



# **UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**

La Universidad Católica de Loja

## **AREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA**

**TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO**

**Susceptibilidad antimicrobiana y evaluación de mecanismos de resistencia de cepas de *E. coli* aisladas de vegetales frescos listos para el consumo y empacados.**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**AUTORA:** Saritama Ramírez, Gabriela Alejandra.

**DIRECTORA:** Toledo Barrigas, Zorayda Patricia, 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

Zorayda Patricia Toledo Barrigas,

**DOCENTE DE LA TITULACIÓN**

De mi consideración:

Que el presente trabajo, denominado: **"Susceptibilidad antimicrobiana y evaluación de mecanismos de resistencia de cepas de *E. coli* aisladas de vegetales frescos listos para el consumo y empacados"** realizado por Saritama Ramírez Gabriela Alejandra ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, mayo de 2017

f).....

Mgtr. Zorayda Toledo B.

**Directora**

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Saritama Ramírez Gabriela Alejandra declaro ser la autora del presente trabajo de titulación: **Susceptibilidad antimicrobiana y evaluación de mecanismos de resistencia de cepas de *E. coli* aisladas de vegetales frescos listos para el consumo y empacados**, de la Titulación Bioquímica y Farmacia, siendo Zorayda Patricia Toledo Barrigas directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

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

f).....

Saritama Ramírez Gabriela Alejandra

C.I. 1104117138

## DEDICATORIA

A Dios, que me ha dado la fortaleza para continuar y poder llegar a esta etapa importante de mi vida a pesar de todos los obstáculos que se presentaron.

De igual forma, dedico este trabajo a mis padres: Germán y Cristina por su apoyo incondicional y sacrificio firme durante todo mi periodo de formación pre-profesional. A mi tía Rebeca quién con su ejemplo de vida y apoyo es fuente de inspiración para poder superarme cada día.

*Gabriela Alejandra.*

## AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradezco a Dios ya que sin él no habría sido posible llegar hasta este momento, además agradezco profundamente a mis padres y tía por su invaluable apoyo, a mis hermanos, a mi esposo e hijo, a ellos que son mis ganas de salir adelante.

Expreso también mi gratitud a mi tutora la Mgtr. Zorayda Toledo por darme la oportunidad de desarrollar este proyecto, por sus conocimientos compartidos que han sido de invaluable apoyo para la culminación de este trabajo.

A la Mgtr. Diana Hualpa por su inestimable asesoría en el desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros de investigación y a todos quienes colaboraron durante todo el periodo del proyecto.

*Gabriela Alejandra Saritama Ramírez.*

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
MARCO TEÓRICO	
1.1. Enfermedades transmitidas por alimentos.....	5
1.1.1. Intoxicaciones alimentarias	
1.1.2. Infecciones alimentarias	
1.1.3. Toxiinfecciones	
1.2. Agentes causantes.....	6
1.2.1. Agentes biológicos	
1.2.2. Agentes químicos	
1.2.3. Agentes físicos	
1.3. <i>Escherichia coli</i> .....	6
1.3.1. Patotipos	
1.3.1.1. ETEC	
1.3.1.2. EIEC	
1.3.1.3. EAEC	
1.3.1.4. EPEC	
1.3.1.5. ADEC	
1.3.1.6. EHEC.....	9
1.3.1.6.1. Patogenia	
1.3.1.6.2. Epidemiología	

1.3.1.6.3. Diagnóstico	
1.3.1.6.4. Tratamiento	
1.4. Antibióticos.....	11
1.4.1. Origen	
1.4.2. Por la interacción germen-antibiótico	
1.4.3. Por su espectro de acción	
1.4.4. Por su mecanismo de acción	
1.4.5. Antibióticos beta-lactámicos.	
1.4.6. Polimixinas.	
1.5. Resistencia bacteriana.....	13
1.5.1. Tipos	
1.5.2. Determinantes de resistencia	
1.5.3. Mecanismos de resistencia	
1.6. Alimentos listos para el consumo.....	18
1.7. Empacados.....	19

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

2.1. Recolección y preparación de la muestra.....	21
2.2. Aislamiento.....	22
2.3. Identificación	
2.3.1 Identificación bioquímica.....	22
2.4. Determinación de susceptibilidad.....	23
2.4.1. Determinación de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido.....	24
2.4.2. Determinación de polimixinas.....	24

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....25**

## **CONCLUSIONES.....31**

## **RECOMENDACIONES.....32**

## **BIBLIOGRAFÍA.....33**

## **ANEXOS.....37**



## ABREVIATURAS

ETA: Enfermedades transmitidas por alimentos

FDA: Food and drug administration

TGI: Tracto gastro intestinal

LPS: Lipopolisacaridos

ETEC: *E. coli* enterotoxigenica

EHEC: *E. coli* enterohemorrágica

EIEC: *E. coli* enteroinvasiva

EPEC: *E. coli* enteropatogena

EAEC: *E. coli* enteroagregativa

DAEC: *E. coli* de adherencia difusa

CFA: Colonization factor antigens

LT: Toxina termolábil

ST: Toxina termoestable

UFC: Unidades formadoras de colonias

OMS: Organización mundial de la salud

SHU: Síndrome hemolítico urémico

SMAC: MacConkey con Sorbitol

ALC: Alimentos listos para el consumo

CDC: Centro para el control y prevención de enfermedades

RAM: Resistencia antimicrobiana

CIM: Concentración inhibitoria mínima

MBC: Concentración bactericida mínima

PBP: Proteínas transportadoras

BLEE:  $\beta$ -lactámicas de espectro extendido

KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases

CLSI: Clinical and Laboratory Standart Institute

RV: Rappaport-Vassiliadis

TT: Tetracionat

## RESUMEN

El presente estudio se realiza como complemento del proyecto “Calidad Microbiana de Verduras Listas para el Consumo”. Tiene como objetivo conocer si las cepas de *E. coli*, que fueron aisladas a partir de vegetales frescos listos para el consumo y empacados presentan o no resistencia a antibióticos y sus posibles mecanismos de resistencia.

En total se analizaron 276 muestras, las mismas que fueron preenriquecidas en caldo lactosa y posterior aislamiento de cepas presuntivas en agar MacConkey; los cultivos fueron purificados hasta la obtención de colonias típicas de *E. coli* y confirmadas mediante el sistema de indentificación Microgen GN-ID. Finalmente se evaluó la susceptibilidad bacteriana mediante la técnica de difusión en disco frente a 15 antibióticos y la evaluación de los mecanismos de resistencia hacia  $\beta$ -lactámicos y polimixinas.

Los resultados muestran tres aspectos importantes a resaltar: la presencia de *Escherichia coli* con un 9%, un elevado porcentaje de resistencia hacia colistin, estreptomicina y cefalotin; y, la sensibilidad de un 100% para ceftazidime, cefepime e imipenem. Por lo que con estos resultados no se encontraron presentes cepas productoras de BLEE.

**PALABRAS CLAVE:** Resistencia antibiótica, pre enriquecimiento, crecimiento bacteriano

## ABSTRACT

The present study was performed as a complement to the project. "The Microbial Quality of Vegetables Ready-to-Eat". The purpose is to know if *E. coli* strains that were isolated from fresh food ready for consumption and packaged or not resistance to antibiotics and its possible mechanisms of resistance.

In total, 276 samples were analyzed, which were pre-mixed in lactose broth and subsequent isolation of presumptive strains on MacConkey agar, were analyzed; The cultures were purified until obtaining colonies typical of *E. coli* and confirmed by means of the identification system Microgen GN-ID, finally the bacterial susceptibility was evaluated by means of the disc diffusion technique against 15 antibiotics and the evaluation of the mechanisms of Resistance to  $\beta$ -lactam and polymyxins.

The results show three important aspects: the presence of *Escherichia coli* with 9%, a high percentage of resistance to colistin, streptomycin and cefalotin; and, the sensitivity of 100% for ceftazidime, cefepime and imipenem. As a conclusion, no ESBL-producing strains were present with these results.

**KEYWORDS:** Antibiotic resistance, pre-enrichment, bacterial growth.

## INTRODUCCIÓN

La demanda de vegetales frescos listos para consumir ha aumentado en el mundo y paralelamente se han incrementado los problemas de salud de los consumidores debido a la proliferación de microorganismos en estos alimentos, en los cuales los procedimientos habituales de lavado no son capaces de reducir significativamente la carga microbiana (Messaria., *et al.* 2005). Hoy en día se considera a las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) como un importante problema de salud pública creciente en todo el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que en países menos desarrollados, las ETA son la principal causa de enfermedad y muerte, sus síntomas más comunes son diarreas y vómitos, pero también se pueden presentar otros como choque séptico, hepatitis, cefaleas, fiebre, visión doble, etc., además se encuentran asociadas a una carga socio-económica significativa; mientras que en los países desarrollados, las ETA son responsables de altos niveles de pérdida de productividad, costos asociados al uso de los servicios de salud y a la implementación y monitoreo de políticas de inocuidad de los alimentos (Olea., *et al.* 2012).

Según la OMS (2011), su importancia como problema de salud pública se hizo patente en 1982, después de un brote registrado en los Estados Unidos de América. A lo que Jones, *et al.* (2008) indica que aproximadamente el 70% de las diarreas se originan por la ingestión de alimentos contaminados con microorganismos o toxinas por lo que se ha descrito alrededor de 250 agentes causantes de ETA, entre los que se incluyen bacterias siendo los géneros *Salmonella*, *Campylobacter* y la cepa O157:H7 de *Escherichia coli* las más representativas, también se encuentran los virus, hongos, parásitos, priones, toxinas y metales. Los cambios en los hábitos alimentarios de la sociedad, como el consumo de alimentos envasados, comidas fuera del hogar, expendio de comidas preparadas y comidas rápidas, son factores que contribuyeron al incremento de las ETA.

La detección y la investigación de los brotes de ETA constituye uno de los principales retos para el Sistema de Salud Pública, pues requiere obtener, de manera oportuna y eficaz, información médica (datos personales, síntomas, etc.) y análisis de laboratorio de los restos de alimentos o de las materias primas empleadas en su elaboración e incluso, de las manos de las personas involucradas en la manipulación del alimento. Tradicionalmente, las infecciones se diagnostican mediante el cultivo de muestras de alimentos que se suponen contaminados y la identificación de las bacterias que crecen en los medios de cultivo, con base en criterios morfológicos y fisiológicos que quizá dependan de factores ambientales o genéticos (González & Rojas.2005).

La OMS (2007) estima que, en el mundo, la incidencia anual de diarreas es de 1.500 millones de casos, y 3 millones de niños menores a 5 años de edad mueren anualmente. Alrededor de 76 millones de personas en USA se enferman anualmente de una ETA, 325.000 se hospitalizan y 5.000 mueren, implicando costos significativos dentro de los gastos en salud. Por otro lado, el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de Atlanta, Georgia, analizó la información contenida en 1.100 brotes de ETA ocurridos durante el año 2007 en USA. Estos brotes causaron más de 21.000 enfermos y 18 muertes según Olea A, *et al.* (2012). Mientras que González & Rojas (2005) nos dicen que en Ecuador en, el año 2010, se registraron 14.887 casos de enfermedades de infecciones producidas por *E. coli*, con una tasa de 127,3 por 100.000 habitantes, casi 50% más que en 2005.

Conjuntamente con este problema según Mosquito, *et al.* (2011) se ha visto incrementado a nivel mundial la resistencia antibiótica en diversas bacterias, en especial en la *Escherichia coli*, que tiene altos porcentajes de resistencia hacia la ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, cloranfenicol y ácido nalidíxico, lo que supone grandes complicaciones en el tratamiento antibiótico cuando este es requerido. Este aumento de resistencia antibiótica se debe a la adquisición de diferentes mecanismos moleculares de resistencia mediante mutaciones puntuales a nivel cromosómico o transferencia horizontal de material genético entre especies relacionadas o diferentes, facilitada por algunos elementos genéticos tales como los integrones. Los mecanismos moleculares de resistencia más comunes en *E. coli* son inactivación enzimática, alteraciones en el sitio blanco y alteraciones de la permeabilidad. Se calcula que entre el 50% y el 60% de más de dos millones de infecciones hospitalarias en USA son causados por bacterias resistentes, y son responsables de cerca de 77.000 muertes por año (Tafur., *et al.* 2008).

Según la OMS, existen principalmente dos métodos de supervisión de resistencia: *in vivo* (fracasos terapéuticos) o *in vitro* (estudios en el laboratorio, en “tubos de ensayo”). Dentro de los métodos *in vitro*, están los fenotípicos (Kirby-Bauer o concentración mínima inhibitoria) y los moleculares cuando se hacen pruebas genéticas (Mosquito, *et al.*, 2011)

Para la mayoría de episodios diarreicos asociados con las *E. coli* diarrogénicas, no es recomendado el tratamiento antibiótico debido a que el uso excesivo de antibióticos contribuye con el aumento de resistencia y, en el caso específico de la *E. coli* O157 relacionado con el desarrollo del síndrome urémico-hemolítico (SUH) (Smith, *et al.*, 2011). Esta investigación en si se plantea evaluar la presencia de resistencia antibiótica y sus mecanismos de resistencia en cepas de *E. coli* aisladas a partir de vegetales frescos listos para el consumo y empacados.

**CAPÍTULO I**  
**MARCO TEÓRICO**

## **1.1 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)**

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) son el síndrome originado por la ingestión de alimentos y/o agua, que contengan agentes etiológicos en cantidades tales que afecten la salud del consumidor a nivel individual o grupos de población. Las alergias por hipersensibilidad individual a ciertos alimentos no se consideran ETA, sin embargo, agencias internacionales como la Food and Drug Administration (FDA), consideran el evento cuando este es debido a una declaración inadecuada de los alérgenos (Guerrero, 2015). Según Díaz *et al*, (2012) las fuentes de contaminación asociadas con los alimentos son variadas, pueden provenir del mismo alimento, medio ambiente, superficies de contacto y principalmente de seres vivos infectados que actúan como reservorios para los agentes patógenos.

La ingesta de alimentos contaminados con patógenos infectivos o incluso que presenten toxinas producidas por algunos microorganismos, tales como *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, conllevan al desarrollo de enfermedades alimentarias, las cuales en la actualidad son poco comprendidas dado que el uso de herramientas de diagnóstico fiables para identificar a los agentes microbianos causantes de estas enfermedades aún son limitadas (Newell, *et al*, 2010); actualmente Lösch (2010) ha descrito más de 250 enfermedades transmitidas por alimentos, presentando una gran variedad de síntomas clínicos, siendo las alteraciones gastrointestinales las de mayor recurrencia por lo que las buenas prácticas de producción de alimentos y adecuados hábitos de consumo son de gran importancia para disminuir el riesgo de infección y de brotes de ETA .

### **1.1.1 Intoxicaciones alimentarias.**

Se produce al ingerir productos contaminados con ciertas bacterias que se han desarrollado y multiplicado a tal punto de elaborar sus propias toxinas, estas son absorbidas a través del epitelio intestinal lo que deriva en alteraciones en el huésped, en sí basta con la presencia de la sustancia toxica para que se desarrolle una enfermedad, y no de la bacteria como tal (Pascual, 2005).

### **1.1.2 Infecciones alimentarias**

Las infecciones alimentarias son enfermedades causadas por la ingestión de alimentos que contienen microorganismos vivos perjudiciales. En general, son determinadas por la invasión, multiplicación y alteraciones de los tejidos del huésped producidas por los gérmenes transportados por los alimentos (Koopers, *et al*, 2009).



### 1.1.3 Toxiinfección

Es el resultado del consumo de alimentos con cierta cantidad de microorganismos patógenos que son capaces de producir o liberar toxinas una vez que han sido ingeridos (Domínguez & Ros, 2010). Este es el tipo de enfermedad procedente del consumo de alimentos contaminados con *E. coli* O157:H7 productor de toxina Shiga, considerada como la causa principal de diarrea sanguinolenta, la cual puede derivar en un fallo renal agudo (Pauta,2016).

## 1.2 Agentes causantes

Las ETAs son originadas por la deglución de alimentos contaminados con agentes patógenos, que en una cantidad considerable afecta la salud del consumidor. Los agentes contaminantes pueden ser:

- 1.1.2 **Agentes biológicos:** bacterias y/o sus toxinas, hongos, virus, parásitos.
- 1.1.3 **Agentes químicos:** plaguicidas, fertilizantes, veneno.
- 1.1.4 **Agentes físicos:** metales, vidrio, madera.

Las enfermedades de transmisión alimentaria más frecuentes se deben a la contaminación de los alimentos con agentes biológicos que en la mayoría de los casos son consecuencia de un tratamiento incorrecto de los alimentos durante su obtención, transformación, almacenamiento o preparación por lo que la Organización Panamericana de la Salud (2002), argumenta que la determinación y la investigación de los brotes de ETA forman parte de uno de los primeros pasos para la realización de adecuados análisis de laboratorio que nos permitan detectar el agente causal de las mismas, por ello la OMS (2008) publicó los siete principales patógenos que se identifican en los alimentos, ellos son: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella spp*, *Listeria monocytogenes* y *Campylobacter spp*.

## 1.3 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* se describió por primera vez en 1885 por el pediatra alemán Theodore Escherich. Fue nombrada inicialmente como "*Bacterium coli commune*", pero en 1919 fue renombrada con el nombre actual en honor a su descubridor. Algunas especies son móviles (por flagelos peritricos), no esporuladas, fermenta la glucosa y la lactosa, son catalasa positiva, oxidasa negativa y reduce nitratos a nitritos. De acuerdo a sus requerimientos de oxígeno son anaerobias facultativas. Forma parte de la microbiota normal del tracto

gastrointestinal (TGI) del ser humano, otros mamíferos y las aves, siendo una de las especies bacterianas más abundantes en esta locación (Romeu, 2012).

En 1944, Kauffman propuso un esquema para la clasificación de *E. coli* utilizando sueros de conejos inmunizados con las variedades de los antígenos O (somático), H (flagelar) y K (capsular). El antígeno O es un polisacárido termoestable, que forma parte del lipopolisacárido (LPS) presente en la membrana externa de la bacteria. El antígeno K corresponde al polisacárido capsular que envuelve a la bacteria. Actualmente se conocen un total de 185 antígenos somáticos, 56 flagelares y 60 capsulares. La combinación específica de los antígenos O y H define el serotipo de una bacteria, en tanto que la identificación del antígeno somático hace referencia al serogrupo de la cepa de *E. coli* (Molina & Eslava, 2015).

### **1.3.1 Patotipos.**

Con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se clasifican en seis grupos: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y adherencia difusa (DAEC) (Rodríguez, 2002).

### **1.3.2 *E. coli* enterohemorrágica (EHEC).**

La OMS (2016) indica que la principal característica de este patotipo es la producción de toxinas semejantes a las producidas por *Shigella dysenteriae* por ello, también es conocida como *E. coli* productora de toxina shiga, la cual puede causar graves enfermedades a través de los alimentos y crece a una temperatura óptima de 37°C, proliferando en alimentos ácidos hasta un pH de 4,4 y en alimentos con una actividad de agua (aw) mínima de 0,95. Dentro de los principales brotes de EHEC se encuentran productos como las hortalizas contaminadas por materia fecal.

#### **1.3.2.1 Patogenia.**

La OMS (2016) argumenta que entre los síntomas ocasionados por una ETA producida por *E. coli* enterohemorrágica los más característicos son diarrea y cólicos abdominales los cuales en casos progresivos pueden desarrollar una colitis hemorrágica, también dentro de este cuadro clínico se puede manifestar fiebre y vómitos.

El periodo de incubación de esta ETA tiene una variación de entre tres y ocho días, pero en casos de niños y personas de tercera edad, en un pequeño porcentaje la infección puede

provocar el síndrome hemolítico urémico (SHU); este síndrome se caracteriza por una insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica y trombocitopenia.

Actualmente el SHU es el principal origen de la insuficiencia renal aguda en niños, acompañado de dificultades neurológicas registradas en un 25% de los casos atendido, añadiendo que aproximadamente el 50% de los casos presenta secuelas renales crónicas. (López & Guevara, 2002).

#### **1.3.2.2 Epidemiología.**

Griffin & Tauxe (1991) comentan que la enfermedad se transmite por vía feco-oral y actualmente se ha demostrado la transmisión de persona a persona teniendo como vehículo de transmisión en la población humana comúnmente a la carne de bovino. Otro tipo de transmisión es la falta de una correcta higiene durante el proceso de la elaboración de los alimentos y la manipulación de los mismos por parte del consumidor. El agente etiológico presente en esta enfermedad es principalmente el serotipo O157: H7, aunque en la actualidad intervienen otros como O26:H11, O111: H8 y O104: H21.

#### **1.3.2.3 Diagnóstico.**

Los casos clínicos concernientes a *E. coli* enterohemorrágica se pueden diagnosticar mediante el hallazgo de estos organismos en las muestras fecales otra opción es la evaluación de las muestras de alimentos y ambientales para determinar el origen de la infección. Las ECEH en ocasiones son difíciles de identificar debido a que son una población menor en la flora de la materia fecal o en los alimentos. Además, se asemejan a la *E. coli* comensal, excepto en la producción de verotoxinas. Sin embargo, la verotoxina, no es un indicativo que ayude a la identificación de un organismo como ECEH, también deben estar presentes otros factores de virulencia adicionales (Bielaszewska, *et al*,2007).

Foster *et al* (2006) nos indican que muchos laboratorios de diagnóstico pueden detectar la *E. coli* productora de verotoxina (ECVT) e identificar la ECEH O157:H7; indicando que no existe una técnica única que se pueda utilizar para aislar todos los serotipos de ECEH. En la actualidad se han desarrollado medios selectivos y diferenciales para la ECEH O157:H7, en base a la incapacidad de la mayoría de las cepas para fermentar el sorbitol. Con frecuencia, se utiliza agar MacConkey que contiene sorbitol al 1% (SMAC), generalmente con cefixima y ramnosa o telurito de potasio.

#### **1.3.2.4 Tratamiento.**

El tratamiento de la colitis hemorrágica es primordial al cual se puede incluir líquidos y una dieta blanda, la administración de antibióticos en este caso es recomendable que se evite

debido a que no reducen los síntomas, no previenen las complicaciones ni disminuyen la propagación, y puede aumentar el riesgo de presentar SUH. En el caso de mostrar un cuadro crónico los pacientes pueden solicitar diálisis, transfusión y/o infusión de plaquetas y en el caso de desarrollar insuficiencia renal irreversible el tratamiento ideal será un trasplante de riñón (Scheiring, *et al*, 2008).

#### **1.4 Antibióticos**

El inicio y avance de la farmacoterapia antiinfecciosa tiene su origen en la obra de Pasteur, Koch y Ehrlich cuyos hitos fundamentales han sido las sulfamidas, la penicilina y los antibióticos, estos últimos introducidos más recientemente con un enorme impacto en la sociedad. En la actualidad utilizamos el término antibiótico para referirnos al subgrupo de antimicrobianos con actividad antibacteriana constituyendo un grupo heterogéneo de sustancias con diferente procedimiento farmacocinético y farmacodinámico, ejerciendo una acción específica sobre una estructura o función del organismo (Cruz & Díaz, 2010).

Los antibióticos se caracterizan por tener elevada potencia biológica cuando actúan a bajas concentraciones, acompañados de una mínima toxicidad para las células de nuestro organismo (Lorenzo, *et al*, 2013).

La actividad de un agente antiinfeccioso está definida por su espectro antibacteriano, es decir, el conjunto de microorganismos patógenos que se ven afectados por las concentraciones del antibiótico sin causarle toxicidad. El objetivo del tratamiento antibiótico es el de reducir microorganismos viables para que el sistema inmunológico se vea capaz en su totalidad de descartarlos, mediante a la interacción germen-antibiótico (Sejia & Vignoli, 2008).

Actualmente existen distintos tipos de clasificaciones para agrupar a estas moléculas:

##### **1.4.1 Su origen puede ser:**

**1.4.1.1 Natural o biológico:** cuando se obtiene de cultivos de microorganismos que pueden ser hongos o bacterias.

**1.4.1.2 Semisintético:** cuando a partir de un núcleo básico de un agente obtenido de forma natural, se modifican algunas de sus características químicas, para mejorar sus propiedades, por ejemplo, aumentar su actividad, ampliar su espectro de acción, facilitar su administración o disminuir los efectos indeseables.

##### **1.4.2 Por la interacción germen-antibiótico**

**1.4.2.1 Bactericidas:** estimulan la lisis bacteriana, dentro de este grupo encontramos

a los  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, fosfomicina, nitrofurantoína, polipéptidos, quinolonas, rifampicina y vancomicina.

**1.4.2.2 Bacteriostáticos:** impiden el desarrollo y multiplicación bacteriana, este grupo

lo conforman las tetraciclinas, sulfamidas, trimetoprima, cloranfenicol, macrólidos y lincosamidas.

**1.4.3 Por su espectro de acción:**

**1.4.3.1 De espectro amplio:** son aquellos que presentan una actividad sobre un amplio número de especies y géneros diferentes entre ellos tenemos a las tetraciclinas, cloranfenicol y algunos  $\beta$ -lactámicos.

**1.4.3.2 De espectro intermedio:** macrólidos y aminoglucósidos.

**1.4.3.3 De espectro reducido:** su característica principal es la de activarse frente a un

grupo reducido de especies ejemplo de ello son los glucopéptidos.

**1.4.4 Por su mecanismo de acción:**

**1.4.4.1 Inhibidores de la síntesis de la pared celular:**  $\beta$ -lactámicos, dentro de ellos están las penicilinas, cefalosporinas y carbapenem, también encontramos otros medicamentos como cicloserina, vancomicina y bacitracina.

**1.4.4.2 Inhibidores de la permeabilidad de la membrana plasmática:** son aquellos que actúan aumentando la permeabilidad provocando así la salida de los compuestos intracelulares, como detergentes del tipo de polimixina; niostatina y anfotericina B, los cuales se adhieren a los esteroides de la pared celular y al polipéptido daptomicina.

**1.4.4.3 Inhibidores de la síntesis proteica:** inhiben de forma irreversible la síntesis de proteínas, alterando la función de las subunidades ribosómicas 30S o 50S, por lo general son bacteriostáticos por ejemplo cloranfenicol, tetraciclinas, eritromicina, clindamicina, estreptograminas y linezólido.

**1.4.4.4 Inhibidores de la síntesis o función de los ácidos nucleicos:** se caracterizan por actuar en el proceso de replicación del ADN (quinolonas), interfiriendo en la transcripción (rifamicinas y nitroimidazoles) y en la inhibición de la síntesis de metabolitos esenciales (Burton, *et al*, 2007).

#### **1.4.5 Antibióticos beta-lactámicos.**

La ampicilina es un beta-lactámico de espectro moderado, cuyo mecanismo de acción se da al interferir en las últimas fases de la síntesis del peptidoglicano, componente necesario en la formación de la pared bacteriana. Uno de los principales mecanismos de resistencia hacia beta-lactámicos es la hidrólisis enzimática, que es debida a la presencia de enzimas llamadas “beta-lactamasas” que se caracterizan por hidrolizar el enlace amida del núcleo beta-lactámico, inactivando de esta manera el antibiótico antes de que genere cualquier efecto. Estas enzimas constituyen una amplia familia que según la clasificación de Bush 2010, se dividen en los grupos 1, 2 y 3, que a su vez están divididos en 16 subgrupos. El número de betalactamasas actualmente descrito es sumamente elevado, incrementándose de manera continua.

Dentro de las más de 890 beta-lactamasas que actualmente se han caracterizado, las familias más comunes dentro de las enterobacterias son: blaTEM, blaSHV, blaOXA-1 y blaCARB. Las dos primeras pertenecientes al grupo 2b, es decir son penicilasas, inhibidas por el ácido clavulánico y que en algunos casos también tienen resistencia antibiótica para *E.coli* y una acción contra cefalosporinas de tercera generación (Bush, 2010).

Otro grupo de betalactamasas descritas por primera vez en *Pseudomonas aeruginosa* y descritas actualmente en *E. coli* son las blaGES que se caracterizan por hidrolizar a la ceftazidima.

#### **1.4.6 Polimixinas.**

En noviembre de 2015 se informó sobre la detección de un mecanismo de resistencia a colistina a través de plásmidos, relacionado al gen llamado mcr-1 (Mobile Colistin Resistance) productor de una enzima responsable de la resistencia de las bacterias a este antibiótico. La colistina es un antibiótico de última línea utilizado en el tratamiento de infecciones multirresistentes. El gen mcr-1 se encuentra en un plásmido, por lo que las bacterias pueden compartir y diseminar fácilmente la resistencia a otras bacterias (Liu, *et al*, 2015).

Este gen ha sido hallado fundamentalmente en *E. coli* con aislamientos recuperados de bacterias de animales para consumo y alimentos, a la fecha, se ha confirmado este gen en América, Europa, África y Asia. Un estudio holandés, detectó portación gastrointestinal por *E. coli* productores de mcr-1 en viajeros sanos que retornaron, luego de visitar destinos en Latino América, sugiriendo que este determinante de resistencia ya se encuentra diseminado en nuestras latitudes (Malbrán, 2016).

## **1.5 Resistencia bacteriana**

La resistencia antimicrobiana (RAM) según la OMS (2016) se produce debido a los cambios que sufren los microorganismos al verse expuestos a los antibióticos, dando como resultado la ineficacia de los medicamentos y la persistencia de las infecciones en el organismo lo que desarrolla la propagación a otras personas. En la actualidad están apareciendo nuevos mecanismos de resistencia que se propagan en todo el mundo y con ello aumenta la preocupación en el campo de la salud debido a que cada vez es más difícil una terapia antibiótica eficaz para combatir las infecciones.

Hoy por hoy la resistencia a los antibióticos se encuentra afectando a todos los países, especialmente a los pacientes con infecciones causadas por bacterias farmacoresistentes ya que son los que corren mayor riesgo de tener peores resultados clínicos y mayores posibilidades de morir, además que desde el punto de vista socio-económico son pacientes que consumen más recursos sanitarios que los infectados por cepas no resistentes de los mismos agentes patógenos, es así que la resistencia de *Escherichia coli* a una de las clases de fármacos más utilizados en el tratamiento de las infecciones urinarias como lo son las fluoroquinolonas se encuentra muy generalizada por lo que en muchos países este tratamiento es ineficaz en más de la mitad de los pacientes, este también es el caso de la colistin que aunque es el último recurso para el tratamiento de infecciones potencialmente mortales por enterobacterias resistentes a los antibióticos carbapenémicos ya se ha detectado resistencia de la misma en varios países y regiones, provocando que mencionadas infecciones dejen de ser tratables (OMS, 2016).

### **1.5.1 Tipos.**

Este fenómeno consta de un sustrato genético intrínseco o adquirido cuya expresión fenotípica es mediada por mecanismos bioquímicos, lo que nos facilita el poder agrupar a la resistencia desde el ambiente biológico y bioquímico (Sussmann, *et al*, 2010).

#### **1.5.1.1 Resistencia intrínseca.**

Se la conoce también como resistencia natural, ya que el mecanismo es permanente determinados genéticamente, un ejemplo de la misma es la resistencia de los bacilos gram negativos aeróbicos a la clindamicina

#### **1.5.1.2 Resistencia adquirida.**

A este tipo de resistencia se la conoce por producir cambios exactos o adquirir el ADN a través de plásmidos, transposones e integrones (Sussmann, *et al*, 2010), en el primer caso la resistencia se transmite de forma vertical de generación en generación mientras que en el

segundo la transferencia de genes se realiza horizontalmente por medio de los elementos genéticos antes mencionados, lo que no solo permite la transmisión a otras generaciones, sino también a otras especies bacterianas, así las bacterias podrán obtener la resistencia a uno o varios antibióticos sin la necesidad de estar en contacto con estos (Fernández *et al*, 2003).

Elementos genéticos móviles como los plásmidos y transposones son claves en el mecanismo, debido a que son los encargados de transportar los genes de resistencia.

Los plásmidos son fragmentos de ADN bacteriano con longitud inestable, algunos presentan la capacidad de replicarse independiente de la maquinaria genética que dispone la célula, por lo que también se los conoce como conjugativos y no conjugativos según la capacidad antes descrita, mientras que los transposones son secuencias de ADN que pueden ser trasladados entre cromosomas o de un cromosoma a un plásmido o entre plásmidos, gracias a un sistema de recombinación propio, y a esto se le suma la capacidad de los plásmidos de trasladarse de una célula a otra durante la conjugación, lo que permite la adquisición de genes de resistencia entre bacterias de la misma especie o especies distintas lo que facilita la expansión epidémica de la resistencia. Algunos plásmidos y transposones tienen elementos genéticos denominados integrones que les permite capturar varios genes exógenos determinando la aparición de una resistencia a varios antibióticos

Conjuntamente con lo descrito anteriormente, existen otras categorías de resistencia como:

#### **1.5.1.3 Resistencia relativa o intermedia**

Este tipo de resistencia ocurre cuando se da un aumento progresivo de la concentración inhibitoria mínima (CIM) a medida que adelanta el tiempo, es decir en esta categoría la susceptibilidad o resistencia depende de la concentración ya que para obtener un efecto terapéutico es importante llegar a niveles séricos y tisulares apropiados (Sussmann, *et al*, 2010).

#### **1.5.1.4 Resistencia Absoluta.**

Ocurre frente a un incremento imprevisto en la CIM de un cultivo durante o después del tratamiento (Torres,2014).

#### **1.5.1.5 Seudoresistencia.**

Se caracteriza por la presencia de resistencia *in vitro*, pero con un gran porcentaje de efectividad *in vivo*, este fenómeno presente en este tipo de resistencia es denominado



tolerancia antibiótica, en el cual la diferencia entre la concentración bactericida mínima (MBC) y la MIC es considerable (Sussmann, *et al*, 2010).

### **1.5.2 Determinantes.**

En la actualidad cada vez hay más pruebas que implican a los genes de resistencia de bacterias ambientales como el principal reservorio de las bacterias que colonizan e infectan a los humanos (Nesme, *et al*, 2014), aunque ambos grupos tienen un conjunto muy sustancial de genes de resistencia distintos (Gibson, *et al*, 2014).

Según Bhullar, *et al* (2012) se han encontrado hoy en día diversas bacterias resistentes a varios antibióticos en lugares alejados del exterior por un tiempo de al menos 4 millones de años, alguna de ellas resistentes a 14 antibióticos comercializados. Un gran número de bacterias ambientales filogenéticamente diversas son capaces de usar antibióticos como única fuente de carbono, lo que nos dice que existen un importante reservorio de genes de resistencia a antibióticos (Dantas, *et al*, 2008). Estudios realizados mencionan que existe evidencia de genes resistentes a beta-lactámicos, tetraciclina y vancomicina en ADN bacteriano de hace 30.000 años (D'Costa, *et al*, 2011). Conjuntamente con estos estudios también se han publicado pruebas de que el intercambio de genes de resistencia a antibióticos entre bacterias ambientales y patógenas de humanos ha crecido y que las secuencias genéticas que movilizan los genes también están presentes en bacterias ambientales, lo que facilita a la diseminación de los mismos (Forsberg, *et al*, 2012).

Además de considerar el origen ambiental de los genes de resistencia, tenemos que tener en cuenta que dichos genes pueden evolucionar una vez que son obtenidos por agentes patógenos o comensales del hombre o de animales (Alós, 2015).

### **1.5.3 Mecanismos de resistencia.**

Desde el punto de vista molecular y bioquímico existen tres mecanismos por los que una bacteria puede convertirse en resistente al tratamiento antibiótico, mencionando que estos mecanismos pueden darse de manera simultánea (Sussmann, *et al*, 2010).

#### **1.5.3.1 Inactivación del antibiótico.**

Este tipo de mecanismo de resistencia se da mediante un proceso molecular en donde la producción de enzimas causa destrucción o modificación de la estructura química del antibiótico (Giedraitien, *et al*, 2011). El principal proceso de inactivación es, la hidrólisis en el caso de las betalactamasas, pero también se puede dar modificaciones no hidrolíticas como las acetilaciones, adenilaciones o fosforilaciones inactivantes de aminoglucósidos.

Una de las características de las bacterias es la de producir enzimas las cuales provocan cambios en la estructura del antibiótico dando como resultado la pérdida de su función, por ejemplo, las enzimas que inactivan a las penicilinas y cefalosporinas son las  $\beta$ -lactamasas, estas enzimas son capaces de hidrolizar el anillo  $\beta$ -lactámico en el caso de las penicilinas para dar ácido peniciloico, el cual carece de actividad antibacteriana, de igual manera ocurre con las cefalosporinas, donde la  $\beta$ -lactamasa genera un producto inestable es decir inactivo que se descompone rápidamente evitando en ambos casos la unión del antibiótico con las proteínas transportadoras (PBP) y por ende se impide la formación de la pared bacteriana y así no se da el proceso de lisis.

Todo el proceso antes mencionado se basa en un extenso sistema enzimático, común y eficiente de resistencia, comúnmente producida por bacterias Gram negativas, por lo que para este tipo de bacterias se instituyó varias clasificaciones siendo la más aceptada la clasificación de Bush, la cual forma grupos de acuerdo a las enzimas que hidrolizan y a la inhibición de su actividad por el ácido clavulánico, EDTA, aztreonam u oxacilina.

#### 1.5.3.1.1 Clasificación

##### 1.5.3.1.1.1 $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

Enzimas producidas por microorganismos Gram negativos como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* y también por bacterias no fermentadoras como *Pseudomonas aeruginosa* y otros, una de las características de estas enzimas es la de inactivar a las penicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación y también a las oximinocefalosporinas (cefalosporinas de tercera generación) y al aztreonam (Álvarez, 2010).

Tafur, *et al* (2008) nos indica que estas enzimas son inhibidas por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam y se han descrito algunas familias de BLEE y las más prevalentes son las TEM, SHV y CTX-M, de estas la mayoría se originan por mutaciones espontáneas de  $\beta$ -lactamasas de espectro reducido y por cambios en el sitio activo de aminoácidos lo que amplía su capacidad hidrolítica. La capacidad de diseminación entre diferentes especies es conferida por las BLEE que son mediadas por plásmidos y al mismo tiempo que llevan estos genes también pueden portar genes que codifiquen resistencia a aminoglucósidos, tetraciclinas y trimetoprim/sulfametoxazol, lo que ayuda al crecimiento de los niveles de resistencia a múltiples antibióticos.

##### 1.5.3.1.1.2 $\beta$ -lactamasas de tipo AmpC.

Estas  $\beta$ -lactamasas son características por su perfil de inhibición y su espectro de hidrolisis, son inhibidas por cloxacilina, aztreonam, ácido borónico y sus derivados (ácido fenilborónico). Las cefalosporinas de primera generación (cefalotina) y segunda (cefuroxima) incluidas las cefamicinas y en menor medida las de tercera generación (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima) son hidrolizadas por estas  $\beta$ -lactamasas de tipo AmpC mientras que para cefalosporinas de cuarta generación (cefepima y ceftipiro) y carbapenems (imipenem y meropenem) no son muy efectivas.

En la actualidad las  $\beta$ -lactamasas de tipo AmpC plasmídicas se han detallado en algunos microorganismos pertenecientes a la familia de las enterobacterias como la *Klebsiella spp*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* y *Salmonella entérica* debido a que presentan relevancia clínica y su distribución es muy amplia (Navarro, *et al*, 2011).

#### **1.5.3.1.1.3 Carbapenemasas.**

Estas enzimas se caracterizan por estar codificadas en el cromosoma bacteriano o a su vez estar presentes en elementos genéticos móviles, por ello se las ha clasificado en dos grupos: el primer grupo conformado por las carbapenemasas de serina que otorgan patrones de resistencia únicos, especialmente a todos los betalactámicos mientras que el segundo grupo está formado por las metalo- $\beta$ -lactamasas que a diferencia de las primeras estas son sensibles a todos menos al aztreonam (Tafur, *et al*, 2008).

Dentro de las carbapenemasas existe un grupo de importancia epidemiológica denominado KPC cuyo nombre fue otorgado por la *Klebsiella pneumoniae* en donde fueron encontradas por primera vez (KPC= *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasas), son de naturaleza plasmídica que se encuentran asociadas al transposón Tn4401, en la actualidad se conocen once variantes dentro de ellas, la KPC-1 y la KPC-2 han sido descritas con mayor frecuencia (Navarro, *et al*, 2011). Giedraitien, *et al* (2011) nos indica que existe un grupo más dentro de esta clasificación y se las denomina OXA, el cual consta de variantes que hidrolizan los carbapenemicos, dentro de ellas, las más importantes son las de los subgrupos OXA-23, OXA-24 y OXA-58.

#### **1.5.3.2 Alteración del sitio blanco.**

Dentro de este tipo de resistencia se encuentran diversas modificaciones entre las más destacadas están: las modificaciones a la pared celular y a la subunidad 50s o 30s ribosomales. Como ejemplo tenemos la producción de proteoglicanos mediante la modificación de enzimas catalizadoras la que confiere la resistencia a los  $\beta$ -lactámicos, determinando que es esta enzima su sitio de acción.

Otro de los ejemplos más representativos de este mecanismo es el de la resistencia a quinolonas en organismos patógenos como la *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* y *Staphylococcus aureus* en donde se produce una modificación mediada por mutación en los genes GyrA y GyrB los cuales codifican para las topoisomerasas II y IV caracterizadas por ser de carácter cromosómico (Torres, 2014).

### **1.5.3.3 Barreras de permeabilidad.**

Este mecanismo incluye tres componentes básicos que son la organización de la membrana externa de la bacteria, las porinas que son conductos inespecíficos que se caracterizan por excluir al antibiótico por tamaño molecular y las características fisicoquímicas del antibiótico como por ejemplo en el caso del imipenem que necesita la presencia de las porinas para poder ser transportado al interior de la célula dentro de las barreras de permeabilidad se presentan dos mecanismos principalmente.

#### *1.5.3.3.1 Entrada disminuida.*

##### *1.5.3.3.1.1 Permeabilidad de la membrana externa.*

Característica en los microorganismos Gram negativos debido a que poseen una membrana lipídica externa que forma una barrera intrínseca para la penetración del antimicrobiano.

##### *1.5.3.3.1.2 Permeabilidad de la membrana interna.*

Se da a causa de un proceso de alteración energética en el transportador aniónico, el cual está encargado de trasladar al antibiótico hacia el interior de la célula ya que la capa lipídica en la membrana interviene como mecanismo de resistencia para los antibióticos hidrófobos.

##### *1.5.3.3.1.3 Porinas.*

Se produce por la transformación mediada por la alteración de estas proteínas generando una depreciación en el paso del antimicrobiano, este mecanismo se da en microorganismos como *E. coli*, *Serratia marcescens* y *Pseudomonas aeruginosa* contra aminoglucósidos y carbapenemes.

#### **1.5.3.3.2 Eflujo activo**

Este mecanismo se da por la alteración en la fabricación de energía y disminución en la entrada del antibiótico y la reducción de la concentración del antimicrobiano promoviendo la extracción activa del mismo, confiriendo resistencia a tetraciclinas, fluoroquinolonas, cloranfenicol y a  $\beta$ -latámicos (Sussmann, *et al*, 2010).

## **1.6 Alimentos listos para el consumo.**

Según Cavallini., *et al* (2010) los alimentos listos para el consumo (ALC) son productos procesados que pueden ser crudos o cocidos, venderse calientes o fríos y consumirse sin ningún tratamiento térmico adicional. En los últimos años la popularidad de este tipo de alimentos se ha incrementado, ya que representan una opción fácil y nutritiva para el consumidor y a la vez, representan una industria creciente que ofrece oportunidades laborales especialmente en países en vías de desarrollo. La calidad microbiológica y la vida útil de estos alimentos se puede estimar determinando el número de bacterias aerobias y anaerobias, el recuento de bacterias lácticas y esporuladas (que resisten algunos tratamientos térmicos y condiciones de acidez), la presencia de indicadores de contaminación fecal e higiene (coliformes fecales y totales) y de patógenos reconocidos, entre los que podemos citar a *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* y *C. botulinum*; siendo *E. coli* O157:H7 una de las bacterias enteropatógenas más representativas debido a su baja dosis infectiva, lo que potencia su peligrosidad (Ordóñez, *et al.*, 2016).

Acorde a la preferencia del consumidor los productos ya vienen troceados, listos para consumir directamente, sin desperdiciar nada ni generar resto alguno, además de ser accesibles en cualquier centro de venta, la comodidad y facilidad para su consumo hacen que sean productos cada vez más demandados (Ainia., 2012).

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

## **1.7 Alimentos empacados**

El principal objetivo del empaque de alimentos es proteger los productos del daño mecánico, de la contaminación química, microbiana y del oxígeno, el vapor de agua y la luz. El tipo de empaque utilizado para este fin juega un papel importante en la vida del producto, brindando una barrera simple a la influencia de factores, tanto internos como externos por lo que empacar vegetales y frutas frescas es uno de los pasos más importantes en el recorrido hasta el consumidor. El concepto de extender la vida de estante de los productos, controlando los gases en el ambiente circundante, no es nueva. (Angelfire.com, 2016).

**CAPÍTULO II**  
**MATERIALES Y MÉTODOS**

## **2.1 Recolección y preparación de la muestra.**

Se recolecto las muestras de vegetales listos para el consumo (138) en los diferentes supermercados y los vegetales frescos de venta libre (138) de la ciudad de Loja, transportándolos de manera aséptica al laboratorio de la Universidad Técnica Particular de Loja.

Para obtener las muestras se basó en la norma (INEN 1750:1994), seleccionando tres unidades al azar de cada tipo de vegetales, mientras que para la elaboración de la submuestra se manejaron las recomendaciones de la norma (INEN 1529-2:2013), la cual nos indica que, si el alimento está conformado por capas, se debe tomar muestras de cada una por separado, impidiendo infectar las partes en la misma igualdad en que se encuentran en el producto original.

## **2.2 Aislamiento e identificación de *E. coli*.**

### **2.2.1 Pre-enriquecimiento.**

En esta etapa se pesó de manera aséptica 25g de muestra, en frascos con capacidad de 500mL, los cuales contenían 225mL de Caldo Lactosa estéril, cerrados con tapa rosca.

Consecutivamente se agitó por dos minutos para luego someterlos a un periodo de reposo durante 60 minutos a temperatura ambiente con la finalidad de poder medir el pH y ajustándolo si es de ser necesario (NaOH o HCL), de esta manera se asegura que siempre se encuentre entre  $6,8 \pm 2$ , seguido de la etapa de incubación que duró un lapso de 24 horas a una temperatura de 37°C.

### **2.2.2 Enriquecimiento.**

Se utiliza esta etapa para recuperar microorganismos patógenos que se hallan en bajo número, a partir de muestras de alimentos donde hay una elevada concentración de microorganismos comensales (Rivas. *et al.*, 2008). Utilizando caldos selectivos como Rappaport-Vassiliadis (RV) y Tetrionato (TT), primero, se agitó suavemente los frascos que contenían Caldo Lactosa para luego con ayuda de micropipetas transferir 1000µL del caldo a 10mL de caldo TT, mientras que para transferir a los 10mL de RV se cogió 100µL del mismo caldo, homogenizando después de cada pipeteada.

Al final se incubo de las siguientes maneras; al caldo RV a baño maría con una temperatura de  $42 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  controlado de manera termostática y un periodo de 24 horas, mientras que al caldo TT se lo incubo a una temperatura de  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.

### 2.2.3 Siembra en medio diferencial.

Una vez culminada la etapa de enriquecimiento se homogenizo los caldos RV y TT, posterior se tomó una alícuota de aproximadamente 10µL de cada uno de los caldos y se inoculo en medio MacConkey, se incubo las placas a una temperatura de 37°C por 24 horas, después de este periodo se seleccionó las placas que fermentaron lactosa para su posterior identificación.

### 2.2.4 Identificación morfológica.

Se identificó un tipo de colonias pequeñas redondas-rosáceas cuyas características son específicas para los serogrupos de *E. coli* (Figura 1) (Feng. *et al.*, 2011).

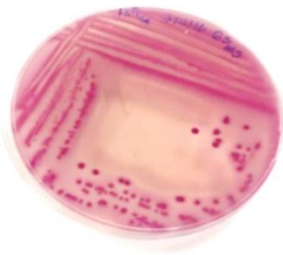


Figura 1. Colonias típicas de *E. coli* en medio MacConkey

## 2.3 Identificación

### 2.3.1 Pruebas bioquímicas.

Al finalizar la identificación morfológica, se identificó el género y especie de *E. coli* mediante la siembra de TSI, LIA, UREA, CITRATO y SIM; y para su confirmación se utilizó el sistema de identificación Microgen GN-ID (figura 3-4), cuyo fundamento, procedimiento e interpretación de resultados se muestra en el anexo 1.

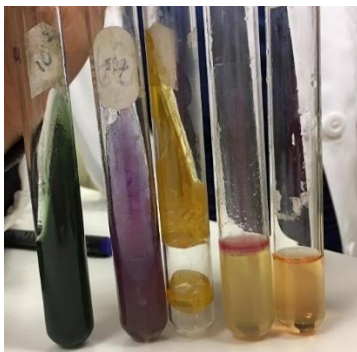


Figura 2. Identificación bioquímica de *E. coli*



Tabla 1. Interpretación de pruebas bioquímicas para *E coli*

Microorganismo	TSI	GAS	H2S	LIA	SIM	INDOL	CITRATO	UREA
<i>Escherichia coli</i>	A/A	+	-	-	+	+	-	-

Fuente. (Alonso M. *et al.*, 2015).

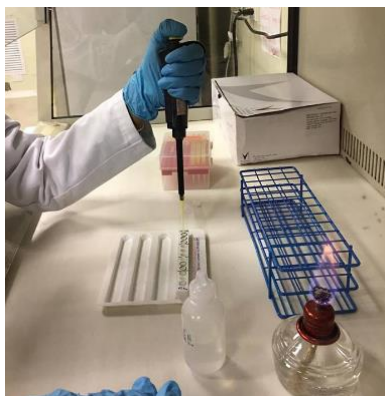


Figura 3. Sistema Microgen GN-ID



Figura 4. Lectura del Sistema Microgen GN-ID

## 2.4 Determinación de la susceptibilidad bacteriana

Esta etapa se determinó aplicando la metodología de difusión en agar Muller Hinton, utilizando la técnica de Kirby y Bauer para la cual se emplea una turbidez de 0,5 en la escala de McFarland a una temperatura de  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , siguiendo de las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standart Institute (CLSI. 2017).

Tabla 2. Puntos de corte para Enterobacterias

GRUPO	ANTIBIÓTICO	CÓDIGO	CONCENTRACIÓN ( $\mu\text{g}$ )	PUNTOS DE CORTE (mm)	
				S $\geq$	R $\leq$
Aminoglucósidos	Amikacina	An	30	17	14
	Estreptomicina	S	10	15	11
	Gentamicina	Gn	10	15	12
Anfenicoles	Cloranfenicol	C	30	18	12
Betalactámicos inhibidores de betalactamasas	Amoxicilina/Acido clavulánico	Amc	20/10	18	13

<b>Cefalosporinas (I, II, III, IV)</b>	Cefazolin	Kz	30	15	14
	Cefalotin	Cf	30	18	14
	Cefepime	Fep	30	25	18
	Ceftazidime	Caz	30	21	17
	Cefotaxime	Ctx	30	26	22
<b>Carbapenémicos</b>	Imipenem	lpm	10	23	19
<b>Fluoroquinolonas</b>	Ciprofloxacino	Cip	5	21	15
<b>Monobactámicos</b>	Aztreonam	Atm	30	21	17
<b>Penicilinas</b>	Ampicilina	Am	10	17	13
<b>Polimixinas</b>	Colistina*	Cl	10	14	10
<b>Sulfamidas</b>	Sulfametosaxol/trimetoprin	Sxt	25	16	10
<b>Tetraciclinas</b>	Tetraciclina	Te	30	15	11

Fuente: CLSI 2017 & Malbrán, 2016

\*Colistin: los datos son los sugeridos por EUCAST.

El criterio de selección para la evaluación del mecanismo de producción de BLEE fue la presencia de cepas con halos <21mm en cefalosporinas de tercera generación (cefotaxime y ceftazidima), las cuales fueron sometidas a la siguiente prueba:

#### 2.4.1 Prueba de sinergia de doble disco.

Esta prueba se fundamenta en colocar un disco de amoxicilina/ácido clavulánico 20/10ug, ceftazidime 30ug, cefotaxime 30 ug, cefepime 30ug y aztreonam 30ug con una distancia de 20mm entre ellos.

Los resultados de la producción de BLEE se demuestra por el desarrollo del halo de inhibición o también llamado efecto sinérgico (efecto huevo) entre el disco con inhibidor y los discos de ceftazidima 30ug, cefotaxime 30 ug, aztreonam 30ug y amoxicilina/ácido clavulánico 20/10ug.

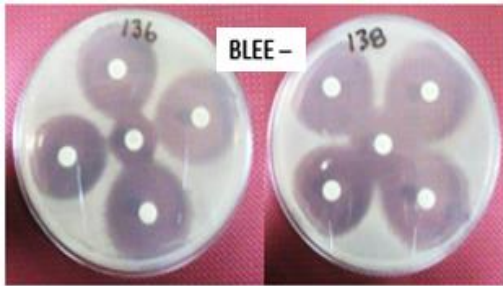


Figura 5. Prueba de sinergia de doble disco negativa para la detección de BLEE.

#### 2.4.2 Detección de polimixinas

El criterio de selección para la evaluación de la resistencia hacia polimixinas fue tomado de estudios previos realizados por el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) de Argentina basándose en datos expuestos por el EUCAST, donde indica que a una concentración de  $\leq 2 \mu\text{g/ml}$  en CIM se relaciona con 14 mm en la técnica de difusión con discos para obtener cepas sensibles; mientras que a una concentración de  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$  en CIM corresponde a una relación de 10mm para la obtención de cepas resistentes y cepas cuyos halos se encuentren entre 11 y 13 mm, requieren definición por CIM (Malbrán. 2016).

**CAPÍTULO III**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### 3.1 Prevalencia de *E. coli*

Se analizó un total de 276 muestras de vegetales listos para el consumo y empacados, de las cuales el 9% (26), presentaron crecimiento bacteriano característico de *E. coli*.

En los últimos años, se ha presentado un aumento de brotes de enfermedades gastrointestinales, con un impacto significativo en los sistemas de salud y producción agrícola, debido al consumo de vegetales mínimamente procesados, los cuales hoy en día representan la segunda causa más importante de infecciones por este microorganismo (OMS, 2011). Al respecto nos indica Massana (2015), que en forma notable se ha observado el incremento de casos de síndrome urémico hemolítico causados por el consumo de verduras envasadas, listas para consumir, y de brotes de semillas contaminados con *E. coli* enterohemorrágica.

Según García, (2013) la presencia de esta bacteria en vegetales listos para el consumo y empacados sirven como indicadores de contaminación fecal, demostrando que no son aptos para el consumo humano, de modo que este estudio se relaciona también con la falta de calidad sanitaria de este tipo de vegetales debido a la presencia de esta bacteria. Estudios realizados por Castro. *et al.*, (2006) mencionan también la presencia de *E. coli* en vegetales listos para el consumo, del total de muestras recolectadas (170) existió un 75%, mientras que Messaria. *et al.*, (2009) en vegetales frescos encontró un 84.7% de *E. coli*, así mismo Rincón, *et al.*, (2010) encontró el 10% de 150 muestras analizadas de vegetales empacados.

Así mismo un estudio realizado en el Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos (INHA) de la Habana (Cuba) reportó un aislamiento de 153 cepas características de *E. coli* en vegetales listos para el consumo (Espino. *et al.*, 2010). Un estudio similar pero realizado dos años después por Peña y colaboradores (2014), en el mismo país revelaron la presencia de 74 cepas de la misma bacteria.

Un estudio realizado en Guatemala por Rodríguez A, (2005) se encontró la presencia de un 16,66% *E. coli* en un total de 42 ensaladas y de las muestras analizadas de cada ingrediente (168) se halló el 5.35% del mismo agente patógeno. En otro estudio realizado en Brasil de muestras de vegetales como lechuga y acelgas se encontró el 40% de *E. coli* del total de las muestras en estudio (Maffei. *et al.*, 2012), mientras que en estudios realizados en nuestro país en la ciudad de Cuenca se encontró un 93.75% de prevalencia de dicha bacteria en una totalidad de 96 muestras analizadas de lechuga (Vélez & Ortega, 2013).

En la actualidad la presencia de esta bacteria en vegetales listos para el consumo y empacados es preocupante al igual que las enfermedades que produce y también su creciente aumento de resistencia a posibles tratamientos antibioticos por lo que se a intensificado el estudio de la misma y a su vez la manera de implementar normas que ayuden a controlar el incremento de resistencia. En este estudio se evaluó la susceptibilidad bacteriana de las cepas aisladas utilizando los antibióticos que siguen las especificaciones mostradas en la tabla 2, conjuntamente con los puntos de corte para Enterobacterias del CLSI 2017.

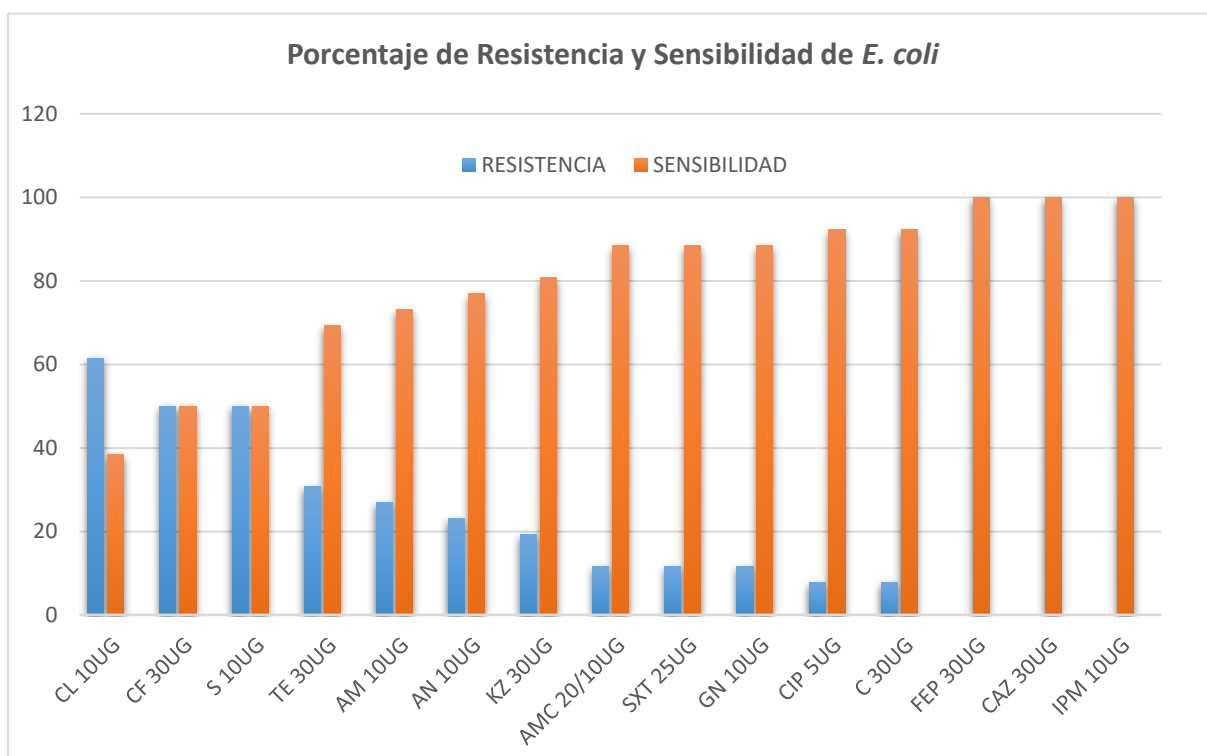


Figura 6. Susceptibilidad antimicrobiana a *Escherichia coli* aisladas a partir de vegetales frescos listos para el consumo y empacados

El porcentaje más alto de resistencia encontrado en este estudio es para colistina con un 61.54%, este dato se corrobora con resultados expuestos por una investigación similar a la nuestra en México donde se encontró un 95% de resistencia (Sánchez. *et al.*, 2014)

Liu y colaboradores (2015) informaron sobre la detección de un mecanismo de resistencia a colistina a través de plásmidos, relacionado al gen llamado *mcr-1* (Mobile Colistin Resistance) productor de una enzima responsable de la resistencia de las bacterias a este antibiótico. La colistina es un antibiótico de última línea utilizado en el tratamiento de infecciones multiresistentes. El gen *mcr-1* se encuentra en un plásmido, por lo que las bacterias pueden compartir y diseminar fácilmente la resistencia a otras bacterias.

Este acontecimiento genera preocupación debido a que hasta el momento se conocía que la resistencia a las polimixinas, entre las que se encuentra la colistina, ocurría por mutaciones cromosómicas y no se había informado de la transferencia horizontal de genes que confirieran resistencia a las mismas (OMS.,2016). De acuerdo con Freire (2016), se sospecha que la principal razón para el surgimiento y la propagación del *mcr-1* sería el uso exagerado de colistina en la producción agropecuaria, como promotora de crecimiento. Sin embargo, la presencia de este gen también fue descrita en muestras de animales domésticos, alimentos y ambientes acuáticos, lo que muestra la propagación hacia diversos ecosistemas. En 2012, la OMS recomendó limitar el uso de colistin, debido que unas 12.000 toneladas de este fármaco son empleadas en la crianza de ganado cada año.

En la actualidad investigadores de Brasil informaron sobre el hallazgo de *E. coli* productora de *mcr-1* en el país, aislado a partir de muestras procedentes de alimentos y animales (Fernandes. *et al.*, 2015). En mayo 2016 se desarrollaron proyectos en donde, el Laboratorio Regional de Referencia de la Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (ReLAVRA) de Colombia y el Servicio Antimicrobianos del INEIANLIS conjuntamente con el Dr. Carlos G. Malbrán de Argentina, confirmó la detección de cepas clínicas de *E. coli* portadoras del gen *mcr-1* comentando que los diferentes aislamientos que portaban el gen *mcr-1* no tenían relación genética entre sí y la resistencia detectada fue de tipo transferible. Esto muestra que el mecanismo es capaz de ser diseminado de una bacteria a otra (Rapoport. *et al.*, 2016).

Seguido de la colistina se encuentran con un 50% de resistencia el cefalotín y estreptomina, datos que se relacionan con los publicados por el Instituto de Genómica de Pekín (BGI) informando que la cepa de *E. coli* aparecida en Alemania mostró una elevada resistencia a distintos tratamientos antibióticos entre los cuales se encontraba cefalotín y estreptomina (Vargas. *et al.*, 2014).

Czirock & Herpay (1995), conjuntamente con Blanco. *et al.*, (1996) y Cransberg. *et al.*, (1996) mencionan que estos hechos no han ocurrido de forma aislada, sino que se debe a la contaminación de los vegetales frescos, con microorganismos de origen fecal, frecuentemente a partir de ganado portador de cepas patógenas, o según Charatan (1999) y Rowe & Kirk (1999) debido a que algunos serotipos de *E. coli* son más prevalentes en las muestras de aguas residuales de procedencias muy diversas, las mismas que son utilizadas para riego hacia productos agrícolas, estas pueden ser las principales causas de varios brotes de enfermedades transmitidas por alimentos ocurridos en los últimos 20 años.

Estos resultados se pueden deber a la presencia de varios mecanismos moleculares de resistencia como son la inactivación enzimática cuyo principal proceso de inactivación es la

hidrolisis, pero también se pueden dar las acetilaciones, adenilaciones o fosforilaciones inactivantes, alteraciones en el sitio blanco que se caracterizan por las modificaciones a la pared celular y a la subunidad 50s o 30s ribosomales y las alteraciones de la permeabilidad que comprende tres aspectos como la estructura de la membrana externa de la bacteria, las porinas y las características fisicoquímicas del antibiótico (Torres, 2014), (Sussman, *et al*, 2010).

Los mecanismos moleculares de resistencia empleados por *E. coli*, según Mosquito. *et al.*, (2011) son de vital importancia en especial de *E. coli* comensales debido a que estas se encontrarían actuando como reservorio de los genes de resistencia antibiotica distribidos en la sociedad, esto debido a la exposición comunitaria a los antibioticos.

Conjuntamente con los resultados expuestos, también se presentó un 100% de sensibilidad hacia imipenem, ceftazidime y cefepime descartando la presencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE; resultando esto interesante ya que, en cepas procedentes de aislamientos de infecciones extrahospitalarias e intrahospitalarias la resistencia hacia mencionados antibioticos es preocupante a causa de resultados encontrados actualmente, por ejemplo en un estudio realizado en Bogotá (Colombia) se encontró 10,3% de resistencia para ceftazidime, 4,5% para cefepime y un 2% para imipenem (Varela, 2008), mientras que en una investigación realizada después de tres años en el mismo país se encontró que dentro del 41,8% de las muestras recolectadas que se tipificarón como *E. coli*, resultaron resistentes en un 100% para ceftazidime y cefepime mientras que para imipenem se encontró un 14.5% (Pérez, *et al*, 2011)

Colquechagua y colaboradores en 2015 al realizar su investigación encontraron el 86.1% de cepas de *E. coli* productoras de BLEE a partir de aislamientos de muestras procedentes de pacientes ambulatorios y de aquellos que acudieron al servicio de emergencia; en cambio en una investigación realizada en Ecuador (Loja) se encontró 19.2% de BLEE (Torres., 2014). Estos resultados obtenidos se pueden deber a que las muestras procedentes de aislamientos a partir de vegetales listos para el consumo y empacados aún no presentan cepas productoras de BLEE, lo que evidentemente no sucede en cepas aisladas a partir de pacientes con infecciones que pueden ser gastrointestinales, urinarias etc, esto, debido a que pueden ser bacterias de origen comensal, las cuales se diferencian de las patógenas por contener un millón menos de pares de bases, los cuales probablemente corresponden a los genes de factores de virulencia y resistencia (Croxen. *et al.*, 2013).



## CONCLUSIONES

- ✓ La frecuencia de cepas de *E. coli* aisladas fue del 9% en vegetales listos para el consumo y empacados.
- ✓ Las cepas de *E.coli* presentaron 61.54% de resistencia hacia colistina y 50% para cefalotin y estreptomicina y 100% de sensibilidad al imipenem, ceftazidime y cefepime, descartando la presencia de cepas productoras de BLEE.

## RECOMENDACIONES

- ✓ Debido al incremento tanto de las enfermedades transmitidas por alimentos y la resistencia de *E. coli* a varios antibióticos, se debería aumentar el número de muestras empleadas para un futuro estudio.
- ✓ Con la presencia de resistencia a polimixinas se recomienda realizar un estudio a nivel molecular para poder determinar la presencia del gen *mcr-1* en las muestras analizadas.
- ✓ Los requisitos básicos para mantener los alimentos a salvo de los peligros derivados de la presencia de este tipo de agentes microbianos son conocidos y sencillos (Vargas, *et al*, 2014), por lo que es necesaria la colaboración activa de veterinarios, médicos, productores y proveedores de la industria alimentaria para que por medio de una campaña de información a la sociedad se puede asegurar que estos requisitos básicos se conozcan y se puedan llegar a cumplir.

## BIBLIOGRAFIA

- Ainia. (2012). Alimentación saludable: ensaladas listas para consumir. Barcelona, España. Ainia Publishing. Recuperado de <https://actualidad.ainia.es>
- Angelfire.com. (2016). Descripción de empaques para frutas y vegetales frescos. Available at: <http://www.angelfire.com/ia2/ingenieriaagricola/empaques.htm> [Accessed 30 Dec.2016]
- Bachelli M., Amaral R y Benedetti B. (2013). Alternative sanitization methods for minimally processed lettuce in comparison to sodium hypochlorite. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(3), 673-678.
- Bogotá, D. E. (2010). Secretaria Manual De Actualizacion En Resistencia Bacteriana Y Normas CLSI M100 – S20. Control, 1–78.
- Bhullar, N. Waglechner, A. Pawlowski, K. Koteva, E.D. Banks, M.D. Johnston Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome *PLoS One*, 7 (2012), pp. e34953 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0034953> Medline.
- Bielaszewska M, Köck R, Friedrich AW, von Eiff C, Zimmerhackl LB, Karch H, Mellmann A. Shiga toxin-mediated hemolytic uremic syndrome: time to change the diagnostic paradigm? *PLoS ONE*. 2007;2(10):e1024.
- Castro, J., Rojas, M., Noguera, Y., Santos, E., Zuñiga A., & Gómez C. (2006). Calidad sanitaria de ensaladas de verduras crudas, listas para su consumo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Cavallini R., Rodríguez E., Gamboa C., Arias M, Arias María Laura. (2010). Evaluación microbiológica de alimentos listos para consumo procesados por pequeñas industrias costarricenses. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 60(2), 179-183. Recuperado en 30 de diciembre de 2016, de [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222010000200011&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222010000200011&lng=es&tlng=es).
- CLSI. (2017). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing Twenty-Second Informational Supplement. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Colquechagua Aliaga, Fabiola; Sevilla Andrade, Carlos y Gonzales Escalante, Edgar. Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en muestras fecales en el Instituto Nacional de Salud del Niño, Perú. *Rev. perú. med. exp. salud pública* [online]. 2015, vol.32, n.1, pp. 26-32. ISSN 1726-4634.
- Croxen, Robyn J. Law, Roland Scholz, Kristie M. Keeney, Marta Wlodarska y B. Brett Finlay (2013). «Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic Escherichia

- coli» [Avances recientes en el entendimiento de la E. coli enteropatógena]. *Clinical Microbiology Reviews* (en inglés) (American Society for Microbiology, publicado el 1 de octubre de 2013) **26** (4): 822-880. doi:10.1128/CMR.00022-13. ISSN 1660-4601.
- Dantas, M.O. Sommer, R.D. Oluwasegun, G.M. Church Bacteria subsisting on antibiotics *Science*, **320** (2008), pp. 100-103 <http://dx.doi.org/10.1126/science.1155157> Medline
  - D'Costa, C.E. King, L. Kalan, M. Morar, W.W. Sung, C. Schwarz Antibiotic resistance is ancient *Nature*, **477** (2011), pp. 457-461 <http://dx.doi.org/10.1038/nature10388> Medline.
  - Díaz T., Valdés M., Caballero A y Monterrey P. (2012). Enfermedades transmitidas por alimentos: Causas más frecuentes en los niños. *Revista de Nutrición e Higiene*, **7** (44), 42-44
  - Domínguez, L. A., & Ros, C. (2010). Manipulador de alimentos: La importancia de la higiene en la elaboración y servicio de comidas. Mexico DF, Mexico. Ideaspropias Editorial S.L.
  - Freire, A. (2016). Diseño de un plan de mejoras, basado en el estudio de BPMs y trazabilidad, aplicado sobre el brocoli y la lechuga de la empresa PROAGRIP CIA. LTDA. de la provincial de Tungurahua. Universidad Técnica de Ambato.
  - Feng P, Weagant S, & Jinneman K. (2011). Bacteriological Analytical Manual: Diarrheagenic Escherichia coli. USA. Recuperado de <https://www.fda.gov>.
  - Foster G, Evans J, Knight HI, Smith AW, Gunn GJ, Allison LJ, Syngé BA, Pennycott. Analysis of feces samples collected from a wild-bird garden feeding station in Scotland for the presence of verocytotoxin-producing Escherichia coli O157. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(3):2265-7.
  - Forsberg, A. Reyes, B. Wang, E.M. Selleck, M.O. Sommer, G. Dantas The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens *Science*, **337** (2012), pp. 1107-1111 <http://dx.doi.org/10.1126/science.1220761> Medline.
  - García, R. (2013). Identificación de los sitios de contaminación en la cadena de producción de tomate y chila jalapeño mediante la determinación de microorganismos indicadores de contaminación fecal y enteropatógenos. Universidad Autónoma de Nuevo León.
  - García M, M<sup>a</sup> C. (2013). Escherichia coli portador de betalactamasas de espectro extendido: resistencia. *Sanidad Militar*, **69**(4), 244-248. <https://dx.doi.org/10.4321/S1887-85712013000400003>.
  - González T., Rojas R. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *SCIELO*, vol.47 n.5, 3.

- Guerrero J. (2015). Enfermedades Transmitidas por Alimentos. 2016, de *Instituto Nacional de Salud* Sitio web: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/SubdireccionVigilancia/sivigila/Protocolos%20SIVIGILA/PRO%20Enfermedades%20Trans.%20por%20alimentos.pdf>.
- Giedraitien, A., Vitkauskien, A., Naginien, R., & Pavilonis, A. (2011). Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (kaunas)*, 47(3), 137-146.
- Gibson, K.J. Forsberg, G. Dantas Improved annotation of antibiotic resistance determinants reveals microbial resistomes cluster by ecology *ISME J*, (2014).
- Griffin, PM; Tauxe, RV. The epidemiology of infections caused by Escherichia coli O157:H7, other enterohemorrhagic E. coli, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiology*, 1991; 13:60-98 – See more at: <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2001/08/23/369.php#sthash.SckPfjYa.dpuf>.
- Kooper G., Calderón G., Schneider S., Domínguez W y Gutiérrez G. (2009). Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Roma: FAO.
- Liu, Y-Y, Wang, Y, Walsh, TR et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism mcr-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. 2015; (published online November 18.) [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7).
- López Acuña, W. & Guevara Duncan, J. (2002). INFECCIÓN POR ESCHERICHIA COLI ENTEROHEMORRÁGICA. *Sisbib.unmsm.edu.pe*. Retrieved 18 February 2017, from [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/rfmh\\_urp/v03\\_n1/a12.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/rfmh_urp/v03_n1/a12.htm).
- Lösch L. (2010). Patógenos productores de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). *Revista de Inmunología y Microbiología Argentina*, 3(7), 3-6.
- Malbrán, C. (2017). *antimicrobianos.com.ar | Servicio Antimicrobianos del Instituto Malbran* [antimicrobianos.com.ar](http://antimicrobianos.com.ar). [online] [Antimicrobianos.com.ar](http://antimicrobianos.com.ar). Available at: <http://antimicrobianos.com.ar/> [Accessed 2 Jan. 2017].
- Malbrán, C. (2016). *Programa de Control de Calidad Nacional en Bacteriología*. [online] LNR. Available at: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2016/02/Alerta-epidemiol%C3%B3gica.pdf> [Accessed 1 Feb. 2017].
- Messaria G., Rincon G., Romero S., Harris B., Castellano M., Colina G. (2005). Especies de Aeromonas en vegetales frescos que se expanden en un mercado popular de Maracaibo. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. V25n2 Caracas.

- Messaria, G., Romero, S., Rincón, G., Castellano, M., Avila, Y., Colina, G., Perozo, A. (2009). Indicadores entéricos en vegetales frescos que se comercializan en mercados populares de Maracaibo. *Rev. de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29;52-56.
- Mosquito S, Ruiz J, Bauer J y Ochoa T. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *SciELO Public Health*. Volumen 28. Número 4.
- Molina, J, y Eslava, C. (2015). *Infecciones por Escherichia coli - Recursos en Bacteriología - UNAM*. [online] *Facmed.unam.mx*. Available at: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichia-coli.html> [Accessed 30 Dec. 2016].
- Navarro, F., Calvo, J., Cantón, R., Fernández, F., & Mirelis, B. (2011). Detection of resistance phenotypes in gram-negative bacteria. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 29(7), 524-534. Doi: 10.1016/j.eimc.201103.011.
- Newell D., Koopmans M., Verhoef L., Duizer E., Aidara-Kane A., Sprong H., Kruse H. (2010). Food-borne diseases – The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge, *International Journal of Food Microbiology*, 139(1), 3-15.
- NTE INEN 1529-2 (2013): Control microbiológico de los alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico.
- NTE INEN 1750 (1994): Hortalizas y frutas frescas. Muestreo.
- Olea A., Díaz J., Rodrigo F., Vaquero A y García M. (2012). Vigilancia de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en Chile. *SCIELO*, 29, 7.
- Organización Mundial de la Salud. 2011. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/>
- Organización Panamericana de la Salud. Enfermedades transmitidas por alimentos [Internet]. PANALIMENTOS, OPS/OMS; 2002. Disponible en: <http://www.panalimentos.org/comunidad/educacion1.asp?id=67>.
- OMS. 2007. Consultation to develop a strategy to estimate the global burden of foodborne diseases. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Available at: [http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne\\_disease/burden\\_sept06/en/index.html](http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/burden_sept06/en/index.html).
- Ordóñez, J., Cambero, I., Cabeza, M. and de la Hoz, L. (2016). Higienización de alimentos listos para su consumo (RTE) mediante radiaciones ionizantes.
- Pauta, R. (2016). Detección y Aislamiento de cepas presuntivas de *E. coli* productor de toxina shiga en ensaladas de lechuga listas para el consumo. *Bioquímico Farmacéutico*. Universidad Técnica Particular de Loja.

- Pascual M. (2005). Enfermedades de origen alimentario: su prevención. Ed. Diaz de Santos.
- Pérez, N. Pavas, N. Molina, E.I. Rodríguez. (2015), Resistencia a los antibióticos en *Escherichia coli* con beta-lactamasas de espectro extendido en un hospital de la Orinoquia colombiana. Rev. Elsevier. Volume 15, Issue 3, September 2011, Pages 147-154.
- Rincón V, Gresleida, Ginestre P, Messaria, Romero A, Sonia, Castellano G, Maribel, & Ávila R, Yeiny. (2010). Calidad microbiológica y bacterias enteropatógenas en vegetales tipo hoja. *Kasmera*, 38(2), 97-105. Recuperado en 08 de mayo de 2017, de [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0075-52222010000200002&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-52222010000200002&lng=es&tlng=es).
- Rodríguez, A. (2005). Determinación de *Escherichia coli* en ensaladas a base de lechuga preparadas en restaurantes de comida rápida. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Rodríguez A, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. [online] Scielo.org.mx. Available at: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-36342002000500011](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342002000500011) [Accessed 2 Jan. 2017].
- Romeu B. (2012). Caracterización de cepas de *Escherichia coli* de importancia clínica humana aisladas de ecosistemas dulceacuícolas de la Habana. Doctor en Ciencias Biológicas. UNIVERSIDAD DE LA HABANA FACULTAD DE BIOLOGIA.
- Smith K., Wilker P., Reiter P., Hedican E., Bender J y Hedberg C. (2011). Antibiotic Treatment of *Escherichia coli* O157 Infection and the Risk of Hemolytic Uremic Syndrome, Minnesota. *Pediatr Infect Dis J*.
- Scheiring J, Andreoli SP, Zimmerhackl LB. Treatment and outcome of Shiga-toxin-associated hemolytic uremic syndrome (HUS). *Pediatr Nephrol*. 2008;23(10):1749-60.
- Sussmann, O., Mattos, L., & Restrepo, A. (2010). Resistencia bacteriana. *Univ Med*, 43(1), 20-6.
- Tafur J., Torres J y Villegas M. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Scielo*, vol.12 no.3, 6.
- Torres, A. (2014). Resistencia bacteriana en bacilos Gram negativos de cultivos aislados de muestras clínicas en pacientes ambulatorios del hospital "Manuel Ygnacio Monteros" durante el periodo agosto - septiembre 2013. Universidad Técnica Particular de Loja.

- Varela, C. (2008). Comparación de la resistencia al tratamiento de infecciones urinarias no complicadas a nivel internacional, con historias clínicas del servicio de urgencias del hospital San Ignacio del 2007. doctorado. Pontificia Universidad Javeriana.
- Vargas, M., Rodríguez, F., Fernández, L., Fernández, F., Morales, J. (2014). De residuo a recurso: El camino hacia la sostenibilidad. Grupo Mundi-Prensa. Madrid.
- Vélez, A., Ortega, J. (2013). Determinación de coliforms totales y *E. coli* en muestras de lechuga expandidas en cuatro mercados de la ciudad de Cuenca. Universidad de Cuenca.
- Yi-Yun Liu, Yang Wang, Walsh T. R, Ling-Xian Yi, Rong Zhang, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2015; 16(2): 161-168



## **ANEXOS**

## Anexo 1. Metodología del MICROGEN GN-ID

### 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 nitrato. 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.

Colour chart/Farbtafel/Tableau 'de couleurs

Microgen™ GN A ID

WELL/POCILLO/SOULET	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	7
Reactive	Control	Qualitest	Sub	Glucose	Starch	Starch	ONPG	Indole	Voges	V.P.	Glucose	TDA	Nitrate
Negative	White	White	White	White	White	White	White	White	White	White	White	White	White
Positive	Black	Blue	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Pink	Pink	Red	Red	Red

Microgen™ GN B ID

WELL/POCILLO/SOULET	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Reactive	Control	Maltose	Arabin	Arabin	Mannose	Inositol	Lactose	Arabinose	Arabin	Arabin	Nitrate	Arabinose 24hrs	Arabinose 48hrs
Negative	White	White	White	White	White	White	White	White	White	White	White	White	White
Positive	Black	Blue	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Blue

Read 8000x. Keep out of direct sunlight. Store in a cool, dry place. Do not use after the expiration date. These colours are provided as general guide to the range of test colours.

Legend:

- Appropriate reagent in the well prior to reading.
- Combined with another reagent cell.
- Not needed with all the various positive reactions.

Microgen Bioproducts Limited, 1 Adelaide Way, Chesham Surrey GU14 0JF UK

© 2004 - 12