UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Serotipificación de cepas de *Salmonella* aisladas de vegetales frescos empacados

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR**:** Calva Montero, Henry Johnson

DIRECTOR: Hualpa Salinas, Diana Inés, Mgtr.

LOJA – ECUADOR

2017

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, 2017

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Magister.

Diana Inés Hualpa Salinas

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: **Serotipificación de cepas de *Salmonella* aisladas de vegetales frescos empacados**, realizado por Henry Johnson Calva Montero, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, febrero de 2017.

f).....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo Calva Montero Henry Johnson, declaro ser autor del presente trabajo de titulación: Serotipificación de cepas de *Salmonella* aisladas de vegetales frescos empacados, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Hualpa Salinas Diana Inés, Mgtr, 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 de 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; a 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……..
Autor: Calva Montero Henry Johnson
Cédula: 1104811086

DEDICATORIA

Dedico este trabajo especialmente a mi abuelita, que supo ser padre y madre para mí. A mis padres por su apoyo y amor incondicional, gracias a su esfuerzo han hecho posible este sueño. A mi esposa e hijo, por el apoyo moral que me brindaron fuerza para salir adelante. A todos los profesores que han colaborado para engrandecer mis conocimientos y crecer como persona.

HENRY CALVA.

AGRADECIMIENTO

Primeramente agradezco a Dios por permitirme cumplir uno de mis sueños y metas trazadas en mi vida.

A mi Familia que siempre ha estado apoyándome, dándome ánimos para cumplir mis metas y sueños planteados en mi vida.

Agradezco a la Universidad Técnica Particular de Loja, por dejarme formar parte de ella. A todos los docentes que formaron parte de este camino universitario y guiaron mis pasos para cumplir este sueño.

Un Agradecimiento muy especial a la Mgtr. Diana Inés Hualpa Salinas, por haberme dado la oportunidad de recibir de su experiencia, conocimiento científico, sobre todo por su paciencia para guiarme durante todo el desarrollo de la tesis.

TABLA DE CONTENIDO

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS III
DEDICATORIA IV
AGRADECIMIENTO V
ABREVIATURAS 8
RESUMEN 10
ABSTRACT 11
INTRODUCCIÓN 12
CAPÍTULO I 14
MARCO TEÓRICO 14
1.1 Enfermedades trasmitidas por los alimentos (ETA) 15
1.1.1. Infección alimentaria. 15
1.1.2. Intoxicación alimentaria. 16
1.1.3. Toxiinfección alimentaria. 16
1.2 Microorganismos indicadores 16
1.3 Familia Enterobacteriaceae 17
1.3.1 Grupo coliforme. 18
1.3.2 Enteropatógenos. 19
1.4 Género Salmonella 20
1.5 Clasificación taxonómica 20
1.6 Morfología y características fisiológicas en medios de cultivo 21
1.7 Condiciones de supervivencia 21
1.8 Reservorios 22
1.9 Patogenia 22
1.10 Epidemiologia 22
1.10.1. Salmonelosis. 23
1.10.2. Fiebre tifoidea. 23
1.10.3. Gastroenteritis aguda. 23
1.11 Identificación y serotipificación 23
1.12 Tratamiento 24
1.13 Inocuidad de los Alimentos 25
CAPITULO II 26
MATERIALES Y MÉTODOS 26
2.1 Recolección de vegetales frescos 27

2.2 Aislamiento e identificación 28
2.2.1 Preparación de la muestra. 28
2.2.2. Pre- enriquecimiento. 28
2.2.3. Enriquecimiento selectivo. 28
2.2.4. Siembra en medios selectivos. 29
2.2.5. Identificación morfológica de colonias típicas de *Salmonella.* 29
2.3. Identificación 29
2.3.1. Pruebas bioquímicas. 29
CAPÍTULO III 31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN 31
CONCLUSIONES 37
RECOMENDACIONES 38
BIBLIOGRAFÍA 39
ANEXOS 46
Anexo 1: Flujograma de metodología 47
Anexo 2: Metodología del Microgen GN-ID Identificación 48
Anexo 3: Interpretación e identificación de microorganismos en pruebas bioquímicas 49
Anexo 4: Porcentajes individuales de los microorganismos aislados a partir de vegetales frescos empacados y de venta libre. 49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Enterobacterias de Importancia Clínica 17
Tabla 2. Clasificación Taxonómica de Salmonella spp 20
Tabla 3. Morfología de colonias de Salmonella spp 21
Tabla 4. Condiciones de Supervivencia 22
Tabla 5. Clasificación de Serotipos de Salmonella spp 22
Tabla 6. Plan de muestreo 27
Tabla 7. Interpretación de pruebas bioquímicas para Salmonella 30
Tabla 8. Porcentaje total de aislamiento de microorganismos 32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Colonias típicas de *Salmonella spp*……...29

ABREVIATURAS

µL: Microlitros

µm: micras

aw: actividad de agua

BPM: Buenas Prácticas de Manufactura

BPMP: Buenas Practicas de Manejo Postcosecha

ETA: Enfermedades Trasmitidas por Alimentos

FDA: Administracion de Alimentos y Medicamentos

ºC: Grados Celsius

g: Gramos

H2S: Acido Sulfhidrico

LIA: Agar Hierro-Lisina

TSI: Agar Triple Azucar- Hierro

mL: Mililitros

NaOH: Hidroxido de Sodio

RV: Caldo Rappaport-Vassiliadis

TT: Caldo Tetrationato

spp: Engloba varias especies del mismo genero

SNC: Sistema Nervioso Central

GEA: Gastroenteritis Aguda

MPD: Programa de Datos Microbiológicos

BAM: Manual Analítico Bacteriológico

BGNNF: Bacilos Gram Negativos no Fermentadores

XLD: Agar Xilosa Lisina Desoxicolato

SS: Agar *Salmonella - Shigella*

BS: Agar Bismuto Sulfito

HK: Agar Hektoen

RESUMEN

Salmonella es una enterobacteria responsable de causar salmonelosis, es un bacilo gramnegativo anaerobio facultativo, móvil ya que posee flagelos perítricos, no fermenta lactosa, productora gas a partir de la fermentación de hidratos de carbono. El objetivo de esta investigación fue detectar la presencia de cepas y serotipos de *Salmonella* en vegetales frescos empacados y de venta libre: lechuga, espinaca, albahaca, brotes de soja, culantro, perejil y col; que se expenden en los mercados y supermercados de la ciudad de Loja. Se analizó 138 muestras, de cada producto y de cada lote se tomó 3 productos al azar para establecer una unidad analítica. Se utilizó la metodología propuesta por el Manual Analítico Bacteriológico (BAM) para aislamiento y detección de *Salmonella,* que consistió en preenriquecimiento, enriquecimiento selectivo, siembra en medios selectivos e identificación y confirmación bioquímica. En los resultados obtenidos no se logró detectar la presencia de *Salmonella* en este tipo de vegetales, sin embargo se aisló e identificó otros microorganismos entéricos de mayor importancia como: *Citrobacter freundii* 19,57% y *E. coli* 15,94%, que sirven como indicadores de contaminación fecal.

Palabras clave: Vegetales frescos empacados y de venta libre, ETA, *Salmonella,* Serotipificación, Patogenicidad, Microorganismos entéricos.

ABSTRACT

Salmonella is an enterobacteria responsible for causing salmonellosis, is an anaerobic gramnegative bacillus facultativo, mobile as it has perimeter flagella, does not ferment lactose, producing gas from the fermentation of carbohydrates. The objective of this research was to detect the presence of *Salmonella* strains and serotypes in fresh and packaged vegetables: lettuce, spinach, basil, soybean shoots, coriander, parsley and cabbage; which are sold in the markets and supermarkets of the city of Loja. 138 samples were analyzed, of each product and each batch was taken 3 random products to establish an analytical unit. We used the methodology proposed by the Bacteriological Analytical Manual (BAM) for isolation and detection of *Salmonella*, which consisted of pre - enrichment, selective enrichment, selective seeding and biochemical identification and confirmation. In the results obtained it was not possible to detect the presence of Salmonella in this type of vegetable, however it was isolated and identified other enteric microorganisms of major importance as: *Citrobacter freundii* 19,57% and *E. coli* 15,94%, that serve as Indicators of fecal contamination.

Key words: Fresh and packaged vegetables, ETA, Salmonella, Serotyping, Pathogenicity, Enteric microorganisms

INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe una elevada demanda en el consumo de vegetales frescos empacados y de venta libre, a los cuales los podemos adquirir en diferentes supermercados, mercados o ferias libres en diversas presentaciones, estos poseen diferentes propiedades alimenticias que son una fuente muy rica en vitaminas, minerales, fibra los cuales proporcionan energía al cuerpo humano, sin embargo, estos vegetales son vulnerables y están expuestos a contaminación biológica y química debido a las propiedades físicas y de cultivo, situación que genera un peligro para la salud humana (Quilliam et al., 2012).

Diversos vegetales como: lechuga, espinaca, perejil, culantro, albahaca, brotes de soja, entre otros, son muy utilizados como fuentes de alimento primario como condimentos y ensaladas, característicos de zonas semitempladas en todo el mundo, lo cual refleja la importancia del control de calidad e inocuidad de los vegetales (Monge et al., 2011).

Según Puig et al. (2013) la contaminación biológica de productos hortícolas están relacionadas con las malas prácticas sanitarias, como es la siembra, desarrollo, cosecha, post cosecha, uso de agua contaminada. El uso de desechos biológicos solidos utilizados como fertilizantes sin tratamiento alguno, presencia de animales en el área de cultivo, el suelo, transporte, almacenamiento, empaquetamiento (Suslow, 2009).

El estudio de ETA, se realiza debido a la prevalencia de enfermedades producidas por microorganismos patógenos, desde el punto de vista sanitario estos vegetales pueden ser el vehículo de infecciones o intoxicaciones (Dennis et al., 2010). Se estima que las ETA afectan aproximadamente a 48 millones de personas anualmente en Estados Unidos, de los cuales 9.4 millones de enfermedades son producidas por patógenos conocidos (Scallan et al., 2011). Painter et al (2013) atribuye a los vegetales y frutas el 51% de las ETA en Estados Unidos (1998-2008), mientras que productos de origen animal tanto terrestre como acuáticos representan el 42% y 6% respectivamente.

La familia enterobacteriaceae es responsable de producir enfermedades, debido a que esta familia es colonizadora exitosa en ambientes favorables para su desarrollo (Stanbrige. 1998; Nychas. *et al.* 2008; Vasilopoulos. et al. 2010). En los diferentes estudios de diversos alimentos ya sean cárnicos o vegetales, se han podido encontrar brotes y subtipos pertenecientes a esta familia causantes de diversas enfermedades a nivel mundial (Doulgeraki. *et al.* 2011).

Los vegetales frescos empacados y de venta libre son aquellos que conservan sus propiedades físicas, propias del alimento sin recibir alguna modificación en la forma original

del vegetal, la utilización de bolsas plásticas es para proteger a los vegetales de un posible daño mecánico, contaminación química y microbiana, brindando una barrera simple a la influenza de factores externos e internos, debido a que los vegetales frescos empacados representan el 33% de exportaciones y comercialización total (INEN 1750:1994; Garcerant., 2015).

El capítulo I hace referencia a las Enfermedades Trasmitidas por los Alimentos (ETA), infección e intoxicación alimentaria, fuentes de transmisión, reservorios, además se realiza una descripción de patógenos causantes de enfermedades pertenecientes a la familia enterobacteriaceae, se realiza descripción de los métodos de detección y confirmación de los microorganismos pertenecientes a la familia enterobacteriaceae.

En este contexto se realiza el estudio de serotipificación de cepas aisladas de *Salmonella spp* de vegetales frescos empacados, partiendo de estudios realizados por Reddy (2015), en donde estudió Prevalencia y características de los serotipos de Salmonella aislados de productos frescos comercializados en los Estados Unidos, y por Barrantes (2011) Calidad Microbiológica y análisis de patógenos (*Shigella y Salmonella*) en lechuga.

En el capítulo 2, hace referencia a la metodología empleada en este estudio, la cual se basó en la utilización propuesta por el Manual Analítico Bacteriológico (BAM) capítulo 5: *Salmonella,* de la FDA en el 2007, se realizó un estudio de 138 muestras de vegetales frescos empacados y venta libre en los diferentes mercados y supermercados de la ciudad de Loja.

El capítulo 3, indica los resultados obtenidos en el presente trabajo, en la cual no se pudo aislar *Salmonella spp,* pero sin embargo se logró aislar otros microorganismos pertenecientes a la familia enterobacteriaceae y que nos sirven con indicadores de higiene de los alimentos.

Durante el desarrollo de la investigación se observaron dificultades en la identificación de *Salmonella spp,* debido a que colonias de *Citrobacter freundii* produjeron H_2S, se las considero como *Salmonella spp*, debido a esto se utilizó técnicas semiautomatizadas para la confirmación de los microorganismos en estudio.

Es este estudio no se encontró *Salmonella spp,* sin embargo se logró aislar e identificar microorganismos como C*itrobacter freundii,* es la bacteria de mayor incidencia, con el 19,57% (27/138), *E. coli*, con el 15,94%(22/138), *Pantoea agglomerans,* con el 4,35% (6/138), *Enterobacter cloacae*, con el 2,90% (4/138), seguido de *Citrobacter koseri*, *Enterobacter aerogenes, Alkalescens dispar,* con el 1,45% (2/138) y finalmente, *Proteus vulgaris, Klebsiella pneumoniae* con el 0,72% (1/138), que nos sirven como indicares de higiene en alimentos.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Enfermedades trasmitidas por los alimentos (ETA)

Las Enfermedades Trasmitidas por los Alimentos (ETA) son originadas por la ingestión de alimentos y/o agua, que contengan agentes etiológicos en cantidades que afecten a la salud del consumidor a nivel individual o grupal en la población humana (Guerrero, 2016).

Se atribuye a los vegetales y frutas el 51% de las ETA en Estados Unidos (1998-2008), mientras que productos de origen animal tanto terrestre como acuáticos representan el 42% y 6% respectivamente (Painter et al, 2013). Se estima que ETA afecta alrededor de 48 millones de personas anualmente en Estados Unidos, de los cuales el 9,4 millones de enfermedades son producidas por patógenos conocidos (Scallan et al., 2011).

Se han reportado más de 250 ETA, pero las más importantes son las alteraciones gastrointestinales (Pauta, 2014). Existen numerosos tipos de ETA que presentan diferente sintomatología, dependientes del tipo de contaminación y cantidad de alimento consumido, los signos más comunes son vómitos y diarreas pero también pueden presentarse dolores abdominales, dolor de cabeza, fiebre, síntomas neurológicos, visión doble entre otros, además, ciertas ETA pueden generar enfermedades crónicas a largo plazo tales como daños renales, artritis, meningitis, aborto y en casos extremos la muerte (Kopper et al., 2009).

Los agentes etiológicos predominantes son responsables de causar alteraciones gastrointestinales que puede deberse al consumo de alimentos y bebidas que contienen microorganismos patógenos y sus toxinas, estas alteraciones resultan del consumo de alimentos y agua contaminados con células de bacterias patógenas. Con base a las características de las enfermedades se pueden dividir en tres grupos: Intoxicación, infección y toxicoinfección (Ray & Bhunia, 2010).

1.1.1. Infección alimentaria.

Las enfermedades de este tipo es el resultado del consumo de alimentos y agua contaminados con bacterias y virus enteropatogénicos que deben permanecer vivos en los alimentos o agua durante el consumo, así las mismas se encentren en números reducidos tienen la capacidad de multiplicarse en el tracto gastrointestinal por ejemplo infecciones por *Salmonella, Escherichia coli* (enterohemorrágica y enteropatogénica) (Ray & Bhunia, 2010).

Las infecciones alimentarias son producidas por la ingestión de alimentos con agentes infecciosos tales como bacterias, virus, hongos, parásitos, que en la luz intestinal pueden multiplicarse y producir toxinas o a su vez invadir la pared intestinal para atentar con el sistema inmunológico (Guerrero, 2016).

1.1.2. Intoxicación alimentaria.

Las enfermedades producidas por intoxicación alimentaria ocurren como consecuencia de la ingesta de toxinas bacterianas preformadas que crecen en los alimentos, una toxina debe estar presente en forma activa en un alimento contaminado para producir la intoxicación; una vez que los microorganismos han crecido y generado toxinas en el alimento, no hay necesidad de que este tenga células viables cuando es consumido para que presente la enfermedad por ejemplo cepas de *Clostridium botulinum* (Ray & Bhunia, 2010). Además las intoxicaciones son producidas por la ingesta alimentos que contengan toxinas producidas por los microorganismos presentes en tejidos de plantas o animales (Kopper et al, 2009). Se produce cuando ciertas bacterias una vez desarrolladas secretan toxinas y son ingeridas mediante los alimentos, se absorben en el epitelio intestinal solo basta la presencia de sustancias toxicas para desarrollar enfermedades y no de la bacteria como tal (Pascual, 2005).

1.1.3. Toxiinfección alimentaria.

Los problemas de salud generados se debe a la ingesta de un gran número de células viables de algunas bacterias patógenas que se encuentra en el alimento o agua contaminada, por lo regular las células bacterianas esporulan, colonizan o mueren y liberan toxinas que producen los síntomas de la enfermedad por ejemplo gastroenteritis producida por *Escherichia coli, Salmonella spp* (Ray & Bhunia, 2010).

1.2 Microorganismos indicadores

Se considera como microorganismos indicadores a todos los grupos o especies de microorganismos implicados en enfermedades de origen alimentario que por lo usual son patógenos entéricos, lo que significa que pueden sobrevivir en el tracto gastrointestinal de los seres humanos, así como de animales y aves, un producto contaminado de manera directa o indirecta con materia fecal de cualquiera de estas fuentes, es indicativa de la posible presencia de patógenos entéricos (Ray & Bhunia, 2010). Los microorganismos indicadores advierten un manejo inadecuado de alimentos, los cuales pueden incrementar la presencia de microorganismos patógenos causantes de ETA (Fuentes et al, 2014).

Los denominados microorganismos indicadores de la calidad microbiana o indicadores de la durabilidad, son organismos o productos metabólicos, cuya presencia en determinados niveles en los alimentos se utiliza para evaluar la calidad del alimento, la principal bacteria de este grupo es la *Escherichia coli* cuya presencia en los alimentos indica una posible

contaminación fecal por lo cual el consumidor en casa de ingerir este alimento podría estar expuesto a bacterias entéricas (Vázquez & O'Neill, 2013).

1.3 Familia Enterobacteriaceae

La familia Enterobacteriaceae es aquella responsable de producir enfermedades, debido a que son colonizadores exitosos en ambientes favorables para su desarrollo (Stanbrige, 1998; Nychas et al, 2008; Vasilopoulos et al, 2010). En los diferentes estudios de diversos alimentos sean cárnicos o vegetales se han podido encontrar brotes y subtipos pertenecientes a esta familia causantes de diversas enfermedades a nivel mundial (Doulgeraki et al, 2011). La familia Enterobacteriaceae está formada por bacilos y cocobacilos gramnegativos, tienen esta denominación por su localización habitual como saprofitos en el tubo digestivo, aunque son bacterias ubicuos encontrándose en el suelo, vegetación, agua y formando parte de la flora intestinal del hombre y de muchos animales (Garcia & Rodríguez, 2010).

En la tabla 1, se muestra los diferentes géneros y especies de Enterobacterias de importancia clínica, responsables de causar diversas patologías en el ser humano.

Tabla 1. Enterobacterias de Importancia Clínica

Género	**Especie**
Escherichia	*coli, alberti, alvei*
Klebsiella	*pneumoniae, oxytoca, granulomatis*
Salmonella	*Choleraesuis*
Enterobacter	*aerogenes, cloacae, aglomerans, gergoviae, sakazakii*
Serratia	*Marcencens*
Hafnia	*Alves*
Citrobacter	*freundii, amalonaticus, diversus*
Yersinia	*pestis,enterocolitica, pseudotuberculosis*
Proteus	*mirabilis, vulgaris*
Providencia	*rettgeri,stuartii*
Morganella	*Morganii*

Shigella	*dysenterii, flexneri,sonnei, boydei*
Plesiomonas	*Shigelloides*
Edwarsiella	*tarda*
Ewingella	*Americana*

(Garcia & Rodríguez, 2010)

1.3.1 Grupo coliforme.

El grupo coliforme está conformado por especies de diversos géneros como: *Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter,* estas especies comparten características comunes, son bacilos gramnegativos, no formadores de esporas, anaeróbicos facultativos, móviles, en 48 horas fermentan lactosa para producir ácido y gas a temperaturas de 32 a 35ºC, todas tienen la capacidad de progresar en los alimentos, excepto los que tienen un pH ≤ 4 y Aw ≤ 0.92, suelen estar presentes en heces de humanos, animales de sangres caliente y aves (Ray & Bhunia, 2010).

El grupo coliforme es casi exclusivo de la materia fecal, sin embargo las características de sobrevivencia y capacidad para multiplicarse fuera del intestino también se observan en agua potable, por lo que al grupo coliforme se lo utiliza como indicador de contaminación fecal (Camacho et al, 2009).

1.3.1.1 Citrobacter.

Son bastoncillos de 1x4µm solos o en pares, por lo general son móviles, mesofílicos, se encuentran en los contenidos intestinales de los seres humanos, animales, aves y en el ambiente, se incluye en el grupo de coliformes como indicador de higiene la especie más importante de este género es el *Citrobacter freundii* (Ray & Bhunia, 2010).

El género *Citrobacter* está ampliamente disperso en la naturaleza, encentrándose en el agua, suelo, tracto intestinal de humanos y animales, se los denomina *Citrobacter* por su capacidad de usar citrato como única fuente de carbono, estos microorganismos fermentan lactosa, produce H_2S, por lo que se los puede confundir con *Salmonella,* este microorganismo se lo denomina patógeno oportunista debido a que causa infecciones a personas inmudeprimidas, tales como: infecciones urinarias, abscesos cerebrales y gastroenteritis (Garcia & Rodríguez, 2010).

1.3.1.2 Enterobacter.

Son bastoncillos de 1x2mm, móviles, mesofílicos, se encuentran en los contenidos intestinales de los seres humanos, animales, aves y en el ambiente, se incluye en el grupo de coliformes como indicador de higiene la especie más importante de este género es *Enterobacter aerogenes* (Ray & Bhunia, 2010).

Las cepas de *Enterobacter* tienen motilidad positiva, citrato y descarboxilan ornitina y produce gas a partir de glucosa, estos microorganismos poseen cápsulas pequeñas de polisacáridos (Jawetz et al, 2010).

1.3.1.3 Klebsiella.

Son bastoncillos medianos 1x4µm, muestran multiplicación mucoide, generalmente son móviles, poseen cápsulas de polisacáridos de gran tamaño y falta de motilidad (Jawetz et al, 2010).

Bastoncillos medianos 1x4µm se presenta solo o en pares, móviles, encapsulados, mesofílicos, se encuentran en contenidos intestinales de los seres humanos, animales, aves, suelo, agua y granos, se incluye en el grupo de coliformes como indicador de higiene la especie más importante de este género es *Klebsiella pneumoniae* (Ray & Bhunia, 2010).

1.3.1.4 Escherichia.

El género *Escherichia* son bastoncillos rectos 1x3µm móviles o inmóviles, descarboxilan lisina, producen gas a partir de glucosa, la mayor parte fermentan lactosa; la *Escherichia coli* es la especie más importante dentro de este grupo de bacterias, debido a que no solo forman parte la flora habitual del intestino, sino porque además agrupa cepas extraintestinales (Garcia & Rodríguez, 2010).

El género *Escherichia* son microorganismos mesofílicos, se encuentra en contenidos intestinales de seres humanos, animales de sangre caliente, aves, muchas cepas no son patógenas pero algunas son patógenas para los humanos y animales, están implicadas en las enfermedades de origen alimentario, se usan como indicador de higiene del grupo coliforme, la especie más importante de este género es *Escherichia coli* (Ray & Bhunia, 2010).

1.3.2 Enteropatógenos.

Este grupo incluye muchos patógenos entéricos, sin embargo unos participan con más frecuencia que otros, las células vivas de patógenos entéricos ingresan al organismo por

medio de los alimentos contaminados, las células que sobreviven al ambiente gástrico penetran la membrana y se establecen en las células epiteliales de los intestinos, donde se multiplican y producen toxinas, los síntomas entéricos son locales y se debe a la infección del tracto gastrointestinal. Lo que incluye dolor abdominal, diarrea, nauseas, vómitos y fiebre, los ejemplos de estos patógenos son: *Salmonella, Shigella, E. coli (enteropatogénica, enterotoxigenica, enteroinvasora)* y *Campylobacter jejuni* (Ray & Bhunia, 2010; Jawetz et al, 2010).

1.4 Género Salmonella

El género Salmonella es una bacteria patogénica responsable de causar salmonelosis, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, es un bacilo Gramnegativo aerobio o anaerobio facultativo, generalmente móvil debido a que presenta flagelos perítricos, no fermentan lactosa, aunque la mayoría producen sulfuro de hidrogeno o gas por fermentación de hidratos de carbono, requiere una temperatura optima de 36^{o}C y un pH 7.0 respectivamente, esta bacteria reside en los intestinos de personas y animales (Fallis, 2013).

1.5 Clasificación taxonómica

El género *Salmonella* tiene una taxonomía difícil, modificada por estudios moleculares en su ADN, que han aclarado el panorama taxonómico de las Enterobacterias, además el género *Salmonella* debe su nombre a David Elmer Salmon, médico veterinario que dirigió los estudios en 1884 que llevaron al descubrimiento de este género, que contiene más de 2000 serotipos en función a sus antígenos: Antigueno Somático (O), Flagelar (H) y virulento (Vi) (esquema de Kauffman-White) (Delgado, 2015)**.**

En la tabla 2 utilizando el esquema de Kauffman-White, se muestra la clasificación taxonómica de *Salmonella,* este género se ha simplificado y reagrupado todas las cepas (patógenos y no patogenas) en 2 únicas especies *S. entérica* que se subdivide en 6 subespecies que son patogénicas y la *S. bongori* que no es patogénica para el ser humano.

Tabla 2. Clasificación Taxonómica de *Salmonella spp*

1ra Especie	**2da Especie**
Esta se encuentra dividida en 6 subespecies 1. ***Salmonella enterica*** *subespecie* ***entérica (I)*** 2. ***Salmonella entérica*** subespecie ***salamae (II)*** 3. ***Salmonella entérica*** subespecie ***arizonae (IIIa)*** 4. ***Salmonella entérica*** subespecie ***diarizonae (IIIb)***	***Salmoenlla bongori***

5. ***Salmonella entérica*** subespecie ***houtenae (IV)*** 6. ***Salmonella entérica*** subespecie ***indica (VI)***	

Fuente: (Gonzalez et al, 2014)**.**

1.6 Morfología y características fisiológicas en medios de cultivo

La característica morfológica y bioquímica de las colonias de *Salmonella spp s*e diferencian morfológicamente debido a su gran tamaño de 2.4mm y tienen una estructura rugosa y lisa (FDA, 2009; Gonzalez et al, 2014).

Utilizando la metodología del BAM (2007) y de González et al (2014), nos muestran las colonias típicas de *Salmonella* en los diferentes medios de cultivos descritos en la tabla 3.

Tabla 3. Morfología de colonias de *Salmonella spp*

Medios de Cultivo	**Selectividad**	**Aspecto de las Colonias**
Agar Bismuto	Alta	Negras o gris verdoso, pueden presentar brillo metálico, con o sin oscurecimiento del medio que los rodea
Agar XLD **(Xilosa Lisina Desoxicolato)**	Alta	Rojas con centro negro
Agar Hektoen	Alta	Verdes – Azuladas con centro negro
Agar SS (Salmonella Shigella)	Alta	Incoloro, colonias generalmente negras

Fuente: (FDA, 2009; Gonzalez et al, 2014)**.**

1.7 Condiciones de supervivencia

Cuando las colonias de *Salmonella* pasan de los animales hospedadores a los alimentos, son capaces de multiplicarse a un ritmo muy acelerado entre 15-20 minutos, la temperatura es una de la piezas claves para el crecimiento de esta bacteria, en la tabla 4 se muestra las condiciones de crecimiento de *Salmonella* (Elika, 2013).

En la tabla 4, describe las condiciones de supervivencia máximas y mínimas que se debe tener en cuenta para poder aislar cepas de *Salmonella.*

Tabla 4. Condiciones de Supervivencia

Condiciones	**Mínimo**	**Óptimo**	**Máximo**
Temperatura	5.2	35-43	46.2
pH	3.8	7-7.5	9.5
Actividad de Agua	0.93	0.99	>0.99

(Elika, 2013).

1.8 Reservorios

La bacteria de *Salmonella spp.* tienen como reservorios principalmente el tracto gastrointestinal de animales sanos, como aves de corral, ganado vacuno y animales domésticos, sin provocar problemas a la salud humana, además en esta bacteria puede sobrevivir en el medio ambiente durante mucho tiempo, debido a su gran resistencia a la baja actividad del agua (Elika, 2013).

1.9 Patogenia

La *Salmonella spp,* presenta diferencias en cuanto a la especificidad del hospedero, mientras que diversas variedades son capaces de producir enfermedades con diferentes características y sintomatología, la serovariedad más común en el hombre es la *S. typhi* (Minor, 2011).

La salmonelosis logra observarse bajo cinco diferentes síndromes clínicos, que se presentan de forma exclusiva o superpuesta, los que son estrictamente de humanos y de portadores asintomáticos, como se puede observar en la tabla 5.

Tabla 5. Clasificación de Serotipos de *Salmonella spp*

Serotipos estrictamente de Humanos	Serotipos ubicuos
• Causan síndromes tifoideos, con cuadros de septicemia.	• Aquellos serotipos que provocan diarrea, vómito y friebre.

(Minor, 2011).

1.10 Epidemiologia

Los brotes de salmonelosis más comunes y de mayor peligrosidad son la fiebre tifoidea y gastroenteritis aguda (Fica et al., 2012).

1.10.1. Salmonelosis.

La salmonelosis es un conjunto de infecciones alimentarias más frecuentes en todo el mundo, asociada a ETA, es la mayor responsable de muertes (Betancor & Yim, 2012). El número de brotes ha aumentado a un total de 37 brotes de salmonelosis, los cuales se los ha relacionado con el consumo de alimentos de origen vegetal que incluye productos frescos (Biohaz. 2013).

1.10.2. Fiebre tifoidea.

La fiebre tifoidea es una enfermedad febril aguda de origen entérico producida por la *Salmonella typhi*, en ocasiones muy raras producidad por *Salmonella paratyphi A, Salmonella paratyphi B y Salmonella paratyphi C*, pueden provocar un cuadro clínico similar aunque de menor gravedad, estas salmonellas solo afectan a los humanos, las complicaciones suelen ser la perforación y hemorragia intestinal (Jurado et al, 2010).

1.10.3. Gastroenteritis aguda.

La gastroenteritis aguda (GEA), infección que afecta al tracto gastrointestinal caracterizada por la presencia de diarrea, acompañada o no de fiebre, náuseas, vómito, dolor abdominal. La duración de la diarrea dura aproximadamente 7 días, la GEA es más frecuente en niños menores de 5 años, es una enfermedad muy frecuente en pacientes hospitalizados (Benéitez Maestre & de Miguel Durán, 2015)**.**

1.11 Identificación y serotipificación

Se entiende por identificación microbiana al conjunto de técnicas y procedimientos para establecer la identidad de un microorganismo, en el área clínica donde es importante conocer el agente responsable de una infección o intoxicación que presenten las personas; la identificación bioquímica de *Salmonella* es relativamente estándar, sin embargo se han encontrado algunas variaciones en los diferentes medios de cultivo y pruebas bioquímicas, lo cual se han llevado a tomar técnicas moleculares como diagnóstico más rápido y simple (Fernández et al, 2010; Vizcarrondo & Gutiérrez, 2008). Para detectar este microorganismo se realiza un pre-enriquecimiento no selectivo de la muestra, seguido de enriquecimiento selectivo, para luego realizar la siembra en medios de cultivo selectivos y posteriormente la caracterización de las cepas mediante pruebas bioquímicas (TSI, LIA, SIM, UREA, Citrato) (Gonzalez et al, 2014).

Para la conformación de *Salmonella* se realizó mediante el kit Microgen TM GN- ID identificación, este sistema comprende dos tiras de micropocillos por separado (GN- A y GN-B), cada uno utiliza de 12 a 24 substratos bioquímicos estandarizados para la identificación de la familia Enterobacteriaceae (Pazmiño, 2012).

La serotipificación es un complemento importante en la identificación bioquímica, ya que nos permite determinar desde el punto de vista epidemiológico la prevalencia de serovariedades de patógenos en diferentes zonas geográficas, la cual es una técnica útil para el estudio de brotes principales causantes de enfermedades y conocer las vías de contaminación (Ministerio de Salud, 2011).

Las reacciones de antígeno – anticuerpo para la serotipificación de cepas se basa fundamentalmente en la que los microorganismos presentan diferencias en su constitución antigénica, estos microorganismos presentan variedad de antígenos, productos de excreción, que con un correcto anticuerpo van a reaccionar contra distintos determinantes antigénicos de la misma molécula la cual nos ayuda a identificar el serotipo de la cepa causante de la infección (Caffer & Terragno, 2011). La serotipificación de *Salmonella* está determinada por los siguientes tres tipos de antígenos: el antígeno somático (O) ‘’estos son lipopolisacáridos componentes principales de la pared celular’’, el antígeno flagelar (H) ‘’son proteínas localizadas en los flagelos’’ y el antígeno de virulencia (Vi) ‘’es un polisacárido termolábil localizado en la capsula”. En julio de1963 se identificaron 3 especies de *Salmonella: S. typhi, S. Choleraesuis y S. enteritidis* y la mayoría de los serotipos analizados pertenecen a la última especie antes mencionada (Esquema de Kauffman- White) (Fern, 2015).

1.12 Tratamiento

El tratamiento utilizado para tratar la fiebre tifoidea han sido: cloranfenicol, ampicilina, cotrimoxazol, quinolonas y cefalosporinas de tercera generación; se han reportado cepas resistentes al cloranfenicol, ampicilina y cotrimoxazol, en caso de que existieran complicaciones con afección al SNC, se puede utilizar esteroides para evitar complicaciones. Asimismo si existe hemorragia intestinal puede usar transfusiones sanguíneas y en caso de perforación intestinal la cirugía es inexcusable (Jurado et al., 2010).

El tratamiento para salmonelosis gastroenteríticas, es un cuadro autolimitado que no precisa de tratamiento antibiótico, solo de medidas de sostén con reposición de líquidos y electrolitos, en pacientes más vulnerables con enfermedades asociadas o patologías que alteren resistencia antibioterapia, que puede realizarse con quinolonas, cotrimoxazol o amoxicilina durante 48-72 horas, no se recomienda el uso de inhibidores de la motilidad intestinal, ya que

predisponen a la aparición de bacteriemia, en caso de infecciones vasculares se recomiendo un tratamiento con betalactámicos (ampicilina o ceftriaxona) por via intravenosa durante 6 semanas (Jurado et al., 2010).

La base del tratamiento es la realimentación precoz y el uso de soluciones de rehidratación oral para la deshidratación leve-moderada, los antimicrobianos no tienen ningún papel establecido en el tratamiento inicial de la mayoría de GEA, los fármacos antidiarreicos no son eficaces en general, y algunos están contraindicados (Benéitez Maestre & de Miguel Durán, 2015).

1.13 Inocuidad de los Alimentos

La inocuidad de los alimentos hace referencia al nivel de confianza de un alimento, la cual no perjudique la salud del consumidor a corto o mediano plazo (FAO, 2012).

La pérdida de inocuidad de los alimentos puede ocurrir a los largo de la cadena alimentaria como en la fase de producción, desarrollo, cosecha, transporte y almacenamiento, los principales peligros relacionados con los alimentos son contaminación microbiana, residuos de plaguicidas, residuos de medicamentos veterinarios, contaminantes biológicos y otros factores con micotoxinas, biotoxinas marinas, material extraño entre otros (Blanco-metzler, 2010). Además las fuentes de contaminación biológica de productos hortícolas está relacionado con las malas prácticas sanitarias y uso de agua contaminada (Puig, et al., 2013).

En productos hortícolas las principales fuentes de contaminación son: presencia de animales en el área de cultivo, suelo, uso de desechos biológicos utilizados como fertilizantes sin recibir tratamiento alguno, transporte, almacenamiento y empaquetamiento (Rushing, 2012; Suslow, 2009).

Los vegetales frescos empacados son aquello que conservan sus propiedades físicas propias del alimento, sin recibir alguna modificación en la forma original del vegetal, la utilización de bolsas plásticas es proteger a los vegetales de un posible daño mecánico, contaminación química y microbiana, brindando una barrera simple a la influenza de factores externos e internos, debido que los vegetales frescos empacados representan el 33% de exportaciones y comercialización total (INEN 1750:1994; Garcerant., 2015).

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se la realizó con un total de 138 muestras, utilizando la Metodología propuesta por el BAM capítulo 5: *Salmonella spp,* de la FDA (2007), la misma que consistió en:

2.1 Recolección de vegetales frescos

Las muestras de vegetales frescos empacados se obtuvieron en los diferentes supermercados y los vegetales frescos en mercados de venta libre de la cuidad de Loja y se trasladaron asépticamente al laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad Técnica Particular de Loja.

La obtención de la muestra se la realizó, escogiendo 3 unidades de cada lote del vegetal basándonos en la metodología del BAM y puntos clave de la norma técnica ecuatoriana NTE INEN 1750: hortalizas y frutas frescas. Muestreo, la metodología se demuestra en el **anexo 1.**

En la tabla 6 se indica el plan de muestreo realizado en este estudio, describiendo número de muestras analizadas de cada vegetal.

Tabla 6. Plan de muestreo

Muestra	**No. de Muestras Analizadas**
Lechuga crespa	13
Lechuga americana	3
Lechuga criolla	2
Lechuga seda	1
Lechuga fresca	6
Espinaca	17
Espinaca francesa	3
Espinaca Americana	1
Perejil	15
Perejil liso	7
Culantro	15
Culantro orgánico	7
Albahaca	17

Albahaca orgánica	2
Brotes de soja	20
Col verde rallada	9
Total	**138**

Fuente: Autor.

2.2 Aislamiento e identificación

2.2.1 Preparación de la muestra.

Se procedió a tomar asépticamente pequeñas sub-muestras de cada uno de los tres empaques de los vegetales frescos empacados, para reunir una sola muestra (25 g), considerando sacar los vegetales 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).

2.2.2. Pre- enriquecimiento.

- Se pesó asépticamente 25g de la muestra vegetal, en un frasco con tapa rosca de 500mL que contenía 225mL de Caldo Lactosa estéril.
- Posteriormente se mezcló por agitación, durante dos minutos, luego se dejó reposar durante 60 minutos a temperatura ambiente, midiendo el pH, ajustar si es necesario (NaOH o HCL), asegurándose que se encuentre en un pH de 6,8 ± 2.
- Luego se lo incubo por 24 ± 2 horas a 35^{o}C ± 2^{o}C.

2.2.3. Enriquecimiento selectivo.

- En esta fase se utilizó caldos selectivos como Rappaport - Vassiliadis (RV) y Tetrationato (TT).
- Se sacó los frascos de la incubadora, se cerró la tapa y se los agitó suavemente.
- Con la ayuda de micropipetas de transfirió 1000µL de Caldo Lactosa a 10mL de caldo TT, asimismo se transfirió 100µL de caldo lactosa a 10mL de caldo RV, homogenizando las muestras.
- Se procedió a incubar de la siguiente manera: el caldo RV se lo incubo por 24± 2 h a 42± 0,2 ^{0}C, en baño maría, controlado termostáticamente. De igual forma se incubo el caldo TT por 24± 2 h a 35± 2 ^{0}C.

2.2.4. Siembra en medios selectivos.

- Una vez terminado el periodo de incubación se procedió a homogenizar los medios de enriquecimiento selectivo TT y RV.
- Con la utilización de un asa de 3mm estéril se tomó una alícuota aproximadamente de 10µL, del caldo TT y se inoculó con la técnica de estriado por agotamiento o cuadrantes en agar XLD, HK, BS, SS, para obtener colonias puras.
- Se repitió el paso anterior de igual manera con el tubo de caldo RV, se procedió a incubar las cajas petri a 35± 2 ^{0}C por 24 ± 2h.

2.2.5. Identificación morfológica de colonias típicas de *Salmonella.*

Pasado el tiempo de incubación, se procedió a observar e identificar las colonias que presentaron una morfología y características de las colonias típicas en la tabla 3 y en la figura 1 se pueden observar como son dichas colonias en los diferentes medios de cultivo.

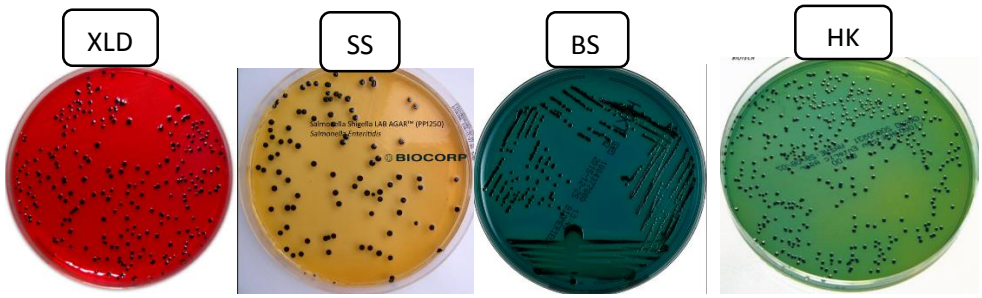


Figura 1. Colonias típicas de *Salmonella spp*

Fuente: (FDA, 2009; Gonzalez et al, 2014)**.**

2.3. Identificación

2.3.1. Pruebas bioquímicas.

Una vez purificadas cepas típicas se *Salmonella*, se procedió a realizar la identificación bioquímica que consta de TSI, LIA, UREA, SIM y CITRATO, con un periodo de incubación de 24 horas a 37ºC ±2, para identificación de microorganismos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae enfocado a la identificación de *Salmonella* (MINSA/DIGESA, 2008).

La interpretación de las pruebas bioquímicas para identificación de *Salmonella* se presenta en la tabla 7, los resultados de las pruebas bioquímicas se muestra en el **anexo 3.**

Tabla 7. *Interpretación de pruebas bioquímicas para Salmonella*

Microorganismo	TSI	GAS	H2S	LIA	UREA	SIM	INDOL	CITRATO
Salmonella spp	K/A	+	+	+	-	+	-	+
Salmonella Typhi	K/A	-	+	+	-	+	-	-
Salmonella Paratyphi	K/A	-	-	-	-	+	-	-

Fuente:(FDA, 2009).

La interpretación de las pruebas bioquímicas en la identificación de los diferentes microorganismos se muestra en el **anexo 3** y se validó mediante el kit Microgen GN-ID identificación, el fundamento y metodología de este kit se muestra en el **anexo 2.**

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la actualidad existe una elevada demanda en el consumo de vegetales frescos empacados y de venta libre, algunos vegetales pueden contaminarse con microorganismos patógenos, siendo una preocupación para la Salud Pública (Rodríguez et al, 2010), los microorganismos tienen una amplia distribución a nivel mundial, por ello es necesario que los resultados obtenidos en este estudio nos ayuden en el análisis y prevención de enfermedades al momento de consumir vegetales crudos (Gómez et al, 2013).

Salmonella constituye un gran problema de salud pública, tanto por la morbimortalidad debida a gastroenteritis y fiebres entéricas, como por las repercusiones que conlleva, en las industrias alimentarias (Rincon et al, 2010).

Este estudio estuvo enfocado en la identificación y serotipificación de *Salmonella,* lo cual se determinó ausencia de *Salmonella*, en 138 muestras de vegetales empacados y de venta libre (ver **anexo 4**), por tal motivo no se realizó la serotipificación de dichas cepas de *Salmonella,* sin embargo se procedió a identificar qué tipo de Enterobacterias estaban presentes en estos vegetales, los mismos que son indicadores de inocuidad de los alimentos, que han sido aislados en diferentes países como Chile, Perú, México, EEUU, Canadá, Brasil, Venezuela. Costa Rica.

En la tabla 8 indica el número de cepas y porcentajes totales de los microorganismos aislados e identificados a partir de vegetales frescos empacados y de venta libre.

Tabla 8. Porcentaje total de aislamiento de microorganismos

Microorganismo identificado	**No. de cepas totales**	**%**
Escherichia coli	22	15,94 %
Citrobacter freundii	27	19, 57 %
Pantoea agglomerans	6	4,35 %
Enterobacter cloacae	4	2,90 %
Enterobacter aerogenes	2	1,45 %
Citrobacter koseri	2	1,45 %
Alkalescens dispar	2	1,45 %
Proteus vulgaris	1	0,72 %
Klebsiella pneumoniae	1	0,72 %
Bacilos Gram Negativos No Fermentadores	29	21,01 %

Microorganismo no identificados	42	30, 43 %
Total	**138**	**100 %**

Fuente: autor

Existe un gran porcentaje de microorganismos no identificados, con el 33,33% (46/138), debido a que no pertenecen al grupo de bacilos gramnegativos entéricos, la metodología propuesta se basa principalmente en la identificación de la familia Enterobacteriaceae (Jawetz et al, 2010). Además se obtuvo porcentajes altos de bacilos gramnegativos no fermentadores (BGNNF), con el 21,01% (29/138), debido a que estas especies no utilizan hidratos de carbono como fuentes de energía (Lugo et al., 2014). A continuación C*itrobacter freundii,* es la bacteria de mayor incidencia, con el 19,57% (27/138), *E. coli*, con el 15,94%(22/138), *Pantoea agglomerans,* con el 4,35% (6/138), *Enterobacter cloacae*, con el 2,90% (4/138), seguido de *Citrobacter koseri*, *Enterobacter aerogenes, Alkalescens dispar,* con el 1,45% (2/138) y finalmente, *Proteus vulgaris, Klebsiella pneumoniae* con el 0,72% (1/138).

En la presente investigación no se encontró *Salmonella spp,* en 138 muestras de vegetales empacados y de venta libre, resultados similares realizados en Costa Rica por Berrantes & Ach (2011), en Venezuela por Gil & Gaesrte (2010), en Estados Unidos por Mukherjee et al (2006), en 2,029 muestras indican que no se detectó *Salmonella.* Otros estudios realizados en São Paulo-Brasil, por Sant'Ana et al (2011), en 512 muestras indican que la presencia de este patógeno es muy baja, con el 0,78%, de igual manera en estudios realizados por Reddy (2016), nos indica que varios estudios entre los años 2002 al 2012 en Estados Unidos, mostraron que la prevalencia de *Salmonella* suele ser baja en productos frescos, estos resultados concuerdan con El Programa de Datos Microbiológicos (MDP), establecido en el 2001 y administrado por el departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) (2015) con un porcentaje del 1%, y Olivera et al (2011), reporta el 1,2% de *Salmonella* en 162 muestras de vegetales, de la misma forma estudios realizados en Canadá, por Bohaychuk (2009), y México, por Cárdenas (2013), en estudios realizados por Arias & Antillón (2000), con el 2,00%, Vásquez (2002), con el 3,10% y Rincón et al (2010), encontró solo dos cepas de S*almonella* que representa el 4,08%, en 150 muestras de vegetales frescos, todos estos autores reportan que se encontraron niveles bajos de aislamiento de este patógeno. El único estudio donde se reporta un gran porcentaje de *Salmonella spp* aislada de verduras realizado por Muñoz (2013), con el 10%.

En este estudio no se detectó la presencia de *Salmonella spp,* esto significa que no es indicador definitivo de la ausencia de este patógeno, en este tipo de vegetales analizadas, puede deberse a muchos factores, tales como la competencia bacteriana por los nutrientes,

condiciones ambientales adversas y mecanismos de resistencia, pudieron incidir en no lograr su aislamiento (Gil, Morón de Salim, & Gaesrte, 2010).

Además en este estudio no se logró identificar algunas cepas de microorganismos, que comprende el 33,33% (46/138) del total de las muestras, debido a que no pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, esta investigación se basa específicamente en pruebas de identificación de bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae (Garcia & Rodríguez, 2010).

Los microorganismos aislados con mayor frecuencia fueron BGNNF, con el 21,01% (29/138), según Lugo et al (2014), aisló el 87% de estos microorganismos en agua, lo cual manifiesta que la detección de estos microorganismos, tiene poco valor cuando se trata de relacionar con el índice de la presencia de patógenos, por cuanto no hay la posibilidad de producir trastornos gastrointestinales; sin embargo, se los utiliza como indicadores de BPM, además este grupo se lo puede utilizar para evaluar la limpieza e integridad de los sistemas de distribución, algunos de ellos son parte de la microbiota habitual del hombre, encontrándose ampliamente distribuidos en las heces, suelo, agua de mar y agua dulce en esta última con gran capacidad de multiplicación, la mayoría de estos microorganismos son patógenos oportunistas asociados a infecciones nosocomiales y a infecciones en pacientes inmunocomprometidos (Lugo et al., 2014). Muchas de estas especies no utilizan los hidratos de carbono como fuentes de energía o los degradan por vías metabólicas diferentes a la de fermentación, no son capaces de acidificar medios como el TSI, crecen en condiciones aerobias, el microorganismo más frecuente de este grupo de BGNNF es *Pseudomona aeruginosa,* esta clase de bacterias son las responsables de provocar la descomposición de los alimentos (Lugo et al., 2014). León (2014), reporta el 39% de microorganismos no fermentadores aislados en muestras de vegetales, estos resultados son similares al nuestro, estos microorganismos nos sirven como indicadores de higiene.

Se aisló el 19,57% (27/138) de *Citrobacter freundii* y se detectó la presencia de *E. coli,* con el 15,94% (22/138) del total de las muestras analizadas, estos resultados indican que existe una contaminación de origen fecal

Citrobacter freundii, fue la enterobacteria que se aisló en mayor frecuencia de los vegetales analizados, los cuales podría suponerse que forman parte de la microbiota autóctona de estos alimentos, autores como Muñoz (2013), aisló el 50% de este microorganismo en muestras de tomate.

La especie de *Citrobacter* cobra importancia con lo reportado por Abu-Ghazaleh (2006), quien también aisló este género en agua de riego y suelo de cultivo, Perereira et al. (2010) señala

que *Citrobacter freundii* están relacionados con factores de virulencia de diarrea infantil en pacientes inmunodeprimidos.

Se les denomina *Citrobacter* por su capacidad para usar citrato como única fuente de carbono, el *Citrobacter freundii* produce H_2S, es por ello que se lo puede confundir con *Salmonella*, este microorganismo está asociado en infecciones intraabdominales, infecciones de tejidos blandos y osteomielitis (Garcia & Rodríguez, 2010). Estudios realizados por León (2014) identifico el 4%, Sandoval (2012) aisló el 50% de *Citrobacter freundii* en tomate. Este microorganismo provoca una sintomatología a nivel gastrointestinal como: diarrea, fiebre, convulsiones, decaimiento, ictericia, distensión abdominal en pacientes inmunodeprimidos (León, 2014).

Acevedo (2001), aisló el 45,09% de *Citrobacter freundii*, en frutas y verduras frescas, además el autor indica que este microorganismo se encuentra en elevadas cantidades en hortalizas y carnes frescas.

La presencia de *E. coli,* con el 15,94%(22/138) encontrado en este estudio, según Ávila (2008), indica que este microorganismo lo relaciona con la falta de calidad sanitaria de vegetales crudos. Estudios realizados por Rincón (2010), Gonzáles & Col (2005), muestran un porcentaje de 10% de aislamiento de *E. coli,* en 150 muestras de vegetales crudos. Sagoo & Col (2005) reportaron una baja frecuencia de este microorganismo 1,50 %, en vegetales frescos listos para el consumo, otros autores reportaron niveles superiores en comparación con nuestro estudio, tales como López (2003) y Rivera (2009), reportaron 30%, asimismo Curtis (2000), Muñoz (2013), Ginestre (2009), Monge (1996) y Makherjee (2004), encontraron porcentajes de 76,22%, 55%, 52%, 44% y 42% respectivamente.

Makherjee (2006), aisló *E. coli*, en la mayoría de muestras en diferentes vegetales, en muestras semiorgánicas aisló 8%, en frutas y hortalizas orgánicas aisló 7%. La concentración de *E. coli,* nos sirve como un indicador de contaminación fecal, lo que significa que estas muestras no están aptas para el consumo humano (García, 2013).

En este estudio también se identificó el 4,35% (6/138) de *Pantoea aglomerans,* el 2,90% (4/138) de *Enterobacter cloacae*, existen otros estudios realizados por León (2014), donde aisló el 49% de *Pantoea agglomerans.* Estudios realizados por Sandoval (2012), aisló entre el 0, 50 y 100% de *Enterobacter cloacae.*

Estos microorganismos son patógenos oportunistas, estas dos especies son los responsables de la mayor parte de infecciones intrahospitalarias, estos microorganismos causan

infecciones nosocomiales, aunque también se han descrito casos de meningitis neonatal (Segado et al, 2012).

Finalmente en nuestro estudio se identificaron especies como: *Alkalescens dispar, Enterobacter aerogenes, Citrobacter koseri*, con el 1,45% (2/138) respectivamente, finalmente se aisló *Proteus vulgaris y Klebsiella pneumoniae* con el 0,72% (1/138). Es estudios realizados por León (2014), reporta el 17% de aislamiento de *Klebsiella pneumoniae,* estos tipos de coliformes son identificados como bacterias naturales de la flora de los vegetales, estos microorganismos son patógenos oportunistas en personas inmudeprimidas, pueden causar neumonía, esputo con sangre, hemorragia pulmonar, infecciones en el tracto urinario, con una dosis letal media (DL50) igual a 10^7 para producir estas patologías (Garcia & Rodríguez, 2010).

Se reportan que especies de microbiota autóctona de vegetales crudos, pueden ser capaces de secretar enzimas degradativas y proteasas que favorecen a la disponibilidad de nutrientes y proporcionan el desarrollo a las poblaciones microbianas, la contaminación de hortalizas puede ser consecuencia de irrigación con agua contaminada de heces humanos o de animales, usos de abonos orgánicos con estiércol, omisión o desconocimiento de las normas sanitarias básicas de manipulación, así como deficiente calidad sanitaria de agua utilizada para lavar los vegetales cosechados (Rincon et al, 2010).

La norma MINSA/DIGESA (2012) menciona el criterio microbiológico que deben cumplir los vegetales crudos, para el caso de *Salmonella spp* y *E. coli* indica ausencia en 25g. Se detectó la presencia del 15,45% de *E.coli* en las muestras analizadas, según la normativa de referencia no cumplen con este criterio, lo cual son consideradas como no aptas para el consumo humano.

CONCLUSIONES

- No se detectó la presencia de *Salmonella spp* en vegetales frescos empacados y de venta libre.
- Se detectó el 15,45% de *E.coli* del total de estos vegetales, según la norma de referencia, no son aptos para el consumo humano.
- La mayoría de los microorganismos aislados son indicadores de contaminación fecal.
- *Citrobacter freundii,* BGNNF forman parte de la flora bacteriana de los vegetales como lechuga, col, culantro entre otros.

RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio a las cepas de *E. coli,* aisladas para conocer si son productoras de toxina shiga.
- Debido a un gran porcentaje de microorganismos como indicadores de contaminación fecal, es recomendable desinfectar correctamente los vegetales antes de ser consumidos.

BIBLIOGRAFÍA

Abu-Ghazaleb, B. (2006). Inhibition of *Citrobacter freundii* by lactic acid, ascorbic acid, citric acid, *Thymus vulgaris* extract and NaCl at 31ºC Annals of Microbiology. 56:261-267.

Acevedo, L., Mendoza, C., & Oyón, R. (2001). Coliformes totales, fecales y algunas enterobacterias, *Sthaphylococcus spp,* y hongos en ensaladas para perro calientes expendidas en la ciudad de Maracay, Venezuela. *Archivos Latinoamericanos de Nitrición, 51(4),* 366-370. Recuperado el 08 de Enero de 2017, de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222001000400007&lng=es&tlng=es.

Alexandre, S., Pozo, C., Gonzáles, V., Martínez, M., Prat, S.m Fernández, J., & Heitmann, I. (2000). Detección de *Salmonella* enteritidis en muestras de productos avicolas de consumo humano en la Región Metropolitana. *Revista médica de Chile*, 128(10), 1075-1038. Recuperado el 20 de Diciembre de 2016, de: http://www.scielo.cl.sci-hub.bz/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872000001000001&lng=es&tlng=es. 10.4067/S0034-98872000001000001

Arias, M. & Antillón, F. (2000) Contaminación microbiológica de los alimentos en Costa Rica: Rev Biomed. 11(2): 113-122.

Ávila, G., Sánchez, E., Muñoz, E. Martínez, L., & Villalobos, E. (2008). Diagnóstico de la calidad microbiológica de las frutas y hortalizas en Chihuahua, México.

Ávila, Y., Colina, G., & Perozo, A. (2009). Indicadores entéricos en vegetales frescos que se comercializan en mercados populares de Maracaibo. Rev Soc Ven Microbiol; 29:52-56.

Barrantes, K., & Ach, R. (2011). Calidad microbiológica y análisis de patógenos (Salmonella y Shigella) en lechugas, 31–36.

Betancor, L., & Yim, L. (2012). Salmonella y salmonelosis. *Bacteriología, Departamento Desarrollo Biotecnológico, Facultad de Medicina, UdelaR.*, 1–11.

Benéitez Maestre, A. M., & de Miguel Durán, F. M. (2015). Gastroenteritis aguda. *Pediatria Integral*, *19*(1), 51–57. http://doi.org/10.1016/S1695-4033(01)77719-3

Biohaz. (2013). Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin . Part 1 (outbreak data analysis and risk ranking of food / pathogen. *European Food Safe Authority*, *11*(1). http://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3025.

Bohaychuk, V., Bradbury, R., Dimock, M., Fehr, G., Gensler, R., King, R., Rieve, R., & Barrios, R. (2009). A microbiological survey of selected Alberta-grown fresh produce from farmers markets in Alberta, Canada. J. Food Prot. 72:415-420.

Blanco-metzler, A. (2010). Vigilancia sanitaria de los alimentos en Costa Rica, 311–338.

Caffer, M., & Terragno, R. (2001). Manual de procedimientos para la caracterización de Salmonella. *Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas*, 37.

Camacho, A., Giles, M., Ortegón, A., Palao, M., & Velázquez, O. (2009). Método para la determinación de bacterias coliformes , coliformes fecales y Escherichia coli por la técnica de diluciones en tubo múltiple (Número más Probable o NMP). *Técnicas Para El Análisis Microbiológico de Alimentos*, *2*, 1–17.

Cárdenas, C., Molina, N., Heredia, N., & García. (2013). Evaluation of microbial contamination of tomatoes and peppers at retail markets in Monterrey, Mexico. J. Food Prot. 76:1475–1479

Delgado, F. (2015). Peculiaridad de la clasificación taxonómica y nomenclatura del género Salmonella, *9*(4), 73–75.

Dennis, S., Brandt, M., Solomotis, M. D., Gieraltowski, L., Vikas Gill, C., Thomas Hammack, F. S., … Donald Zink, F. (2010). Risk Management/Advisor Team Nega Beru, FDA (Spice Risk Management Team Leader). *Fda*.

De Curtis, M., Franceschi, O., Castro, N. (2000). Determinación de la calidad microbiológica de los alimentos servidos en comedores de empresas privadas; 50(2): 117-182.

Doulgeraki., Paramithiotis., & Nychas. (2011). International Journal of Food Microbiology Characterization of the Enterobacteriaceae community that developed during storage of minced beef under aerobic or modi fi ed atmosphere packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology*, *145*(1), 77–83. http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.030

Douglas, R. (2014). Pruebas Bioquímicas para Enterobacterias. [Blog] *Microbiología.* Available at: http://apuntesytrabajosdemicrobiologia.blogspot.com/2014/08/pruebas-bioquímicas -para-enterobacterias.html Accessed 23 Dec.2016.

Elika. (2013). Salmonella. *Fundación Vasca Para La Seguridad Agroalimentaria*, 1–6.

Fallis, A. . (2013). Identificación de los Sitios de Contaminación en la Cadena de Producción de Tomate y Chile Jalapeño Mediante la Determinación de Microorganismos Indicadores

de Contaminación Fecal y Enteropatógenos. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *53*(9), 1689–1699. http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004

FAO. (2012). *Manual de Buenas Prácticas Agrícolas para el Productor Hortofrutícola.* Retrieved from: http://www.fao.org/3/a-as171s.pdf

Fern, D. (2015). Peculiaridad de la clasificación taxonómica y nomenclatura del género Salmonella, *9*(4), 73–75.

Fernández O, A. Garcia F, C. Saéz N, J. Valdezate R, S. (2010). *Metodos de Identificación Bacteriana en el Laboratorio de Microbiología*. (Cercenadi E. & Cantón R., Ed.). España: Rev. Seimc. Retrieved from file:///C:/Users/InnoVacliente/Desktop/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf

Fica, A., Acosta, G., Dabanch, J., Perret, C., Torres, M., López, J., … Emergentes, D. I. (2012). Brotes de salmonelosis y el tamaño y rol del Estado en Chile, *29*(2), 207–214.

Fuentes, L., González, V., Umpiérrez, N. (2014). Indicadores microbiológicos en alimentos, (598), 5–7. Retrieved from http://www.montevideo.gub.uy/sites/default/files/indicadores_microbiologicos_en_alimentos_0.pdf

FDA. (2009). Bacteriological Analytical Manual (BAM): Salmonella. Retrieved Junuary 05, 2017., (December 2007). Retrieved from http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodScienceResearch/UCM309839.pdf

García, R. (2013). IDENTIFICACIÓN DE LOS SITIOS DE CONTAMINACIÓN EN LA CADENA DE PRODUCCIÓN DE TOMATE Y CHILE JALAPEÑO MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS INDICADORES DE CONTAMINACIÓN FECAL Y ENTEROPATÓGENOS.

Garcia & Rodríguez. (2010). Enterobacterias, *10*(51). Retrieved from http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias_Medicine2010.pdf

Garcerant, I. (2015). Función del envase. En la conservación de los alimentos. Primera edición. Editorial ECOE. Bogotá-Colombia.

Gil, A., Morón de Salim, A., & Gaesrte, Y. (2010). Calidad microbiológica en frutas de conchas comestibles expendidas en mercados populares de los municipios Valencia y San Diego, estado Carabobo, Venezuela. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, *30*,

24–28.

Ginestre, M., Romero, S., Rincón, G., Castellano, M., Ávila, Y., López, G., Perozo, A. (2009). Indicadores entericos en vegetales frescos que se comercializan en mercados populares de Maracaibo. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología,* 52-56. Retrieved from http://www.scielo.org.ve/pdf/rsvm/v29n1/art11.pdf

Gómez, C., Rangel, E., Castro, R. (2013). Frequency and correlation of some enteric indicador bacteria and *Salmonella* in ready-to-eat raw vegetable salads from Mexican restaurants. *Journal of Food Science,* 78(8), 1201-1207.

Gonzáles, A., Muñoz, E., & Roldan, C. (2005). Clidad microbiológica de los vegetales que se consumen frescos en la ciudad de Maracaibo, Venezuela.

Gonzalez, J., Pereira, N., Soto, Z., Hern'amdez, E., Villarreal, C., & Sanandres, N. P. (2014). Aislamiento microbiológico de Salmonella spp . y herramientas moleculares para su detección Microbiological Isolation of Salmonella spp . And Molecular tools for detection. *Revista Salud Uninorte*, *30*(1), 73–94.

Guerrero, J. (2016). Enfermedades Transmitidas por alimentos. PROTOCOLO DE VIGILANCIA EN SALUD PUBLICA. *Instituto Nacional De Salud*, 3–4.

Jurado Jiménez, R., Arenas Muñoz, C., Doblas Delgado, A., Rivero, A., & Torre-Cisneros, J. (2010). Fiebre tifoidea y otras infecciones por salmonellas. *Medicine*, *10*(52), 3497–3501. http://doi.org/10.1016/S0304-5412(10)70069-X

Jawetz., Melnick., & Adelberg. (2010). Microbiología Médica. 25ª Edición, Editorial Mc Graw Hill, México, Bogota, Buenos Aires.

Kooper, G., Calderón, G., Scheider, S., Domínguez, W., Gutiérrez , G. (2009). Enfermedades trasmitidas por alimentos y su impacto socieconómico. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Retrieved from http://www.fao.org/3/a-i0480s.pdf

León, L. H. M. (2014). Determinación del potencial promotor del crecimiento vegetal de las enterobacterias aisladas de la rizósfera del cultivo de maíz (Zea mays L.). *Scientia Agropecuaria*, *5*, 177–185. http://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2014.04.02

López, L., Romero, J., & Duarte, F. (2003). Calidad microbiológica y efecto del lavado y desinfección en vegetales pretrozados expendidos en Chile: 53(4): 383-388

Lugo, R., Gil, M., Rojas, T., Márquez, E., Machado, M., Vásquez, Y., & Fernández, Y. (2014). Bacilos gramnegativos no fermentadores en agua embotellada: susceptibilidad antimicrobiana y formación de biopelículas. *Sociedad Velezolana de Microbiologia*, *1*(34), 64–69.

Ministerio de Salud. (2011). Análisis microbiológico de los alimentos. *Red Nacional de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos*, 1–175.

Minor, L. (2011). Introducción. Características microbiológicas. El género.

MINSA/DIGESA. (2008). NORMA SANITARIA QUE ESTABLECE LOS CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE CALIDAD SANITARIA E INOCUIDAD PARA LOS ALIMENTOS Y BEBIDAS DE CONSUMO HUMANO, 1–23.

Mukherjee, A., Speh, D., Jonnes, A., Buesing, K., Diez, I. (2006). Longitudinal microbological survey of fresh produce grow by farmers in the upper Midwes. J Food Prto. 69: 1928-32.

NTE INEN 1750. (1994). Hotalizas y frutas frescas. Muestreo. Norma Técnica Ecuatoriana Obligatoria, ECUADOR.

Olivera, M., Souza, V., Bergamini, A., Martinis, E. (2011). Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. *Food Control,* 22(8), 1400-1403.

Painter, J., Hoekstra, R., Ayers, T., Tauxe, R., Braden, C., Angulo, F., & G., & M. (2013). Attribution of Foodborne Illnesses, Hospitalizations, and Deaths to Food Commodities by using Outbreak Data, United States, 1998–2008 - Volume 19, Number 3—March 2013 - Emerging Infectious Disease journal - CDC. *Cdc*, *19*(3), 407–415. http://doi.org/10.3201/eid1903.111866

Pascual, M. (2005). Enfermedades de origen alimentario: su prevencion. Ed Diaz de Santos.

Pauta, R. (2014). Detección y aislamiento de cepas presuntivas de E. coli productor de toxina shiga en ensaladas de lechuga listas para el consumo. Retrieved from http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/15882/1/PAUTA MAZA RICHARD XAVIER.pdf

Pazmiño, M. (2012). Microgen TM GN-ID Identificación. Retrieved from http://www.medica-tec.com/chi/files/MICROGEN-GN-ID-MID64-641-65..pdf

Pereira, A., Silva, T., Gomes, A., Araujo, A., & Giugliano, L. (2010). Diarrhea-associated biofilm formed by enteroaggregative *Escherichia coli* and aggregative *Citrobacter freundii:* a consurtium mediated by putative F pili. The Journal of Microbiology 10:3-18.

Puig, Y., Leiva, V., Rodríguez, A., Suárez, J., Molejón, P., Pérez, Y., Muñoz, O. (2013). Microbiological quality of vegetales and factors associated with contamination in growing areas in havana. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos, 2-3.

Quilliam, R., Prysor, A., Jones, D. (2012). Lettuce Cultivar Mediates Botg Phyllosphere and Rhizosphere Activity of *Escherichia coli*. Appled and Environmental Microbiology, 1-7.

Ray, B., & Bhunia, A. (2010). Fundamentos microbiológicos de los alimentos. *Editorial Mc Graw Hill, México, 18.*

Reddy, S. P., Wang, H., Adams, J. K., & Feng, P. C. H. (2016). Prevalence and Characteristics of Salmonella Serotypes Isolated from Fresh Produce Marketed in the United States. *Journal of Food Protection*, *79*(1), 6–16. http://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-274

Rincon V, G., Ginestre P, M., Romero A, S., Castellano G, M., & Avila R, Y. (2010). Microbiological Quality and Enteropathogenic Bacteria in Leaf Vegetables. *Kasmera*, *38*(2), 97–105.

Rivera, J., Rodríguez, C., & López, J. (2009). Contaminación fecal en hortalias que se expenden en mercados de la ciudad de Cajamarca, Perú. Rev. Perú med; 26(1): 45-48.

Rodríguez, E., Rodríguez , C., Del Mar, G., Arias, M. (2010). Evaluación microbiológiva de alimentos listos para el consumo procesados por pequeñas industrias castarricenses. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 60(2),* 179-183.

Rushing, J. (2012). Mejorando la Seguridad y Calidad de Frutas y Hortalizas Frescas: Un Manual de Capacitación para Capacitadores, 320. Retrieved from http://jifsan.umd.edu/docs/gaps/es/Manual Completo. pdf

Sant'Ana, A., Landgraf, M., Destro, M., Franco, B.(2011). Prevalence and counts of *Salmonella spp*. in miniimally processed vegetables in São Paulo, Brazil. *Food Microbiology,* 28(6), 1235-1237.

Sagoo, S., Little, C., & Mitchell, R. (2001). The microbiological examination of ready-ti eat organic vegetables from retail establishments.

Sandoval, G., Álvarez, M., Paredes, M., & Lascano, A. (2012). Diversidad de enterobacterias asociadas a frutos de tomate (Lycopersi- cum sculentum Mill) y suelos de invernadero. *Scientia Agropecuaria*, *2*, 123–131.

Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., … Griffin, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens.

Emerging Infectious Diseases, *17*(1), 7–15. http://doi.org/10.3201/eid1701.P11101

Segado-Arenas, A., Alonso-Ojembarrena, A., Lubián-López, S. P., & García-Tapia, A. M. (2012). Pantoea agglomerans: ¿un nuevo patógeno en la unidad de cuidados intensivos neonatales?: a new pathogen at the neonatal intensive care unit? *Archivos Argentinos de Pediatría*, *110*(4), e77–e79. Retrieved from http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-00752012000400017&lang=pt

Suslow, V. (2009). Detección de Salmonella spp. En Melón Cantaloupe en Unidades de Producción y Unidad de Empaque, *35*, 135–145.

Stanbride, L., DAvies, A. (1998). The Microbiology of mest and poultry. Blackir Academic and profesional. London.Pp 174-219.

U.S. Departament of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. (2015). MIcrobiology/Baseline Data. Available at: http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/data-collection-and-reports/microbiology/baseline.Accessed Junuary 03,2017.

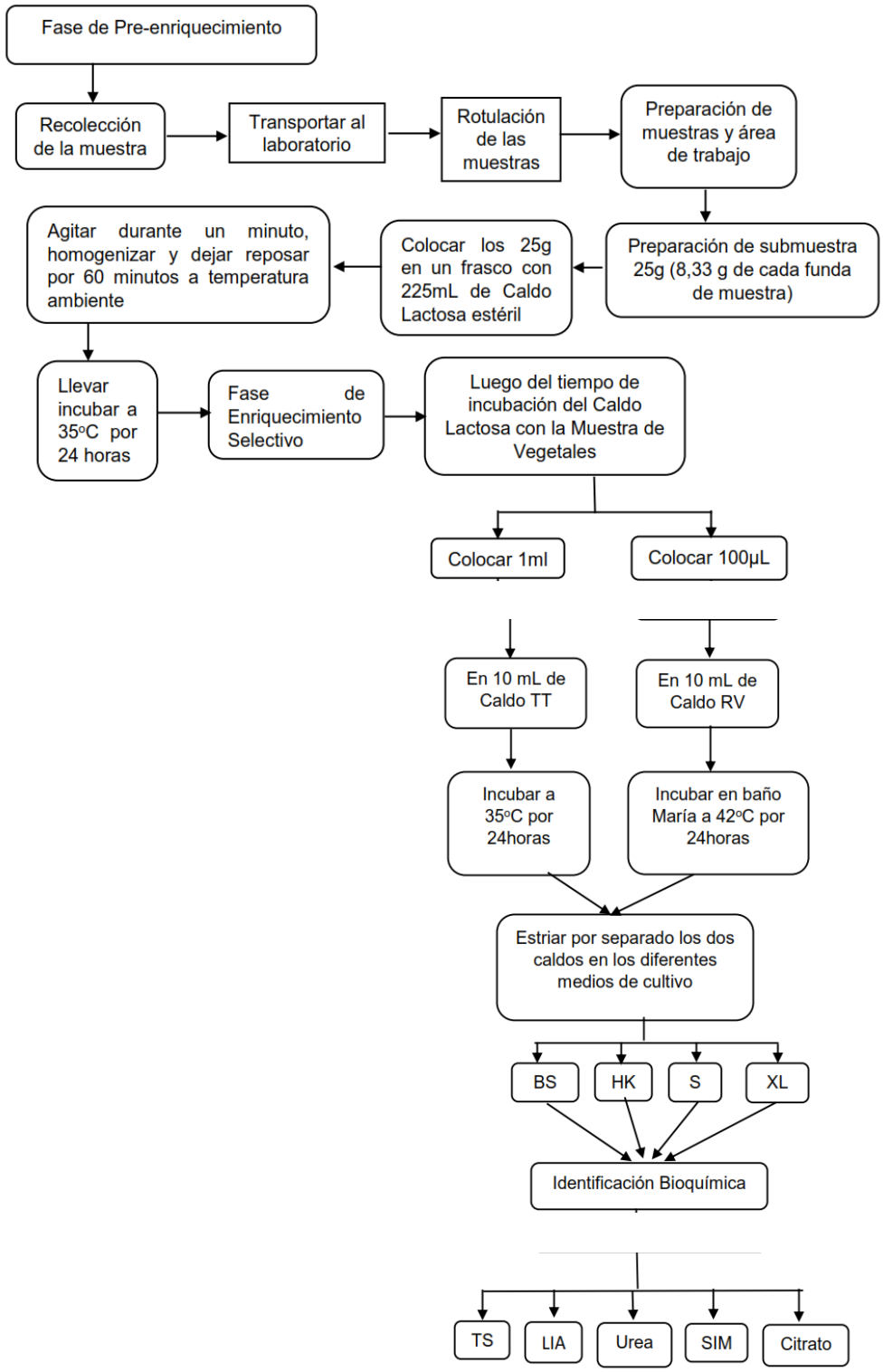
Vasilopoulos, C. *et al.* (2010). Technology-induced selection towards the spoilage microbiota of artisan-type cooked ham packed under modified atmosphere. Food microbiology 27,77-84

Vázquez, S., O'Neill, S. & L. M. (2013). Importancia de los Coliformes en lo Alimentos. Retrieved from http://www.montevideo.gub.uy/sites/default/files/importancia_de_los_coliformes_en_los_alimentos.pdf

Vizcarrondo, M. Gutiérrez, S. O. (2008). identificación microbiana, *1*, 1–13. Retrieved from http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_12_identificación.pdf

ANEXOS

Anexo 1: Flujograma de metodología



Fuente: Autor

Anexo 2: Metodología del Microgen GN-ID Identificación

PROCEDIMIENTO - INOCULACIÓN E INCUBACIONES

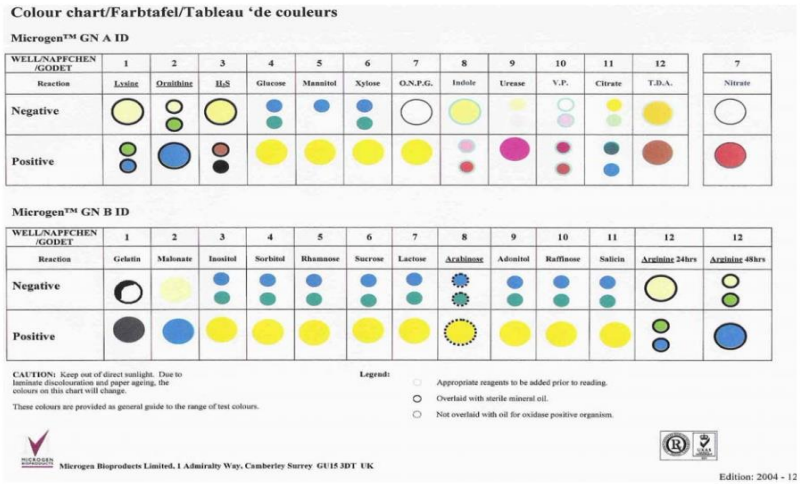
1. Hacer un test oxidasa del organismo aislado. Los organismos oxidasa positivos solo se pueden identificar inoculando tanto las tiras del GN A como GN B.
2. Emulsificar una única colonia obtenida de un cultivo de 18-24 horas en 3 mL de solución salina estéril 0.85% para la tira GN A. Si se van a inocular ambas tiras, GN A y GN B, la colonia se debe emulsificar en 3-5mL de solución salina estéril 0.85%. Mezclar bien.
3. Quitar la lamina adhesiva que sella los pocillos cuidadosamente. **NO tirar la tira adhesiva, que a posteriori se volverá a necesitar.**
4. Usando una pipeta pasteur estéril, añadir 3-4 gotas (aproximadamente 100µL) de la suspensión bacteriana a cada pocillo de la tira(s).
5. Para comprobar la pureza del inóculo, transferir 1 gota de la suspensión bacteriana a una placa de medio no-selectivo. Incubar la placa aeróbicamente a 35-37°C durante 18-24 horas.
6. Después de la inoculación, revestir los pocillos 1,2 y 3 (numerar la tira GN A empezando por el final de la etiqueta) y pocillos 20 y 24 (tira GN B – el pocillo 13 es al final de la etiqueta) con 3-4 gotas de aceite mineral. **(NO añadir aceite en el pocillo 20 si el organismo aislado es oxidasa positivo).** Estos pocillos están marcados con un círculo Negro alrededor para facilitar su identificación.
7. Sellar la parte superior de la tira(s) con la cinta adhesiva que se había retirado antes e incubar a 35-37°C. **Asegurarse que los "agujeros" de la cinta adhesiva están sobre los pocillos 7, 11 y 12 en la tira GN A strip y sobre el pocillo 14 en la tira GN B.**
8. Las tiras GN A t GN B se leerán después de 18-24 horas de incubación para las *Enterobacteriaceae*, y tras 48 horas para los aislados oxidasa positivos.

PROCEDIMIENTO – LECTURA Y ADICIÓN DE REACTIVOS

Tira GN A

1. Quitar la cinta adhesiva y anotar todas las reacciones positivas con la ayuda de la carta de color (incluida). Anotar los resultados en la hoja de resultados proporcionada.
2. Añadir los reactivos apropiados a los siguientes micropocillos:
   a) Añadir 2 gotas de reactivo Kovac's al pocillo 8. Leer y anotar los resultados después de 60 segundos. Formación de color rojo indica un resultado positivo.
   b) Añadir 1 gota del reactivo VP I y 1 gota del reactivo VP II al pocillo 10 y leer y anotar los resultados tras 15-30 minutos. La formación de un color rosa / rojo indica un resultado positivo.
   c) Añadir 1 gota del reactivo TDA al pocillo 12 y leer después de 60 segundos. La formación de un color rojo cereza indica un resultado positivo.
3. Hacer el test de reducción de nitrato al pocillo 7 después de leer y anotar el resultado del test ONPG. Añadir 1 gota del reactivo Nitrato A y una gota del reactivo Nitrato B al pocillo y leer después de 60 segundos. El desarrollo de color rojo indica que el nitrato ha sido reducido a nitrito. Si el pocillo 7 se mantiene amarillo o incoloro después de la adición de los reactivos nitrato, añadir una pequeña cantidad de polvo de zinc. Esto indicará si el nitrato ha sido completamente reducido a nitrógeno gas.
   Ej. Después de la adición del Nitrato A + B:
   Rojo = Positivo
   Incoloro / amarillo = Negativo

   Después de la adición de polvo de zinc:
   Incoloro / amarillo = Positivo
   Rojo = Negativo
4. Anotar estos resultados adicionales en la hoja de resultados proporcionada.



Fuente: (Pazmiño, 2012)

Anexo 3: Interpretación e identificación de microorganismos en pruebas bioquímicas

TSI	Gas	H_2S	LIA	UREA	SIM	Indol	Citrato	MO
A/A	+	-	+	-	+	+	-	*E. coli*
K/A A/A	+	+	-	-	+	-	+	*Citrobacter freundii*
K/A	+/-	-	-	+/-	+	+/-	+/-	*Pantoea agglomerans*
K/A	+	-	-	-	+	+	+	*Citrobacter koseri*
A/A	++	-	+	-	+	-	+	*Enterobacter aerogenes*
A/A	++	-	-	+/-	+	-	+	*Enterobacter cloacae*
A/A	++	-	+	+	-	-	+	*Klebsiella pneumoniae*
K/A	+/-	+	-	++	+	+	+/-	*Proteus vulgaris*
K/A	-	-	+/-	-	-	+	-	*Alkalescens dispar*
K/K	-	-	+	-	-	-	-	MO no Fermentador
K/A	+	-	-	-	-	-	-	MO No Identificado

Fuente: Autor

Anexo 4: Porcentajes individuales de los microorganismos aislados a partir de vegetales frescos empacados y de venta libre.

Vegetales	**No. de Muestras Analizadas**	**Enterobacterias**		
		No. de cepas	**Microorganismo aislado**	**%**
Lechuga crespa	13	3	***Escherichia coli***	2,17 %
		4	***Citrobacter freundii***	2,90 %
		1	***Pantoea agglomerans***	0,72 %
		1	***Alkalescens dispar***	0,72 %
		4	**M/O no identificado**	2,90 %
Lechuga Americana	3	1	***Enterobacter cloacae***	0,72 %
		1	***Pantoea agglomerans***	0,72 %
		1	**M/O no identificado**	0,72 %
Lechuga criolla	2	1	**M/O no fermentador**	0,72 %
		1	**M/O no identificado**	0,72%
Lechuga seda	1	1	***Citrobacter freundii***	0,72 %

Lechuga fresca	6	4	***Citrobacter freundii***	2,90 %
		2	**M/O no identificado**	1,45 %
Espinaca	17	4	***Escherichia coli***	2,90 %
		5	***Citrobacter freundii***	3,62 %
		1	***Enterobacter aerogenes***	0,72 %
		1	***Klebsiella pneumoniae***	0,72 %
		1	***Pantoea agglomerans***	0,72 %
		4	**M/O no identificado**	2,90 %
		1	**M/O no fermentador**	0,72 %
Espinaca francesa	3	1	***Pantoea agglomerans***	0,72 %
		1	**M/O no identificado**	0,72 %
		1	**M/O no fermentador**	0,72 %
Espinaca Americana	1	1	***Proteus vulgaris***	0,72 %
Perejil	15	5	***Escherichia coli***	3,62 %
		3	***Citrobacter freundii***	2,17 %
		1	***Pantoea agglomerans***	0,72 %
		4	**M/O no identificado**	2,90 %
		2	**M/O no fermentador**	1,45 %
Perejil liso	7	1	***Escherichia coli***	0,72%
		1	***Alkalescens dispar***	0,72 %
		1	**M/O no identificado**	0,72 %
		4	**M/O no fermentador**	2,90 %
Culantro	16	4	***Escherichia coli***	2,90 %
		2	***Citrobacter freundii***	1,45 %
		7	**M/O no identificado**	5,07 %
		3	**M/O no fermentador**	2,17 %
	6	1	***Escherichia coli***	0,72 %
		1	***Citrobacter freundii***	0,72 %

Culantro orgánico		2	**M/O no identificado**	1,45 %
		2	**M/O no fermentador**	1,45 %
Albahaca	17	1	***Escherichia coli***	0,72 %
		2	***Citrobacter freundii***	1,45 %
		2	***Citrobacter koseri***	1,45 %
		6	**M/O no identificado**	4,35 %
		6	**M/O no fermentador**	4,35 %
Albahaca orgánica	2	1	***Escherichia coli***	0,72 %
		1	**M/O no identificado**	0,72 %
Brotes de soja	20	7	***Citrobacter freundii***	5,07 %
		1	***Pantoea agglomerans***	0,72 %
		1	***Enterobacter cloacae***	0,72 %
		8	**M/O no identificado**	5,80 %
		3	**M/O no fermentador**	2,17 %
Col verde rallada	9	2	***Escherichia coli***	1,45 %
		1	***Enterobacter aerogenes***	0,72 %
		1	***Enterobacter cloacae***	0,72 %
		5	**M/O no identificado**	3,62 %
Total	**138**	**138**		**100 %**

Fuente: Autor