



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TITULO DE BIOQUÍMICO FARMACEUTICO

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

TRABAJO DE TITULACIÓN.

AUTOR: Campoverde Guerrero, Carlos Miguel

DIRECTORA: Salinas Hualpa, Diana Inés, 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.

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 vegetales (espinaca, zanahoria y col) listos para el consumo.**" realizado por Campoverde Guerrero Carlos Miguel ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, noviembre de 2016

f.....

Mgtr. Diana Inés Hualpa Salinas.

Directora

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo Campoverde Guerrero Carlos Miguel, declaro ser autor del presente trabajo de titulación: **“Detección y aislamiento de cepas presuntivas de *E.coli* productor de toxina shiga en vegetales (espinaca, zanahoria y col) listos para el consumo.”**, de la titulación de 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 con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f
Campoverde Guerrero Carlos Miguel.
C.I 1105583023

DEDICATORIA

Dedicado principalmente a Dios, que ha sido mi fortaleza, durante estos largos años de estudios y ha sido el principal en ayudarme a vencer las barreras que se me consideraban insuperables, que se me han presentado durante el transcurso de mis estudios. Seguidamente quiero agradecer a mis padres: Miguel Tomas Campoverde Gonzaga y María Auxiliadora Guerrero Japa, y mi hermano que han sido los actores principal para mi formación académica.

Carlos

AGRADECIMIENTO

Doy gracias a Dios, por permitirme terminar con mucho éxito mis estudios, y levantarme en mis momentos difíciles que atravesé en mi vida y permitirme vencer obstáculos que en momentos de mi vida parecían infranqueables.

Expreso mi más sentido agradecimiento a la Universidad Técnica Particular de Loja, por la apertura de sus laboratorios para realizar dicho proyecto, a la titulación de bioquímica y farmacia, a sus directores, en especial a mi director de tesis Mgtr. Diana Inés Hualpa, que además de haberme guiado y haberme permitido formar parte del proyecto, supo ayudarme de la manera más cordial y desinteresada para la culminación de mi carrera.

A mis padres Miguel Tomas Campoverde Guerrero y María Auxiliadora Guerrero Japa, mi hermano Pablo Andrés Campoverde Guerrero, que han sido las personas más trascendentales que me han ayudado en mi formación profesional.

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
INDICE DE TABLAS/FIGURAS	viii
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I.....	5
MARCO TEÓRICO	5
1.1 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA).....	6
1.2 <i>Escherichia coli</i>	7
1.2.1 <i>E. coli</i> productora de toxina Shiga.	7
1.2.1.1 Fuentes de transmisión.	8
1.2.1.2 Principales reservorios.	8
1.2.1.3 Signos y cuadros clínicos.	8
1.2.1.4 Epidemiología.....	8
1.2.2 Identificación y caracterización de <i>E.coli</i> O157:H7.....	9
1.3 Vegetales listos para el consumo.	9
CAPITULO II.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
2.1 Muestreo y preparación de la muestra	12
2.2 Enriquecimiento en medio diferencial	12
2.3 Aislamiento en medios diferenciales.....	13

CAPITULO III.....	15
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	15
CONCLUSIONES	20
RECOMENDACIONES.....	21
BIBLIOGRAFÍA.....	22
ANEXOS.....	29
ANEXO A. Enriquecimiento de muestras	30
ANEXO B. Aislamiento de cepas bacterianas en medio selectivo diferencial.....	30
ANEXO C. Colonias aisladas y controles usados en la etapa de siembra.....	32
ANEXO D. Amplificación de DNA mediante PCR multiplex: Cepa control <i>E.coli</i> O157:H7 ...	33

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Plan de muestreo	12
Tabla 2. Ensaladas de col, zanahoria y espinaca: Porcentaje de muestras presuntivas	16

INDICE DE FIGURA

Figura 1. Porcentajes de enfermedades transmitidas por alimentos durante los últimos 21 años en el Ecuador.....	6
Figura 2. Cultivo puro obtenido de <i>E.coli</i> O157:H7 en agar SMAC, mediante resiembra. ...	13

ABREVIATURAS

°C:	Grados centígrados.
CH:	Colitis Hemorrágica.
EHEC:	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica
ETA:	Enfermedades Transmitidas por Alimentos
g:	Gramos
ICMSF:	Comisión Internacional sobre Especificaciones Microbiológicas.
mL:	Mililitros
mg:	Miligramos
mEc+n:	Medio <i>E.coli</i> modificado con novobiocina.
Stx:	Toxina shiga.
STEC:	<i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga.
SMAC:	Agar mackonkey sorbitol
SUH:	Síndrome Urémico Hemolítico
VLC:	Vegetales listos para el consumo

RESUMEN.

Los vegetales listos para el consumo, son verduras y hortalizas que mantienen su frescura y su valor nutricional, que no incorporan ningún tipo de aditivo en su procesamiento, alterando solamente su forma física original; este tipo de productos han sido implicados en algunos casos en la aparición de brotes de *E. coli* O157:H7 en los últimos años, reconocido como patógeno emergente debido a los cuadros clínicos que genera (Colitis Hemorrágica y Síndrome Urémico Hemolítico). Considerando estos antecedentes el objetivo de la presente investigación fue conocer la presencia de cepas presuntivas de *E. coli* O157:H7 aislada de vegetales (zanahoria, espinaca y col) listos para el consumo. En total se analizaron 15 muestras de cada vegetal, los cuales fueron enriquecidos en caldo *E. coli* modificado con novobiocina (0.02g/L) y su posterior aislamiento en Agar MacConkey con Sorbitol; las colonias presuntivas de *E.coli* O157:H7, fueron aisladas mediante resiembra, hasta obtener colonias típicas y posteriormente se crioconservó a -80°C. El 100% de muestras analizadas presentaron crecimiento bacteriano presuntivo para el serotipo O157:H7 productor de toxina shiga. De acuerdo a las normativas de referencia las muestras analizadas no cumplen con los criterios establecidos y pueden considerarse como factores de riesgo en la transmisión de ETA, si se confirma por métodos moleculares o serológicos.

Palabras claves. *E. coli* O157:H7, colitis hemorrágica, vegetales.

ABSTRACT

Vegetables ready-to-eat are vegetables that maintain their freshness and nutritional value, do not incorporate any type of additive in their processing, altering only their original physical; these types of products have been implicated in some cases in the emergence of outbreaks of *E. coli* O157:H7 in recent years, recognized as an emerging pathogen due to the clinical conditions it generates (Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome). Considering these antecedents the objective of the present investigation was to know the presence of presumptive strains of *E. coli* O157:H7 isolated from vegetables (carrot, spinach and cabbage) ready-to-eat. In total, 15 samples of each plant were analyzed, which were enriched in novobiocin modified *E. coli* broth (0.02g/L) and its subsequent isolation in MacConkey Agar with Sorbitol; The presumptive *E. coli* O157:H7 colonies were isolated by re-seeding, until typical colonies were obtained and subsequently cryopreserved at -80 ° C. 100% of the analyzed samples presented presumptive bacterial growth for the shiga toxin-producing serotype O157:H7. According to the reference standards, the analyzed samples do not meet the established criteria and can be considered as risk factors in the transmission of ETA, if confirmed by molecular or serological methods.

Keywords. *E. coli* O157: H7, hemorrhagic colitis, vegetables.

INTRODUCCIÓN.

Los alimentos listos para el consumo, son productos mínimamente procesados que pueden ser crudos o cocidos, venderse calientes o fríos y consumirse directamente sin ningún tratamiento adicional; en los últimos años, este tipo de productos han tenido un crecimiento importante ya que representan una opción fácil y nutritiva para el consumidor. A pesar de su amplia aceptación, éstos productos pueden representar un riesgo significativo para la salud, debido a su contaminación mediante microorganismos patógenos como consecuencia de una inadecuada manipulación por parte de los consumidores en su preparación o por el mal procesamiento realizado desde las industrias alimentarias (Rodríguez *et al.*, 2010).

El consumo de hortalizas es vital para la salud humana puesto que poseen innumerables propiedades alimenticias, son fuente inagotable de vitaminas, minerales, fibra y energía, sin embargo, por sus características físicas y de cultivo, algunos de estos productos están expuestos a contaminación de tipo biológico y químico, situación que genera un riesgo para la salud (Soliva & Beloso, 2003). Las Ensaladas listas para el consumo, son definidas como un producto que ha sido alterado físicamente a partir de su forma original, atravesando por una etapa de pelado, clasificado, lavado, secado y expandidas al pormenor en un régimen de frío que mantiene su estado fresco (García, 2008).

Los vegetales listos para el consumo a pesar de ser sometidos a un procesamiento mínimo, pueden ser considerados como vehículos importantes para la transmisión de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)(Jung *et al.*, 2014; Sabbithi *et al.* , 2014). Entre los patógenos más comunes transmitidos por las ETA, se encuentran la *Salmonella spp*, *Shigella* y el patógeno de interés *E. coli* O157:H7; por lo general, este microorganismo entra en contacto con los vegetales, mediante la irrigación de cultivo con agua contaminada y el mal manejo de los cultivos durante la cosecha (Cardamone *et al.*, 2015; Johannessen *et al.*, 2004).

E. coli productor de toxina Shiga (STEC) es reconocido como un patógeno emergente en varias partes del mundo, que es transmitido por lo general mediante alimentos, generando cuadros de colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH), en diferentes regiones del mundo (Zotta *et al.*, 2009). En los últimos años, se han incrementado la notificación de brotes asociados a STEC debido a cambios en la producción, procesamiento y distribución de alimentos, en los hábitos de consumo y en los métodos de detección (Gomez *et al.*, 2005).

Por lo antes ya mencionado, la razón de este estudio centra su atención en el aislamiento de cepas presuntivas de *E.coli* productor de toxina shiga, en vegetales listos para el consumo.

La presente tesis de investigación se desarrolla en tres capítulos: En el capítulo I, se presenta todos los aspectos relacionados a la revisión bibliográfica, enfocándose a los temas de interés de la investigación, en el capítulo II, se detalla los aspectos metodológicos aplicados en este estudio y en el capítulo III, se aborda todo lo referente a los resultados y la discusión generados en la investigación.

Para el aislamiento bacteriano de *E. coli* O157:H7 productora de toxina shiga en este estudio, se utilizó caldo de *E. coli* modificado con novobiocina como una etapa de enriquecimiento y su posterior aislamiento en Agar MacConkey con Sorbitol.

El 100% de todas las muestras analizadas presentaron crecimiento presuntivo para el serotipo O157:H7; con dichos resultados obtenidos, los alimentos de estudio pueden ser considerados como posibles factores de riesgos para la transmisión de enfermedades.

La presencia de *E. coli* O157:H7 en vegetales, comúnmente es debido a que el agricultor, aplica estiércol de ganado como fertilizante al momento de cultivar estos productos, siendo este animal reservorio natural para este patógeno (Park et al., 2012). Entre otros factores podemos considerar que a nivel industrial, no hay tratamiento capaz de asegurar una eliminación efectiva de *E. coli* O157:H7, además al momento de corte y triturado del tejido vegetal, forman microambientes capaces de permitir el crecimiento bacteriano como consecuencia de la liberación de nutrientes mediante los exudados (Posada et al., 2016).

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA).

Las enfermedades transmitidas por los alimentos o también conocidas por sus siglas (ETA), son un conjunto de signos y síntomas, producidos por la ingestión de alimentos o bebidas que han sido contaminados con microorganismos patógenos, afectando la salud del consumidor en forma individual o colectiva (Gonzales & Rojas, 2005). Los centros para el control y la prevención de enfermedades (CPE), estiman que cada año en los Estados Unidos, las enfermedades transmitidas por alimentos, provocan unas 325.000 hospitalizaciones y 5.000 muertes cada año; entre los patógenos más comunes que producen contaminación en alimentos, se encuentra, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella* y *E. coli* O157:H7 (Nyachuba, 2010).

La mayoría de las enfermedades de origen alimentario, son producidas por intoxicaciones, mediante patógenos y son reportadas diariamente; la letalidad que produce estos microorganismos es dependiente del agente que ocasiona la intoxicación (SIVE, 2012).

Granda (2015), indica en Ecuador hay un índice elevado de enfermedades transmitidas por los alimentos, que durante los últimos 21 años han aumentado de manera esporádica desde 1994 hasta el 2014; cabe destacar, que la provincia con más intoxicaciones producidas por alimentos se encuentra Zamora Chinchipe con 182 casos, seguidamente El Oro con 161.5 casos y la provincia de Loja con 114.3 casos por año. En la siguiente figura, se puede observar el porcentaje de enfermedades transmitidas por alimentos, en las provincias más afectadas en el Ecuador, según la gaceta epidemiológica SIVE (**figura 1**).

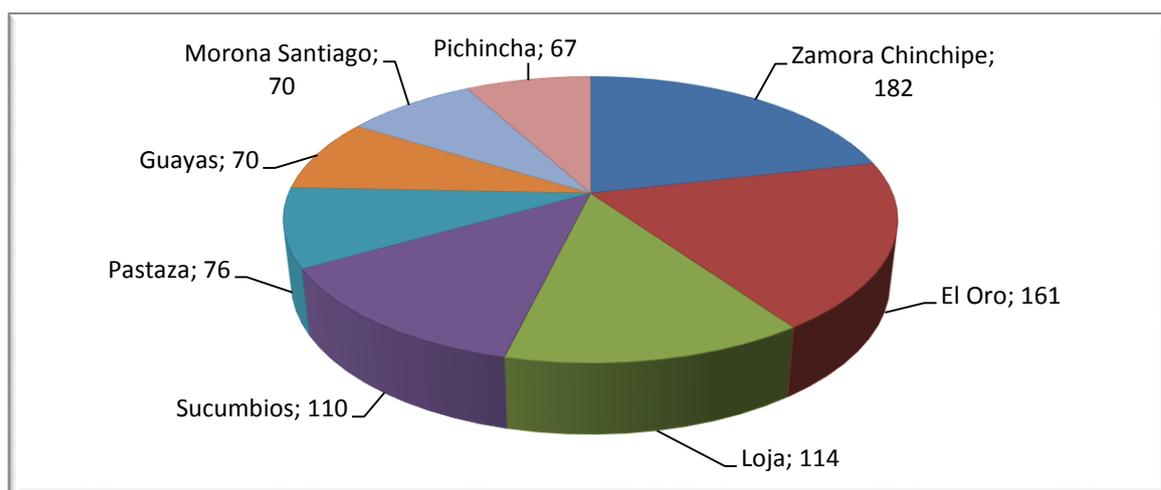


Figura 1. Porcentajes de enfermedades transmitidas por alimentos durante los últimos 21 años en el Ecuador.

Fuente: SIVE, 2012.

1.2 *Escherichia coli*.

Escherichia coli, es un microorganismo que pertenece a la familia de las enterobacterias, que tienen las características generales de ser oxidasa negativa, catalasa positiva, fermentando carbohidratos como la glucosa, lactosa y sacarosa, en la mayoría de los casos no utilizan el citrato y no producen ácido sulfhídrico; por lo general la *E. coli* pertenece de manera natural al intestino de los seres humanos y animales, siendo la mayoría de las cepas inoñas (Cabral, 2010). Pero también existen cepas que son patógenas, causantes de cuadros diarreicos, que se encuentran clasificadas según su patogénesis y las características epidemiológicas, este grupo de bacterias se dividen en seis patotipos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigena (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de adherencia difusa (ADEC) y *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC), siendo esta última la de mayor consideración, debido a los cuadros clínicos que genera (Colitis Hemorrágica y Síndrome Urémico Hemolítico) (Gomez *et al.*, 2005).

1.2.1 *E. coli* productora de toxina Shiga.

E. coli enterohemorrágica es un conjunto de cepas productoras de toxinas Shiga, que han sido asociadas con los animales y las heces humanas, entre los serotipos más importantes se encuentra la *E. coli* O157: H7, que expresa su antígeno somático (O) 157 y su antígeno flagelar (H)7, siendo uno de los patógenos más transmitidos por alimentos y agua en todo el mundo (Noyce *et al.*, 2006). *E. coli* O157: H7, es un patógeno productor de dos toxinas, que inhiben la síntesis de proteína, causando daño en células renales e intestinales; estas toxinas pueden encontrarse independientemente o conjuntamente en una sola cepa bacteriana, este tipo de patógeno es uno de los más transmitidos por alimentos, produciendo diarreas acuosas y sanguinolentas (Jure *et al.*, 2015).

En el ámbito mundial la *E. coli* O157:H7, ha causado brotes y problemas de salud de manera significativa y creciente en numerosas regiones de todo el mundo, en particular en Europa, Norteamérica, Sudamérica, Sur de África y Japón, encontrándose vinculada con una gama de productos cárnicos, frutas y hortalizas, que en la mayoría de los casos se producen por contaminaciones cruzadas con heces fecales de animales, que se encuentran en el suelo al momento de sembrar estos productos (Hodges & Kimball, 2005).

En los Estados Unidos, *E. coli* O157:H7 ha causado 73.000 infecciones y 60 muertes al año; este patógeno causa afecciones graves a niños menores de 5 años y mujeres embarazadas, por lo general no produce manifestaciones clínicas tempranas, pero el síntoma clásico que

presenta se encuentra la diarrea acuosa con sangre macroscópica denominada colitis hemorrágica, que puede durar algunos días; sin embargo, solo una pequeña porción (5%) de los niños desarrollan Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) (Ahmed *et al.*, 2005; Cleary, 2004)

1.2.1.1 Fuentes de transmisión.

Por lo general *E.coli* O157:H7 puede sobrevivir en entornos abiertos, heces fecales de animales, agua y sobre todo puede subsistir en condiciones limitantes de nutrientes (Elsas *et al.*, 2011). Investigaciones han demostrado que la *E.coli* O157:H7, se introduce en los vegetales cultivados con agua contaminada con heces de animales (Solomon *et al.*, 2002).

1.2.1.2 Principales reservorios.

El ganado es considerado como el principal reservorio de *E.coli* O157:H7; sin embargo, este patógeno ha sido aislado en distintos animales como ovejas, cabra, cerdos y especies de rumiantes salvajes (Rahal *et al.*, 2012).

1.2.1.3 Signos y cuadros clínicos.

La infección producida por *E. coli* O157:H7 comienza con un cuadro de Colitis Hemorrágica, que se caracteriza por presentar calambres abdominales acompañados de diarrea con o sin presencia de sangre, atravesando por un período de incubación de 3-4 días, por lo general la mayoría de los pacientes se recuperan dentro de una semana; sin embargo el 5 al 10% evolucionan a SUH, debido a liberación de la toxinas Shiga, este cuadro clínico tiene las características de presentar la tríada clásica de anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e insuficiencia renal (Rahal *et al.*, 2012).

1.2.1.4 Epidemiología.

Los centros para el control y prevención de enfermedades, estima que la *E.coli* productora de toxina shiga causa 73,000 casos de hospitalizaciones, en Estados Unidos, la incidencia de infección por este patógeno es de 2,1 casos por cada 100.000 habitantes, representando la segunda causa de hospitalizaciones (29%) por ETA seguido de *Listeria*; a nivel latinoamericano, en Colombia *E. coli* O157:H7 es responsable del 7,2% de los casos de diarrea, en Chile y Argentina, STEC O157 está asociados a cuadros clínicos de colitis hemorrágica y SUH, en el 2002 se reportó en Uruguay el primer caso de *E.coli* O157:H7; estos registros presentados en Latinoamérica demuestran la importancia de ETA asociadas a STEC (WHO, 2008).

1.2.2 Identificación y caracterización de *E.coli* O157:H7.

En la actualidad, se han creado diferentes medios para la identificación de *E.coli* O157:H7, entre los más comunes encontramos medios diferenciales, como el Agar MacConkey con Sorbitol (SMAC), que evalúa la actividad e inactividad de la enzima β -glucuronidasa (enzima que cataliza la descomposición de hidratos de carbono) conjuntamente con la capacidad de fermentar o no el sorbitol, ya que la mayoría de la cepas enterohemorrágicas de *E.coli* O157:H7 son incapaces de fermentar este azúcar, debido a la inactividad de la β -glucuronidasa; por lo general los resultados obtenidos son complementados mediante medios serológicos y moleculares (CFSPH, 2010, Sheng *et al.*, 2005, Watterworth *et al.*, 2004).

1.3 Vegetales listos para el consumo.

Los vegetales listos para el consumo, son productos mínimamente procesados que han sido sometidos a una etapa de pelado y cortados, alterando su forma física original, pero manteniendo su frescura y valor nutritivo, que son vendidos y expendidos al por menor en una cadena de frío (2-4°C), con la finalidad de reducir el metabolismo del vegetal manteniendo su frescura por lo menos una semana; encontrándose en una forma lista para consumir (De Giusti *et al.*, 2014; Caponigro *et al.*, 2010; Armijos & Alejandra, 2015).

Este tipo de alimentos juegan un papel importante en la transmisión de enfermedades de origen alimentario, que constituyen un problema de salud pública alrededor del mundo, que por lo general se produce como resultado de la mala manipulación y preparación inadecuada de los alimentos, por parte de los consumidores (Scott, 2003).

Los productos de frutas y hortalizas de la cuarta gama son todas aquellas variedades de frutas y verduras frescas listas para el consumo. Los productos frutícolas y vegetales de cuarta gama, son todas aquellas variedades de frutas y hortalizas frescas, solas o mixtas, procedentes de cultivos orgánicos o cultivos integrados, que durante la elaboración posterior a la recolección están sujetos a ciertos procedimientos (también denominados de procesamiento de los productos de la cuarta gama, que incluyen: selección, clasificación, el descascarillado, corte y el lavado y luego se envasan en sobres o bandejas selladas de alimentos, a través de la cadena de frío para ser finalmente vendido en el mercado de frutas y verduras listo para el consumo crudo o listo para ser consumido.

La zanahoria de cultivar es originaria del medio oriente; fue intercambiada con ciertos productos importantes en la edad antigua como el aceite de oliva, que fueron utilizados por los agricultores en celebraciones especiales, este vegetal no solo se consume de manera cocida, sino también de forma cruda, tanto su tallo como sus raíces y tiene la capacidad de albergar numerosos compuestos como el caroteno, geraniol y minerales; por lo general este tipo de hortaliza se la puede encontrar en ensalada lista para el consumo; a nivel industrial la zanahoria ha sido rallada, lavada, secada y colocadas en bolsa de polipropileno y expandidas en un régimen de frío para mantener su frescura (Flamini *et al.*, 2014).

El repollo o también conocido como col blanca es nativo de la región mediterránea y considerado como un cultivo primitivo y de alto rendimiento, es decir que es menos susceptible a plagas y enfermedades, adaptándose a una amplia gama de climas y tiene la capacidad de albergar en su interior compuestos fenólicos, vitaminas C y minerales; el repollo se lo puede encontrar en ensalada que viene en presentaciones listas para el consumo, que ha sido rallado, lavado, secado y expandidos en bolsa de polipropileno conjuntamente con aderezos en un régimen de frío para mantener su frescura (Vale *et al.*, 2015).

La espinaca o también conocida, como *Spinacia oleracea*, es una verdura que se encuentra conformada por varias hojas y es considerada como un producto funcional, alta en fibra y baja en calorías; siendo uno de los ingredientes preferidos por chefs alrededor del mundo (Kisan *et al.*, 2015). Las espinacas, se cultivan en una amplia gama de climas, siendo materia prima fundamental en la industria de alimentos, albergando en su interior caroteno, ácido ascórbico y minerales; este vegetal se lo encuentra en hojas enteras listas para el consumo, que han atravesado por una etapa de pelado, lavado, secado y colocadas en bolsa de polipropileno y expandidas en un régimen de frío para mantener su frescura (Ko *et al.*, 2014).

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1 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 vegetales zanahoria rallada, col con zanahoria y espinaca, 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 Hortalizas y frutas frescas. Muestreo (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), que indica que si el alimento está formado por capas o extractos y evitando contaminar las partes, tomar muestras de cada una, en la misma proporción en que se encuentran en el producto original.

Tabla 1. Plan de muestreo

Muestra	# Muestras	Unidades por muestra
Zanahoria rallada	5	3
Espinaca	5	3
Col con zanahoria	5	3
Total	15	

Fuente: El autor.

2.2 Enriquecimiento en medio diferencial

Este paso es fundamental para aumentar las concentraciones bacterianas, que han disminuido por causa del estrés, además en esta etapa se puede agregar agentes, que permiten volver al medio más selectivo, potenciando el crecimiento preferencial sobre otro cierto tipo de bacterias (Suo & Wang, 2013).

Para la preparación de la suspensión, se utilizó 450 ml de caldo *E.coli* modificado con novobiocina (0.02g/L) (**ANEXO A**), posterior a ello se pesó 200g de la muestra y se la

homogenizó. Se procedió a incubar a 37°C de 18 a 24 horas. Posterior al tiempo de incubación se apreció un cambio en la turbidez del medio además de presencia de gas.

2.3 Aislamiento en medios diferenciales.

Los medios diferenciales por lo general permiten el crecimiento de una serie de microorganismos que se diferencia entre sí, por tener una capacidad metabólica específica, debido la utilización de algún carbohidrato y dicha capacidad se evidencia por la variación del pH que se observa en el medio, debido a la presencial en particular de una enzima (Pachón, 2009).

La técnica permite 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® el cual contiene sorbitol en lugar de lactosa para la identificación de microorganismos fermentadores y no fermentadores de sorbitol (**Anexo B**), y se incubó a 37°C durante 24 horas en atmósfera aeróbica. 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.

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.

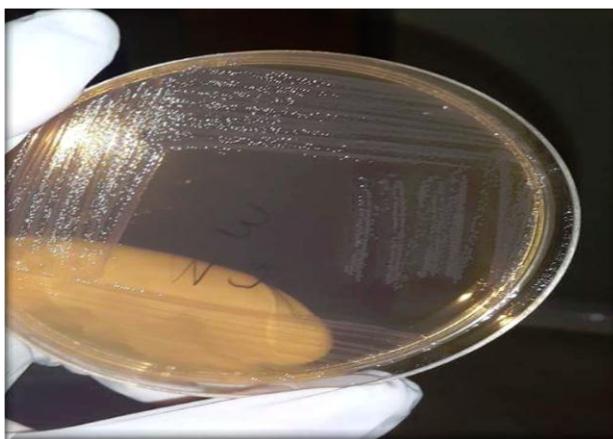


Figura 2. Cultivo puro obtenido de *E.coli* O157:H7 en agar SMAC, mediante resiembra.
Fuente: El autor

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 -70°C.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

En la presente investigación se analizaron 15 muestras de vegetales listos para el consumo de las cuales el 100% (**Tabla 2**) es decir todas las muestras presentaron crecimiento bacteriano presuntivo para *E. coli* serotipo O157:H7, productor de Toxina Shiga. Según Schamberger *et al.*, (2004), Omisakin *et al.*, (2003) y Rump *et al.*, (2012) las cepas que no fermentan el sorbitol (de características incoloras), dentro de las 24 horas de incubación a 37°C, con un diámetro aproximado de 1-2mm, en Agar SMAC, son consideradas como presuntivas para *E. coli* O157:H7, ya que la mayoría de las cepas enterohemorrágicas (EHEC) O157:H7 son incapaces de fermentar este carbohidrato, debido a la inactividad de β -glucuronidasa; dichas características se presentaron en las colonias de estudio, considerándolas como presuntivas para el serotipo ya mencionado. El Agar MacConkey con Sorbitol, es un medio diferencial con un rendimiento aceptable de especificidad, para evaluar la presencia de *E.coli* O157:H7 (Church *et al.*, 2007).

Tabla 2. Ensaladas de col, zanahoria y espinaca: Porcentaje de muestras presuntivas

Vegetales	N° de muestras analizadas	Presencia presuntiva de STEC	
		n°	%
Zanahoria rallada	5	5	100
Espinaca	5	5	100
Col con zanahoria	5	5	100
Total	15	15	100

Fuente: El autor

De acuerdo a Ahmed *et al.*, (2005) la presencia de este tipo de microorganismo en los alimentos, son usados para verificar la calidad microbiana, debido a que esta clase de bacteria se encuentra en el tracto gastrointestinal de animales de sangre caliente y su presencia en alimentos permite conocer que existió contaminación fecal.

Los vegetales estudiados, se encuentran expuestos en la superficie del suelo y están compuestos por hojas conformadas por una gran superficie microrugosa, facilitando la adhesión y permitiendo que ECEH O157:H7 colonicen estas hortalizas (Torres *et al.*, 2015).

La presencia de *E.coli* O157:H7, en estos productos estudiados, puede deberse a múltiples factores, entre el más importante se encuentra la aplicación de estiércol de ganado, que por lo general los agricultores usan como abono orgánico para mejorar la productividad del cultivo (Atidégla *et al.*, 2016). Según Walker *et al.*, (2010) el ganado es un reservorio de *E.coli* O157:H7, por lo que la aplicación de las heces de este animal directamente sobre los campos de cultivos, pudo haber sido uno de múltiples factor claves en la contaminación de los vegetales estudiados. De igual manera, la irrigación con aguas residuales y la utilización

de la misma en plaguicidas, para ser aplicados en cultivos, es un factor importante para producir contaminaciones por *E.coli* O157:H7 en vegetales (Tzschoppe *et al.*, 2011).

Entre otros factores considerados como posibles contaminantes de las hortalizas, están la falta de aplicación de las buenas prácticas de higiene por parte de los productores al momento de procesar, manipular, transportar y distribuir las hortalizas, pudiendo ser un factor clave para la contaminación de estos productos en la presente investigación planteando posiblemente un problema de seguridad alimentaria (Jung *et al.*, 2014). ANMAT, (2015) menciona que para que un análisis sea confiable, se debe realizar un muestreo representativo del lote y que el mismo haya sido manipulado de tal forma que asegure su integridad; vale destacar que el número de muestras analizadas en el presente estudio no contrasta con lo antes mencionado, debido a que el muestreo no fue representativo para dar un juicio final sobre la calidad microbiológica de estos productos, por lo que se los podría catalogar como posibles factores de riesgo en la transmisión de enfermedades alimentarias.

Por lo general las ensaladas listas para el consumo son sometidas a un procesamiento mínimo que incluyen una etapa de lavado, pelado, cortado; este tipo de procesos que atraviesan estos productos, aumentan el riesgo de contaminación por microorganismos patógenos o proporcionan un medio adecuado para la rápida proliferación bacteriana, por lo que muchas de las veces estos alimentos son consumidos directamente, sin ser aplicado un tratamiento de consideración (Castro *et al.*, 2006).

Las operaciones de lavado, corte, desinfección en el procesamiento de estos vegetales elimina la mayoría de bacterias patógenas, pero en algunos casos este tipo de procesos no aseguran una buena desinfección, por lo que es reflejado en la calidad microbiológica de los vegetales estudiados, presentando un crecimiento presuntivo de *E.coli* consistente con el serotipo O157:H7. Según Microbiologysociety, (2014) menciona que un pequeño número de bacterias, son capaces de invadir el interior del vegetal, en donde éstas no son vulnerables, protegiéndose del lavado, por lo que es de vital importancia usar bactericidas para estos productos alimentarios.

Los resultados que se encontraron en la presente investigación, en comparación con otros estudios realizados en diferentes partes del mundo, mostraron valores inferiores y variables en ensaladas frescas y listas para el consumo. Estudios realizados en Estados Unidos por Feng & Reddy (2013) reportan la presencia de *E.coli* O157:H7 en el 0.5% (1/70) de muestras analizadas, valores inferiores a nuestro estudio, en Sudáfrica estudios realizados por Abong'O *et al.*, (2008) encontraron el 2.7% (1/36) de presencia de este patógeno, en Irán reportaron el 11.4% (6/20) según Mohammad & Bahreini, (2012), en Egipto Khalil *et al.*,

(2015) reportaron una prevalencia de 16.7% (2/12), y en Nigeria Reuben & Makut, (2014) reportaron una prevalencia alta de 30% (3/10). En otras investigaciones realizadas por Jeddí et al., (2014) en China, Johnston *et al.*, (2006) en México, Seow et al., (2011) en Singapur, Saeed et al (2013) Duhok, Mukherjee *et al.*, (2003) en Minnesota y Johnston et al., (2005) en Estados Unidos no lograron aislar *E.coli* O157: H7 obteniendo una prevalencia del 0%.

Entre los vegetales estudiados en la presente investigación, la espinaca tiene mayor incidencia e importancia a nivel mundial, debido a que ha generado brotes de consideración; un claro ejemplo tenemos el producido en el año 2006, en donde afectó a 26 estados de Estados Unidos, con 183 casos confirmados y tres muertes, producto de consumir este vegetal contaminado con *E.coli* O157:H7 (Torres et al., 2015). Jiang et al., (2002) reportó un caso, en donde una persona adquirió *E. coli* O157:H7 y falleció, debido al consumo de verduras fertilizadas con estiércol de ganado consumidas directamente desde su huerto.

Los vegetales analizados, no cumplen con los criterios microbiológicos establecidos, ya que este microorganismo debe estar ausente en 25g de muestra analizada, debido a que la presencia de 2 bacterias en 25 g de alimento de *E.coli* O157: H7 son suficientes para causar infecciones por este tipo de patógeno, por lo que todas las normativas para este tipo de producto, indican ausencia de *E.coli* O157:H7 en 25 gramos de muestra analizada (Rubeglio & Tesone, 2007).

Los criterios y especificaciones que han sido tomados como referencia para la evaluación microbiológica, aplicados a los vegetales listos para el consumo en la presente investigación, se los menciona a continuación: Centre for Food Safety of Hong Kong., (2014), NAP, (2003) e ICMSF, (2011), ya que en Ecuador no cuenta con criterios microbiológicos para este tipo de productos. La posible presencia de este patógeno puede generar un riesgo significativo para la salud, debido a sus toxinas que generan cuadros de colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico, causando insuficiencia renal, anemia hemolítica y trombocitopenia OMS, (2011).

La presencia presuntiva de *E. coli* O157:H7/25g hallada en las muestras estudiadas y en otro tipo de vegetales listos para el consumo ha permitido establecer que éstos alimentos en la actualidad pueden presentar un riesgo en la transmisión de ETA; además es importante aclarar que al momento de la preparación de la sub-muestra de 200g, de las 3 unidades seleccionadas, solamente una puede estar contaminada. Para la confirmación de *E. coli* O157:H7, se debe realizar estudios adicionales mediante técnicas moleculares

como PCR multiplex o el uso de antisuero anti_O157 para identificar la presencia de toxinas y los respectivos factores de virulencia.

CONCLUSIONES

- Se determinó que en el 100% de las muestras analizadas hubo crecimiento bacteriano consistente con el serotipo *E.coli* O157:H7, debido a esto se las clasificó como cepas presuntivas.
- Las muestras analizadas no cumplen con los criterios microbiológicos establecidos por normativas internacionales.

RECOMENDACIONES.

- Se debe complementar con estudios adicionales mediante la técnica de PCR-Múltiplex los resultados obtenidos para verificar la presencia de *E.coli* O157:H7 productor de toxina shiga, debido a que se realizó un ensayo preliminar en donde se verificó la presencia de las toxinas y algunos factores de virulencia correspondientes a la cepas de referencia que se usó como control positivo y se verificó el control negativo (**ANEXO D**).
- Realizar estudios adicionales similares con otros vegetales listos para el consumo con la finalidad de investigar otro tipo de bacterias patógenas.

BIBLIOGRAFÍA.

- Abong'O, B., Momba, M., & Mwambakana, J. (2007). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* O157:H7 in vegetables sold in the Amathole District, Eastern Cape Province of South Africa. *Journal of Food Protection*, 71(4), 816–819.
- Ahmed, W., Neller, R., & Katouli, M. (2005). Host Species-Specific Metabolic Fingerprint Database for Enterococci and *Escherichia coli* and Its Application To Identify Sources of Fecal Contamination in Surface Waters. *American Society for Microbiology*, 71(8), 4461–4468.
- ANMAT. (2015). Prevención de enfermedades transmitidas por alimentos. Buenos Aires, Argentina. ANMAT Publishing. Recuperado de <http://www.anmat.gov.ar/>
- Armijos, M., & Alejandra, M. (2015). Efecto de recubrimientos comestibles formulados a base de alginato, carboximetilcelulosa y proteína de suero de leche en la vida útil de la remolacha (*Beta vulgaris L.*) mínimamente procesada. Universidad Tecnica Particular De Loja, Loja, Ecuador.
- Atidéglá, S., Huat, J., Agbossou, E., Saint, M., & Glèlè, K. (2016). Vegetable Contamination by the Fecal Bacteria of Poultry Manure: Case Study of Gardening Sites in Southern Benin. *International Journal of Food Science*, 67(5) , 211–280.
- Cabral, J. (2010). Water Microbiology . Bacterial Pathogens and Water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 70(6), 3657–3703.
- Caponigro, V., Ventura, M., Chiancone, I., Amato, L., Parente, E., & Piro, F. (2010). Variation of microbial load and visual quality of ready-to-eat salads by vegetable type , season , processor and retailer. *Food Microbiology*, 27(8), 1071–1077.
- Cardamone, C., Aleo, A., Mammina, C., Oliveri, G., & Di Noto, M. (2015). Assessment of the microbiological quality of fresh produce on sale in Sicily ,Italy: preliminary results. *Journal of Biological Research*, 22(3), 1–6.
- Castro, J., Rojas, M., Noguera, Y., Santos, E., Zúñiga, A., & Gómez, C. (2006). Calidad sanitaria de ensaladas de verduras crudas , listas para su consumo. *Alfa Editores Técnicos*, 1(1), 9–21.
- Centre for Food Safety of Hong Kong. Microbiological Guidelines for Food: For ready-to-eat food in general and specific food items. (2014). Recuperado de <http://www.cfs.gov.hk/>

- CFSPH. (2010). E.Coli enterohemorrágica. Escherichia coli Productora de Verocitotoxina (ECVT), Escherichia coli Productora de Toxina Shiga (STEC), Escherichia coli O157:H7 Iowa. Recuperado de <http://www.cfsph.iastate.edu/>
- Church, D. L., Emshey, D., Semeniuk, H., Lloyd, T., & Pitout, J. D. (2007). Evaluation of BBL CHROMagar O157 versus Sorbitol-MacConkey Medium for Routine Detection of Escherichia coli O157 in a Centralized Regional Clinical Microbiology Laboratory. *American Society for Microbiology.*, 45(9), 3098–3100.
- Cleary, T. (2004). The role of Shiga-toxin-producing Escherichia coli in hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 15(1), 260–265.
- De Giusti, M., Solimini, A., Cottarelli, A., De Vito, C., Aurigemma, C., Tufi, D., ... Marinelli, L. (2014). Temporal Pattern of microbial indicators of ready-to-eat rocket salads during shelf life. *Ann Ist Super Sanità*, 50(1), 90–95.
- Elsas, J. D. Van, Semenov, A. V, Costa, R., & Trevors, J. T. (2011). Survival of *Escherichia coli* in the environment : fundamental and public health aspects. *The ISME Journal*, 5(2), 173–183.
- Feng, P. C. H., & Reddy, S. (2013). Prevalences of shiga toxin subtypes and selected other virulence factors among Shiga-toxigenic Escherichia coli strains isolated from fresh produce. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(22), 6917–6923.
- Flamini, G., Cosimi, E., Cioni, P., Molfetta, I., & Braca, A. (2014). Essential-Oil Composition of *Daucus carota ssp.major* (Pastinocello Carrot) and Nine Different Commercial Varieties of *Daucus carota ssp. sativus* Fruits. *Chemistry & Biodiversity*, 11(20), 1022–1033.
- García, A. (2008). Aplicación de la técnica de IV gama para la elaboración de ensaladas. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 61(2), 4658–4666.
- Gomez, D., Miliwebsky, E., Silva, A., Deza, N., Zotta, C., Cotella, O., ... Rivas, M. (2005). Aislamiento de Escherichia coli productor de toxina Shiga durante un brote de gastroenteritis en un Jardín Maternal de la Ciudad de Mar del Plata. *Revista Argentina de Microbiología*, 37(4), 176–183.
- Gonzales, T., & Rojas, R. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud Pública de México*, 47(5), 388–390.

- Granda, J. (2015). *Anuario de vigilancia epidemiológica 1994-2014 Enfermedades ETAS*. Recuperado de <https://public.tableau.com/profile/vvicentee80#!/vizhome/ETAS-2014/ANUARIO>
- Hodges, J., & Kimball, A. (2005). The global diet : trade and novel infections. *Globalization and Health*, 1(4), 1–7.
- ICMSF. (2011). *Microorganisms in Foods 8. Use of Data for Assessing Process Control and Product Acceptance*. Springer US. Recuperado de <http://www.springer.com/>
- INEN. (1994). Norma Técnica Ecuatoriana Obligatoria: Hortalizas Frutas Frescas y Muestreo. *INEN 1750*. 17p.
- INEN. (2013). Norma Técnica Ecuatoriana Obligatoria: Control microbiológico de los alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico. *INEN 1529-2*. 19p.
- Jeddi, M., Yunesian, M., Gorji, M., Noori, N., Pourmand, M., & Khaniki, G. (2014). Microbial evaluation of fresh, minimally-processed vegetables and bagged sprouts from chain supermarkets. *Journal of Health, Population and Nutrition*, 32(3), 391–399.
- Jiang, X., Morgan, J., & Doyle, M. P. (2002). Fate of Escherichia coli O157: H7 in Manure-Amended Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2605–2609.
- Johannessen, G., Bengtsson, G., Heier, B., Bredholt, S., Wasteson, Y., & Rørvik, L. (2004). Potential Uptake of Escherichia coli O157 : H7 from Organic Manure into Crisphead Lettuce. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2221–2225.
- Johnston, L. M., Jaykus, L.-A., Moll, D., Martinez, M. C., Anciso, J., Mora, B., & Moe, C. L. (2005). A field study of the microbiological quality of fresh produce. *Journal of Food Protection*, 68(9), 1840–7.
- Johnston, L. M., Jaykus, L. A., Moll, D., Anciso, J., Mora, B., & Moe, C. L. (2006). A field study of the microbiological quality of fresh produce of domestic and Mexican origin. *International Journal of Food Microbiology*, 112(2), 83–95.
- Jung, Y., Jang, H., & Matthews, K. R. (2014). Effect of the food production chain from farm practices to vegetable processing on outbreak incidence. *Microbial Biotechnology*, 7(6), 517–527.
- Jure, M. A., Condorí, M. S., Pérez, G., Catalán, M. G., López, A., Zolezzi, G., ... Castillo, M.

- (2015). Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* O157 en productos cárnicos bovinos y medias reses en la provincia de Tucumán. *Revista Argentina de Microbiología.*, 47(2), 125–131.
- Khalil, R., Gomaa, M., & Khalil, M. (2015). Detection of shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) in leafy greens sold at local retail markets in Alexandria , Egypt. *International Journal of Food Microbiology*, 17(20), 58–64.
- Kisan, B., Shruthi, H., Sharanagouda, H., Sb, R., & Nk, P. (2015). Agrotechnology Effect of Nano-Zinc Oxide on the Leaf Physical and Nutritional Quality of Spinach. *Agrotechnology*, 4(2), 1–3.
- Ko, S., Park, J., Kim, S., Lee, S. W., Chun, S., & Park, E. (2014). Antioxidant Effects of Spinach(*Spinacia oleracea* L.) Supplementation in Hyperlipidemic Rats. *Preventive Nutrition and Food Science*, 19(1), 19–26.
- Microbiologysociety. (2014). New Research Shows How Pathogenic *E. coli* O157:H7 Binds to Fresh Vegetables. Recuperado de <http://www.microbiologysociety.org/>
- Mohammad, 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(20), 62–66.
- Mukherjee, A., Speh, D., Dyck, E., & Diez-Gonzalez, F. (2003). Preharvest evaluation of coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157:H7 in organic and conventional produce grown by Minnesota farmers. *Journal of Food Protection*, 67(5), 894–900.
- NAP. (2003). Scientific Criteria to Ensure Safe Food. *Committee on the Review of the Use of Scientific Criteria and Performance Standards for Safe Food*. Recuperado de <http://www.nap.edu/>
- Noyce, J., Michels, H., & Keevil, C. (2006). Use of Copper Cast Alloys To Control *Escherichia coli* O157 Cross-Contamination during Food Processing. *Applied And Environmental Microbiology.*, 72(6), 4239–4244.
- Nyachuba, D. G. (2010). Foodborne illness : is it on the rise ? *Nutrition Reviews*, 68(5), 257–269.
- Omisakin, F., Macrae, M., Ogden, I., & Strachan, N. (2003). Concentration and Prevalence of

- Escherichia coli* O157 in Cattle Feces at Slaughter. *American Society for Microbiology*, 69(5), 2444–2447.
- OMS. (2011). E. coli enterohemorrágica (EHEC). *Nota descriptiva N° 125*. Recuperado de <http://www.who.int/>
- Pachón, D. (2009). Aislamiento, Identificación y Serotipificación de Enterobacterias del Género Salmonella en una Población de Crocodylus Intermedius y Testudinos Mantenidos en Cautiverio en la Estación de Biología Tropical Roberto Franco e.b.t.r.b de la Facultad de Ciencia. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá-Colombia.
- Park, S., Szonyi, B., Gautam, R., Nightingale, K., Anciso, J., Ivanek, A. N. D. R., & Al, P. E. T. (2012). Risk Factors for Microbial Contamination in Fruits and Vegetables at the Preharvest Level: A Systematic Review. *Journal of Food Protection*, 75(11), 2055–2081.
- Posada, I., Del Rosal, S., Valero, A., Zurera, G., Sant'Ana, A., Alvarenga, V. O., & Pérez-Rodríguez, F. (2016). Accessing the growth of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella in spinach, lettuce, parsley and chard extracts at different storage temperatures. *Journal of Applied Microbiology*, 120(76), 1701–1710.
- Rahal, E., Kazzi, N., Nassar, F., & Matar, G. (2012). Escherichia coli O157 : H7 — Clinical aspects and novel treatment approaches. *Cellular and Infection Microbiology*, 2(11), 1–7.
- Reuben, C. R., & Makut, M. 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.
- Rodríguez-Cavallini, E., Rodríguez, C., Del Mar Gamboa, M., & Arias, M. L. (2010). Evaluación microbiológica de alimentos listos para consumo procesados por pequeñas industrias costarricenses. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 60(2), 179–183.
- Rubeglio, E., & Tesone, S. (2007). Escherichia coli O157 H7: presencia en alimentos no cárnicos. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 105(3), 193–194.
- Rump, L., Meng, J., Strain, E., Cao, G., Allard, M., & Gonzalez, E. (2012). Complete DNA sequence analysis of enterohemorrhagic Escherichia coli plasmid po157_2 in β -Glucuronidase-positive E. coli O157:H7 reveals a novel evolutionary path. *Journal of Bacteriology*, 194(13), 3457–3463.

- Sabbithi, A., Kumar, R., Kashinath, L., Bhaskar, V., & Rao, S. (2014). Microbiological quality of salads served along with street foods of Hyderabad, India. *International Journal of Microbiology*, 114(13), 1–6.
- Saeed, A., Mazin, H., Saadi, A., & Hussein, S. (2013). Detection of *Escherichia coli* O157 in vegetables. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 6(2), 16–18.
- Schamberger, G., Phillips, R., Jacobs, J., & Gonzalez, F. (2004). Reduction of *Escherichia coli* O157: H7 populations in cattle by addition of colicin E7-producing *E. coli* to feed. *American Society for Microbiology.*, 70(10), 6053–6060.
- Scott, E. (2003). Food safety and foodborne disease in 21 st century homes. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 14(5), 277–280.
- Seow, J., Aoston, R., Phua, L., & Gyun, Y. (2011). Microbiological quality of fresh vegetables and fruits sold in Singapore. *Food Control Journal*, 25(12), 39–44.
- Sheng, H., Davis, M. ., Knecht, H., Hancock, D. ., Van Donkersgoed, J., & Hovde, C. . (2005). Characterization of a shiga toxin-, intimin-, and enterotoxin hemolysin-producing *Escherichia coli* ONT:H25 strain commonly isolated from healthy cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(7), 3213–3220.
- SIVE. (2012). Normas del sistema integrado de vigilancia epidemiológica del Ecuador (*sive*). MSP. Recuperado de <https://aplicaciones.msp.gob.ec>
- Soliva, R. ., & Belloso, O. (2003). New advances in extending the shelf-life of fresh-cut fruits: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 14(9), 341–353.
- 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. *Applied And Environmental Microbiology.*, 68(1), 397–400.
- Suo, B., & Wang, Y. (2013). Evaluation of a multiplex selective enrichment broth SEL for simultaneous detection of injured *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(3), 737–742.
- 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*, 34(1), 64–83.

- Tzschoppe, M., Martin, A., & Beutin, L. (2011). A rapid procedure for the detection and isolation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serogroup O26, O103, O111, O118, O121, O145 and O157 strains and the aggregative EHEC O104:H4 strain from ready-to-eat vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 152(20), 19–30.
- Vale, A. P., Santos, J., Brito, N. V, Peixoto, V., Carvalho, R., Rosa, E., & Oliveira, M. B. P. P. (2015). Light influence in the nutritional composition of Brassica oleracea sprouts. *Food Chemistry*, 178(2015), 292–300.
- Walker, C., Shi, X., Sanderson, M., Sargeant, J., & Nagaraja, T. (2010). Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in gut contents of beef cattle at slaughter. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(3), 249–255.
- Watterworth, L., Topp, E., Schraft, H., & Tin, K. (2004). Multiplex PCR-DNA probe assay for the detection of pathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods*, 60(20), 93–105.
- WHO. (2008). Manual de Procedimientos: Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de alimentos. America del Sur. Recuperado de www.who.int/
- Zotta, C. M., Carbonari, C., Gómez, D., Deza, N., Lavayén, S., Miliwebsky, E., ... Rivas, M. (2009). Nuevo patrón genético de *Escherichia coli* O157 : H7 biotipo “ B ” en Argentina. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana.*, 43(4), 589–591.

ANEXOS

ANEXO A. Enriquecimiento de muestras

A.1 Caldo *E.coli* modificado con noboviocina

- Pesar 16.65 g y homogenizar en 450ml de agua destilada
- Se calienta agitando frecuentemente hasta ebullición durante 1 minuto
- Esterilizar en autoclave a 121°C, 15 PSI durante 15 minutos.
- Dejamos enfriar y se colocamos 0.09 g de noboviocina
- Conservar en refrigeración de 2° a 8°C.

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 aeróbico

ANEXO B. Aislamiento de cepas bacterianas en medio selectivo diferencial.

B.1 Agar Macconkey con sorbitol (SMAC)

- Pesar 51,6 g de SMAC y diluir en 1000 ml de agua destilada.
- Autoclavar a 121 ° a 1 atmósfera de presión durante 15 minutos.
- Enfriar a 50 °C y se vierte en placas de cultivo (15-20ml en cada placa) y dejamos solidificar.

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

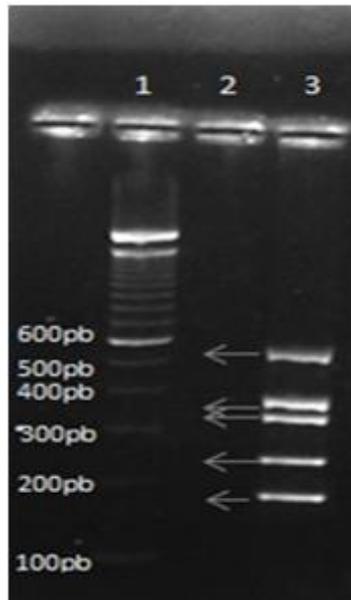


Figura 3. Control positivo: Cepa de referencia *E.coli* O157:H7
Fuente: Pauta, 2016



Figura 4. Colonias típicas de *E.coli* fermentadoras de sorbitol
Fuente: Pauta, 2016

ANEXO D. Amplificación de DNA mediante PCR multiplex: Cepa control *E.coli* O157:H7



Pocillo numero 1: Aquí se puede evidenciar el marcador de peso molecular, que nos sirve como referencia TrackIt™ 100 pb DNA Ladder Invitrogen; Pocillo numero 2: Control negativo para *E.coli* O157:H7; Pocillo número 3: Control Positivo *E.coli* O157:H7. En la columna 2 se puede evidenciar la ampliación de las dos toxinas: *stx2* (584pb) y *stx1* (348 pb) con sus factores de virulencia *eaeA* (397pb); *uidA* (252pb) y *ehxA* (158pb). Los distintos pesos moleculares de las cinco bandas, se encuentran señaladas con las flechas de la izquierda.