme culminar mis estudios universitarios con éxito.

A mis amados padres, Ramos José y Valladolid Beatriz, con mucho cariño, por ser mi soporte incondicional, brindarme su amor, confianza, fortaleza y consejos en todos los momentos difíciles que se me presentaron durante mis estudios universitarios.

A mis queridos hermanos, Nixon y Johana por su inmenso apoyo, para así poder gozar de nuestros logros a lo largo de nuestras vidas, para satisfacción propia y de nuestra familia.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios por bendecirme y guiarme por concluir mi etapa universitaria con satisfacción propia y de mi querida familia.

A mis amados padres, Ramos José y Valladolid Beatriz, por guiarme por el camino del bien, animándome y recordándome que siempre tendré su apoyo tanto económico como espiritual y así afrontar toda situación del diario vivir.

A mis queridos hermanos Nixon y Johana por siempre brindarme su apoyo y no dejarme sola dándome palabras de aliento para continuar y llegar a mí meta propuesta.

Agradecimiento especial a mi directora de tesis Mgtr. Maritza Janneth Castillo Carrión por su cooperación y paciencia para el progreso de este proyecto.

También a mi tribunal Mgtr. Zorayda Toledo y Mgtr. Ruth Martínez, por sus conocimientos impartidos y paciencia para concluir dicho proyecto.

A la Mgtr. Diana Hualpa por su apoyo para realizar este proyecto con éxito.

A la Universidad Técnica Particular de Loja y a todos mis educadores durante el estudio universitario.

## 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 .....	x
RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>5</b>
<b>MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>5</b>
1.1. Productos de IV Gama.....	6
1.2. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA).....	7
1.3. <i>Escherichia coli</i> .....	8
1.3.1 Fuentes y transmisión.....	8
1.3.2. Grupos importantes de <i>Escherichia coli</i> .....	9
1.4. <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica O157:H7 .....	9
1.4.1 Síntomas .....	9
1.4.2. Patología y patogenia .....	10
1.4.3. Detección de <i>E.coli</i> O157:H7.....	10
<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>12</b>
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>12</b>
3.1. Muestras.....	13
3.2. Preparación de la unidad de muestra.....	13
3.3. Aislamiento de cepas de <i>E.coli</i> O157:H7.....	14
3.3.1. Enriquecimiento en medio selectivo.....	14
3.3.2. Aislamiento en medio diferencial.....	14

<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>17</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>17</b>
4.1. Colonias presuntivas de <i>E.coli</i> O157:H7. ....	18
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>22</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>23</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>24</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>29</b>
ANEXO A: Preparación del caldo <i>E.coli</i> .....	30
ANEXO B: Preparación de Agar Macconkey Sorbitol.....	31



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig 1.</b> Enriquecimiento de muestras. ....	14
<b>Fig 2a.</b> Cepas presuntiva de <i>E. coli</i> O157:H7. ....	15
<b>Fig 2b.</b> Cepas negativo para <i>E.coli</i> O157:H7.....	15
<b>Fig.3.</b> Criocongelación de cepas <i>E.coli</i> O157:H7.....	16
<b>Fig 4.</b> Caldo <i>E.coli</i> más novobiocina (ECm+n).....	30
<b>Fig 5.</b> Agar MacConkey sorbitol (SMAC) .....	31

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Descripción de muestras .....	13
<b>Tabla 2.</b> Vegetales listos para el consumo: muestras presuntivas.....	18

## ABREVIATURAS

**BPM:** Buenas prácticas de manufactura

**BPMP:** Buenas prácticas de manejo postcosecha

**ECDA:** *E. coli* difusa adherencia

**ECm+n:** de caldo *E. coli* modificado con novobiocina

**ECEH:** *E. coli* entero hemorrágico

**ECEP:** *E. coli* entero patógena

**ETA:** enfermedades transmitidas por alimentos

**g:** gramo

**L:** Litro

**SMAC:** agar MacConkey sorbitol

**ECST:** *E. coli* productora de la toxina Shiga

**SUH:** Síndrome urémico hemolítico

## RESUMEN

*Escherichia coli* es una bacteria que habita en el tracto gastrointestinal de los animales y los humanos. En ocasiones cepas de este patógeno pueden ser causantes de algunas enfermedades intestinales que pueden ser transmitidas por agua, alimentos contaminados y por contacto con animales. El objetivo de esta investigación fue detectar la presencia de cepas de *Escherichia coli* presuntivas de generar toxina Shiga en vegetales listos para el consumo: manzana, tomate baby y zanahoria baby; que se expenden en supermercados de la ciudad de Loja. Se realizó cinco muestreos de cada producto, que correspondieron a cinco distintos lotes de producción, en cada muestreo se tomó al azar tres paquetes de cada producto para constituir la unidad de la muestra analizada. La detección de *E.coli* O157:H7 se realizó por enriquecimiento en caldo EC (*Escherichia coli*) modificado con novobiocina (ECm+n) y el aislamiento en agar SMAC (Mac Conkey sorbitol). Los resultados evidenciaron que el 80% de las muestras presentaron colonias características de *E.coli* O157:H7 productor de toxina Shiga; incumpliendo el requisito normativo para este tipo de productos y constituyéndose en un riesgo para la salud del consumidor.

**PALABRAS CLAVES:** *Escherichia coli*, vegetales listos para el consumo, toxina Shiga.

## ABSTRACT

*Escherichia coli* is a bacterium that lives in the gastrointestinal tract of animals and humans. Sometimes strains of this pathogen may be the cause of some intestinal diseases that can be transmitted by water, contaminated food and close contact with animals. The objective of this research work is to detect the presence of *Escherichia coli* strains which allegedly generate Shiga toxin in vegetables that are ready to eat such as: apple, tomato baby and carrot baby; which are sold in supermarkets in the city of Loja. It was performed five samples of each product, that correspond to five different production lands, in each sampling it was taken by random three packages of each product to form the unit of the analyzed sample. The detection of *E. coli* O157:H7 was performed by enrichment broth EC (*Escherichia coli*) modified with novobiocin (ECM+n) and isolation on SMAC agar (MacConkey sorbitol). The results demonstrate that 80% of the samples contained characteristic colonies of *E. coli* O157:H7, Shiga toxin-producing; failing the normative requirement of this kind of products and becoming a risk to the consumer's health.

**KEYWORDS:** *Escherichia coli*, vegetables ready to eat, Shiga toxin.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad la población a nivel mundial presta especial interés al consumo de alimentos nutritivos y saludables incentivando a la agroindustria a la oferta de productos mínimamente procesados (García, 2008). La industria alimentaria estima el tiempo del consumidor y le brinda diversidad de comidas saludables, provechosas y convenientes (Salgado, 2014).

Los productos “listos para el consumo” son considerados como alimentos de la IV Gama y corresponden a vegetales, frutas y hortalizas que han sido lavados, desinfectados, procesados, trozados, envasados, etiquetados, almacenados en bajas temperaturas y así listos para servirse (Cecu, 2013; Saldías *et al.*, 2013). El lavado es una de las etapas más críticas en el procesado de estos vegetales, ya que está íntimamente relacionado con la seguridad y vida útil del producto final (Gil *et al.*, 2005). Numerosas son las fuentes de contaminación de frutas y vegetales con microorganismos patógenos (Méndez, 2008). Hasta el momento no existe un proceso que garantice una total seguridad y asepsia de este tipo de productos y por ende la presencia de bacterias es muy probable (Salgado, 2014).

En todo el mundo alrededor de 600 millones de personas se enferman por ingerir carne cruda o mal cocida, verduras y frutas contaminados presentando síntomas como diarrea; de estas personas, 420.000 mueren, incluidos 125.000 niños menores de 5 años (OMS, 2015).

Las enfermedades transmitidas por los alimentos son un problema de salud pública en todo el mundo y una causa significativa de morbilidad (Palomino & González, 2014). Entre las enfermedades que son clasificadas como emergentes se incluyen la originada por *Escherichia coli* entero hemorrágica (particularmente el O157:H7), *Campylobacter jejuni* y *Salmonella typhimurium* del tipo definitivo (DT) (Rojas & González, 2006).

Las investigaciones ejecutadas han reconocido la participación de *E.coli* en las enfermedades humanas; por esa razón, dicho microorganismo es uno de los patógenos que mayor atención ha recibido y hacia las cuales se han dirigido la mayor parte de las investigaciones, surgiendo el planteamiento del presente trabajo, el cual tuvo como objetivo detectar y aislar cepas de *Escherichia coli* presuntivas de generar toxina Shiga, aisladas de vegetales listos para el consumo.

El trabajo se presenta en 3 capítulos, en el primero se hace una revisión bibliográfica de ensaladas listas para el consumo, enfermedades transmitidas por alimento (ETA) y el patógeno *E.coli*, sus fuentes de transmisión, grupos y su detección. En el segundo capítulo se describe la metodología desde la recolección y preparación de muestras hasta el enriquecimiento, aislamiento y criocongelación de cepas *E.coli* O157:H7. Finalmente en el tercer capítulo se expone los resultados, discusión, conclusiones y recomendaciones.

El desarrollo del trabajo inició con la obtención de las muestras de los vegetales en supermercados de la ciudad de Loja, tratamiento de la muestra y análisis microbiológico mediante un enriquecimiento selectivo en el caldo E.C con novobiocina y posterior aislamiento selectivo y diferencial con el agar MacConkey sorbitol, terminando el trabajo con la criocongelación de cepas presuntivas. Los resultados evidenciaron un 80% de muestras contaminadas con cepas presuntivas de *E.coli* O157:H7 y con 12 cepas aisladas y criocongeladas para su posterior confirmación.

## **CAPÍTULO I**

### **MARCO TEÓRICO**



## 1.1. Productos de IV Gama.

Los productos de IV Gama se refiere a vegetales y/o frutas “frescas”, que no sufren ningún tratamiento térmico y se caracterizan por haber pasado únicamente por procesos de lavado, desinfectado, troceado, etiquetado, envasado y se encuentran listos para servirse (Saldías *et al.*, 2013; Posada, 2013; Salgado, 2014). En estos productos se conservan sus propiedades naturales y frescas, sin agregar ningún tipo conservante o aditivo, pero requiere el mantenimiento en cadena de frío (4°C) para su conservación y su período de duración es de 7 días (Aguerri, 2014; Valero, 2008). Es importante señalar, que al tratarse de productos que fueron pelados y troceados, estos procesos influyen en su actividad metabólica, ya que pueden liberar ciertos sustratos y enzimas, que propicien el crecimiento microbiano y/o la aparición de sabores y olores desagradables (García, 2008).

Hay que tener en cuenta que si los microorganismos patógenos sobreviven al proceso de lavado y desinfección, pueden multiplicarse durante la conservación del producto. Es por ello que hay que añadir barreras para el control de su crecimiento hasta su consumo, entre las que destacan el uso de bajas temperaturas y atmósferas modificadas (Oliviera *et al.*, 2013).

Por ello es necesario asegurar la producción de alimentos inocuos, mediante la aplicación de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y de Buenas Practicas de Manejo Postcosecha (BPMP), en combinación con la utilización de empaques adecuados y técnicas de conservación que permitan alcanzar un producto de buena calidad.

Los productos de IV gama traen algunos beneficios al consumidor (Valero, 2008), entre ellos:

- Minimizan el tiempo de preparación de los platos al momento de servir, ya que no es necesario lavar las hortalizas ni trozarlas.
- Optimizan los recursos económicos y humanos en el hogar, debido a que las personas pueden destinar su tiempo a otras labores.
- Utilización del 100% del producto, ya que todo lo que se encuentra al interior del envase es ensalada.
- Homogeneización de las mezclas para cada uno de los platos al momento de servir, ya que, todas cuentan las mismas porciones de los productos.

## 1.2. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA).

Las ETA, se manifiestan después de horas o días de haber consumido alimentos o bebidas contaminadas por microorganismos patógenos o sus toxinas (Torrens *et al.*, 2015).

En todo el mundo las ETA son un problema para la salud pública y una causa significativa de morbilidad, lo que conlleva a un conflicto en la economía, perjuicios a sus consumidores y un derribe a la comercialización universal de dichos alimentos nutritivos. Esta dificultad se despliega con el surgimiento de varias formas de transmisión (Palomino & González, 2014; Cerna *et al.*, 2013).

Más de 250 enfermedades habituales se propagan por alimentos. En Estados Unidos se presentan entre 24-81 millones de casos anuales, pero en países en vías de desarrollo la frecuencia de ETA es más marcada. En México los casos aumentan a 200 millones cada año (Castro *et al.*, 2006). Este episodio se va elevado considerablemente durante los últimos tiempos por la acelerada globalización de alimentos en el mercado y los diferentes modos de alimentación (Palomino & González, 2014).

Según el reporte de la Gaceta Epidemiológica de Ecuador “SIVE-ALERTA” que es el sistema para vigilar los eventos de alto potencial epidémico, brotes y epidemias en el país, de enero a octubre del 2016 se han reportado 10.075 casos de intoxicaciones alimentarias de los cuales las personas más afectadas han estado en edades comprendidas entre 20 a 49 años; sobresaliendo las provincias de Pichincha y Guayas con el 23.64 y 19.17%, respectivamente. La provincia de Loja se ubica en el quinto lugar con un 6.8% (680 casos) y con menor porcentaje están las provincias de Galápagos y Bolívar con 0.22% (22 casos) (MSP, 2016).

Entre las bacterias más comunes que provocan este tipo de enfermedades, se encuentran; *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* (Palomino & González, 2014).

Las enfermedades clasificadas como emergentes incluyen a las originadas por *Escherichia coli* entero hemorrágica (particularmente el serovar O157:H7), *Campylobacter jejuni* y *Salmonella* (Rojas & González, 2006). La bacteria *Escherichia coli* O157:H7 productor de toxina shiga (STEC) es una amenaza mundial para la salud pública y se ha implicado en muchos brotes de colitis hemorrágica de los cuales algunos se derivan en la muerte. Sin embargo el consumo de

productos mínimamente procesados de frutas y verduras está asociado con esta infección (Pinaka *et al.*, 2013; Islam *et al.*, 2005 ; Abadias *et al.*, 2012), pues se ha demostrado que los tratamientos actuales de lavado y desinfección industrial no garantiza la total eliminación de dicho patógeno (Abadias *et al.*, 2012). Por lo tanto hay que evitar la contaminación de vegetales y frutas con *E.coli* O157:H7 previniendo su aparición durante la producción, cosecha, procesamiento y comercialización (Beuchat & Ammar, 2006).

Según Kopper *et al.*(2009) y Orquero & Sanchez (2012) las ETA se dividen en dos grupos:

- **Infecciones alimentarias:** Son enfermedades causadas por ingerir alimentos contaminados con microorganismos patógenos vivos, que se reproducen y causan alteraciones en los tejidos del huésped. Ejemplos: salmonelosis, shigelosis, listeriosis, hepatitis A, toxoplasmosis, entre otros.
- **Intoxicaciones alimentarias:** Son las enfermedades causadas por ingerir un alimento que incluye a la toxina originada por un microorganismo. Ejemplo: intoxicación por botulismo, hongos, especies marinas, sustancias químicas, entre otras.

### 1.3. *Escherichia coli* (*E. coli*)

*E. coli* es una bacteria de la familia Enterobacteriaceae, es Gram negativa, anaerobio facultativo, que habita normalmente en el intestino del hombre y animales de sangre caliente, está considerada como una bacteria de flora normal y desempeña un papel importante en la fisiología del intestino. Existen cepas que pueden ser nocivas y causar daño ocasionando cuadros clínicos, como presencia de diarrea (Rodríguez, 2002).

#### 1.3.1 Fuentes y transmisión.

El reservorio de este microorganismo es el ganado bovino especialmente. Se piensa que hay otros reservorios importantes, como cabras, ciervos y ovejas, también se ha descubierto la infección de distintos mamíferos (caballos, conejos, cerdos, gatos y perros) y aves (pavos, y pollos).

La transmisión de *Escherichia coli* es más frecuente por vía fecal-oral (Méndez, 2008) y por consumo de alimentos contaminados, como carne cruda, picada o poco cocida, leche, vegetales (Pinaka *et al.*, 2013; Who, 2016). Esto debido a que los agricultores utilizan el estiércol de bovino y el agua de riego sin tratar para el cultivo de sus vegetales (Reuben & Makut, 2014).

### **1.3.2. Grupos importantes de *Escherichia coli*.**

De acuerdo a su patogenicidad y su cuadro clínico, las cepas de *E.coli* son indicadoras de diarrea y están clasificadas en seis grupos: entero hemorrágica conocidas como productoras de toxina Vero o Shiga (STEC/EHEC/VTEC), entero toxigénica (ETEC), entero invasiva (EIEC), entero agregativa (EAEC), entero patógena (EPEC) y difusa adherencia (DAEC) (Feng & Monday, 2000).

La cepa de *E. coli* productora de la toxina Shiga (STEC), también conocida como *E. coli* verotoxigénica, fue reconocida a finales de los años 70 en Canadá. Así mismo, la cepa enterohemorrágica (EHEC) O157:H7 se aisló y se identificó por primera vez en 1975 y 1982 como un patógeno significativo presente en los alimentos. Además de las citotoxinas, pueden originar nuevos factores virulentos (Rojas & González, 2006).

### **1.4. *Escherichia coli* enterohemorrágica O157:H7**

Bacteria que puede originar enfermedades graves por ingerir alimentos contaminados o poco cocinados como carne, leche, vegetales. Entre los grupos mas sensibles están los niños menores de 5 años y los ancianos (Orquero Tella & Sanchez Calle, 2012). Su período de incubación es de 3 a 8 días, y los pacientes se recuperan entre en el término de 10 *días* (Who, 2016).

#### **1.4.1 Síntomas**

Los síntomas que presentan son diarrea con sangre (colitis hemorrágica), náuseas, calambres, dolores abdominales, vómitos y a veces fiebre (Orquero Tella & Sanchez Calle, 2012). Presenta complicaciones, incluyendo el síndrome urémico hemolítico (SHU) que ocasiona insuficiencia renal aguda, trombocitopenia, anemia hemolítica y convulsiones que son particularmente graves en los niños y la tasa de mortalidad es de 5%. Además que no existe tratamiento específico para dicho síndrome (Ibekwe & Grieve, 2003; Rivas *et al.*, 2008; Who, 2016).

### 1.4.2. Patogenia

*E. coli* O157:H7 es el modelo de un grupo de más de 150 serotipos de STEC que conservan semejantes marcadores de virulencia. Entre ellos, existen 5 serotipos (O26:H11, O103:H2, O111:NM, O113:H21 y O145:NM) que fueron reconocidos por la Organización Mundial de la Salud por su potencial patogénico. La patogenicidad de las cepas de STEC esta asociado con factores de virulencia, en los que incluye algunas citotoxinas que forman parte de la familia de las toxinas Shiga (Stxs), las que poseen organización de subunidades A-B. Stxs se catalogan en dos tipos, Stx1 y Stx2, responsables del daño del endotelio vascular (Blanco, 2012; Leotta *et al.*, 2005). Otro factor de virulencia es una proteína llamada intimina de la membrana externa 94-kDa codificada por el gen *eae*, situada en la isla de patogenicidad LEE (del inglés, locus of enterocyte effacement), locus que esta asociado con la adherencia íntima de la bacteria a la célula epitelial. Lo que confiere a las cepas STEC mayor virulencia por la presencia de LEE (Rivas *et al.*, 2006).

### 1.4.3. Detección de *E. coli* O157:H7.

Para el aislamiento, identificación y caracterización de cepas de *E. coli* se aplican métodos tradicionales, *in vivo* e *in vitro* y de biología molecular (Rodríguez, 2002). El método tradicional es el aislamiento de bacterias previo a un pre-enriquecimiento selectivo para incrementar la posibilidad de aislar *E. coli* O157:H7. Para esta etapa se puede usar caldo *E. coli* modificado con novobiocina (ECm+n) con incubación a 37°C de 18-24horas (Okrend *et al.*, 1990) o también medio soya tripticaseína con 50ng/ml de cefaxima y 40µg/ml de vancomicina. El enriquecimiento se utiliza con la finalidad de proporcionara nitrógeno, vitaminas, aminoácidos y la baja concentración de sales biliares que permite el crecimiento de *E. coli* O157:H7 e inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas (Neogen, 2011).

Rodríguez (2002) indica que en muchos laboratorios y hospitales el diagnóstico de muestras diarreicas con sangre, se realiza con agar Mac-Conkey con 1% de sorbitol (SMAC) en lugar de lactosa, ya que *E. coli* O157 no fermenta el sorbitol y produce colonias incoloras, a diferencia de la mayoría de las cepas de *E. coli* que fermentan sorbitol y forman colonias de color rosa. La eficiencia de sorbitol en el agar MacConkey fue confirmada por (March & Ratnam, 1986) quienes encontraron una sensibilidad del 100% y especificidad del 85%, recomendando el medio como un medio simple, de bajo costo, rápido y fiable para la detección de *E. coli* O157:H7 (Oxoid, 2016a).

A partir del medio SMAC se han generado otros medios mucho más selectivos para la detección de *E. coli* O157:H7, uno de ellos es el CT-SMAC que consiste en el mismo agar MacConkey con sorbitol pero que tiene adicionalmente telurito de potasio para inhibir las especies de *Providencia* y *Aeromonas* y cefixima que es un inhibidor de *Proteus spp.*; el uso de este medio está descrito en el Manual Analítico Bacteriológico de la FDA (Oxoid, 2016a; Biokar, 2009).

Otro medio utilizado es el SMAC con BCIG (5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-glucurónido) el cual combina dos mecanismos diferentes para la detección de *E. coli* O157:H7, la no fermentación de sorbitol y la ausencia de actividad  $\beta$  glucuronidasa. El uso del cromógeno BCIG reduce el número de falsos positivos en un 36% al mejorar la especificidad del medio (Oxoid, 2016b; Lamb, 2016).

La serotipificación de *E. coli* requiere de gran número de antisueros, por lo que se prefiere identificar las cepas mediante sus factores de virulencia empleando ensayos *in vitro* como por ejemplo ensayos de adherencia en células Hep-2 y ensayos de toxigenicidad en células (Rodríguez, 2002). Según Feng *et al.* (2016); Rodríguez, (2002); Abakpa *et al.*, 2015), se puede detectar *E.coli* O157:H7 por kits de VTEC-RPLA, prueba inversa de aglutinación de látex para la detección de verocitotoxinas VT1 y VT2 que son producidas por *Escherichia* a partir de cultivos.

Otro método para el diagnóstico de *E. coli* O157:H7, es por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) Multiplex que permite diagnosticar e identificar agentes etiológicos y sus genotipos de virulencia, mediante amplificaciones, que permiten obtener copias de una secuencia diana de ADN de microgramos a partir de una molécula inicial (Feng & Monday, 2000; Fratamico *et al.*, 1995). Por lo tanto para realizar la PCR se necesita algunas medidas como; los cebadores, concentraciones de magnesio, la cantidad, calidad y muestra de ADN y el programa de amplificación (Méndez & Pérez, 2004).

## **CAPÍTULO II**

### **METODOLOGÍA.**

### 3.1. Muestras.

Para este estudio se trabajó con vegetales y frutas listos para el consumo de manzana, tomate baby y zanahoria baby, empacados en bolsas de polipropileno; obtenidos en supermercados de la ciudad de Loja en el período Septiembre - Octubre del 2015 (**Ver tabla 1**).

**Tabla 1.** Descripción de muestras

<b>Muestra</b>	<b>Descripción</b>
Manzana	Manzanas verdes lavadas y cortadas.
Tomate baby	Tomate Cherry lavado y entero.
Zanahoria baby	Zanahoria baby lavada y pelada.

**Fuente:** La autora

Se realizaron cinco muestreos que correspondieron cada uno a distintos lotes de producción, en cada muestreo se seleccionó 3 unidades al azar de cada tipo de vegetal; considerando lo indicado en la Norma INEN para el muestreo de hortalizas y frutas frescas que indica que para productos empacados se debe tomar 3 unidades de un lote no mayor de 50 unidades que es como se encontró el producto en los supermercados (INEN 1750, 1994).

Las muestras se trasladaron asépticamente al laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad Técnica Particular de Loja para su análisis.

### 3.2. Preparación de la unidad de muestra.

La unidad de muestra constituyó la cantidad de material usado realmente en el análisis, para lo cual se procedió a tomar asépticamente pequeñas sub-muestras de cada uno de los tres empaques de los vegetales para reunir una sola muestra, considerando sacar los ingredientes en la misma proporción en que se encuentran en el producto original, según lo recomienda la norma INEN para la toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico (INEN 1529-2, 2013).



### 3.3. Aislamiento de cepas de *E.coli* O157:H7.

#### 3.3.1. Enriquecimiento en medio selectivo.

De la unidad de muestra se pesó asépticamente 200g del vegetal a analizar y se colocó en un frasco con 450ml de caldo *Escherichia coli* modificado con novobiocina (ECm+n) (**Ver anexo A**). La muestra se incubó a 37°C de 18-24horas (Okrend *et al.*, 1990). Al término de la incubación se evidenció turbidez y presencia de gas en la muestra.



**Fig 1.** Enriquecimiento de muestras.

**Fuente:** La autora.

#### 3.3.2. Aislamiento en medio diferencial.

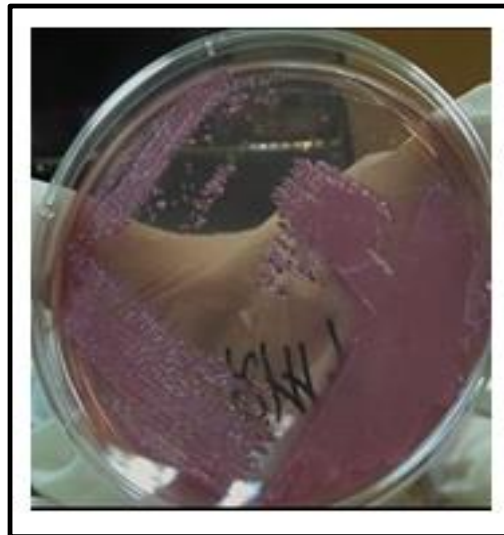
Después de la incubación se tomó una asada de aproximadamente 50 uL del caldo enriquecido y se sembró sobre Agar solidificado MacConkey sorbitol (SMAC) de la marca Oxoid (**Ver anexo B**), en forma confluyente media placa y luego en forma aislada hasta completar toda la placa. Las placas se incubaron a 37°C de 18 a 24 horas.

Como control positivo se usó una cepa de *E. coli* O157:H7 de referencia donada por el Dr. Heriberto Fernández de la Universidad Austral de Chile. Las colonias pequeñas, redondas e incoloras se reportaron como *E.coli* O157:H7 (Fig.2a). Mientras que las colonias redondas y rosáceas como negativas para *E.coli* O157:H7 (Fig.2b).

Con la finalidad de obtener un mejor aislamiento, las colonias típicas de *E.coli* O157:H7 se resembraron en nuevas placas de agar SMAC.



**Fig 2a.** Cepas presuntiva de *E. coli* O157:H7.  
**Fuente:** La autora.

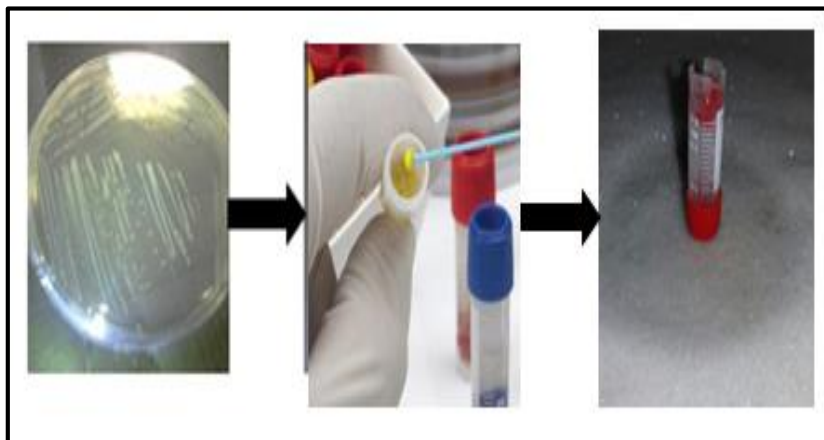


**Fig 2b.** Cepas negativo para *E.coli* O157:H7  
**Fuente:** La autora.

### 3.3.3. Criocongelación.

Las cepas presuntivas de *E. coli* O157:H7 aisladas y de cultivos de máximo 18 horas se colocaron en criotubos con glicerol y perlas de cerámica. Los tubos se invirtieron manualmente para homogenizar y se dejó en esa posición por 20 minutos. El exceso de crio-conservante se eliminó con ayuda de una pipeta y finalmente los tubos se almacenaron en una cámara - 80°C; esto se

realizó con la finalidad de conservar las cepas de *E.coli* O157:H7 para su posterior uso en pruebas confirmatorias como PCR o pruebas antigénicas (MBM, 2016).



**Fig.3.** Criocongelación de cepas *E.coli* O157:H7  
**Fuente:** La autora.

## **CAPÍTULO III**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### 4.1. Colonias presuntivas de *E.coli* O157:H7.

El 80% de las muestras analizadas (Tabla2) presentaron colonias características y presuntivas de *E.coli* O157:H7 productor de toxina Shiga. Según Torres *et al.* (2015) y Feng *et al.*(2016) el agar MacConkey sorbitol (SMAC) es un medio selectivo y diferencial que permite identificar las colonias de *E.coli* O157:H7 como incoloras ya que no fermenta el sorbitol, en contraste con la mayoría de las cepas de *E.coli* que si lo fermenta y forman colonias de color rosa.

**Tabla 2.** Vegetales listos para el consumo: muestras presuntivas.

Vegetales	N° de muestras analizadas	Presencia presuntiva de <i>E.coli</i> O157:H7	
		Cantidad	%
Manzana	5	2	40
Tomate baby	5	5	100
Zanahoria baby	5	5	100
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>12</b>	<b>80</b>

Fuente: La autora.

El Código Alimentario Argentino y el Centro para la Seguridad Alimentaria de Hong Kong mencionan el criterio microbiológico que deben cumplir los alimentos listos para el consumo y que para el caso del patógeno *E.coli* O157:H7 indica ausencia en 25g (Centre for Food Safety, 2014). El 40% de las muestras analizadas de manzana y el 100% de tomate baby y zanahoria baby no cumplen con dicho criterio, teniendo en consideración que para este estudio en cada muestreo se tomó 3 unidades de cada producto, pudiendo estar contaminada uno o los tres empaques; por lo tanto los resultados solo reflejan la calidad de las muestras analizadas, no siendo general al resto de producto que se encuentren en el mercado.

Una de las fuentes de contaminación de las frutas, son los insectos que transfieren directamente las bacterias, en algunas ocasiones los frutos se desprenden y entran en contacto con el suelo

contaminado, agua de riego y estiércol (Hsu *et al.*, 2014; Berger *et al.*, 2010). Esta contaminación inicial que pueden presentar los vegetales debería eliminarse con el lavado y desinfección; y ser una condición implícita en los productos listos para el consumo como los son los alimentos analizados en este estudio, por cuanto el consumidor asume que estos productos han pasado por procesos adecuados de lavado antes de ser pelados o cortados.

El lavado es la etapa más crítica en el procesamiento de estos productos, pues el mismo tiene como objetivo eliminar residuos de plaguicidas y la carga microbiana, sin embargo se ha encontrado que ninguno de los procedimientos de desinfectantes disponibles, pueden garantizar la eliminación total de los patógenos para asegurar la calidad de los vegetales mínimamente procesados (Tornuk *et al.*, 2011; Rico *et al.*, 2007; Francis *et al.*, 2012 y Maffei *et al.*, 2016).

Eribo & Ashenafi (2003) han demostrado que la *E. coli* O157:H7 puede sobrevivir marcadamente en productos como los de este estudio y ellos indican que la supervivencia se prolonga a temperaturas de refrigeración. Por lo tanto se debe prevenir la contaminación de vegetales y frutas de *E.coli* O157:H7 durante la producción, cosecha, procesamiento y comercialización para su consumo (Beuchat & Ammar, 2006).

Se ha demostrado particularmente en Canadá el riesgo del consumo de productos sin procesar, así por ejemplo el jugo de manzana sin pasteurizar estuvo involucrado en un brote de *E.coli* O157:H7; en donde 70 personas que lo ingerieron presentaron síntomas de la enfermedad lo que originó su hospitalización e incluso se reportó la muerte de algunos de los afectados, la contaminación del jugo se puede explicar a causa de que encontraron una gran cantidad de manzanas en descomposición en algunos lotes (Cody *et al.*, 1999). En otros productos como las fresas también se han encontrado la presencia del patógeno en estudio, Gurtler *et al.* (2014) mencionan que en el Estado de Oregon, Estados Unidos, las fresas causaron un brote de colitis hemorrágica provocando la muerte de algunos de los consumidores involucrados, ellos consideran que la contaminación de las fresas se debe al estiércol de animales y agua de riego; por lo que deben ser sometidas a procesos adecuados antes de su consumo para evitar infecciones.

Un estudio realizado en Egipto reveló que el 4.23% de frutas y vegetales presentó contaminación por *E.coli* O157:H7 (Khalil & Gomaa, 2016) en donde están incluidas las muestras analizadas, en nuestro estudio; las mismas que presentaron el 80% de contaminación, valor muy superior. Este resultado puede estar relacionado a la falta de higiene durante la cosecha y post-cosecha que certifique la comercialización de estos productos en los supermercados del país.

Los resultados encontrados en el distrito de Estambul en Turquía, demostró la detección del serotipo O157:H7 en el 3.3% de muestras de zanahoria (Özpınar *et al.*, 2013). Según Seow *et al.* (2012) y Vital *et al.* (2014) las zanahorias tienen mayor carga microbiana por ser cultivos subterráneos que están en contacto directo con el suelo, abonos, fertilizantes, agua de riego y también por contaminación cruzada con desechos de animales como el ganado vacuno, cabras, cerdos, pollos y ovejas, que ingresan a los sembradíos de estos cultivos (Pinaka *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2013). Las zanahorias listas para el consumo analizadas se presentan peladas, lo cual sumado a un adecuado lavado, debería eliminar toda la carga microbiana que podría estar en la superficie del vegetal y al no cumplirse esto, es recomendable que se analicen todas las etapas de procesamiento que la empresa utiliza, en especial el lavado que es la etapa crítica que debería asegurar la completa eliminación de los microorganismos; por cuanto las etapas posteriores no tienen influencia alguna para lograr esta condición.

Khandaghi *et al.* (2010) en Tabriz-Iran, reportaron la prevalencia del 1.77% de vegetales (zanahoria y tomate) con *E.coli* O157:H7, mientras que Abakpa *et al.* (2015) en Nigeria, revelaron el 7.3% de contaminación con el serotipo en estudio; en estos mismos vegetales dichos resultados difieren con la presente investigación donde el 100% de tomate y zanahoria presentaron colonias presuntivas para este patógeno. La carga microbiana presente en el tomate es principalmente superficial y al igual que lo indicado para la zanahoria se origina por contaminantes externos relacionados al medio donde se cultiva. A diferencia de la zanahoria, el tomate baby se vende y consume con cáscara, lo que implica que el procesamiento de este vegetal debería ser mucho más cuidadoso y exigente para asegurar la ausencia de patógenos. Es preocupante el resultado encontrado en este estudio, ya que en el 100% de las muestras se encontró colonias presuntivas del patógeno *E.coli* O157:H7 y aunque hace falta su confirmación con métodos como el PCR y antisueros, el resultado encontrado es bastante fiable por cuanto la eficiencia del agar sorbitol MacConkey ha sido confirmada, con una sensibilidad del 100% y especificidad del 85%, y se lo ha recomendado como un medio simple, de bajo costo, rápido y fiables para la detección de la *E. coli* O157 (Oxoid, 2016a). Özpınar *et al.* (2013) encontraron que el 13.3% de muestras de tomate analizadas presentaron colonias características del microorganismo en estudio.

Finalmente con la criocongelación se pudo conservar 12 cepas presuntivas de *E.coli* O157:H7 a una temperatura de -80°C (Parra *et al.*, 2006), ya que mediante las perlas de cerámica que contienen los criotubos se puede absorber la solución celular, lo que permite usar una o varias

perlas sin necesidad de descongelar las demás y utilizar las cepas conservadas para estudios posteriores (MBM, 2016).



## CONCLUSIONES.

- El 100% de muestras de tomate baby y zanahoria baby, no cumplen el requisito normativo para *E.coli* O157:H7.
- El 40% de las muestras de manzana lista para el consumo presentaron colonias características del patógeno O157:H7, incumpliendo el requisito normativo.

## RECOMENDACIONES.

- Se recomienda confirmar las colonias presuntivas para O157:H7 obtenidas en este trabajo con pruebas moleculares.
- Realizar las cajas del agar MacConkey sorbitol (SMAC) en el momento que se vaya a reavivarse las colonias presuntivas de *E.coli* O157:H7 de los crio-tubos, ya que las cajas de SMAC con el tiempo se deterioran.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abadias, M., Alegre, I., Oliviera, 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., Umoh, V., Ameh, J., Yakubu, S., & Ibekwe, A. (2015). Prevalence and antimicrobial susceptibility of pathogenic *Escherichia coli* O157 in fresh produce obtained from irrigated fields. *Environmental Technology & Innovation*, 4, 1–7.
- Abakpa, G., Umoh, V., Ameh, J., Yakubu, S., Kwaga, J., & Ibekwe, A. (2015). Occurrence of Enteric Pathogens on Fresh Produce Grown on Irrigated Soils. *British Microbiology Research Journal*, 6(1), 13–23.
- Aguerri, I. (2014). *Análisis de la situación actual del consumo de productos de IV Gama en pamplona*. Universidad Pública de Navarra.
- Berger, C. N., Sodha, S. V., Shaw, R. K., Griffin, P. M., Pink, D., Hand, P., & Frankel, G. (2010). Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology*, 12(9), 2385–2397.
- Beuchat, L. R., & Ammar, M. S. (2006). Survival and Growth of *Escherichia coli* O157: H7 on Salad Vegetables. *Microbiology*, 59(7), 1999–2006.
- Biokar. (2009). *Macconkey sorbitol agar (Ct-SMAC)* (Vol. 33). Francia.
- Blanco, J. (2012). *Escherichia coli* enteroagregativa O104:H4-ST678 productora de Stx2a. ¡Diagnóstico microbiológico ya, de este y otros serotipos de STEC/VTEC! *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 30(2), 84–89.
- Castro, J., Rojas, M., Noguera, Y., Santos, E., Zúñiga, A., & Gómez, C. (2006). Calidad sanitaria de ensaladas de verduras crudas , listas para su consumo, 9–21.
- Cecu. (2013). Los productos de IV Gama. Retrieved from <http://cecu.es/campanas/alimentacion/4Gama.pdf>
- Centre for Food Safety, H. kong. (2014). Microbiological Guidelines for Food: For ready-to-eat food in general and specific food items. Retrieved from [http://www.cfs.gov.hk/english/food\\_leg/files/food\\_leg\\_Microbiological\\_Guidelines\\_for\\_Food\\_e.pdf](http://www.cfs.gov.hk/english/food_leg/files/food_leg_Microbiological_Guidelines_for_Food_e.pdf)
- Cerna, J., Gómez, C., Rangel, E., Ramírez, E., & Castro, J. (2013). Presence of indicator bacteria, *Salmonella* and diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes on mung bean sprouts from public markets in Pachuca, Mexico. *Food Control*, 31(2), 280–283.
- Chang, W., Afsah, H., Rukayadi, Y., Khatib, A., Lye, Y., Loo, Y., ... R, S. (2013). All Rights Reserved Quantification of *Escherichia coli* O157 : H7 in organic vegetables and chickens. *International Food Research*, (January 2012).

- Cody, S., Kathleen, G., Farrar, J., Cairns, L., Griffin, P., Kobayashi, J., ... Vugia, D. (1999). An Outbreak of Escherichia coli O157\_H7 Infection from Unpasteurized Commercial Apple Juice. *PubMed*.
- Eribo, B., & Ashenafi, M. (2003). Behavior of Escherichia coli O157:H7 in tomato and processed tomato products. *Food Research International*, 36(8), 823–830.
- Feng, P., & Monday, S. R. (2000). Multiplex PCR for detection of trait and virulence factors in enterohemorrhagic Escherichia coli serotypes. *Molecular and Cellular Probes*, 14(6), 333–337.
- Feng, P., Weagant, S., & Jinneman, K. (2016). Bacteriological Analytical Manual Chapter 4A Diarrheagenic Escherichia coli. Retrieved from <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070080.htm>
- Francis, G., Gallone, A., Nychas, G. J., Sofos, J. N., Colelli, G., Amodio, M. L., & Spano, G. (2012). Factors affecting quality and safety of fresh-cut produce. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(7), 595–610.
- Fratamico, P. M., Sackitey, S. K., Wiedmann, M., & Deng, M. Y. (1995). Detection of Escherichia coli O157:H7 by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(8), 2188–91.
- García, A. (2008, October). Aplicación de la técnica de IV Gama para la elaboración de ensaladas. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín*, 1(2), 4658–4666.
- Gil, M., Allende, A., Beltrán, D., & Selma, V. (2005). El lavado es una de las etapas más críticas en el procesado de estos vegetales, ya que está íntimamente relacionado con la seguridad y vida útil del producto final. *Agrocsic*, 146–151.
- Gurtler, J. B., Bailey, R. B., Jin, T. Z., & Fan, X. (2014). Reduction of an E. coli O157:H7 and Salmonella composite on fresh strawberries by varying antimicrobial washes and vacuum perfusion. *International Journal of Food Microbiology*, 189, 113–118.
- Hsu, H. Y., Huang, L., & Wu, J. S. B. (2014). Thermal inactivation of Escherichia coli O157: H7 in strawberry puree and its effect on anthocyanins and color. *Journal of Food Science*, 79(1), 74–80.
- Ibekwe, M., & Grieve, C. (2003). Detection and quantification of Escherichia coli O157 : H7 in environmental samples by real-time PCR. *Journal Of Applied Microbiology*, 94(3), 421–431.
- INEN 1529-2. (2013). Control Microbiológico de los Alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico, *Primera ed*, 7–12. Retrieved from <http://normaspdf.inen.gob.ec/pdf/nte1/1529-2-1R.pdf>
- INEN 1750. (1994). Hortalizas y frutas frescas. Muestreo, 1750, 16. Retrieved from <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.1750.1994.pdf>

- Islam, M., Doyle, M. P., Phatak, S. C., Millner, P., & Jiang, X. (2005). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on carrots and onions grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Food Microbiology*, 22(1), 63–70.
- Khalil, R. K. S., & Gomaa, M. a E. (2016). Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in fruits and vegetables sold at local street markets in Alexandria, Egypt. *LWT - Food Science and Technology*, 74(2016), 199–210.
- 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.
- Kopper, G., Calderón, G., Schneider, S., Domínguez, W., & Gutiérrez, G. (2009). *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación.*
- Lamb. (2016). Harlequin™ SMAC-BCIG. Retrieved from <http://www.labm.com/products/harlequin-smac-bcig.asp>
- Leotta, G., Chinen, I., S.Espzteyn, Miliwerbsky, E., Meladamed, I., Motter, M., ... M.Rivas. (2005). Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Revista Argentina de Microbiología*, 37(1), 1–10.
- Maffei, D. F., Alvarenga, V. O., Sant'Ana, A. S., & Franco, B. D. G. M. (2016). Assessing the effect of washing practices employed in Brazilian processing plants on the quality of ready-to-eat vegetables. *LWT - Food Science and Technology*, 69(2016), 474–481.
- 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.
- Méndez, E. (2008). *Correlación entre la presencia de microorganismos indicadores de higiene y grupos patógenos de E.coli determinados PCR pcr en ensaldas de verduras crudas.* [cvonline.uaeh.edu.mx](http://cvonline.uaeh.edu.mx). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Méndez, S., & Pérez, E. (2004). La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 22(03), 183–192.
- MSP. (2016). Enfermedades Transmitidas por agua y alimentos, otras intoxicaciones alimentarias. Retrieved from [http://instituciones.msp.gob.ec/images/Documentos/gaceta/GACETA\\_GENERAL\\_SE41.pdf](http://instituciones.msp.gob.ec/images/Documentos/gaceta/GACETA_GENERAL_SE41.pdf)
- Neogen. (2011). EC Medium, modified with Novobiocin ( 7700 ). Retrieved from [http://foodsafety.neogen.com/pdf/Acumedia\\_PI/7700\\_PI.pdf](http://foodsafety.neogen.com/pdf/Acumedia_PI/7700_PI.pdf)
- Oliviera, M., Viñas, I., Alegre, I., Torres, R., & Abadias, M. (2013). El uso de la bioconservación en frutas y hortalizas mínimamente procesadas (IV Gama). *Horticultura*.

- OMS. (2015). Inocuidad de los alimentos. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/>
- Orquero Tella, A. C., & Sanchez Calle, R. D. (2012). *Prevalencia de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos en la Ciudad de Cuenca en los Años 2009 a 2011*.
- Oxoid. (2016a). Cefixime-Tellirite Suppleent. Retrieved from [http://www.oxoid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM0813&c=UK&lang=EN](http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0813&c=UK&lang=EN)
- Oxoid. (2016b). Sorbitol MacConkey agar (SMAC) with BCIG. Retrieved from [http://www.oxoid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM0981&org=72&sec=2](http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0981&org=72&sec=2)
- Özpinar, H., Turan, B., Tekiner, I. H., Tezmen, G., Gökçe, I., & Akineden, Ö. (2013). Evaluation of pathogenic *Escherichia coli* occurrence in vegetable samples from district bazaars in Istanbul using real-time PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 57(4), 362–367.
- Palomino, C., & González, Y. (2014). Técnicas Moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Revista Peru Med EXP Salud Pública*, p. 536.
- Parra, I., Pérez, M., Morales, M., Moreno, Z., & Castaño, D. (2006). Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia ( IBUN ). *Nova - Publicación Científica*, 4(5), 39–49.
- Pinaka, O., Pournaras, S., Mouchtouri, V., Plakocefalos, E., Katsiaflaka, A., Kolokythopoulou, F., ... Hadjichristodoulou, C. (2013). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Central Greece: Prevalence and virulence genes of O157:H7 and non-O157 in animal feces, vegetables, and humans. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 32(11), 1401–1408.
- Posada, D. (2013). *Estudio y modelización del efecto de procesos de descontaminación y desinfección sobre microorganismos patógenos en productos vegetales*. Universidad de Córdoba.
- Reuben, R., & Makut, D. (2014). Occurrence of *Escherichia coli* O157 : H7 in vegetables grown and sold in Lafia metropolis , Nigeria. *World Journal of Microbiology*, 1(3), 17–21.
- Rico, D., Martín-Diana, A., Barat, J. M., & Barry-Ryan, C. (2007). Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 18(7), 373–386.
- Rivas, M., Miliwebsky, E., Chinen, I., Deza, N., & Leotta, G. a. (2006). The epidemiology of hemolytic uremic syndrome in Argentina. Diagnosis of the etiologic agent, reservoirs and routes of transmission. *Epidemiologia Del Síndrome Uremico Hemolítico En Argentina. Diagnóstico Del Agente Etiológico, Reservorios Y Vías de Transmisión.*, 66 Suppl 3(November 2016), 27–32.

- Rivas, M., Sosa-Estani, S., Rangel, J., Caletti, M. G., Vallés, P., Roldán, C. D., ... Griffin, P. M. (2008). Risk Factors for Sporadic Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Infections in Children, Argentina. *Emerging Infectious Diseases*, 14(5), 763–771.
- Rodríguez, A. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, 44(5), 464–475.
- Rojas, R., & González, T. (2006). Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Bioquímica*, 31(2), 69–76.
- Saldías, R., Lagos, O., & Bravo, B. (2013). Tecnologías de conservación y empaques para el consumo de hortalizas listas para consumir en la Región Metropolitana: Una opción saludable. *Come Risco, Sano, Nutritivo Y Listo*, pp. 1–56. Santiago de Chile.
- Salgado, I. (2014). *Propuesta para el establecimiento de una planta procesadora de ensaladas de IV gama, mediante un estudio de mercado y técnico*. Universidad Veracruzana.
- Seow, J., Agoston, R., Phua, L., & Yuk, H. G. (2012). Microbiological quality of fresh vegetables and fruits sold in Singapore. *Food Control*, 25(1), 39–44.
- Tornuk, F., Cankurt, H., Ozturk, I., Sagdic, O., Bayram, O., & Yetim, H. (2011). Efficacy of various plant hydrosols as natural food sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* on fresh cut carrots and apples. *International Journal of Food Microbiology*, 148(1), 30–35.
- Torrens, R., Argilagos, B., Cabrera, S., Valdés, B., Sáez, M., & Viera, G. (2015). Las enfermedades transmitidas por alimentos, un problema sanitario que hereda e incrementa el nuevo milenio. *REDVET - Revista Electrónica de Veterinaria*, 16, 1–27.
- Torres, V., Manjarrez, C., Acosta, C., Guerrero, V., Parra, R., Noriega, L., & Ávila, G. (2015). Interacciones entre *Escherichia coli* O157:H7 y Plantas Comestibles. ¿Se han Desarrollado Mecanismos de Internalización Bacteriana? *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 64–83.
- Valero, S. (2008). *Estudio sobre el comportamiento de compra de ensaladas frescas preparadas (Cuarta gama) en comunas de Santiago*. Universidad Central.
- Vital, P. G., Dimasuay, K. G. B., Widmer, K. W., & Rivera, W. L. (2014). Microbiological quality of fresh produce from open air markets and supermarkets in the Philippines. *Scientific World Journal*, 2014.
- Who. (2016). Organización Mundial de la Salud, (EHEC). Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/>

## **ANEXOS**



## ANEXO A: Preparación del caldo E.coli

1. Para preparar 450 ml de caldo, se pesa 37,4 g del caldo E.coli y se coloca en un frasco estéril.
2. Adicionar un litro de agua destilada.
3. Calentar hasta su total disolución.
4. Esterilizar en autoclave mediante calor húmedo a 121°C y 1 atmosfera de presión por 15 minutos.
5. Cuando el caldo esté frío, adicionar 0,009g de novobiocina.

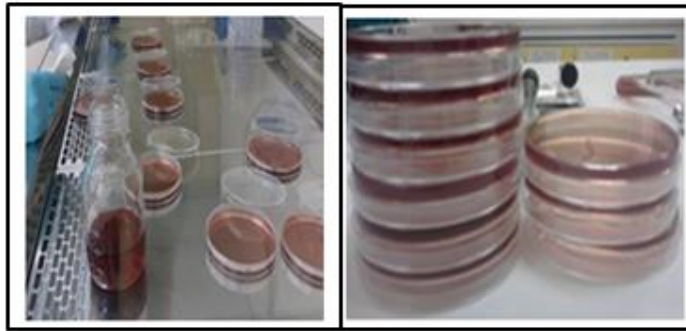


**Fig 4.** Caldo E.coli más novobiocina (ECm+n)

**Fuente:** La autora.

## ANEXO B: Preparación de Agar Macconkey Sorbitol

1. Se pesó 51,5g del Agar MacConkey sorbitol (SMAC) de Oxoid, colocar en un frasco estéril.
2. Adicionar un litro de agua destilada.
3. Calentar hasta su total disolución.
4. Esterilizar en autoclave mediante calor húmedo a 121°C y 1 atmosfera de presión por 15 minutos.
5. Dispensar en las cajas Preti, esperar que el medio se solidifique y guardar hasta su uso.



**Fig 5.**

Agar MacConkey sorbitol (SMAC)

**Fuente:** La autora.