

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



DETERMINACIÓN DE COLIFORMES Y *Escherichia coli* EN ENSALADAS FRESCAS  
COMERCIALIZADAS EN ESTABLECIMIENTOS DEL “CENTRO HISTÓRICO” DE SAN  
SALVADOR

TRABAJO DE GRADO  
MODALIDAD TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

PRESENTADO POR  
JOSUÉ ISAÍ DELGADO MENJÍVAR  
ANDREA ABIGAIL VIDES MARTÍNEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE  
LICENCIADO(A) EN QUÍMICA Y FARMACIA

NOVIEMBRE 2024

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO JUAN ROSA QUINTANILLA

SECRETARIO GENERAL

LICENCIADO PEDRO ROSALÍO ESCOBAR CASTANEDA

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANA

MAESTRA NANCY ZULEYMA GONZÁLEZ SOSA

SECRETARIA

LICENCIADA EUGENIA SORTO LEMUS

DIRECCIÓN GENERAL DE PROCESOS DE GRADO

DIRECTORA GENERAL (AD-HONOREM)

MAESTRA KATIA LISSETTE MARTÍNEZ DE PALACIOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN SALUD (CENSALUD)

LICENCIADO CARLOS ALBERTO BUENDÍA RIVAS

TRIBUNAL EVALUADOR

ASESORA DE ÁREA EN MICROBIOLOGÍA

DOCTORA TANIA ETHEL CUADRA ZELAYA

ASESORA

LICENCIADA ZENIA IVONNE ARÉVALO DE MÁRQUEZ

DOCENTE ASESOR

MAESTRO GUILLERMO EMILIO ALVARENGA MARROQUÍN

## **DEDICATORIA**

A Dios todopoderoso por brindarme sabiduría, entendimiento, haberme guiado y darme además de fortaleza y confianza, la inteligencia necesaria para lograr mis propósitos y así poder culminar exitosamente mis estudios y por permitirme tener el respaldo de mi familia en todo momento.

A mi madre y abuela, que a lo largo de mi vida me han apoyado, motivado y han dado todo por mí, siempre han estado en los momentos más difíciles dándome ánimos, consejos y apoyo, sobre todo en esta etapa tan importante de mi formación académica. Este logro es un reflejo del incansable esfuerzo que han invertido para brindarme una educación sólida. Cada sacrificio que han hecho, cada día de trabajo duro y cada decisión que tomaron en mi nombre son el fundamento de mi éxito. Gracias por ser los faros en mi vida, por iluminar el camino hacia el conocimiento y por inculcarme la importancia del trabajo duro y la educación.

A mi hijo, quien ha sido mi mayor motivación para nunca rendirme y poder seguir adelante con mis estudios y poder culminar esta etapa de mi vida, y así ser un buen ejemplo para él.

A mis amigos que me brindaron siempre su apoyo y su ayuda para poder desarrollar este trabajo de graduación y siempre estuvieron conmigo en los momentos más difíciles a lo largo de la carrera.

Al Licenciado Guillermo Castillo, cuyo legado de sabiduría y pasión por la educación siempre será recordado. A través de su enseñanza y dedicación, dejó una huella imborrable en mi educación y en mi vida. Este logro es un tributo a su memoria y un recordatorio constante de su impacto en quienes tuvimos el privilegio de conocerlo.

Andrea Vides

## ÍNDICE GENERAL

	Pág. N°
<b>RESUMEN</b>	
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>1.0 INTRODUCCIÓN</b>	13
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>2.0 OBJETIVOS</b>	16
2.1 Objetivo general	16
2.2 Objetivos específicos	16
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>3.0 MARCO TEÓRICO</b>	18
3.1. Generalidades de una ensalada	18
3.2. Tipos de ensaladas	18
3.3. Hortalizas principales que constituyen una ensalada	19
3.3.1. Aceituno	19
3.3.2. Aguacate	19
3.3.3. Cebolla	20
3.3.4. Chile verde	20
3.3.5. Lechuga	20
3.3.6. Pepino	21
3.3.7. Tomate	21
3.3.8. Zanahoria	21
3.4. Enfermedades de Transmisión Alimentaria (ETA)	21
3.4.1. Síntomas de una intoxicación por alimentos	23
3.5. Microorganismos más frecuentes que generan ETAS	23
3.5.1. Salmonella	23
3.5.2. <i>Escherichia coli</i>	24
3.5.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	24
3.5.4. <i>Clostridium perfringens</i>	24
3.5.5. Shigella	25

3.5.6. <i>Campylobacter</i>	25
3.5.7. <i>Clostridium botulinum</i>	25
3.5.8. Otras fuentes de intoxicación por alimentos.	26
3.6. Coliformes en alimentos	26
3.7. <i>Escherichia coli</i>	27
3.8. Cepas de importancia en Salud Pública	28
3.9. Epidemiología de <i>Escherichia coli</i>	30
3.10. Detección microbiológica de <i>Escherichia coli</i>	32
3.11. Buenas Prácticas de Higiene en la Preparación de Alimentos	33
3.12. Logística, transporte y almacenamiento de alimentos en Establecimientos de Comida Rápida	34
3.13. Requisitos para la Venta de Comida en Establecimientos de Comida Rápida	35
<b>CAPÍTULO IV</b>	
<b>4.0 DISEÑO METODOLÓGICO</b>	39
4.1. Tipo de Estudio	39
4.2. Investigación bibliográfica	40
4.3. Investigación de campo	41
4.3.1. Universo	41
4.3.2. Muestra	41
4.3.3. Diseño y Tamaño de la Muestra	41
4.4. Parte Experimental	46
4.4.1. Recolección de las muestras	46
4.4.2. Evaluación del Grado de Aplicación de Buenas Prácticas Higiénicas en la Dispensación de Ensaladas	47
4.4.3. Aislamiento y detección de aislamiento presuntivo	47
4.4.4. Preservación en crioviales de colonias presuntivas	48
4.4.5. Pruebas complementarias para <i>E. coli</i>	48
4.4.6. Prueba API 20 E <sup>TM</sup>	49
4.4.6.1. Preparación de la galería	49
4.4.6.2. Preparación del inóculo	50
4.4.6.3. Inoculación de la galería	50
4.4.6.4. Lectura de la galería	51

4.4.6.5. Interpretación de la galería	52
4.4.7. Estandarización de Microorganismos	52
4.4.8. Verificación del recuento de los microorganismos en la suspensión estandarizada	53

## **CAPÍTULO V**

5.0 RESULTADOS	56
5.1 Identificar el grado de aplicación de las Buenas Prácticas en el manejo y dispensación de ensaladas frescas a través de una hoja de cotejo en diversos establecimientos de comida rápida	56
5.1.1 Evaluación del grado de aplicación en el manejo y dispensación de ensaladas frescas de los diferentes establecimientos	56
5.2 Recuento de Coliformes Totales y detección presuntiva de <i>Escherichia coli</i> a través de medios de cultivo selectivos en ensaladas frescas comercializadas en establecimientos de comida rápida en el “Centro Histórico” de San Salvador	61
5.3 Confirmación de <i>Escherichia coli</i> a través de pruebas bioquímicas API 20E en aislamientos presuntivos	69

## **CAPÍTULO VI**

6.0 CONCLUSIONES	76
------------------	----

## **CAPÍTULO VII**

7.0 RECOMENDACIONES	79
---------------------	----

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## **ANEXOS**

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura N°</b>		<b>Pág. N°</b>
1	Gráfico del porcentaje de cumplimiento de las Buenas Prácticas en el manejo y dispensación de ensaladas frescas por estrato.	60
2	Resultados de muestras en Agar VRBA-MUG sin exposición a la luz uv y con exposición a la luz uv.	64
3	Comparación de los resultados de la galería API 20E para la muestra 20240115-26 y el control positivo <i>E. coli</i> ATCC 8739.	70
4	Gráfico de número de muestras positivas con presencia de diversas bacterias frente a muestras con presencia de coliformes en cada estrato.	72

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°		Pág. N°
1	Características de algunos brotes epidémicos causados por <i>E. coli</i> diarreogénicas.	31
2	Definición y medición de variables por objetivo específico.	40
3	Establecimientos por estrato.	42
4	Porcentaje de representatividad por estrato.	43
5	Cantidad de establecimientos muestreados por estrato.	44
6	Cantidad de muestras extraídas por cada establecimiento seleccionado de cada estrato.	45
7	Cantidad de muestras procesadas por estrato.	45
8	Tiempo y frecuencia de muestreo en los establecimientos.	46
9	Medios de cultivo utilizados en las pruebas complementarias para <i>E. coli</i> .	49
10	Resumen de los resultados obtenidos mediante la guía de observación de los diferentes establecimientos inspeccionados.	56
11	Porcentaje de cumplimiento de Buenas Prácticas en el manejo y dispensación de ensaladas frescas en los establecimientos por estratos muestreados.	59
12	Resultados obtenidos de recuentos de Coliformes Totales en Agar VRBA-MUG.	61
13	Resultados en diferentes medios de cultivo selectivos para <i>Escherichia coli</i> de colonias aisladas de las muestras en agar VRBA-MUG.	65
14	Resultados obtenidos en la identificación con API 20E.	72

## ÍNDICE DE ANEXOS

### Anexo N°

- 1 Delimitación centro histórico San Salvador.
- 2 Etiqueta para identificación de muestras.
- 3 Evaluación de Buenas Prácticas Higiénicas.
- 4 Esquema de realización del análisis de ensaladas frescas.
- 5 Esquema de Criopreservacion.
- 6 Características positivas de *E. coli* en diferentes medios de cultivo.
- 7 Identificación bioquímica.
- 8 Tabla de lectura.
- 9 Hoja de resultados.
- 10 Estandarización de microorganismos.
- 11 Recuento de microorganismos.
- 12 Hojas de resultados de las pruebas API 20E.
- 13 Perfil numérico de cada muestra, lectura de bionúmeros con APIWEB.
- 14 Procesamiento de las muestras.
- 15 Hoja de cotejo utilizada en los diferentes establecimientos.
- 16 Agua Peptonada Bufferada.
- 17 VRBA-MUG.
- 18 Agar TSA.

## RESUMEN

Las ensaladas son una parte esencial de la alimentación y la calidad microbiológica es fundamental al momento de consumir alimentos. Las enfermedades transmitidas por alimentos son provocadas por microorganismos como *Escherichia Coli*, mesófilos, coliformes totales y coliformes fecales. Por lo que se realizó la investigación para detectar coliformes, *Escherichia coli*, y verificar el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura.

Se evaluaron ensaladas frescas dispensadas en establecimientos del Centro Histórico del Distrito de San Salvador en el periodo comprendido entre diciembre de 2023 y febrero de 2024 en la que se evaluaron las condiciones higiénicas de cada establecimiento visitado por medio de una hoja de cotejo con parámetros a evaluar tomados del RTCA 67.01.33:06. Los análisis fueron realizados en los Laboratorios de Microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud de la Universidad de El Salvador.

Los resultados indican que en las muestras de 36 ensaladas de vegetales frescos analizadas todas tienen presencia de Coliformes ya que presentan colonias rojas con precipitado en agar VRBA-MUG sin embargo no se detectó la presencia de *Escherichia Coli* porque no presentaron fluorescencia cuando se expuso la muestra a luz ultravioleta. En cuanto a las Buenas Prácticas Higiénicas en los establecimientos se encontró que 3 de las 4 zonas muestreadas cumplen con el criterio de calidad con porcentajes de 94.2%, 98.55% y 100.0% pero una de estas zonas no alcanzó el porcentaje mínimo para cumplir con el requisito de calidad quedando con 78.26%.

Por tanto, se determina que las ensaladas frescas que se distribuyen en el Centro Histórico de San Salvador cumplen con los límites de registro y vigilancia para *Escherichia coli* según el RTCA 67.04.50:17 y con los requisitos de Buenas Prácticas de Manufactura del RTCA 67.01.33:06.

## **CAPÍTULO I**

## 1.0 INTRODUCCIÓN

Las ensaladas frescas son un tipo de alimento que las personas incluyen dentro de su dieta alimentaria, estos aportan muchos nutrientes que son importantes para mantener una buena salud y que serán de beneficio si son preparadas en condiciones higiénicas, también es importante mencionar que los vegetales que componen estas ensaladas deben tener una detallada vigilancia desde la cosecha, almacenaje, traslado y dispensación en lugar donde se comercializan, debido a que, cualquiera de estas etapas que no se controle de la mejor manera puede llegar a afectar la calidad de la ensalada y con ello la salud de las personas que las consumen.

La calidad de los alimentos es algo sumamente variable, ya que la higiene que hay en cada establecimiento donde se elaboren ensaladas frescas, es una de las causas para que estos alimentos contaminados puedan ser causantes de enfermedades diarreicas debido a microorganismos patógenos que se encuentran esporádicamente en hortalizas por malas prácticas agrícolas, dentro de estos microorganismos patógenos podemos mencionar la *Escherichia coli*.

*Escherichia coli* es una bacteria presente frecuentemente en el intestino de organismos de sangre caliente. La mayoría de las cepas son inocuas, pero algunas pueden causar graves intoxicaciones alimentarias. Aunque la mayoría de los casos remite espontáneamente la enfermedad puede llegar a poner en peligro la vida, por ejemplo cuando da lugar al Síndrome Hemolítico Urémico, especialmente en niños pequeños y ancianos.

Por lo que, en la presente investigación se identificó el grado de cumplimiento de las Buenas Prácticas en el manejo y dispensación de las ensaladas frescas a través de una lista de verificación en los establecimientos donde se tomaron las muestras. Posteriormente se determinó la presencia de *Escherichia coli* en las ensaladas frescas comercializadas en establecimientos de comida rápida del “Centro Histórico” de San Salvador mediante un muestreo aleatorio simple.

Las muestras recolectadas fueron procesadas en los laboratorios de Microbiología y Biotecnología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador, donde se realizó un preenriquecimiento de la muestra, recuento y aislamiento de *Escherichia coli* a través de medios de cultivo selectivos y diferenciales y se realizó la identificación bioquímica a través de pruebas bioquímicas API 20E comparándolas con una cepa control positivo *Escherichia coli* ATCC 8739 y control negativo de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031. Esta etapa fue desarrollada en el periodo comprendido entre diciembre de 2023 y febrero de 2024 dentro de los límites geográficos del “Centro Histórico” de San Salvador, el cual fue seccionado en 4 estratos según puntos cardinales (Norte, Sur, Este y Oeste) para facilitar el muestreo.

Con los resultados obtenidos se demostró la ausencia de *Escherichia coli* en este tipo de alimentos y con ello se verificó el grado de cumplimiento de las Buenas Prácticas en el manejo y dispensación de este tipo de alimentos.

## **CAPÍTULO II**

## **2.0 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Determinar la presencia de coliformes y *Escherichia coli* en ensaladas frescas comercializadas en establecimientos del “Centro Histórico” de San Salvador.

### **2.2 Objetivos específicos**

- 2.2.1 Identificar el grado de aplicación de las Buenas Prácticas en el manejo y dispensación de ensaladas frescas a través de una hoja de cotejo en diversos establecimientos de comida rápida.
- 2.2.2 Realizar el recuento de Coliformes Totales y detección presuntiva de *Escherichia coli* a través de medios de cultivo selectivos en ensaladas frescas comercializadas en establecimientos de comida rápida en el “Centro Histórico” de San Salvador.
- 2.2.3 Confirmar la presencia de *Escherichia coli* a través de pruebas bioquímicas API 20E en aislamientos presuntivos.

## **CAPÍTULO III**

### **3.0 MARCO TEÓRICO**

#### **3.1. Generalidades de una ensalada**

Una ensalada es un plato que combina dos o más hortalizas, verduras o legumbres, que pueden utilizarse crudas o cocidas, dependiendo de la preparación, los cuales suelen condimentarse y/o se le pueden agregar aderezos con diferentes ingredientes. Por lo general, una ensalada es una comida que se considera saludable y los nutricionistas recomiendan que se incluya dentro de una dieta, aunque sus características van a depender de la manera en que son preparadas. Existe una gran variedad de ensaladas. Hay quienes las consumen como plato principal, pero lo más común es que se consuman como acompañamiento o guarnición.<sup>1</sup>

Las ensaladas pueden incluir: cereales, hongos, frutas, quesos, frutos secos y carnes. En cuanto a los condimentos o aderezos que suelen ser de mayor uso, podrían mencionarse algunos como: sal, pimienta, vinagre y aceite. Específicamente, los componentes más habituales de una ensalada son: lechuga, tomate, cebolla, pepino, zanahoria, entre otros. La elección de uno u otro suele vincularse a las tradiciones gastronómicas de cada región.<sup>1</sup>

#### **3.2. Tipos de ensaladas**

Muchas ensaladas tienen una identidad de acuerdo con cada región de donde provienen. Entre algunos tipos, podemos mencionar la ensalada rusa o ensalada Olivier, que suelen prepararse con papas, guisantes, zanahoria o mayonesa.

La ensalada Cesar incluye lechuga, pan tostado, huevo, queso y anchoas, entre otros ingredientes. Por su parte, la ensalada Waldorf por lo general contiene apio, manzana y nueces; ingredientes como tomates, albahaca, mozzarella y aceite de oliva son ingredientes de la ensalada caprese. En el medio oriente, en tanto nació la ensalada tabule o tabbule, una ensalada que se realiza con trigo, tomate, perejil y jugo de limón.<sup>1</sup>

La gran mayoría de las ensaladas se sirven frías o con hortalizas usualmente crudas o sin mayor cocimiento, como lo son en nuestra región, pero de una manera breve podemos decir que hay

algunas excepciones. Las ensaladas tibias, por ejemplo, pueden combinar berenjena, calabazas (zucchini) y espárragos.

En Alemania, es afamada la ensalada de papas o Kartoffelsalat, que se consume caliente. La receta depende de la zona, aunque suele hacerse con papas hervidas, tocino y cebolla.<sup>1</sup>

### 3.3. Hortalizas principales que constituyen una ensalada

Las verduras y hortalizas son la parte comestible de una planta entre las que se incluyen hojas, tallos, raíces, tubérculos, bulbos, flores y semillas. Los tejidos vegetales, con excepción de ciertas semillas son pobres en proteínas. Por su parte, fibra, almidón, algunas vitaminas, minerales y ciertos lípidos son sus componentes principales. A continuación, se detalla información sobre cada uno de los elementos que forman parte de una ensalada fresca, los cuales son los principales componentes de las ensaladas en estudio.<sup>1</sup>

#### 3.3.1. Aceituno

Nombre científico: *Simarouba glauca*.

- Distribución: Desde Florida hasta Panamá.
- Usos: Los frutos son comestibles, pero de baja calidad. La corteza y las flores son fuentes de taninos.
- Propiedades: antioxidante, antimicrobiano.
- Parte comestible: frutos maduros, en una ensalada se utilizan previamente cocinados.<sup>2</sup>

#### 3.3.2. Aguacate

Nombre científico: *Persea americana*.

- Distribución: originario de México, Centroamérica, caribe y países tropicales.
- Usos: afrodisiaco, arte culinario, fabricación de aceites y cosméticos.<sup>3</sup>

- Propiedades: diurético, emenagogo, anti icterico, antibacterial, anti disentérico para heridas y llagas, diurético, inflamaciones bronquiales.
- Parte comestible: fruto maduro, el cual se consume crudo.<sup>3</sup>

### 3.3.3. Cebolla

Nombre científico: *Allium cepa*

- Distribución: Mundial.
- Usos: gastronómicos.
- Propiedades: antiinflamatorio, fungicida, antibacteriano.
- Parte comestible: bulbo, se puede consumir crudo o cocinado dependiendo de la gastronomía local.<sup>4</sup>

### 3.3.4. Chile verde

Nombre científico: *Capsicum annuum*

- Distribución: Mesoamérica y Asia.
- Usos: gastronómicos.
- Propiedades: antihemorroidal, antirreumático, aperitivo.
- Parte comestible: frutos, se pueden comer crudos o cocinados dependiendo de la gastronomía local.<sup>5</sup>

### 3.3.5. Lechuga

Nombre científico: *Lactuca sativa*

- Distribución: desde el Mar Mediterráneo hasta Siberia, Europa occidental, Asia y América.
- Usos: gastronómicos.
- Propiedades: ansiolítico y afrodisiaco.
- Parte comestible: hojas, normalmente se come cruda, como ingrediente de ensaladas y otros platos.<sup>6</sup>

### 3.3.6. Pepino

Nombre científico: *Cucumis sativus*

- Distribución: Asia, Europa occidental y América.
- Usos: culinarios.
- Propiedades: aporta fibra, pequeñas cantidades de vitamina C, provitamina A, vitamina E, y en proporciones menores vitaminas del grupo B como Folatos, B1, B2 y B3.<sup>7</sup>
- Parte comestible: fruto que se consume crudo.<sup>8</sup>

### 3.3.7. Tomate

Nombre científico: *Solanum lycopersicum*

- Distribución: cosmopolita debido a su cultivo.
- Usos: gastronómicos.
- Propiedades: antioxidante, salud visual.
- Parte comestible: frutos maduros, se pueden consumir crudos o cocinados.<sup>9</sup>

### 3.3.8. Zanahoria

Nombre científico: *Daucus carota*

- Distribución: Asia, Europa, América.
- Usos: gastronómicos.
- Propiedades: antioxidante, salud visual.
- Parte comestible: raíz, se consume cruda o cocinada según la gastronomía local.<sup>10</sup>

## 3.4. Enfermedades de Transmisión Alimentaria (ETA)

Después que los alimentos salen de la fábrica o industria donde han sido procesados o tratados tecnológicamente, son almacenados y manejados durante el transporte en los almacenes al por mayor y al por menor, donde posteriormente se preparan dichos alimentos. El almacenamiento o la manipulación no adecuados de los alimentos pueden ser causa de la alteración de estos

productos y de enfermedades al consumidor. Factores que contribuyen a la presentación de enfermedades transmitidas por alimentos.

Aunque los alimentos se contaminan en algunas ocasiones en las fases de producción y de procesado, es más frecuente que esta contaminación se produzca en fases posteriores por un mal manejo o mantenimiento durante el transporte, el almacenamiento y durante la preparación. La mayoría de las descripciones de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos señalan como causas los defectos o practicas no correctas en los establecimientos donde se sirven o se preparan los alimentos.<sup>11</sup>

Los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos suceden como consecuencia de una serie de acontecimientos que difieren algo con cada agente etiológico, pero que se inician con la contaminación del alimento por el agente infeccioso o toxigénico, correspondiente. Después de la contaminación con bacterias toxigénicas o mohos, el alimento debe ofrecer condiciones adecuadas para el crecimiento del microorganismo y ha de ser mantenido o almacenado a temperaturas adecuadas, para tal crecimiento durante el tiempo suficiente para que se originen números elevados de microorganismos y se elabore una cantidad de toxinas capaz de ocasionar enfermedades.<sup>12</sup>

Un brote de ETA es definido como un incidente en el que dos o más personas presentan una enfermedad semejante después de la ingestión de un mismo alimento, y los análisis epidemiológicos apuntan al alimento como el origen de la enfermedad. Los brotes pueden involucrar números diferenciados de casos. Los alimentos involucrados con más frecuencia en las epidemias y casos de ETA son aquellos de origen animal. Para que ocurra una ETA, el patógeno o sus toxinas deben estar presentes en el alimento. Sin embargo, la sola presencia del patógeno no significa que la enfermedad ocurrirá. En la mayoría de los casos de ETA:

- El patógeno debe estar presente en cantidad suficiente como para causar una infección o para producir toxinas.
- El alimento debe ser capaz de sustentar el crecimiento de los patógenos, o sea, debe presentar características intrínsecas que favorezcan el desarrollo del agente.

- El alimento debe permanecer en la zona de peligro de temperatura durante tiempo suficiente como para que el organismo patógeno se multiplique y/o produzca toxina. Otras condiciones extrínsecas deben prevalecer para que esta multiplicación y/o producción de toxina sea favorecida.
- Debe ingerirse una cantidad (porción) suficiente del alimento conteniendo el agente, para que la barrera de susceptibilidad del individuo sea sobrepasada.<sup>12</sup>

Las ETA pueden clasificarse en infecciones, intoxicaciones o infecciones mediadas por toxina. La infección transmitida por alimentos es una enfermedad que resulta de la ingestión de alimentos conteniendo microorganismos patógenos vivos, la intoxicación causada por alimento ocurre cuando las toxinas producidas por bacterias o mohos están presentes en el alimento ingerido o elementos químicos en cantidades que afecten la salud. Las toxinas generalmente no poseen olor o sabor y son capaces de causar la enfermedad incluso después de la eliminación de los microorganismos.<sup>12</sup>

#### 3.4.1. Síntomas de una intoxicación por alimentos

Los síntomas de la intoxicación por alimentos se suelen parecer a los de otras enfermedades intestinales: calambres abdominales, náuseas, vómitos, diarrea y fiebre. Pero si otras personas que han consumido el mismo alimento tienen los mismos síntomas, lo más probable es que el problema sea una intoxicación por alimentos.<sup>12</sup>

### 3.5. Microorganismos más frecuentes que generan ETAS

#### 3.5.1. Salmonella

La bacteria (hay muchos tipos) es una de las principales causas de intoxicación por alimentos. Los alimentos contaminados con mayor frecuencia son la carne cruda (incluido el pollo), los huevos crudos o poco cocidos y la leche sin pasteurizar. Afortunadamente, la salmonella muere cuando los alimentos se cocinan bien. Los síntomas causados por la infección por salmonella generalmente comienzan entre seis y 48 horas después de comer y pueden durar siete días.<sup>13</sup>

### 3.5.2. *Escherichia coli*

La *Escherichia coli* son un grupo de bacterias que normalmente viven en los intestinos de niños y adultos. Algunas cepas de estas bacterias pueden causar enfermedades relacionadas con los alimentos. La carne molida de res poco cocida es una fuente común de *E. coli*, aunque los productos frescos crudos y el agua contaminada han causado algunos brotes. Los síntomas de una infección por *E. coli* generalmente incluyen diarrea (que puede variar de leve a grave), dolor abdominal y, en algunos casos, náuseas y vómitos.

Algunos brotes de *E. coli* han sido graves e incluso han causado muertes en casos poco comunes. En su mayoría no causan problemas, pero algunos tipos pueden producir enfermedades y causar diarrea. Uno de ellos causa la diarrea del viajero. El peor tipo de *E. coli* causa una diarrea hemorrágica y a veces insuficiencia renal y hasta la muerte, en el peor de los casos. Esto, en general, ocurre en niños y en adultos con sistemas inmunitarios debilitados.<sup>13</sup>

### 3.5.3. *Staphylococcus aureus*

La contaminación por esta bacteria es una de las principales causas de intoxicación por alimentos. Estas bacterias normalmente causan infecciones de la piel, tales como granos o forúnculos. Se pueden transmitir cuando los alimentos son manipulados por alguien que está infectado. Cuando los alimentos no se mantienen lo suficientemente calientes, la bacteria se multiplica y produce una toxina que la cocción común no destruirá. Los síntomas comienzan de una a seis horas después de comer el alimento contaminado y generalmente duran alrededor de un día.<sup>13</sup>

### 3.5.4. *Clostridium perfringens*

Este es un tipo de bacteria que se suele encontrar en el suelo, las aguas residuales y los intestinos de humanos y animales. Por lo general, alguien que manipula los alimentos lo transmite al alimento mismo, donde se multiplica y produce su toxina. Los alimentos más frecuentemente involucrados son la carne de res, las aves, las

salsas, el pescado, los guisados, los estofados y los burritos de frijoles cocidos. Los síntomas de este tipo de intoxicación comienzan de seis a 24 horas después de comer y pueden durar de uno a varios días.<sup>13</sup>

### 3.5.5. *Shigella*

Las shigellosis, son infecciones intestinales causadas por uno de los muchos tipos de bacterias *Shigella*. Estas bacterias pueden transmitirse a través de alimentos y agua potable contaminados, así como también a través de una higiene deficiente. El microorganismo invade el revestimiento del intestino y puede provocar síntomas tales como diarrea, fiebre y calambres. La shigellosis y sus síntomas generalmente comienzan de uno a tres días después de la exposición y mejoran dos o tres días después del inicio de los síntomas.<sup>13</sup>

### 3.5.6. *Campylobacter*

Es un tipo de bacteria que se suele encontrar en el pollo crudo o poco cocido, la leche sin pasteurizar o el agua contaminada. Los niños con *Campylobacter* normalmente tienen síntomas tales como diarrea acuosa (y a veces con sangre), calambres y fiebre, entre dos y cinco días después de consumir alimentos contaminados. La infección por *Campylobacter* generalmente sigue su curso sin necesidad de un tratamiento formal, aparte de asegurarse de que deben tomarse muchos líquidos para reemplazar los que se pierden a causa de la diarrea.<sup>13</sup>

### 3.5.7. *Clostridium botulinum*

Estas bacterias normalmente se pueden encontrar en el suelo y el agua. Sin embargo, no suelen causar enfermedades porque necesitan condiciones muy especiales para multiplicarse y producir toxinas. *Clostridium botulinum* crece mejor sin oxígeno y en ciertas condiciones químicas. Esta es la razón por la que los alimentos enlatados incorrectamente se contaminan con mayor frecuencia, especialmente las verduras de baja acidez, tales como las judías verdes, el maíz, la remolacha y los guisantes.

*Clostridium botulinum* ataca el sistema nervioso y causa visión doble, párpados caídos, disminución del tono muscular y dificultad para tragar y respirar. También puede causar vómitos, diarrea y dolor abdominal. Los síntomas generalmente se desarrollan dentro de las 12 a 48 horas y pueden durar de semanas a meses. En los bebés, el período de incubación puede ser más prolongado. Sin tratamiento, puede ser fatal. Incluso con tratamiento, puede causar daño a los nervios.<sup>13</sup>

#### 3.5.8. Otras fuentes de intoxicación por alimentos.

La intoxicación por alimentos también puede ser causada por hongos venenosos, productos de pescado contaminados y alimentos con condimentos especiales. A los niños pequeños no les gusta la mayoría de estos alimentos, por lo que los comerán muy poco. Sin embargo, sigue siendo muy importante ser conscientes del riesgo.<sup>12</sup>

### 3.6. Coliformes en alimentos

Los denominados microorganismos indicadores de la calidad microbiana o indicadores de la durabilidad son organismos, o productos metabólicos de éstos, cuya presencia en determinados niveles en los alimentos se utiliza para evaluar la calidad del alimento o para predecir la durabilidad de este.

Entre los indicadores más usados se encuentran los coliformes, representados habitualmente por cuatro géneros de la familia *Enterobacteriaceae*: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella*. Se trata de un grupo de bacterias gramnegativas, aerobias y anaerobias facultativas, no formadoras de esporas, fermentadoras de la lactosa a 37 °C en 48 horas, que poseen la enzima  $\beta$ -galactosidasa, son oxidasa negativa y su forma celular es de bacilos cortos.<sup>12</sup>

Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, se los puede encontrar en el agua, el suelo y los vegetales, y forman parte de la flora intestinal de los seres humanos y de los animales de sangre caliente y fría. Los coliformes fecales relacionados a la flora intestinal presentan la particularidad de ser termotolerantes (se pueden multiplicar a 44 °C) y de fermentar la lactosa, lo que la diferencia del resto que son denominados coliformes totales. 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 caso de ingerir ese alimento podría estar expuesto a bacterias entéricas.<sup>11</sup>

*Escherichia coli* reúne las condiciones del indicador ideal de contaminación fecal: está presente universalmente en las heces y en las aguas residuales y es fácilmente detectable por métodos rápidos. Muchas cepas de *E. coli* son causantes de enfermedad en humanos y animales. Los coliformes pueden proliferar en gran cantidad de alimentos, en agua y productos lácteos. Pueden ser fácilmente destruidos por el calor utilizado en las diversas etapas de elaboración.<sup>11</sup>

### 3.7. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichia*. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea.

Para determinar el grupo patógeno al que pertenecen se desarrolló un esquema de serotipificación que continuamente varía y que actualmente tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno “O” es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O: H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular.<sup>14</sup>

*Escherichia coli* se caracteriza por ser un bacilo gram negativo, no esporulante, con producción de indol a partir de triptófano, no utiliza citrato como fuente de carbono y no produce acetoina. Asimismo, esta bacteria fermenta la glucosa y la lactosa produciendo gas. Es una bacteria mesófila, debido a que su óptimo desarrollo se encuentra entre los 35°C a 43 °C, temperatura corporal de los animales de sangre caliente, y su temperatura límite de crecimiento se sitúa alrededor de 7 °C. Por otro lado, el pH y la actividad de agua pueden influir en la proliferación de *Escherichia coli*. Las condiciones óptimas de desarrollo para estos parámetros son de 7,2 y 0,99 respectivamente. El desarrollo de *Escherichia coli* se detiene a pH inferior a 3,8 y superiores a 9,5; y a valores de actividad de agua inferiores a 0,94. Desde el punto de vista taxonómico la clasificación de *Escherichia coli* es la siguiente: <sup>14</sup>

– Phylum: *Proteobacteria*

- Clase: *Gammaproteobacteria*
- Orden: *Enterobacteriales*
- Familia: *Enterobacteriaceae*
- Género: *Escherichia*
- Especie: *Escherichia coli*

Esta bacteria puede llegar a medir entre 1 hasta 3 micras y posee capacidad de movimiento a través de flagelos (antígeno H), los flagelos son estructuras filiformes que pueden medir varias micras. También posee fimbrias (antígeno F) que son estructuras más pequeñas, que a diferencia de los flagelos no tienen movilidad, pero por ser de naturaleza proteica, posee propiedades antigénicas y hemoaglutinantes. Asimismo, posee una pared celular (antígeno O) que está compuesta por lipopolisacáridos, esta pared es altamente antigénica y con capacidad de excretar endotoxinas. Finalmente, *Escherichia coli* posee una capsula (antígeno K) que le otorga protección contra la fagocitosis y la acción inmunitaria primaria.<sup>14</sup>

### **3.8. Cepas de importancia en Salud Pública.**

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) .
- Adherencia difusa (DAEC).<sup>15</sup>

*Escherichia coli* Enterotoxígena (ECET) es causa común de la “diarrea del viajero” y agente etiológico importante de diarrea en lactantes de los países en desarrollo. Factores específicos de colonización de la ECET promueve en humanos la adherencia a las células epiteliales del intestino delgado. La profilaxis antimicrobiana puede ser eficaz, pero a veces incrementa la resistencia bacteriana a los antibióticos y tal vez no debe recomendarse en todos los casos. Una vez presente la diarrea, el tratamiento con antibióticos reduce de manera eficaz la duración de la enfermedad.<sup>16</sup>

*Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC) se escribió y relacionó a EHEC con brotes caracterizados por dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre y poco o nada de fiebre, cuadro al que se le llamó colitis hemorrágica (CH) y que era debido a la ingestión de carne cruda o mal cocida. La bacteria aislada de todos los casos fue *E. coli* del serotipo O157:H7.

También se ha asociado con casos aislados de síndrome urémico hemolítico (SUH) caracterizado por daño renal agudo, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática, precedida por diarrea con sangre, con la presencia en heces de *E. coli* productora de una citotoxina con actividad en células Vero, por lo que se le llama verotoxina (VT), y a las cepas capaces de producirla se les denominó *E. coli* verotoxigénicas (VTEC).<sup>17</sup>

*Escherichia coli* Enteroinvasora (ECEI) produce una enfermedad muy similar a la shigelosis. La enfermedad se presenta comúnmente en los niños de los países en desarrollo y en las personas quienes viajan a dichos países. Igual que la *Shigella*, las cepas de ECEI no fermentan la lactosa, o la fermentan tardíamente, y carecen de motilidad. La ECEI produce la enfermedad al invadir las células epiteliales de la mucosa intestinal.<sup>18</sup>

*Escherichia coli* Enteropatógena (ECEP) es causa importante de diarrea en los lactantes, particularmente en los países en desarrollo. La ECEP se asoció antes con brotes de diarrea en guarderías en los países desarrollados. La ECEP se adhiere a las células mucosas del intestino delgado. Los factores mediados cromosómicamente promueven

adherencia firme. Hay pérdida de las microvellosidades, formación de pedestales de actina filamentosa o estructuras calciformes, y en ocasiones, las ECEP penetran a las células mucosas.

La infección por ECEP provoca diarrea acuosa, generalmente auto limitada, pero puede ser crónica. La diarrea por ECEP se ha vinculado con múltiples serotipos específicos de *Escherichia coli*; las cepas se identifican mediante la tipificación del antígeno O y en ocasiones del antígeno H.<sup>18</sup>

*Escherichia coli* Enteroagregativa (ECEA) causa diarrea aguda y crónica (mayor a 14 días de duración) en personas de los países en desarrollo. Estos organismos también son causantes de enfermedades producidas por alimentos contaminados, en países industrializados. Se caracteriza por su patrón de adherencia a células humanas. Cuando las defensas anormales del huésped son inadecuadas, la *Escherichia coli* puede alcanzar el torrente sanguíneo. Los recién nacidos a veces son muy susceptibles a la septicemia por *Escherichia coli* debido a que carecen de anticuerpos IgM.<sup>19</sup>

### **3.9. Epidemiología de *Escherichia coli***

Se define como brote epidémico la presencia de 2 o más personas que presentan la misma enfermedad tras estar en contacto con una misma fuente de infección, o bien, si en un periodo de tiempo se registra un número inusual de los casos de enfermedad con características clínico-epidemiológicas comunes.

Ante la sospecha de un brote es importante recopilar los datos de los pacientes que permiten tener pistas epidemiológicas y orientar al origen de la infección, como antecedentes de viajes recientes, consumo de alimentos y agua, fecha de aparición de los síntomas, etc.<sup>20</sup>

En general, los brotes epidémicos causados por cepas de *E. coli* diarreagénicas se asocian con el consumo de alimentos o agua contaminados. A pesar de las evidencias clínicas y epidemiológicas en muchos casos no se logra identificar con certeza el origen de la infección, es decir, conseguir el aislamiento microbiológico de patógeno causante.

**Tabla N°1:** Características de algunos brotes epidémicos causados por *E. coli* diarreogénicas.<sup>20</sup>

<b>Fecha, lugar</b>	<b>Fuente de infección</b>	<b>Población afectada</b>	<b>Microorganismo</b>
<b>Italia, ciudad de Civitanova Marche. Febrero-marzo 2006</b>	No se identificó con certeza. Presuntamente queso hecho con leche no pasteurizada de oveja y servido en un restaurante local.	15 personas con síntomas durante el primer brote y 16 durante el segundo.	ECEA Serotipo O92:H33
<b>Alemania. Mayo-junio 2011</b>	No identificado. Se sospechan brotes de soja como fuente de infección.	3.222 personas afectadas, de los cuales 810 (25%) desarrollaron SUH y 39 fallecieron. La edad media de la población afectada fue de 43 años.	ECEA productora de toxina Shiga. Serotipo O104:H4
<b>Bélgica, provincia de Antwerp. Septiembre- Octubre 2007.</b>	Helado preparado con leche pasteurizada en una granja local.	12 casos identificados, de los que 5 niñas (entre 2-11 años) desarrollaron SUH.	ECEH2 serotipos: O145:H28 y O26:H11
<b>EE. UU., Connecticut. Junio-Julio 2008.</b>	Leche sin pasteurizar proveniente de una granja de productos lácteos.	14 casos identificados (7 confirmados) de los que 3 personas desarrollaron SUH.	ECEH Serotipo O157:NM
<b>EE. UU., Oklahoma. Agosto 2008.</b>	No identificado con certeza. Asociación con la comida en un restaurante tipo buffet.	341 caso detectado. 156 personas con infección confirmada o probable de los que 26 desarrollaron SUH y 1 persona falleció. La edad media de los pacientes hospitalizados fue de 56,5 años.	ECEH Serotipo O111
<b>EE. UU., Illinois. Septiembre 2004.</b>	No identificado con certeza. Asociación de brote con el consumo de ensalada de pepinos y de pasta en una comida de empresa.	111 personas afectadas. La edad media fue de 25 años.	ECET Varios serotipos.
<b>Japón, ciudad de Niigata. Junio 2007.</b>	No identificado.	Niños de 6º grado de tres escuelas primarias que desarrollaron cuadro clínico después de un viaje escolar.	ECEP Varios serotipos. Serotipo predominante:(NT):H21

Diferentes entidades sanitarias (USDA Food Safety, Center for Disease Control and Prevention) han desarrollado un conjunto de medidas para reducir la colonización/infección por *E. coli* diarreagénicas y con ello los potenciales brotes epidémicos. Aunque estas normas se han descrito fundamentalmente para ECEH se pueden extrapolar a otros *E. coli* diarreagénicas. Las enfermedades infecciosas entéricas y fundamentalmente las causadas por los diversos patotipos de *E. coli* siguen siendo una prioridad en el ámbito de salud pública a nivel mundial.<sup>20</sup>

### **3.10. Detección microbiológica de *Escherichia coli***

Según el Manual Bacteriológico Analítico capítulo 4 “Enumeración de *Escherichia coli* y Bacterias coliformes” existen varios métodos avalados para la detección de coliformes, el método convencional que se basa en la fermentación de la Lactosa y una variación a esa prueba que utiliza sustratos fluorogénicos para detectar *E. coli*.

El ensayo LST-MUG se basa en la actividad enzimática de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUD), que escinde el sustrato 4-metilumbeliferil  $\beta$ -D-glucurónido (MUG), para liberar 4-metilumbeliferona (MU). Cuando se expone a la luz ultravioleta de onda larga (365 nm), la MU exhibe una fluorescencia azulada que se visualiza fácilmente en el medio o alrededor de las colonias. Más del 95% de *E. coli* produce GUD, incluidas las cepas anaerogénicas (que no producen gases). Una excepción es la *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) del serotipo O157:H7, que es consistentemente negativa a GUD. La falta de fenotipo GUD en O157:H7 se utiliza a menudo para diferenciar este serotipo de otras *E. coli*, aunque existen variantes GUD positivas de O157:H7. La producción de GUD por otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* es rara, a excepción de algunas shigellae (44-58%) y salmonellae (20-29%). Sin embargo, la detección inadvertida de estos patógenos mediante ensayos basados en GUD no se considera un inconveniente desde una perspectiva de salud pública. La expresión de la actividad de GUD se ve afectada por la represión de catabolitos, por lo que en ocasiones, algunas *E. coli* son GUD-negativas, aunque portan el gen *uid A* (*gus A*) que codifica la enzima. Sin embargo, en la mayoría de los análisis, alrededor del 96% de los aislamientos de *E. coli* analizados son GUD-positivos sin necesidad de inducción enzimática. La MUG se puede incorporar en casi cualquier medio para su uso en la detección de *E. coli*. Pero algunos medios como EMB, que contienen componentes fluorescentes, no son adecuados, ya que enmascararán la fluorescencia de MU.

Cuando se incorpora MUG al medio LST, los coliformes se pueden enumerar sobre la base de la producción de gas a partir de la lactosa y *la E. coli* se identifica presuntivamente por fluorescencia en el medio bajo luz UV de onda larga, por lo que es capaz de proporcionar una identificación presuntiva de *E. coli* dentro de las 24 h.<sup>21</sup>

### **3.11. Buenas Prácticas de Higiene en la Preparación de Alimentos**

Las Buenas Prácticas de Manufactura son regulaciones publicadas por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) para proveer los criterios de conformidad con el Acta Federal sobre alimentos, drogas y cosméticos (FD&C ACT), requiriendo que todos los alimentos de consumo humano estén libres de toda adulteración.<sup>22</sup>

Vestuario:

- Se debe dejar la ropa y los zapatos de calle en el vestuario.
- No utilizar ropa de calle en el trabajo, ni se debe salir con la ropa del trabajo a la calle.
- Cuidar muy bien la ropa de trabajo y revisar que las botas utilizadas se encuentren siempre limpias.
- Utilizar calzado adecuado, cofia y guantes en caso de ser necesario.<sup>22</sup>

Higiene Personal:

- Cuidar diariamente el aseo personal.
- Mantener las uñas cortas.
- Usar el pelo recogido bajo la cofia.
- Dejar reloj, anillos, pendientes o cualquier otro elemento que pueda tener contacto con algún producto y/o equipo.
- Lavarse las manos al ingresar al sector de trabajo, después de utilizar los servicios sanitarios y después de tocar los elementos ajenos al trabajo que se está realizando.
- Las manos deben lavarse con agua caliente y jabón desinfectante, utilizando un cepillo para uñas y secándose con toallas descartables o secadores de manos automáticos.<sup>22</sup>

## Estado de Salud

- Evitar el contacto con alimentos si se tiene alguna afección de la piel, heridas, resfríos, diarrea o intoxicaciones.
- En caso de tener pequeñas heridas, cubrir las mismas con vendajes y envoltura impermeable.
- Evitar toser o estornudar sobre los alimentos o equipos de trabajo.<sup>22</sup>

## Responsabilidad

- Realizar cada tarea de acuerdo con las instrucciones recibidas.
- Leer con cuidado y atención las señales y carteles indicadores.
- Mantener los utensilios de trabajo limpios.
- Respetar los NO del sector: NO fumar, NO beber, NO comer, NO silbar.<sup>22</sup>

Atención con el producto Se debe evitar la contaminación cruzada siguiendo los siguientes consejos:

- Almacenar en lugares separados al producto y a la materia prima.
- Evitar circular desde un sector sucio a un sector limpio.<sup>22</sup>

### **3.12. Logística, transporte y almacenamiento de alimentos en Establecimientos de Comida Rápida.**

En los restaurantes pueden llegar a existir áreas de riesgo considerable para los productos que se almacenan en las bodegas de esta, por lo que se debe plantear un orden estratégico para llevar a cabo el traspaso de cada alimento que se vaya a almacenar en la cocina. En los establecimientos de comida se deben llevar a cabo planes y métodos estratégicos para el transporte de los alimentos que, aunque tengan que circular obligatoriamente por zonas de riesgo para los mismos, y que así las técnicas planteadas proporcionen métodos para que el producto no sufra daño alguno durante su transporte.<sup>23</sup>

En los determinados sitios en donde el alimento se encuentra ya listo para ser comercializado, es de suma importancia que el producto esté ubicado estratégicamente, esto a medida que si no se produce su venta en un lapso determinado, este no vaya a sufrir de daños, alteraciones o defectos en su empaque y por ende conlleve a su contaminación, además de esto hay que tomar en cuenta que debe existir una higiene completa y óptima en el lugar que vayan a ser ubicados estos productos ya que si la asepsia no es existente en dicha área el producto se ver afectado y sufrirá de defectos en su composición.<sup>23</sup>

Tomando en cuenta que se llevará a cabo el transporte de los alimentos ya aprobados para salir a la venta, es necesario que se deban tomar sus respectivas medidas de higiene y aseo del vehículo en el cual se vayan a transportar dichos alimentos, ya que si en el mismo no existe una asepsia adecuada y obligatoria que se debe tener, durante su transporte los alimentos podrán sufrir algún tipo de alteración o contaminación, esto al estar en contacto con suciedad, plagas, malos olores u otros factores que afectaran su función y composición durante este proceso, es por eso que se necesita de personal que se encargue exclusivamente de la asepsia del vehículo, para que así no existan factores que conlleven a la contaminación o descomposición de los alimentos.<sup>23</sup>

### **3.13. Requisitos para la Venta de Comida en Establecimientos de Comida Rápida**

Para la elaboración de todo alimento en los diferentes establecimientos es fundamental y obligatorio implementar las Buenas Prácticas de Manufactura, esto porque en toda la elaboración se debe implementar un control óptimo de calidad para el consumidor, tomando en cuenta cada propiedad y beneficio del alimento que se ira a comercializar, cabe recalcar que a más de esto todo debe relacionarse en gran cantidad con la higiene absoluta en la elaboración, ya que si se está en el ámbito de los alimentos debe ser estricta, ya que son personas las cuales consumirán dichos alimentos y cualquier defecto podría producir consecuencias y alteraciones en su bienestar, es por ello que se debe estar consiente a la hora de la elaboración sobre el riesgo que se podría producir al no existir una correcta implementación de las BPM.<sup>24</sup>

En El Salvador todo establecimiento que se dedique a comercializar con alimentos debe obtener un permiso especial autorizado por el Ministerio de Salud para su funcionamiento. Desde 2013 el MINSAL vio la necesidad de emitir normas para determinar las condiciones esenciales que deben tener los alimentos y bebidas destinadas al consumo público y los locales en los que se produzcan,

envasen, almacenen, distribuyan o expendan dichos artículos, así como los medios de transporte.<sup>25</sup>

Es así como nace la “Norma Técnica de Alimentos” según acuerdo No. 150 del Ministerio de Salud en el Ramo de Salud quienes consideran que: es necesario exigir la implementación de medidas sanitarias en la producción, elaboración, almacenamiento y distribución de los alimentos, para proveer al consumidor alimentos inocuos.<sup>25</sup>

La autoridad competente en El Salvador dicta los requisitos técnicos y legales que todo establecimiento de comida rápida debe cumplir con rigurosidad para otorgar el permiso de funcionamiento: los artículos del 5 al 17 se establecen las características físicas que debe cumplir el establecimiento como sus alrededores, infraestructura, pisos, paredes, techos, ventanas, puertas, iluminación, ventilación, calidad del agua, entre otros.<sup>25</sup>

En el artículo No. 18 se establecen los mecanismos para el lavado y desinfección de frutas, verduras y otras materias primas: Los alimentos crudos que se utilizan como materia prima deben lavarse y desinfectarse con métodos y productos químicos especiales para alimentos; la dosis debe ser la indicada por el fabricante. En la sala de preparación de alimentos debe mantenerse la información acerca de las concentraciones de los químicos u otros desinfectantes y los tiempos de desinfección de la materia prima. Si se usan concentraciones a base de cloro, las soluciones deben mantenerse con viñetas de información que especifiquen la fecha de preparación, vencimiento y las dosis recomendadas. Si se utiliza ozono como método de desinfección, debe mantenerse información acerca del funcionamiento del equipo, fechas de cambio de filtros y los tiempos de aplicación de la ozonización.<sup>25</sup>

La Norma Técnica de Alimentos se desglosa de la siguiente manera:

- Capítulo III (Instalaciones Sanitarias)
- Capítulo IV (Limpieza y Desinfección del Establecimiento)
- Capítulo V (Diseño de Equipos y Utensilios)
- Capítulo VI (Control de Plagas)
- Capítulo VII (Higiene del personal y Requisitos Sanitarios)
- Capítulo VIII (Materias Primas y Productos)

Los establecimientos de Comida rápida además de los requisitos generales deben cumplir con los requisitos específicos por establecimiento alimentario contemplados en el capítulo V de lo específico: dentro de estos requisitos, el artículo No. 71 establece que “Los productos crudos utilizados para elaboración de ensaladas frescas deben ser desinfectados previamente con una solución de cloro al 250 mg/ litro de producto activo por treinta minutos u otro desinfectante que cumpla con la concentración establecida”.

En caso de que los vegetales no se utilicen de inmediato, deberán almacenarse según lo indica el artículo No. 78 y No. 88 de la misma norma, el primero de los cuales indican que se debe cumplir ciertas condiciones de estiba, separación por tipo de alimentos y usar el método PEPS (Primeras Entradas, Primeras Salidas), y el segundo dice que se debe mantener el control estricto de las temperaturas de almacenaje por medio de termómetros y bitácoras en buen estado.<sup>25</sup>

Los establecimientos que se dediquen a la preparación y distribución de alimentos además de los requisitos de obligatorio cumplimiento de la Norma Técnica para obtención de la Licencia de funcionamiento también deberán cumplir con los requisitos de inspección del ente regulador en nuestro país basados en el RTCA 67.01.33:06 “Industria de Alimentos y Bebidas Procesados. Buenas Prácticas de Manufactura. Principios Generales.” El cual fue aprobado por el Comité Técnico de Normalización de los países centroamericanos. Este reglamento tiene como objeto establecer las disposiciones generales sobre prácticas de higiene y de operación durante la industrialización de los productos alimenticios a fin de garantizar alimentos inocuos y de calidad. Este reglamento proporciona una guía de inspección detallada para ser aplicada a los establecimientos correspondientes a fin de regular la actividad y garantizar alimentos seguros y de calidad para los consumidores.<sup>26</sup>

## **CAPÍTULO IV**

## 4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

### 4.1. Tipo de Estudio

- 4.1.1. Transversal: se verificó la presencia de *Escherichia coli* en muestras de ensaladas frescas comercializadas en establecimientos de comida rápida del "Centro Histórico" de San Salvador en el periodo comprendido entre los meses de diciembre de 2023 a febrero de 2024.
- 4.1.2. De campo: en la investigación se procedió a visitar las ubicaciones donde se venden ensaladas frescas en establecimientos de comida rápida seleccionados del "Centro Histórico" de San Salvador. Donde también se verificó el grado de aplicación de las Buenas Prácticas en el manejo y dispensación a través de una hoja de cotejo.
- 4.1.3. Descriptivo: se realizaron una serie de ensayos microbiológicos con las muestras de ensaladas frescas con el objetivo de realizar un recuento de coliformes y detectar la presencia de *Escherichia coli* usando medios de cultivo selectivos y pruebas bioquímicas API 20E. En el siguiente cuadro se observan las variables de cada objetivo específico y su clasificación según su tipo y como fueron medidas estas para constatar el cumplimiento del objetivo planteado.

**Tabla N° 2.** Definición y medición de variables por objetivo específico.

Objetivo específico	Variables	Tipo	Medición
<b>Identificar el grado de aplicación de las Buenas Prácticas en el manejo y dispensación de ensaladas frescas a través de una hoja de cotejo en diversos establecimientos de comida rápida.</b>	Condiciones sanitarias de almacenamiento y manipulación de las ensaladas listas para su consumo.	Cualitativo	Hoja de evaluación diseñada para determinar el grado de cumplimiento. (Ver Anexo No. 2)
<b>Realizar el recuento de Coliformes Totales y detección presuntiva de <i>Escherichia coli</i> a través de medios de cultivo selectivos en ensaladas frescas comercializadas en establecimientos de comida rápida en el “Centro Histórico” de San Salvador.</b>	Recuento de Coliformes totales y presencia o ausencia del patógeno <i>Escherichia coli</i> .	Cualitativo	Crecimiento de colonias características en medios de cultivo selectivos.
<b>Confirmar la presencia de <i>Escherichia coli</i> a través de pruebas bioquímicas API 20E en aislamientos presuntivos.</b>	Presencia o ausencia del patógeno <i>Escherichia coli</i>	Cualitativo	Resultados positivos para <i>E. coli</i> en la galería API.

Fuente: Elaboración propia.

#### 4.2. Investigación bibliográfica

Las bibliotecas en las cuales se realizó la investigación bibliográfica con las siguientes:

- Biblioteca de la Facultad de Química y Farmacia “Dr. Benjamín Orozco de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca Científica Electrónica en Línea (SciELO).
- Biblioteca Electrónica de Grupo ELSIEVER INC.
- Base de datos electrónico del Ministerio de Salud (MINSAL).

### 4.3. Investigación de campo

Se realizó una visita a los establecimientos de comida rápida del “Centro Histórico” del Distrito de San Salvador, donde se verificó el grado de cumplimiento de las BPM además de la obtención de las muestras de ensaladas frescas listas para su consumo en su empaque original, dicha recolección se llevó a cabo durante los meses de diciembre del año 2023 a febrero del año 2024.

#### 4.3.1. Universo

Está integrado por todos los establecimientos de comida rápida que venden ensaladas frescas listas para su consumo dentro del “Centro Histórico” del Distrito de San Salvador.

#### 4.3.2. Muestra

Se realizó el muestreo de 12 establecimientos de comida rápida dentro del “Centro Histórico” en el Distrito de San Salvador, donde se recolectaron un total de 36 muestras de ensaladas frescas que fueron analizadas en esta investigación.

#### 4.3.3. Diseño y Tamaño de la Muestra

En el “Centro Histórico” del Distrito de San Salvador existen actualmente 14 establecimientos de comida rápida que venden ensaladas frescas listas para su consumo. (Ver Anexo N° 1).<sup>27</sup> Se estratificaron los establecimientos, agrupándolos según su ubicación geográfica en 4 secciones o estratos (Norte, Sur, Este y Oeste), asignando un código a cada estrato de la siguiente manera:

**Tabla N° 3.** Establecimientos por estrato.

No. estrato	Nombre de estrato	Código	Establecimientos
1	NORTE	A-01	4
2	SUR	A-02	4
3	ESTE	A-03	3
4	OESTE	A-04	3
		<b>Total de establecimientos</b>	<b>14</b>

Fuente: Elaboración propia.

Para determinar la cantidad de Establecimientos a muestrear dentro del Universo se utilizó la siguiente fórmula:

$$n = \frac{NZ^2 p (1 - p)}{e^2 (N - 1) + Z^2 p (1 - p)} \quad (1)$$

Donde:

n = muestra

N= población

Z =estadístico 95%

p = población de individuos con la característica

e = error muestral permisible en la investigación

Entonces:

$$n = \frac{(14)(1.96)^2(0.05)(1 - 0.05)}{(0.05)^2(14 - 1) + (1.96)^2(0.05)(1 - 0.05)}$$

$$n = 12$$

Esto indica que del total de establecimientos que componen el universo (14 establecimientos) se realizaría el muestreo en 12 de ellos.

El porcentaje representativo de cada estrato se calcula así:

$$\% = \frac{N_i}{N} \times 100 \quad (3)$$

Donde:

$N_i$  = establecimientos por estrato

$N$  = establecimientos en el universo

Así tenemos:

**Tabla N° 4.** Porcentaje de representatividad por estrato.

<b>Estrato</b>	<b>Calculo</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>A-01</b>	$\% = 4/14 * 100$	29%
<b>A-02</b>	$\% = 4/14 * 100$	29%
<b>A-03</b>	$\% = 3/14 * 100$	21%
<b>A-04</b>	$\% = 3/14 * 100$	21%
<b>Total</b>		<b>100%</b>

Fuente: Elaboración propia

Para calcular la cantidad de establecimientos a muestrear por cada estrato se utilizó la siguiente fórmula:

$$n_i = (n) \frac{N_i}{N} \quad (2)$$

Donde:

$n_i$  = muestra por estrato

$n$  = establecimientos a muestrear

$N_i$  = establecimientos por estrato

$N$  = total de establecimientos en el universo

Entonces

Para el Estrato A-01:

$$n_i = (12) \frac{4}{14} = 3.42 \approx 3$$

Esta fórmula se aplicó a cada estrato por separado, quedando de la siguiente forma:

**Tabla N° 5.** Cantidad de establecimientos muestreados por estrato.

Nombre de estrato	Código	Establecimientos a muestrear
NORTE	A-01	3
SUR	A-02	3
ESTE	A-03	3
OESTE	A-04	3
	<b>Total de establecimientos</b>	<b>12</b>

Fuente: Elaboración propia

Para conocer la cantidad de muestras a extraer por cada uno de los establecimientos estratificados se utilizó la fórmula de Muestreo Aleatorio Simple:

$$n = \frac{NZ^2 p (1 - p)}{e^2 (N - 1) + Z^2 p (1 - p)} \quad (1)$$

Entonces

Para el Estrato A-01:

$$n = \frac{(3)(1.96)^2(0.05)(1 - 0.05)}{(0.05)^2(3-1) + (1.96)^2(0.05)(1 - 0.05)}$$

$$n = 2.91 \approx 3$$

De igual forma se aplicó el cálculo para todos los estratos, obteniendo los siguientes resultados:

**Tabla N° 6.** Cantidad de muestras extraídas por cada establecimiento seleccionado dentro de cada estrato.

<b>Estrato</b>	<b>Cantidad de muestras a recolectar por establecimiento</b>
A-01	3
A-02	3
A-03	3
A-04	3

Fuente: Elaboración propia.

Finalmente, para determinar la cantidad de muestras total a procesar para esta investigación, se utilizó la siguiente fórmula:

$$n_T = n \times \text{número de muestras por estrato (4)}$$

Donde:

$n_T$  = total de muestras por estrato

$n$  = establecimientos a muestrear por cada estrato

Así para el estrato A-01 tenemos:

$$n_T = 3 \times 4 = 12$$

**Tabla N°7.** Cantidad de muestras procesadas por estrato.

<b>Estrato</b>	<b>Establecimientos a muestrear</b>	<b>Número de muestras</b>	<b>Cantidad de muestras a procesar</b>
A-01	3	3	9
A-02	3	3	9
A-03	3	3	9
A-04	3	3	9
<b>Total de muestras a procesar en la investigación</b>			<b>36</b>

Fuente: Elaboración propia.

Por tanto, en esta parte de la investigación se recolectaron y procesaron un total de 36 muestras de ensaladas frescas listas para su consumo, obtenidas de un total de 12 establecimientos donde se preparan y venden al público en general, los cuales fueron agrupados por su ubicación geográfica en 4 zonas o estratos.

#### 4.4. Parte Experimental

##### 4.4.1. Recolección de las muestras

Para la recolección de las muestras se visitaron los establecimientos seleccionados donde se compraron las muestras; el proveedor entregó la muestra de ensalada fresca, conservando cada muestra en su empaque original. La muestra fue etiquetada (Ver Anexo N° 2) adecuadamente y almacenada en hieleras a temperatura entre 2°C a 10°C para su traslado hasta el Laboratorio de Microbiología y Biotecnología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD).

El tiempo y la frecuencia del muestreo en los establecimientos se muestran en la Tabla N° 8.

**Tabla N°8.** Tiempo y frecuencia de muestreo en los establecimientos.

Semana	Fecha	Días de muestreo	Número de establecimientos muestreados por día	Número de muestras a recolectar por establecimiento	Muestras recolectadas por día
1	Del 11 al 15 de diciembre de 2023	Lunes 11/12/23	6	1	6
2	Del 18 al 22 de diciembre de 2023	Lunes 18/12/24	6	1	6
3	Del 08 al 12 de enero de 2024	Martes 9/01/24	6	1	6
4	Del 15 al 19 de enero de 2024	Lunes 15/01/24	6	1	6
5	Del 22 al 26 de enero de 2024	Lunes 22/01/2024	6	1	6
6	Del 29 al 02 de febrero de 2024	Lunes 29/01/2024	6	1	6
<b>Total de muestras procesadas en la investigación</b>					36

Fuente: Elaboración propia

#### 4.4.2. Evaluación del Grado de Aplicación de Buenas Prácticas Higiénicas en la Dispensación de Ensaladas.

Se realizó una evaluación del grado de cumplimiento de las Buenas Prácticas Higiénicas en los establecimientos seleccionados a través de una hoja observacional de chequeo y con ello se determinó si el establecimiento cumplía o no cumplía con la normativa vigente. (Ver Anexo N° 3)

#### 4.4.3. Aislamiento y detección de aislamiento presuntivo.<sup>28</sup>

Procedimiento:

- Pesar asépticamente 25 g de muestra directamente en bolsas de polietileno.
- Añadir 225 ml de Agua Peptonada Buferada (APB).
- Homogenizar en Stomacher por 3 minutos a 260 rpm.
- Trasladar la solución obtenida a un Erlenmeyer de 250 ml. Esta será la dilución  $10^{-1}$ .
- Pipetear de la dilución anterior 10 ml de inóculo a un frasco que contiene 90 ml de Agua Peptonada Buferada (APB). Esta será la dilución  $10^{-2}$ .
- Realizar el mismo procedimiento del paso anterior para obtener las diluciones  $10^{-3}$ .
- Añadir 1 ml de la dilución  $10^{-1}$  en dos placas Petri. Verter 10 ml de VRBA MUG en la placa, agitar y dejar solidificar.
- Realizar el paso anterior, pero con las diluciones  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ .
- Invertir las placas solidificadas e incubar 18-24 h a 35°C.
- Pasado el tiempo de incubación, realizar el conteo de Coliformes Totales.  
Colonias rosadas, rodeadas de una zona de ácidos biliares precipitados.
- Realizar el conteo de *Escherichia coli*.  
Colonias con fluorescencia al exponerlas a luz UV con longitud de onda de 366 nm.

- Elija todas las colonias típicas con morfología de *E. coli* que resulten positivas (hasta 10, si >10 están presentes) del agar VRBA MUG y transferir cada colonia individual a una placa con agar TSA distinta, aplicando la técnica de estriado.
- Incubar las placas a 35-37 °C por 24 a 48h. (Ver Anexo N° 4)

#### 4.4.4. Preservación en crioviales de colonias presuntivas.<sup>29</sup>

Procedimiento:

- Utilizando asa de anillo extraer de 4 a 5 colonias del medio TSA.
- Las colonias en este medio se criopreservarán en crioviales que contendrán 500 microlitros de caldo CASOY y 500 microlitros de glicerol al 40%.
- Inocular el vial introduciendo el asa que contienen las colonias.
- Cerrar el vial y agitarlo suavemente para homogenizar.
- Los crioviales se conservarán a temperatura de -70°C para su almacenamiento. (Ver Anexo N° 5)

#### 4.4.5. Pruebas complementarias para *E. coli*.<sup>30</sup>

Procedimiento:

- Utilizando asa de anillo, transferir una colonia del crecimiento del medio TSA que se obtuvo en el aislamiento y detección de aislamiento presuntivo.
- Aplicar la técnica de estriado a los siguientes medios de cultivo sólidos y suspender una colonia a los diferentes medios de cultivo líquidos (caldos).
- Para los agares incubar de 18 a 24 horas a 36°C ± 2°C. En el caso del caldo EC incubar de 18 a 24 horas a 44.5 °C ± 0.5°C.
- Realizar las lecturas correspondientes luego del periodo de incubación.

Observar las características específicas de cada medio de cultivo.<sup>31</sup> (Ver Anexo N° 6)

**Tabla N°9.** Medios de cultivo utilizados en las pruebas complementarias para *E. coli*.

Medios con reacciones indicativas para detectar <i>E. coli</i>		Medios con reacciones indicativas para detectar enterobacterias diferentes a <i>E. coli</i>
Agares	Caldos	Agares
MacConkey	LMX	BS (Bismuto sulfito)
VRBA (Violeta Rojo y Bilis Agar)	EC	SS (Salmonella-Shigella)
VRBA-MUG (Agar Bilis Rojo Violeta con MUG)		
Chromocult		
EMB (Agar lactosa sacarosa azul de metileno eosina)		
ENDO		
<i>E. coli</i> O157:h7		
SMAC (Sorbitol-MacConkey)		

Fuente: Elaboración propia.

#### 4.4.6. Prueba API 20 E™ 32

##### 4.4.6.1. Preparación de la galería

Procedimiento:

- Reunir fondo y tapa de una cámara de incubación y llenarla con 5 mL de agua destilada o desmineralizada, en los alvéolos para crear la atmósfera húmeda.
- Inscribir la referencia de la cepa en la lengüeta lateral de la cámara (no inscribir la referencia sobre la tapa, ya que ésta puede quedar desplazada durante la manipulación).
- Sacar la galería de su envase.
- Colocar la galería en la cámara de incubación.

#### 4.4.6.2. Preparación del inóculo

##### Procedimiento:

- Abrir una ampolla de API NaCl 0.85% Mediumm (5 ml) o una ampolla de API Suspensión Medium (5 ml) o utilizar un tubo que contenga 5 ml de agua fisiológica estéril o de agua destilada estéril, sin aditivos.
- Con ayuda de un asa, extraer una sola colonia bien aislada del medio TSA que se obtuvo en el aislamiento y detección de aislamiento presuntivo. Utilizar preferentemente cultivos jóvenes (18-24 horas).
- Realizar una suspensión bacteriana homogeneizando cuidadosamente las bacterias en el medio.  
Esta suspensión debe ser utilizada inmediatamente después de su preparación.

#### 4.4.6.3. Inoculación de la galería

##### Procedimiento:

- Introducir la suspensión bacteriana en los tubos de la galería con la ayuda de una pipeta (para evitar la formación de burbujas en el fondo de los tubos, colocar la punta de la pipeta sobre la pared de la cúpula, inclinando ligeramente la cámara de incubación hacia delante).
- Para las pruebas CIT , VP y GEL , llenar el tubo y la cúpula con la suspensión bacteriana.
- Para las otras pruebas, llenar únicamente los tubos (no las cúpulas).
- Para las pruebas: ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S, URE crear una atmósfera anaerobia llenando la cúpula con aceite de parafina.
- Cerrar la cámara de incubación.
- Incubar a 36°C ± 2°C durante 18-24 horas. (Ver Anexo N° 7)

#### 4.4.6.4. Lectura de la galería

##### Procedimiento:

- Después de la incubación, la lectura de la galería debe hacerse remitiéndose a la Tabla de Lectura. (Ver Anexo N° 8).
- Si 3 o más ensayos (test GLU + o -), resultasen positivos, anotar en la hoja de resultados (Ver Anexo N° 9) todas las reacciones espontáneas y después revelar los ensayos que necesitan la adición de reactivos.
- Prueba TDA: agregar una gota del reactivo TDA (Cloruro Férrico) e inmediatamente se hace la lectura y el resultado se debe anotar en la hoja de resultados.
- Prueba IND: agregar 1 gota del reactivo JAMES o reactivo de Kovac's. La lectura se hace 2 minutos después de agregar el reactivo y el resultado se debe anotar en la hoja de resultados.
- Prueba VP: agregar una gota de los reactivos VP1 (Hidróxido de potasio 40%) y VP2 ( $\alpha$ -naftol). Esperar un mínimo de 10 minutos y el resultado se debe anotar en la hoja de resultados.

NOTA: La prueba de investigación sobre la producción de Indol debe ser realizada en último lugar, pues esta reacción libera gases que pueden alterar la interpretación de las otras pruebas de la galería. No volver a colocar la tapa de la cámara de incubación después de agregar el reactivo.

- Si el número de pruebas positivas antes de añadir los reactivos (incluyendo el ensayo GLU) es inferior a 3, se debe reincubar la galería 24 horas ( $\pm$  2 horas) suplementarias sin volver a añadir los reactivos.
- Para completar la identificación, puede ser útil realizar ensayos complementarios.

#### 4.4.6.5. Interpretación de la galería

Procedimiento:

- En la hoja de resultados (Ver Anexo N° 9), los tests están separados en grupos de tres y se indica para cada uno un valor de 1, 2 o 4.
- Como la galería API 20 E comporta 20 ensayos, sumando al interior de cada grupo los valores que corresponden a reacciones positivas, se obtiene un perfil numérico de 7 cifras.  
A la reacción de la oxidasa, que constituye el test n° 21 se le asigna el valor 4, cuando resulte positiva.
- A partir de la base de datos, con la ayuda del Catálogo Analítico, localizar el perfil numérico en la lista de los perfiles.
- Con la ayuda del software de identificación api web TM, introducir manualmente mediante el teclado el perfil numérico de 7 cifras.
- En ciertos casos, el perfil de 7 cifras resulta insuficientemente discriminante, es necesario realizar ensayos complementarios.
- Estos ensayos complementarios pueden ser utilizados para constituir un perfil de 9 cifras, identificable mediante el software de identificación.
- En casos de discriminación débil, pueden proponerse otros ensayos suplementarios. Consultar el software o Catálogo Analítico.

NOTA: Se llevará un control positivo de *E. coli* ATCC 8739 y control negativo de *klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 desde el apartado aislamiento y detección de aislamiento presuntivo.

#### 4.4.7. Estandarización de Microorganismos <sup>33</sup>

Para la cepa control positivo de *E. coli* ATCC 8739 y control negativo de *klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, realizar el siguiente procedimiento:

- Del vial inicial de cada cepa sembrar en un tubo con agar TSA inclinado e incubar un máximo de 18 a 24 horas a  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

- Transferir a un tubo de fondo plano con 10 mL de solución salina estéril 0.9% un número de colonias suficientes para generar turbidez.
- Leer en un espectrofotómetro UV/Vis a 620nm, ajustar la transmitancia de la suspensión a 3% T, esta será la solución madre [ $10^{10}$ ]. (Ver Anexo N° 10) para lo cual considere los siguientes pasos:
  - a) Encender el espectrofotómetro y calibrar a la longitud de onda de trabajo 580 nm.
  - b) Ajustar a 100% de transmitancia
  - c) Realizar la medición de la suspensión contenida en una celda de cuarzo estéril.
  - d) Si las mediciones no son conforme al rango de transmitancia hacer las diluciones o adiciones de suspensión necesaria.

#### 4.4.8. Verificación del recuento de los microorganismos en la suspensión estandarizada<sup>33</sup>

Para la cepa control positivo de *E. coli* ATCC 8739 y control negativo de *klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, realizar el siguiente procedimiento:

- De la solución madre, del procedimiento Estandarización de Microorganismos, transferir 100  $\mu$ l con micropipeta a 9.9 mL de solución salina 0.9%, en un tubo estéril de fondo plano (solución con concentración  $10^8$ ),
- Realizar otras cuatro diluciones seriadas tomando 100  $\mu$ l con micropipeta de la solución anterior a 9.9 mL de solución salina 0.9%, en un tubo estéril de fondo plano, hasta llegar a la solución con concentración  $10^0$ . Homogenizar bien cada solución.
- Tomar un inóculo de 1 ml de la solución con concentración  $10^8$ , y transferir a una placa estéril. Llevar por duplicado.
- Agregar 10 ml de agar VRBA-MUG a temperatura no mayor a 45° C.
- Agitar en forma de ocho moderadamente sin movimientos bruscos, dejar solidificar.

- incubar un máximo de 18 a 24 horas a  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Pasado el tiempo, realizar el recuento y lectura correspondiente.
- Realizar el mismo procedimiento, pero con las soluciones de concentración  $10^6$ ,  $10^4$ ,  $10^2$  y  $10^0$ . (Ver Anexo N° 11).

NOTA: Con el control positivo *E. coli* ATCC 8739 seleccionar la dilución en la cual se evidencia apropiadamente las características del microorganismo (Colonias color rosado, rodeadas por una zona de ácidos biliares precipitados), en la cual se puede llevar a cabo un recuento que permita comprobar la concentración de la solución madre.

NOTA: Para el control negativo *klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 seleccionar la dilución que evidencia las características en agar VRBA-MUG, con la diferencia que estas no darán fluorescencia.

## **CAPÍTULO V**

## 5.0 RESULTADOS

### 5.1 Identificar el grado de aplicación de las Buenas Prácticas en el manejo y dispensación de ensaladas frescas a través de una hoja de cotejo en diversos establecimientos de comida rápida.

#### 5.1.1 Evaluación del grado de aplicación en el manejo y dispensación de ensaladas frescas de los diferentes establecimientos.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos mediante la aplicación de la guía de observación, donde se evaluaron las condiciones de las instalaciones, manejo y almacenamiento del producto, indumentarias del personal, materiales y equipo utilizado por estos.

**Tabla N°10.** Resumen de los resultados obtenidos mediante la guía de observación de los diferentes establecimientos inspeccionados.

Hoja de evaluación de Buenas Prácticas Higiénicas en la Dispensación de Ensaladas Frescas								
Estratos	NORTE		SUR		ESTE		OESTE	
Cantidad de Establecimientos	3		3		3		3	
INSTALACIONES								
Inspección	EC	ENC	EC	ENC	EC	ENC	EC	ENC
¿Pisos de fácil limpieza?	3	0	3	0	3	0	3	0
¿Ventilación adecuada?	3	0	3	0	1	2	3	0
¿Iluminación correcta?	3	0	3	0	2	1	3	0
¿Techos sin presencia de plagas?	3	0	3	0	3	0	3	0
¿Abastecimiento de agua potable?	3	0	3	0	3	0	3	0
¿Drenajes sanitarios?	3	0	3	0	3	0	3	0
¿Servicios sanitarios limpios?	2	1	3	0	1	2	3	0
¿Instalaciones para lavado de manos?	3	0	3	0	3	0	3	0
¿Programas de limpieza visibles?	1	2	3	0	1	2	2	1
Control de plagas	3	0	3	0	3	0	3	0
EQUIPOS Y UTENSILIOS								
Inspección	EC	ENC	EC	ENC	EC	ENC	EC	ENC
¿Equipo adecuado al proceso y en buenas condiciones?	3	0	3	0	3	0	3	0
¿Equipo limpio?	3	0	3	0	3	0	3	0
¿Materiales de los equipos son de acero inoxidable?	3	0	3	0	3	0	3	0

Tabla N° 10 (Continuación)

PERSONAL								
Inspección	EC	ENC	EC	ENC	EC	ENC	EC	ENC
¿Aplicación de las BPM según manual?	3	0	3	0	3	0	3	0
¿Vestimenta adecuada para la cocina?	3	0	3	0	3	0	3	0
¿Uso de redecilla y cubrebocas?	3	0	3	0	1	2	3	0
¿Lavado de manos constante por parte del personal?	3	0	3	0	1	2	3	0
CONTROL EN EL PROCESO DE ELABORACION								
Inspección	EC	ENC	EC	ENC	EC	ENC	EC	ENC
¿Clasificación de ingredientes por separado?	3	0	3	0	1	2	3	0
¿Refrigeración adecuada antes de mezclar ingredientes?	2	1	3	0	1	2	3	0
¿Limpieza y orden en el área de trabajo?	3	0	3	0	3	0	3	0
ALMACENAMIENTO Y DISTRIBUCION								
Inspección	EC	ENC	EC	ENC	EC	ENC	EC	ENC
¿Producto terminado empacado higiénicamente?	3	0	3	0	3	0	3	0
¿Envase adecuado al producto dispensado?	3	0	3	0	3	0	3	0
¿adecuada manipulación posterior al empacado?	3	0	3	0	3	0	3	0

Fuente: Elaboración propia.

EC: establecimientos que cumplen

ENC: establecimientos que no cumplen

- Instalaciones

En todos los establecimientos de comida rápida se observó que los pisos son de fácil limpieza, por otra parte, los establecimientos 1 y 2 del estrato ESTE no cuentan con la ventilación e iluminación correcta, esto es un riesgo ya que, al no tener una ventilación controlada, puede ser un factor de contaminación. En ningún establecimiento se observó la presencia de plagas, además todos cuentan con abastecimiento de agua potable, drenajes sanitarios e instalaciones para el lavado de manos y control de plagas. Para los establecimientos 1 y 3 del estrato NORTE, 1 y 2 del estrato ESTE y 2 del estrato OESTE, los sanitarios se encontraron sucios y sus programas de limpieza no estaban visibles.

- Equipos y utensilios

Se identificó que en todos los establecimientos cuentan con equipos y utensilios en buenas condiciones: limpios y del material adecuado para el tipo de alimento que se prepara en cada estación lo que evita que se usen los mismos utensilios de cocina para diferentes tipos de alimentos evitando una posible contaminación cruzada.

- Personal

En todos los establecimientos visitados se observó que el personal se encuentra bien capacitado en cuanto a la aplicación de las Buenas Prácticas de Manufactura ya que evitan el uso de los mismos utensilios en diferentes tipos de alimentos, la vestimenta de todo el personal que labora en la cocina de los establecimientos visitados se encontró completa, limpia, ordenada y evitan el uso de objetos extraños o de uso personal en las estaciones de trabajo. Sin embargo, en los establecimientos 1 y 2 del estrato ESTE no todo el personal hace uso correcto del cubrebocas ya que se observó que algunos de los manipuladores de alimentos incumplían este requisito de higiene, además que no lavan sus manos frecuentemente poniendo en peligro la calidad de los alimentos que allí se preparan.

- Control en el proceso de elaboración

Todos los establecimientos de los cuatro estratos muestreados mantienen las estaciones de trabajo y preparación de alimentos muy limpias y ordenadas. Para el establecimiento 3 del estrato NORTE, 1 y 2 del estrato ESTE se observó que no cumplen con la clasificación de los ingredientes por separado y además no cuentan con adecuada refrigeración de los ingredientes antes de mezclarlos en el alimento por lo que no cumplen con el control necesario para la elaboración de ensaladas listas para su consumo.

- Almacenamiento y distribución

En general, todos los establecimientos de los estratos muestreados cumplen con el apartado de almacenamiento y distribución, todas las ensaladas adquiridas fueron entregadas en empaques herméticos, limpios y en excelente presentación, el tipo de

envase utilizado es adecuado para el producto adquirido ya que protege muy bien los alimentos que contienen. La manipulación posterior al empacado se considera adecuado ya que el empaque presenta cierre hermético, no hay exposición del alimento con el ambiente fuera de la cocina y el despachador no tiene contacto directo con el alimento después de su empacado.

**Tabla N° 11.** Porcentajes de cumplimiento de Buenas Prácticas en el manejo y dispensación de ensaladas frescas en los establecimientos por estratos muestreados.

<b>Estrato</b>	<b>Porcentaje de cumplimiento</b>
NORTE	94.20%
SUR	100.0%
ESTE	78.26%
OESTE	98.55%

Fuente: Elaboración propia.

Los cálculos de los porcentajes de cumplimiento representados en la tabla anterior fueron obtenidos de la siguiente manera:

$$A * B = D$$

Dónde: A = cantidad de parámetros evaluados en la hoja de cotejo (23 parámetros)

B = cantidad de establecimientos muestreados por estrato (3 establecimientos)

D = total de posibles cumplimientos.

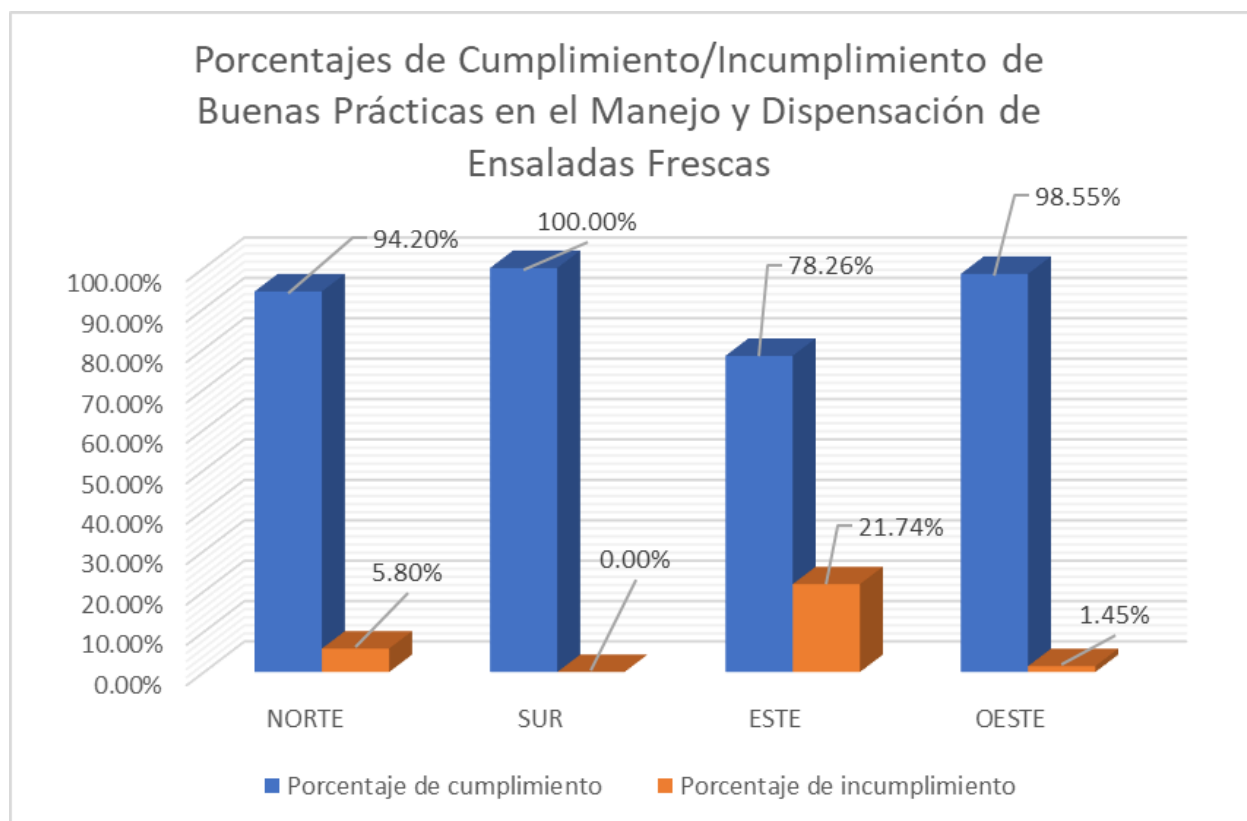
$$23 * 3 = 69 \text{ posibles cumplimientos.}$$

$$\% \text{ cumplimiento} = \frac{\text{cumplimientos obtenidos por estrato}}{\text{total de cumplimientos posibles}} * 100$$

Para el estrato NORTE:

$$\% \text{ cumplimiento} = \frac{65}{69} * 100 = 94.20\%$$

Y así sucesivamente para cada estrato.



**Figura N°. 1.** Gráfico del porcentaje de cumplimiento de las buenas prácticas en el manejo y dispensación de ensaladas frescas por estrato.

Fuente: Elaboración propia.

En la figura N°1 se observa una representación gráfica de los porcentajes de cumplimiento e incumplimiento de los requisitos tomados de la guía de inspección de las Buenas Prácticas de Manufactura del RTCA 67.01.33:06 por cada estrato muestreado. Donde se puede analizar que en general los establecimientos cuentan con altos índices de cumplimiento, los estratos Norte, Sur y Oeste son los mejor evaluados con porcentajes de 94.20%, 100.00% y 98.55% respectivamente y porcentajes de 5.80%; 0.0% y 1.45% para

incumplimiento, estos incumplimientos son menores y no representan un peligro para los consumidores, principalmente se basan en aspectos de infraestructura como iluminación o ventilación.

En el caso del estrato Este se ha encontrado un menor porcentaje de cumplimiento con 78.26% el cual al ser comparado con el Anexo B del RTCA 67.01.33:06 no cumple con el criterio de calidad establecido, ya que según dicho anexo se debe contar con 81 puntos aprobados de 100 criterios evaluados para cumplir con el requisito, tomando la misma proporción para los 69 criterios evaluados en ese estrato, se debe contar con un mínimo de 56 criterios en cumplimiento para aprobar el requisito de calidad. El estrato ESTE cuenta con 54 criterios en cumplimiento por tanto no cumple con el criterio de calidad, esto se puede evidenciar analizando el porcentaje de incumplimientos en dicho estrato el cual alcanza el valor de 21.74% que representa 15 criterios incumplidos en la presente guía de evaluación.

## 5.2 Recuento de Coliformes Totales y detección presuntiva de *Escherichia coli* a través de medios de cultivo selectivos en ensaladas frescas comercializadas en establecimientos de comida rápida en el “Centro Histórico” de San Salvador.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de las diferentes pruebas microbiológicas realizadas a las muestras de ensaladas, recolectadas en los diferentes establecimientos, para la determinación de coliformes totales y la detección de *Escherichia coli*.

**Tabla N°12:** Resultados obtenidos de recuentos de Coliformes Totales en Agar VRBA-MUG.

FECHA DE MUESTRO Y SEMANA N°	ESTRATO / MUESTRA	NORTE		SUR		ESTE		OESTE	
		UFC/g	Log	UFC/g	Log	UFC/g	Log	UFC/g	Log
1 Lunes 11/12/2024	20231211-01	5.0 x 10 <sup>3</sup>	3.69	-	-	-	-	-	-
	20231211-02	-	-	5.5 x 10 <sup>3</sup>	3.74	-	-	-	-
	20231211-03	-	-	-	-	1.0 x 10 <sup>3</sup>	3.00	-	-
	20231211-04	-	-	-	-	-	-	1.7 x 10 <sup>3</sup>	3.23
	20231211-05	5.0 x 10 <sup>3</sup>	3.69	-	-	-	-	-	-
	20231211-06	-	-	1.6 x 10 <sup>3</sup>	3.20	-	-	-	-

Tabla N°12 (Continuación)

FECHA DE MUESTRO Y SEMANA N°	ESTRATO / MUESTRA	NORTE		SUR		ESTE		OESTE	
		UFC/g	Log	UFC/g	Log	UFC/g	Log	UFC/g	Log
2 Lunes 18/12/2024	20231211-07	-	-	-	-	$1.9 \times 10^3$	3.27	-	-
	20231218-08	-	-	-	-	-	-	$7.0 \times 10^4$	4.84
	20231218-09	$1.3 \times 10^5$	2.11	-	-	-	-	-	-
	20231218-10	-	-	-	-	-	-	$2.03 \times 10^4$	5.36
	20231218-11	-	-	-	-	$1.2 \times 10^4$	4.07	-	-
	20231218-12	$8.2 \times 10^4$	4.91	-	-	-	-	-	-
3 Martes 09/01/2024	20231218-13	-	-	$0.6 \times 10^3$	2.77	-	-	-	-
	20231218-14	-	-	-	-	$0.3 \times 10^3$	2.47	-	-
	20240901-15	-	-	-	-	-	-	$4.2 \times 10^5$	5.62
	20240901-16	-	-	$1.8 \times 10^5$	5.25	-	-	-	-
	20240901-17	-	-	-	-	-	-	$2.9 \times 10^5$	5.46
	20240901-18	$3.8 \times 10^4$	4.57	-	-	-	-	-	-
4 Lunes 15/01/2024	20240901-19	-	-	$3.2 \times 10^5$	5.50	-	-	-	-
	20240901-20	-	-	-	-	$9.3 \times 10^5$	5.96	-	-
	20240901-21	$2.6 \times 10^5$	5.41	-	-	-	-	-	-
	20240115-22	-	-	-	-	-	-	$1.6 \times 10^5$	5.20
	20240115-23	-	-	-	-	$2.6 \times 10^4$	4.41	-	-
	20240115-24	-	-	$1.0 \times 10^3$	3.00	-	-	-	-
5 Lunes 22/01/2024	20240115-25	-	-	-	-	$1.8 \times 10^4$	4.25	-	-
	20240115-26	$2.2 \times 10^5$	5.34	-	-	-	-	-	-
	20240115-27	-	-	-	-	$2.4 \times 10^5$	5.38	-	-
	20240115-28	-	-	-	-	-	-	$5.1 \times 10^4$	4.70
	20240122-29	-	-	$1.3 \times 10^5$	5.11	-	-	-	-
	20240122-30	-	-	-	-	-	-	$6.0 \times 10^3$	3.77
6 Lunes 29/01/2024	20240122-31	$8.6 \times 10^4$	4.93	-	-	-	-	-	-
	20240122-32	-	-	$1.1 \times 10^5$	5.04	-	-	-	-
	20240122-33	-	-	-	-	-	-	$1.7 \times 10^5$	5.23
	20240122-34	-	-	$1.8 \times 10^5$	5.25	-	-	-	-
	20240122-35	-	-	-	-	$1.0 \times 10^5$	5.00	-	-
	20240129-36	$1.0 \times 10^4$	4.00	-	-	-	-	-	-

- Nota
- Se utilizó como control positivo *E. coli* ATCC 8739 y control negativo de *klebsiella pneumoniae* ATCC 10031.
  - Todas las medidas corresponden a UFC por gramo de muestra de ensalada.
  - Los recuentos de cada muestra corresponden a la dilución  $10^{-3}$ .

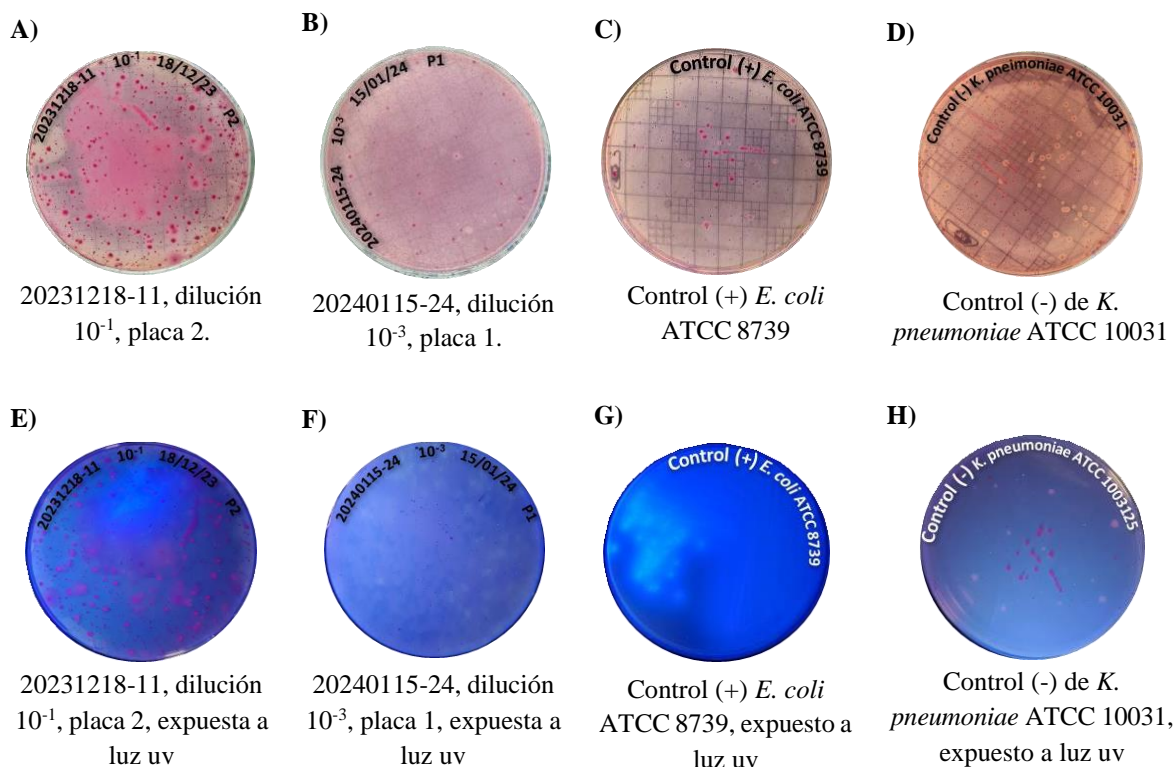
En la Tabla N°12 se observan los promedios de UFC por gramo de ensalada fresca; todas presentaron colonias rojas con precipitado en agar VRBA-MUG; esto nos indica que se tuvo una presencia de coliformes totales y ausencia de *E. coli*, ya que no presenta fluorescencia, cuando se expusieron a la luz ultravioleta (ver Figura N°2). Según el RTCA 67.04.50:17. Grupo del Alimento 17.0, comidas preparadas, Subgrupo 17.1<sup>34</sup>, menciona que el límite permitido para *E. coli* es <10 UFC/g, pero no se pudo hacer ninguna comparación, porque ninguna muestra presentó dicha fluorescencia.

En las 36 muestras que se recolectaron de los 12 establecimientos hubo presencia de bacterias coliformes totales, los recuentos oscilan de 2.77 a 5.62 log ufc/g. El recuento más bajo de microorganismos se observa que lo tiene la muestra 20231218-13, mientras que la muestra 20240109-15 presenta un mayor recuento de coliformes totales. Un estudio realizado en Bagdad indico que las muestras de verduras listas para comer alcanzaron recuentos de 4.78 y 4.32 log ufc/g de bacterias coliformes.<sup>35</sup> Otro estudio que evaluó la calidad microbiológica de las ensaladas listas para consumir, arrojó un total de microbiota aproximadamente de 6 log ufc/g.<sup>36</sup>

Esto nos da un indicio de que el agua con la cual lavan o riegan las verduras puede estar contaminada con aguas negras u otro tipo de desechos en descomposición<sup>37</sup>. Sin embargo, esto no implica contaminación fecal, ya que muchos de estos microorganismos son comunes en el suelo y en las plantas, o forman parte de la microbiota normal de los alimentos. A diferencia de *E. coli* estas no están asociadas a enfermedades gastrointestinales.

Por otro lado, al tener ausencia de *Escherichia coli* en los 12 establecimientos muestreados, el consumidor en caso de ingerir la ensalada fresca no estaría expuesto a bacterias entéricas. *E. coli* reúne las condiciones del indicador ideal de contaminación fecal: está presente universalmente en las heces y en las aguas residuales, no puede crecer en las aguas naturales y es fácilmente detectable por métodos rápidos.<sup>38</sup>

Las colonias de las 36 muestras analizadas dieron positivas para Coliformes totales, dando unas colonias de color rojo intenso, rodeadas de una zona rojiza de bilis precipitada en Agar VRBA-MUG, como se observa en la figura 2A y 2B. Esto es debido a que son bacterias que fermentan la lactosa, acidificando el medio.<sup>39</sup>



**Figura N° 2.** Resultados de muestras en Agar VRBA-MUG sin exposición a luz UV y con exposición a luz UV.

Fuente: Elaboración propia.

Posteriormente se utilizó una cabina de luz UV para evidenciar las características que las colonias de *E. coli* tienen en el agar VRBA-MUG, como se observa en la figura 2G que es el control positivo de *E. coli* ATCC 8739, las cepas Beta-glucuronidasa capaces de metabolizar el 4-metilumbeliferil-B-D-glucoronido (MUG), positivas de *E. coli* se muestran con halos fluorescentes azulados cuando se controlan bajo luz uv de onda larga (365 nm), pero de las 36 muestras analizadas, todas fueron MUG negativo, ya que las características fueron como se observa en las figuras 2E y 2F, que al exponerlas a luz uv no mostraban fluorescencia, al igual que el control negativo que se llevaba de *K. pneumoniae* ATCC 10031 de la figura 2H.

**Tabla N° 13:** Resultados en diferentes medios de cultivo selectivos para *Escherichia coli* de colonias aisladas de las muestras en agar VRBA-MUG.

MEDIO	Reacciones indicativas para detectar <i>E. coli</i>										Reacciones indicativas para detectar enterobacterias diferentes a <i>E. coli</i> .	
	MacConkey	VRBA	VRBA - MUG	Chromocult	EMB	ENDO	E, COLI O157:H7	SMAC	CALDO LMX	CALDO EC	BS	SS
<b>Resultado positivo de <i>E. coli</i></b>	Rosadas – Rojizas con precipitado	Rojas con precipitado	Rojas con fluorescencia	Azul oscuro a violeta	Violeta, brillo metálico	Rojas, brillo metálico	Amarillas con fluorescencia	Rojas	Azul, fluorescencia	Turbidez con gas	Marrón - verde	Rosa - rojo
<b>Muestra</b>	-											
20231211-01	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+
20231211-02	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+
20231211-03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20231211-04	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+
20231211-05	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+
20231211-06	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
20231211-07	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
20231218-08	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
20231218-09	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+
20231218-10	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+

**Tabla N°13 (Continuación)**

MEDIO	Reacciones indicativas para detectar <i>E. coli</i>										Reacciones indicativas para detectar enterobacterias diferentes a <i>E. coli</i> .	
	MacConkey	VRBA	VRBA - MUG	Chromocult	EMB	ENDO	E, COLI O157:H7	SMAC	CALDO LMX	CALDO EC	BS	SS
<b>Resultado positivo de <i>E. coli</i></b>	Rosadas – Rojizas con precipitado	Rojas con precipitado	Rojas con fluorescencia	Azul oscuro a violeta	Violeta, brillo metálico	Rojas, brillo metálico	Amarillas con fluorescencia	Rojas	Azul, fluorescencia	Turbidez con gas	Marrón - verde	Rosa - rojo
<b>Muestra</b>	-											
20231218-11	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+
20231218-12	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
20231218-13	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+
20231218-14	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+
20240109-15	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
20240109-16	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
20240109-17	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
20240109-18	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
20240109-19	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
20240109-20	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+
20240109-21	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
20240115-22	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
20240115-23	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+

**Tabla N°13 (Continuación)**

MEDIO	Reacciones indicativas para detectar <i>E. coli</i>										Reacciones indicativas para detectar enterobacterias diferentes a <i>E. coli</i> .	
	MacConkey	VRBA	VRBA - MUG	Chromocult	EMB	ENDO	E, COLI O157:H7	SMAC	CALDO LMX	CALDO EC	BS	SS
<b>Resultado positivo de <i>E. coli</i></b>	Rosadas – Rojizas con precipitado	Rojas con precipitado	Rojas con fluorescencia	Azul oscuro a violeta	Violeta, brillo metálico	Rojas, brillo metálico	Amarillas con fluorescencia	Rojas	Azul, fluorescencia	Turbidez con gas	Marrón - verde	Rosa - rojo
<b>Muestra</b>	-											
20240115-24	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+
20240115-25	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+
20240115-26	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+
20240115-27	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+
20240115-28	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-
20240122-29	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
20240122-30	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
20240122-31	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
20240122-32	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
20240122-33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
20240122-34	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+
20240122-35	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
20240129-36	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+

**Tabla N°13 (Continuación)**

MEDIO	Reacciones indicativas para detectar <i>E. coli</i>										Reacciones indicativas para detectar enterobacterias diferentes a <i>E. coli</i> .	
	MacConkey	VRBA	VRBA - MUG	Chromocult	EMB	ENDO	E, COLI O157:H7	SMAC	CALDO LMX	CALDO EC	BS	SS
<b>Resultado positivo de <i>E. coli</i></b>	Rosadas – Rojizas con precipitado	Rojas con precipitado	Rojas con fluorescencia	Azul oscuro a violeta	Violeta, brillo metálico	Rojas, brillo metálico	Amarillas con fluorescencia	Rojas	Azul, fluorescencia	Turbidez con gas	Marrón - verde	Rosa - rojo
<b>Muestra</b>	-											
<b>C (+) <i>E. coli</i> ATCC 8739</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>C (-) <i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031</b>	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
<b>Control del medio</b>												

Fuente: Elaboración propia

En la tabla N° 13 se presentan los resultados en cuanto a crecimiento y características de las colonias aisladas de agar VRBA-MUG presuntivas de *E. coli* en los diferentes medios de cultivo. De las treinta y seis muestras analizadas y comparadas con el control positivo *Escherichia coli* ATCC 8739, algunas muestras presentaron características presuntivas para *Escherichia coli* en los medios con reacciones indicativas para detectar *E. coli* y medios con reacciones indicativas para detectar enterobacterias diferentes a *E. coli*, como lo son las muestras 20240109-18, 20240122-33 y la muestra 20240129-36 (Ver anexo N°6), si bien no presentaron las mismas características en todos los medios comparándolas con el control positivo, pero si fueron positivas la mayoría de estas, esto puede ser debido a la cantidad de microorganismo inoculado, factores intrínsecos de los aislados debido a su origen o a factores relacionados con el medio de cultivo.

### 5.3 Confirmación de *Escherichia coli* a través de pruebas bioquímicas API 20E en aislamientos presuntivos.

**Tabla N° 14.** Resultados obtenidos en la identificación con API 20E.

SEMANA	CODIGO DE MUESTRA	BIONUMERO	% DE SIMILITUD	BACTERIA
1	20231211-05	7304773	40.5	<i>Serratia fonticola</i>
2	20231218-10	5255773	97.3	<i>Klebsiella osytoa</i>
3	20231218-14	3307773	51.0	<i>Enterobacter cloacae</i>
	20240109-16	7306773	63.9	<i>Serratia liquefaciens</i>
4	20240109-19	5215773	97.3	<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp <i>Pneumoniae 1</i>
	20240115-23	1215773	98.2	<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp <i>Pneumoniae 1</i>
5	20240115-26	7217773	90.7	<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp <i>Pneumoniae 1</i>
	20240115-28	1347773	99.9	<i>Serratia odorifera 1</i>
	20240122-30	1207453	86.1	<i>Serratia ficaria</i>
6	20240122-33	3305563	99.3	<i>Enterobacter cloacae</i>
	20240129-36	1245573	98.7	<i>Pantoea</i> spp 2
-	C(+) <i>E. coli</i> ATCC 8739	5044553	99.9	<i>Escherichia coli</i>
-	C(-) <i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	1005773	99.9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

Fuente: Elaboración propia

Nota: *Serratia fonticola* está representada con el color turquesa, *Klebsiella osytoa* con color rojo, *Enterobacter cloacae* con color blanco, *Serratia liquefaciens* con color amarillo, *Klebsiella pneumoniae spp Pneumoniae 1* con color verde, *Serratia odorífera 1* con color celeste, *Serratia ficaria* con color naranja, *Pantoea spp 2* con rosado claro, *Escherichia coli* con color azul y *Klebsiella pneumoneae* de color lavanda.

La tabla N° 14 refleja la identidad de las bacterias analizadas mediante las pruebas de galerías API 20E, las cuales tienen como fundamento las interacciones entre los diferentes substratos deshidratados contenidos en los 20 microtubos y las suspensiones bacterianas inoculadas dentro de estos, lo cual permite la reconstitución de los tests; posteriormente en el periodo de incubación se llevan a cabo reacciones bioquímicas que se traducen en cambios de color espontáneos o revelados mediante la adición de reactivos. Mediante la tabla de lectura (ver anexo No.8) se lleva a cabo la identificación de los colores resultantes y su comparación; finalmente se obtiene el bionúmero utilizando el software especial para la prueba (ver anexo No.12).



**Figura N° 3.** Comparación de los resultados de la galería API 20E para la muestra 20240115-26 y el control positivo *E. coli* ATCC 8739.

Fuente: Elaboración propia

El análisis de los resultados del sistema de identificación no confirma los aislados como *E. coli*, ya que haciéndose la comparación de cada una de las muestras con el control positivo de *E. coli* ATCC 8739, ninguna concuerda con las reacciones positivas de esta. En este caso, como se observa en la figura N° 3, la muestra 20240115-26 dio positivo a las reacciones enzimáticas específicas de *Klebsiella pneumoniae spp Pneumoniae 1*.

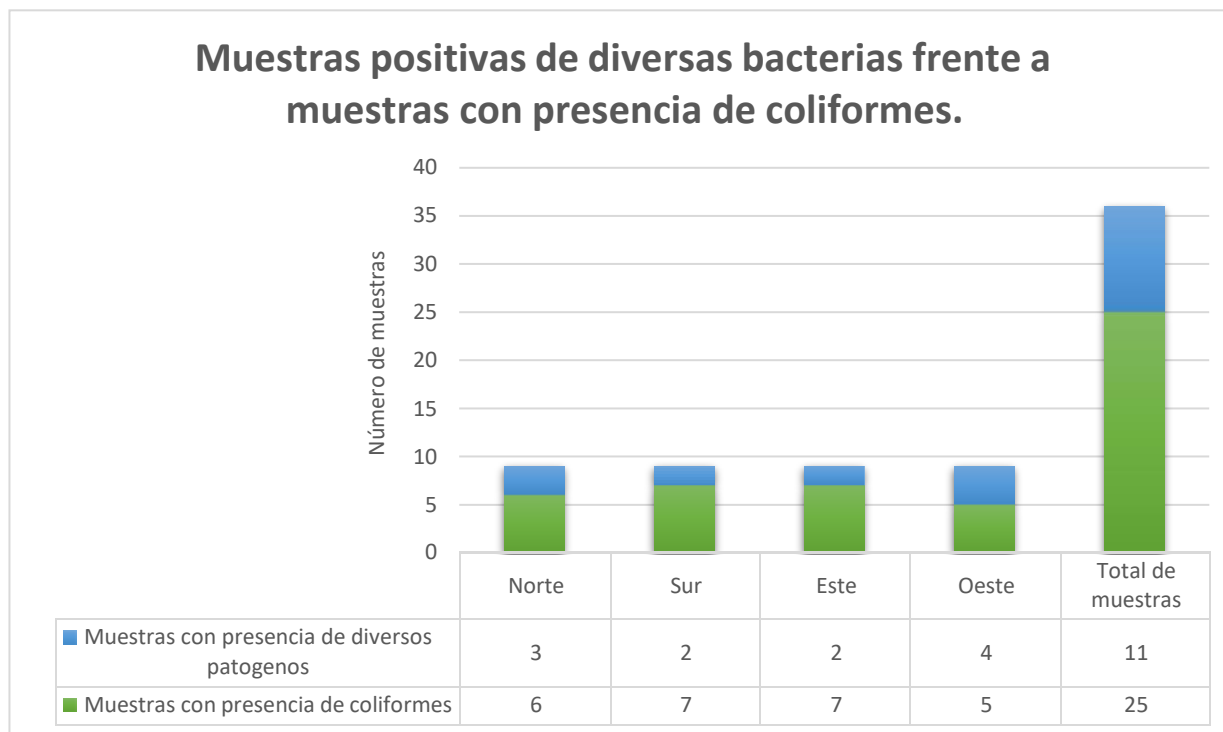
Los resultados obtenidos de estas pruebas en la galería fueron utilizados para generar un código, el cual fue introducido en el software del fabricante para generar un informe (ver anexo No.13), donde se especifican los porcentajes de similitud, tal y como se muestran en la Tabla N° 14. Los resultados obtenidos de la galería más los datos obtenidos en los recuentos en agar VRBA MUG, medios de cultivo selectivos y diferenciales y demás pruebas complementarias nos permitieron obtener la identificación de las bacterias aisladas.

Once de las treinta y seis muestras analizadas que presentaron en cierto nivel características sugerentes de *E. coli* en agar VRBA-MUG y en los demás medios de cultivo selectivos utilizados, no se identificaron como *Escherichia coli*, comparándose con el control positivo ATCC 8739, siendo las muestras 20231211-05, 20231218-10, 20231218-14, 20240109-16, 20240109-19, 20240115-23, 20240115-26, 20240115-28, 20240122-30, 20240122-33 y 20240129-36.

Los resultados, como se muestran en la tabla N°14, se observa que la muestra 20231211-05 arrojó un porcentaje de similitud del 40.5% siendo presuntivamente *Serratia fonticola*, siendo este el porcentaje más bajo. Esto puede significar que aún no se tenía la colonia totalmente aislada, sino que había una mezcla de microorganismos al momento de someterla al sistema de identificación. La muestra 20231218-10 dio un porcentaje del 97.3 % para *klebsiella oxytoca*, las muestras 20231218-14 y 20240122-33 con un porcentaje del 51.0% y 99.3% respectivamente, siendo estas presuntivamente *Enterobacter cloacae*.

La muestra 20240109-16 dio un porcentaje de similitud del 63.9% siendo presuntivamente *Serratia liquefaciens*, las muestras 20240109-19, 20240115-23 y 20240115-26 dieron un porcentaje del 97.3%, 98.2% y 90.7% respectivamente para *klebsiella pneumoniae spp pneumoniae 1* y la muestra 20240115-28 dio un porcentaje del 99.9% siendo presuntivamente *Serratia odorifera 1*.

El porcentaje de similitud para la muestra 20240122-30 fue del 86.1%, presuntiva para *Serratia ficara* y la muestra 20240129-36 con un porcentaje del 98.7%, siendo presuntiva para *pantoea spp 2*.



**Figura N° 4.** Gráfico de número de muestras positivas con presencia de diversas bacterias frente a muestras con presencia de coliformes en cada estrato.

Fuente: Elaboración propia.

En la figura N° 4 se observa el número total de muestras con presencia de diferentes bacterias por estrato, los cuales fueron determinados luego de realizar las pruebas bioquímicas API 20E y las lecturas en los medios de cultivo con reacciones indicativas para detectar *E. coli* y medios con reacciones indicativas para detectar enterobacterias diferentes a *E. coli*.

En el estrato Norte de las nueve muestras, en tres se identificaron diferentes bacterias. La muestra 20231211-05 dio presuntamente positiva para *Serratia fonticola*; esta es una bacteria espectadora que en humanos es poco común, pero se encuentra ampliamente extendida en suelos y agua, por lo que se considera una bacteria parte de la microbiota de suelos cultivables.<sup>40</sup>

La muestra 20240115-26 con un porcentaje de similitud del 90.7% para *klebsiella pneumoniae spp pneumoniae I* este microorganismo patógeno coloniza la nasofaringe en humanos por lo que su presencia en alimentos se considera indicativo de contaminación por incorrecta manipulación

de las personas o mala praxis<sup>41</sup>, y la muestra 20240129-36 presuntamente *Pantoea* spp 2 la cual es una bacteria que se encuentra presente en material vegetal y tierra contaminada es un microorganismo ampliamente distribuido en suelos por lo que se considera microbiota de suelos.<sup>42</sup>

La presencia de estos microorganismos en las ensaladas frescas puede ser un indicativo de que la higiene, el control de salud, el método de preparación, la presentación y el cumplimiento de las medidas de salud en los restaurantes influye en la presencia de contaminantes y patógenos. Por otro lado, estos microorganismos son naturales en los vegetales, y su diversidad es un indicio de un suelo sano, con una variedad de especies beneficiosas. El problema surge cuando prevalece un solo tipo de microorganismo, ya que en ese caso podrían convertirse en patógenos.

Por otra parte, estos microorganismos pueden estar presentes en las ensaladas debido al uso de desechos orgánicos en tierras agrícolas, contaminación directa por ganado, animales salvajes y aves, problemas posteriores a la cosecha, como la higiene de los trabajadores, los contenedores de transporte, el equipo de cosecha o que el agua utilizada durante el cultivo o cosecha estaba contaminada.<sup>36</sup>

Dados los resultados del grado de cumplimiento de las Buenas Prácticas en el Manejo y Dispensación de las ensaladas frescas, que es de 94.20% en el estrato Norte y según la guía de observación cumple con la mayoría de los parámetros en cuanto al uso de equipos, utensilios y almacenamiento.

Para el estrato Sur se tiene que dos de las nueve muestras tienen presencia de bacterias, siendo esta la muestra 20240109-16 que da positivo a *Serratia liquefaciens*, una bacteria ambiental de suelos y plantas, no patógena al ser humano, por lo que se considera microbiota de ambientes naturales<sup>43</sup> y la muestra 20240109-19 dando positivo a *klebsiella pneumoniae spp pneumoniae 1*, bacteria patógena indicativa de mala praxis en la manipulación de alimentos.<sup>41</sup> Las condiciones de almacenamiento, el personal y el equipo cumplen al 100% con las Buenas Prácticas en el Manejo y Dispensación de las ensaladas frescas.

En el estrato Este, la muestra 20231218-14 dio positivo a *Enterobacter cloacae*. Esta bacteria es ubicua en entornos terrestres y acuáticos; se asocia principalmente a infecciones nosocomiales, aunque también se le puede encontrar en los vegetales por el riego con aguas residuales<sup>44</sup>, y la muestra 20240115-23 fue presuntamente positiva para *klebsiella pneumoniae spp pneumoniae 1*,

una bacteria patógena que llega a los alimentos por contaminación humana al no utilizar correctamente el cubrebocas.<sup>41</sup>

Dichas identificaciones tienen relación directa con el más bajo grado de cumplimiento de las Buenas Prácticas en el manejo y Dispensación de las ensaladas frescas, el cual es de 78.26%, donde los parámetros como el control en el proceso de la elaboración de dichas ensaladas son incumplidos y a esto se le suma que el personal no hace un uso correcto del equipo de protección, ya que no utilizan cubrebocas, redrecillas y no lavaban sus manos frecuentemente.

Para el caso del estrato Oeste, que es el que presenta la mayor diversidad de bacterias que corresponde a la muestra 20231218-10 positiva para *Klebsiella oxytoca*, un patógeno oportunista que se encuentra habitualmente en la piel y orofaringe de los humanos, también forma parte de la microflora intestinal y su presencia en alimentos indica malas prácticas higiénicas por parte de los manipuladores de alimentos.<sup>45</sup> 20240115-28 positivo para *Serratia odorífera* 1. Sobre esta bacteria no se conoce exactamente su reservorio natural, aunque se asocia a infecciones hospitalarias y algunos autores la describen como un patógeno emergente. La presencia en alimentos se puede asociar a malas prácticas higiénicas<sup>46</sup>.

La muestra 20240122-30 positiva para *Serratia ficaria*, de la cual se sabe que habita principalmente zonas de cultivo de higos y llega a los alimentos por arrastre, su presencia puede indicar un lavado deficiente de las vegetales<sup>46</sup> y la muestra 20240122-33 positiva para *Enterobacter cloacae*, bacteria indicativa de mala higiene de los manipuladores de alimentos.<sup>44</sup>

Las condiciones de almacenamiento, el personal y equipo cumplen al 98.55% con las Buenas Prácticas en el Manejo y Dispensación de las ensaladas frescas.

Como se puede observar, los porcentajes de cumplimiento en los estratos norte, sur y oeste son muy altos, con el 94.20%, 100% y 98.55% respectivamente, teniendo en cuenta que tienen un buen control en el proceso de elaboración, cumplen con el almacenamiento y distribución, el personal se encuentra bien capacitado en cuanto a la aplicación de las Buenas Prácticas de Manufactura, las instalaciones se encuentran en buenas condiciones y los equipos y utensilios se encuentran limpios y son adecuados para la preparación de las ensaladas.

## **CAPÍTULO VI**

## 6.0 CONCLUSIONES

1. Con la guía de observación aplicada de las Buenas Prácticas en el manejo y dispensación de ensaladas frescas, se determinó que los establecimientos cumplen alrededor del 78.26% al 100.00% de los parámetros definidos, entre los que se mencionan las instalaciones, los equipos y utensilios; además que el personal esté bien capacitado en cuanto a la aplicación de las Buenas Prácticas de Manufactura, así como el control en el proceso de elaboración, almacenamiento y la distribución de alimentos en este caso.
2. Del total de 36 muestras de ensaladas frescas analizadas, quince de ellas presentaron recuentos altos de coliformes totales (5 a 5.95 log ufc/g), las 21 muestras restantes oscilan entre 4.93 a 2.77 log ufc/g.
3. Se identificó la presencia de bacterias diferentes a *E. coli* en once muestras de ensaladas frescas a través de la galería API 20E, como lo son: *K. oxytoca* en una muestra, *Enterobacter cloacae* en dos muestras, *K. pneumoniae spp pneumoniae I* en tres muestras y otras enterobacterias, todas estas representando el 30.55% del total de las muestras analizadas en la investigación.
4. Se determinó que el estrato Este presentó el menor porcentaje de cumplimiento con respecto a la guía de observación, teniendo un 78.26%, esto debido a que en las instalaciones los servicios sanitarios no se encontraban limpios, no había una ventilación adecuada, el personal no hacía uso de reddecilla, cubrebocas y no lavaban sus manos constantemente; los ingredientes no tenían una refrigeración adecuada y no los clasificaban por separado.
5. Se determinó que el estrato Este presentó el menor porcentaje de cumplimiento con respecto a la guía de observación, teniendo un 78.26%, ya que se observó que en las instalaciones los servicios sanitarios no se encontraban limpios, no había una ventilación adecuada, el personal no hacía uso de reddecilla, cubrebocas y no cumplían con los procedimientos de las Buenas Prácticas en el en el manejo y dispensación de ensaladas frescas.

6. Los ingredientes no contaban con una refrigeración adecuada y no eran clasificados por separado.
7. Se observó que el estrato sur cumplió al 100% con los requisitos establecidos por la guía de observación del grado de aplicación de las Buenas Prácticas en el manejo y dispensación de ensaladas frescas.

## **CAPÍTULO VII**

## 7.0 RECOMENDACIONES

Al Ministerio de Salud de El Salvador, a la Alcaldía de San Salvador Centro, a la Defensoría del consumidor, a la Superintendencia de Regulación Sanitaria:

1. Establecer de manera periódica monitoreos de vigilancia y evaluación de la calidad de las ensaladas frescas para evitar posibles enfermedades a la salud de la población.
2. Seguir implementando y aplicando en todo momento programas de Buenas Prácticas Higiénicas y de Manufactura por parte del personal que prepara y dispensa este tipo de alimento.
3. Monitorear procesos de desinfección y/o temperaturas de refrigeración de los materiales, a fin que las posibilidades de multiplicación bacteriana sean las mínimas posibles.
4. Que las instituciones correspondientes y los inspectores de saneamiento de la alcaldía realicen inspecciones periódicas en los establecimientos de comida rápida para chequear los tipos de desinfectantes que se utilizan en el lavado y desinfección de los vegetales y hortalizas.
5. Promover la educación y capacitación, así como fortalecer la Educación para la Salud en nuestro país para prevenir enfermedades de transmisión alimentaria (ETA).

A futuras investigaciones:

6. Llevar a cabo estudios evaluando la calidad microbiológica del agua que es utilizada para el riego, lavado de verduras y hortalizas, ya que la contaminación puede provenir de la misma.
7. Realizar investigaciones para determinar la presencia de *Escherichia coli* en las diferentes etapas de la preparación de ensaladas, desde el recibimiento de las verduras y hortalizas, el lavado y desinfección, el corte de verduras y hortalizas hasta el momento del consumo de las ensaladas.

8. Realizar estudios de vida útil de las materias primas para la elaboración de ensaladas frescas, evaluando las características fisicoquímicas y microbiológicas de los ingredientes a diferentes tiempos para establecer límites aceptables de carga microbiana normal durante su estancia en almacenamiento.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pérez Porto, J. *Ensalada “Qué es, usos, definición y concepto”*. Definición. (2021) disponible en: <https://definicion.de/ensalada/>
2. Arboretum; Simarouba glauca; Universidad Francisco Marroquín; [Internet]; publicado en el 2006; [Consultado el 7 de junio de 2022]; Disponible en: <https://arboretum.ufm.edu/plantas/simarouba-glauca/>
3. Salguero Santos, Rene Mauricio; Vásquez Acevedo, María Magdalena; Estudio etnobotánica de plantas medicinales en el municipio de Santo Tomas; Medicinales, San Salvador, El Salvador, Centroamérica (1994).
4. Toledo Mendoza, Rina Antonieta; 50 especies de la flora medicinal existente en El Salvador, Asociación de promotores salvadoreños, investigación y fotografía; APROCSAL (2002).
5. Ficha técnica de pimiento *Capsicum annum*; Dynaverde S.A.; [Internet]; publicado el 12/06/2018, en Almería; [Consultado el 7 de junio de 2022]; Disponible en: [https://www.google.com/search?q=ficha+tecnica+de+pimiento+capsicum+annum&rlz=1C1CHBF\\_esSV883SV883&oq=ficha+tecnica+de+pimiento+capsicum+annum&aqs=chrome..69i57j33i10i160l2.11948j0j7&sourceid=chrome&ie=UTF-8](https://www.google.com/search?q=ficha+tecnica+de+pimiento+capsicum+annum&rlz=1C1CHBF_esSV883SV883&oq=ficha+tecnica+de+pimiento+capsicum+annum&aqs=chrome..69i57j33i10i160l2.11948j0j7&sourceid=chrome&ie=UTF-8)
6. Zavaleta Vásquez, Eva Judith; ZONIFICACIÓN AGROCLIMÁTICA DE LOS CULTIVOS DE FRESA (*Fragaria chiloensis* L.), LECHUGA (*Lactuca sativa* L.) Y REPOLLO (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) EN EL DEPARTAMENTO DE CHALATENANGO, EL SALVADOR.; Tesis de Pregrado (Ingeniero Agrónomo); San Salvador, El Salvador; Emitida en Universidad de El Salvador (2019); Disponible en: <https://ri.ues.edu.sv/id/eprint/20553/1/13101709.pdf>
7. Eroski Consumer, 2020. Guía Práctica de Verduras, Pepino. Disponible en: Pepino | Introducción | Hortalizas y verduras | CONSUMER EROSKI

8. Ministerio de Agricultura y Ganadería; Aspectos técnicos sobre cuarenta y cinco cultivos agrícolas de Costa Rica. p. 347; San José, Costa Rica (1991).; [Consultado el 7 de junio de 2022]; Disponible en: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-0658pepino.pdf>
9. Fernández, Pedro, y otros. Producción de Tomate bajo Riego con Agua Magnetizada en Casa de Cultivo Protegida, Vol. 1, pp. 60-74. Universidad de Oriente, Cuba. (2019).
10. El huerto urbano; Ficha técnica del cultivo de la zanahoria; Valencia, España; [Internet]; publicado en el 2021; [Consultado el 7 de junio de 2022]; Disponible en: <https://www.elhuertourbano.net/ficha-tecnica-del-cultivo-de-la-zanahoria/>
11. OPS; Enfermedades transmitidas por alimentos; [Internet]; Oficina regional para las Américas de la organización mundial de la salud; [Consultado el 25 de junio de 2022]; Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/enfermedades-transmitidas-por-alimentos>
12. Intoxicación y contaminación alimentaria; [Internet]; American academy of Pediatrics (Estados Unidos y Canadá); Última actualización el 23/03/2022; [Consultado el 25 de junio de 2022]; Disponible en: <https://www.healthychildren.org/Spanish/health-issues/conditions/abdominal/Paginas/Food-Poisoning-and-Food-Contamination.aspx>
13. Doyle M & Beuchat L. Food Microbiology. 3ed edition, Editorial ASM Press. 2017.
14. Environment Agency. The Microbiology of Drinking Water. Part 1 – Water Quality and Public Health. Methods for the Examination of Waters and Associated Materials, Bristol, 2012.
15. Eslava C, Mateo J, Cravioto A. Cepas de *Escherichia coli* Relacionadas con la Diarrea en Diagnostico de Laboratorio de Infecciones Gastrointestinales. Secretaría de Salud. México. 2014.

16. Benvenuto Verónica. Determinación de *Escherichia coli* en agua de mar en Playas de Costa Verde. Universidad Ricardo Palma. Lima, Perú. 2017.
17. Farmer J.J. Enterobacteriaceae, Manual of Clinical Microbiology, 6ª ed. Washington, D.C. ASM Press 2015: 440.
18. Brooks G.F y otros. 2005. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick, Adelberg. 18 ed. Distrito Federal México. Ed. El manual moderno, S.A. de C.V. p. 246-248
19. Rodríguez, Ángeles. Principales Características y Diagnostico de los Grupos Patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública, México, 2002. Vol. 44, 464-475.
20. Vila, Jordi. (2011), “Brotos Epidémicos Causados por *Escherichia coli* diarreagénicas”. Universidad de Barcelona, España. Consultado el 08/01/2024, disponible en: <https://www.elsevier.es/index.php?p=revista&pRevista=pdf-simple&pii=S0210570511003748&r=14>
21. Feng P, D. Weagant S, Jinneman K. BAM Chapter 4: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. U.S. Food and Drug Administration. [Internet]. FDA; 2020. [Consultado el 21 de octubre de 2024]; Disponible en: BAM Chapter 4: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria (October 2020 Edition) (fda.gov)
22. Dirección de Promoción de la Calidad Alimentaria. “Buenas Prácticas de Manufactura de Alimentos”. Buenos Aires, Argentina, 2020.
23. Pazmiño, Tanya. Aplicación de Buenas Prácticas de Manufactura en un Restaurante de Comida Rápida, Guayaquil, Perú. Universidad de Guayaquil, (2014)
24. Carrasco, P. Padilla, D. Recomendaciones para la Aplicación de las Buenas Prácticas de Manufactura Alimentaria para Restaurantes y Cafeterías de los Hoteles de la Ciudad de Ibarra. Ecuador. 2015.

25. Ministerio de Salud, Ramo de Salud, “Norma Técnica de Alimentos”. San Salvador, El Salvador, 2013.
26. RTCA 67.01.33:06 INDUSTRIA DE ALIMENTOS Y BEBIDAS PROCESADOS. BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA. PRINCIPIOS GENERALES. Disponible en: <https://www.defensoria.gob.sv/images/stories/varios/RTCA/ALIMENTOS/NSORTCA67.01.33.06BPM.pdf>
27. DIGESTYC, Censos Nacionales El Salvador, Registro Administrativo de Solvencias, 2019.
28. Feng P, D. Weagant S, Jinneman K. BAM Chapter 4: Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria. U.S. Food and Drug Administration. Sección G. [Internet]. FDA; 2020. [Consultado el 27 de septiembre de 2023]; Disponible en: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria>
29. Mónica, P., Martínez, C., & Gastón, D. MANUAL DE PRESERVACIÓN DE BACTERIAS. [Internet]. 2020. [Consultado el 27 de septiembre de 2023]; <https://sgc.anlis.gob.ar/bitstream/123456789/1634/2/MANUAL%20DE%20PRESERVACION-INEI.pdf>
30. Feng P, D. Weagant S, Jinneman K. BAM Chapter 4: Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria. U.S. Food and Drug Administration. Sección E y F. [Internet]. FDA; 2020. [Consultado el 27 de septiembre de 2023]; Disponible en: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria>
31. Merck Microbiology Manual 12th Edition
32. api® 20 E TM. Francia [Internet]. bioMérieux SA; 2010 [Consultado el 27 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://quios.com.co/wp-content/uploads/2017/05/API-20E-FT.pdf>

33. Raúl Alejandro, S. T., & Juan Manuel, P. M. (s/f). MANUAL PARA LA CONSERVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS DE TRABAJO. [Consultado el 27 de septiembre de 2023]. <https://repositorio.ues.edu.sv/server/api/core/bitstreams/32b2a1cf-2dfd-4b26-a43d-3240ea2b0617/content>
34. RTCA 67.04.50:17 ALIMENTOS. CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA LA INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS [Internet]. minec.gob.sv. 2019 [citado el 28 de julio de 2024]. Disponible en: <http://infotrade.minec.gob.sv/ca/wp-content/uploads/sites/7/2019/03/ANEXO-RES-402-2018-RTCA-67045017-Criterios-Microbiologicos.pdf>
35. Al-Musawi AT, Abu-Almaaly RA, Kareem HS. Fecal Coliform Bacteria in Vegetable Salads Prepared in Baghdad Restaurants. *J Pure Appl Microbiol.* 2023;17(2):1214-1220. doi: 10.22207/JPAM.17.2.51. [citado el 24 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://microbiologyjournal.org/fecal-coliform-bacteria-in-vegetable-salads-prepared-in-baghdad-restaurants/>
36. Łepecka A, Zielińska D, Szymański P, Buras I, Kołożyn-Krajewska D. Assessment of the microbiological quality of ready-to-eat salads—are there any reasons for concern about public health? *Int J Environ Res Public Health* 2022;19: 1582. <https://doi.org/10.3390/ijerph19031582>. [citado el 24 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1660-4601/19/3/1582>
37. Ramos-Ortega LM, Vidal LA, Sandra VQ, Saavedra-Díaz L. Análisis de la contaminación microbiológica (coliformes totales y fecales) en la bahía de Santa Marta, Caribe colombiano [Internet]. 2008 [citado el 28 de marzo de 2024]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v13n3/v13n3a7.pdf>

38. Vázquez S, O'Neill S, Legnani M. IMPORTANCIA DE LOS COLIFORMES EN LOS ALIMENTOS [Internet]. Gub.uy. 2013 [citado el 28 de julio de 2024]. Disponible en: [https://montevideo.gub.uy/sites/default/files/importancia\\_de\\_los\\_coliformes\\_en\\_los\\_alimentos.pdf](https://montevideo.gub.uy/sites/default/files/importancia_de_los_coliformes_en_los_alimentos.pdf)
39. Violet red bile agar MUG [Internet]. Liofilchem.net. [citado el 1 de octubre de 2023]. Disponible en: [http://www.liofilchem.net/login/pd/ts/610187\\_TS.pdf](http://www.liofilchem.net/login/pd/ts/610187_TS.pdf)
40. Aljorayid A, Viau R, Castellino L, Jump RL. *Serratia fonticola*, pathogen or bystander? A case series and review of the literature. *IDCases*. 2016 May 24;5:6-8. doi: 10.1016/j.idcr.2016.05.003. PMID: 27347484; PMCID: PMC4909719. [citado el 29 de septiembre de 2024].
41. *Klebsiella pneumoniae* in Healthcare Settings, Centers for Disease Control and Prevention [Internet]. [citado el 29 de septiembre de 2024]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/klebsiella/klebsiella.html>.
42. Cruz AT et al. *Pantoea agglomerans*, a Plant Pathogen Causing Human Disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007, 45 (6): 1989–1992. [citado el 29 de septiembre de 2024].
43. Lopardo HÁ, Predari S, Vay C. Manual de microbiología clínica de la Asociación Argentina de Microbiología: enterobacterias [Internet]. 1a ed. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología; 2016 [citado el 29 de septiembre de 2024]. Disponible en: <https://www.aam.org.ar/descarga-archivos/Parte21Enterobacterias.pdf>
44. Hoffmann H, Roggenkamp A. 2003. Population Genetics of the Nomenclature Species *Enterobacter cloacae*. *Appl Environ Microbiol* 69. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5306-5318.2003>. [citado el 29 de septiembre de 2024].

45. Yang J, Long H, Hu Y, Feng Y, McNally A, Zong Z, 2022. *Klebsiella oxytoca* Complex: Update on Taxonomy, Antimicrobial Resistance, and Virulence. [Internet]. *Clin Microbiol Rev* 35:00006-21. [citado el 29 de septiembre de 2024]. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/CMR.00006-21>
46. Ingo Stock, Sonja Burak, Kimberley Jane Sherwood, Thomas Gröger, Bernd Wiedemann, Natural antimicrobial susceptibilities of strains of ‘unusual’ *Serratia* species: *S. ficaria*, *S. fonticola*, *S. odorifera*, *S. plymuthica* and *S. rubidaea*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. [Internet]. Volume 51, Issue 4, April 2003, Pages 865–885. [citado el 29 de septiembre de 2024]. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/jac/dkg156>
47. Centro histórico de SS · San Salvador, El Salvador [Internet]. Centro Histórico de SS · San Salvador, El Salvador. [citado el 1 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.google.com/maps/place/Centro+Hist%C3%B3rico+de+SS,+San+Salvador/@13.6986789,-89.1943073,15z/data=!3m1!4b1!4m6!3m5!1s0x8f6330ebffdbfb45:0x513c506801a25f0e!8m2!3d13.6957674!4d-89.1967819!16s%2Fg%2F120jwzzn?entry=ttu>
48. Britania. Agua Peptonada Bufferada. [Citado el 1 de octubre de 2023]. Disponible en: [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_60705cfda7b5e.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_60705cfda7b5e.pdf)
49. Tripteína Soya Agar [Internet]. Britanialab.com. 2021 [citado el 1 de octubre de 2023]. Disponible en: [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_6054e7678b1e3.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6054e7678b1e3.pdf)

## **ANEXOS**

## ANEXO N°1

### DELIMITACIÓN CENTRO HISTORICO SAN SALVADOR



**Figura N°5.** Delimitación geográfica del centro histórico del distrito de San Salvador centro, dividido en los cuatro estratos.<sup>47</sup>

Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO N° 2.**

**ETIQUETA PARA IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS.**

Código de muestra:	
Lugar:	
Hora y Fecha de muestreo:	
Recolector de muestra:	Firma:
Observaciones:	

**Figura N°7.** Formato de etiqueta utilizada para identificar cada una de las muestras recolectadas.  
Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO N° 3**

**EVALUACIÓN DE BUENAS PRÁCTICAS HIGIÉNICAS**

Hoja de Evaluación de Buenas Prácticas Higiénicas en la Dispensación de Ensaladas Frescas											
Estrato		Norte			Sur			Este			Oeste
Establecimiento N°		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1
Fecha de Evaluación:											
Evaluador:											
No.	Inspección	C	NC	Observaciones							
<b>1</b>	<b>INSTALACIONES</b>										
1.1	Pisos de fácil limpieza										
1.2	Ventilación adecuada										
1.3	Iluminación correcta										
1.4	Techos sin presencia de plaga										
1.5	Abastecimiento de agua potable										
1.6	Drenajes sanitarios										
1.7	Servicios sanitarios limpios										
1.8	Instalaciones para lavado de manos										
1.9	Programas de limpieza visibles										
1.10	Control de plaga										
<b>2</b>	<b>EQUIPOS Y UTENSILIOS</b>										
2.1	Equipo adecuado al proceso y en buenas condiciones										
2.2	Equipo limpio										
2.3	Materiales de los equipos son de acero inoxidable										
<b>3</b>	<b>PERSONAL</b>										
3.1	Aplicación de BPM según manual										
3.2	Vestimenta adecuada para cocina										

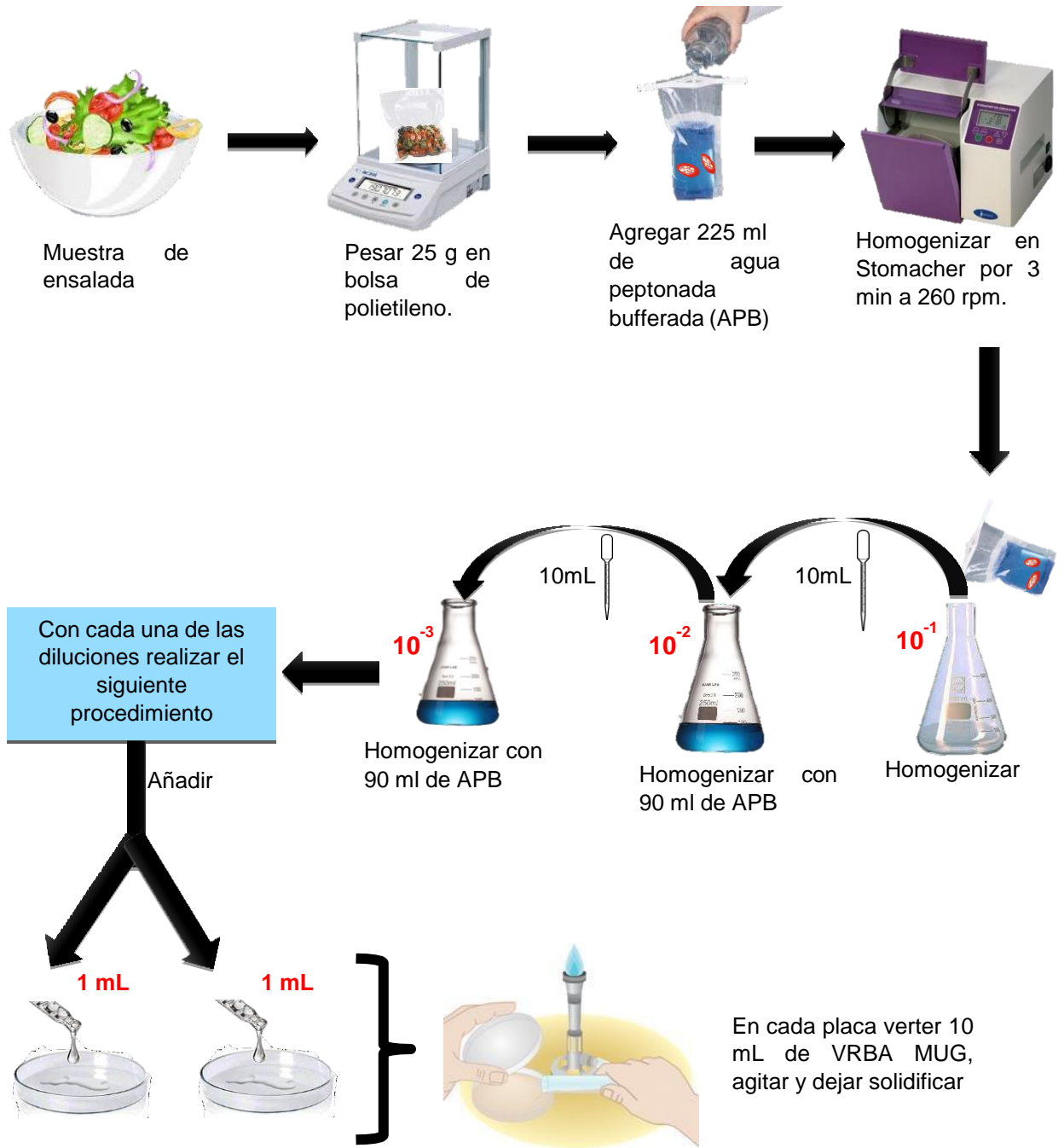
**Figura N°6.** Hoja de Evaluación de Buenas Prácticas Higiénicas en la dispensación de Ensaladas Frescas.  
Fuente: Elaboración propia.

**Figura N°6** (Continuación).

3.3	Uso de redecilla y cubrebocas			
3.4	Lavado de manos constante por parte del personal			
<b>4</b>	<b>CONTROL EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN</b>			
4.1	Clasificación de ingredientes por separado			
4.2	Refrigeración adecuada antes de mezclar ingredientes.			
4.3	Limpieza y orden del área de trabajo			
<b>5</b>	<b>ALMACENAMIENTO Y DISTRIBUCIÓN</b>			
5.1	Producto terminado empacado higiénicamente			
5.2	Envase adecuado al producto dispensado			
5.3	Adecuada manipulación posterior al empacado.			

## **ANEXO N° 4**

### **ESQUEMA DE REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS DE ENSALADAS FRESCAS**



**Figura N°8.** Esquema de aislamiento y detección de aislamiento presuntivo de *E. coli* en ensaladas frescas.

Fuente: Elaboración propia.

**Figura N°8** (continuación).



Invertir las placas solidificadas e incubar a 35°C durante 18 - 24 h



Elija todas las colonias típicas que resulten positivas (hasta 10, si >10 están presentes)



Transferir a placas con agar TSA.



Resultados

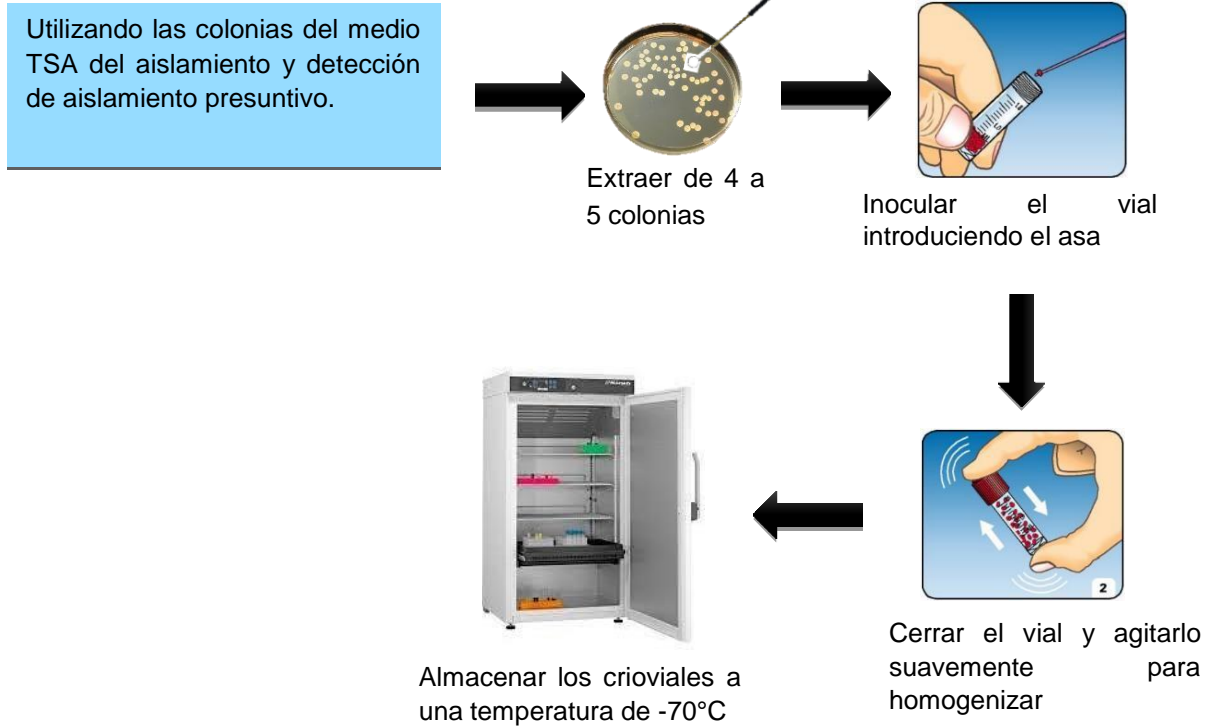


Incubar a 35-37°C durante 24 - 48 h



## ANEXO N° 5

### ESQUEMA DE CRIOPRESERVACIÓN



**Figura N°9.** Esquema de preservación en crioviales de colonias presuntivas de *E. coli*.  
Fuente: Elaboración propia

**ANEXO N° 6**

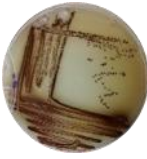

**CARACTERÍSTICAS POSITIVAS DE *E. coli* EN DIFERENTES MEDIOS DE  
CULTIVO**

Medios con reacciones indicativas para detectar <i>E. coli</i>			
MEDIO	Características positivas	Caldos	Características Positivas
MacConkey 	Colonias rosadas-rojizas. Puede observarse halo de precipitación biliar.	LMX 	Color verde azulado del caldo y fluorescencia azul utilizando una fuente de luz UV de onda larga (366 nm).
VRBA 	Colonias rojo púrpura, rodeadas por un halo de precipitación rojizo, con un diámetro de 1-2 mm	EC 	Medio turbio, con producción de gas. (incubación a 44.5 °C)
VRBA-MUG 	Colonias rojas con halos rojo-púrpura. Las cepas Beta-glucuronidasa positivas de <i>E. coli</i> se muestran con halos fluorescentes cuando se controlan bajo una luz UV.		
Chromocult 	Colonias de color azul oscuro a violeta.		
EMB 	Brillo metálico verdoso en luz reflejada, centro negro azulado en luz transmitida.		
ENDO 	Colonias rojas, con brillo metálico permanente		
<i>E. coli</i> O157 	Colonias amarillas, MUG (+) ya que presenta fluorescencia, sorbitol (+) por presencia de colonias amarillas.		
SMAC 	Colonias rojas, sorbitol (+)		

**Figura N°10.** Características positivas de *E. coli* en cada medio de cultivo con reacciones indicativas para detectar *E. coli* y medios con reacciones indicativas para detectar enterobacterias diferentes a *E. coli*, utilizadas en las pruebas complementarias.<sup>31</sup>

Fuente: Elaboración propia.

**Figura N°10** (continuación).

<b>Medios con reacciones indicativas para detectar enterobacterias diferentes a <i>E. coli</i></b>	
<b>MEDIO</b>	<b>Características Positivas de <i>E. coli</i>.</b>
BS 	Colonias de color marrón-verde.
SS 	Colonias de rosa a rojo.

# ANEXO N° 7

## IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

api® 20 E™

075841 - xl - 2009/10

METHODOLOGIE / PROCEDURE / METHODIK / TECNICA / PROCEDIMENTO /  
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ / METOD / METODYKA

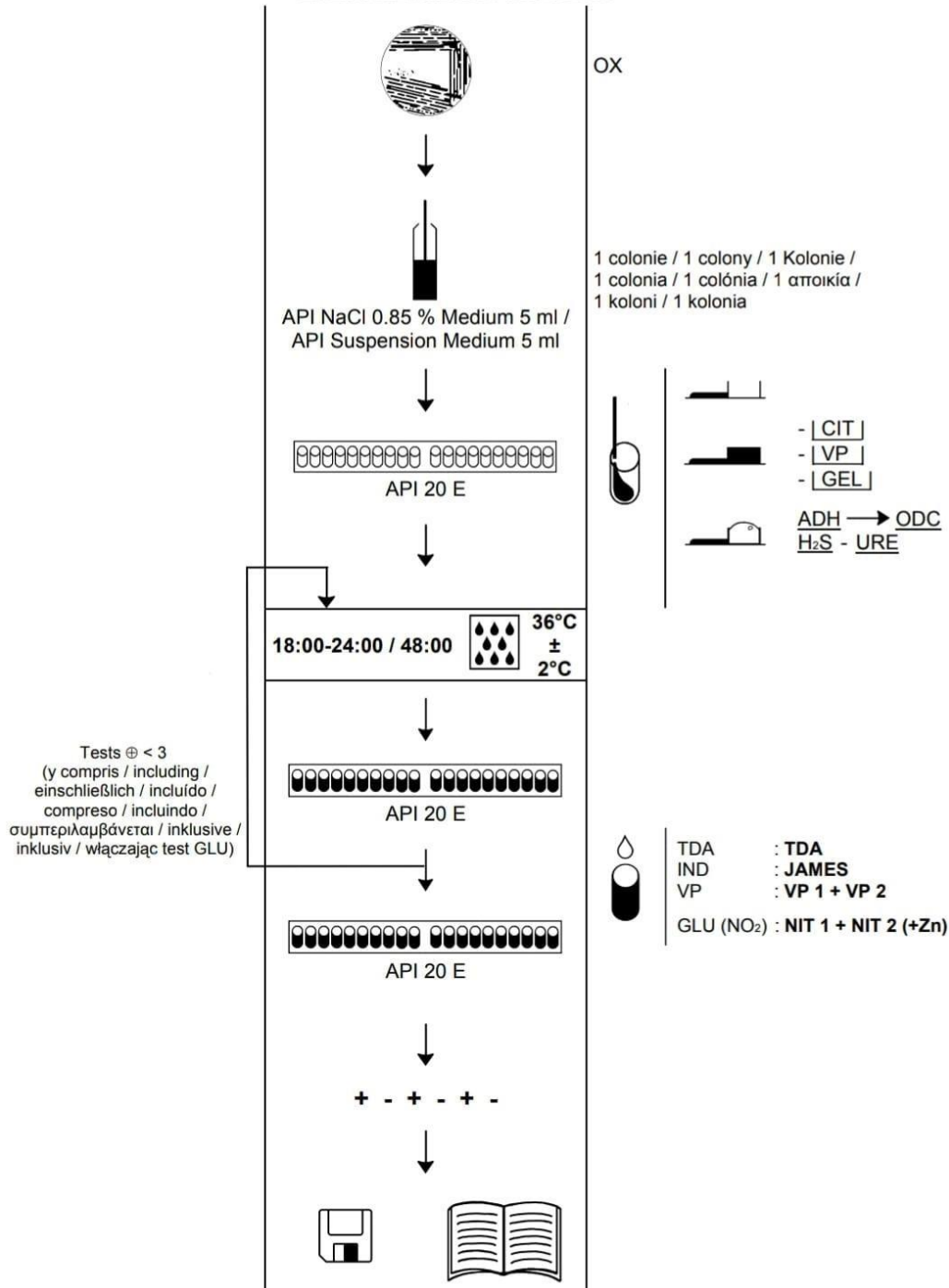


Figura N°11. Identificación bioquímica de *E. coli* con el sistema api® 20 E™.32

## ANEXO N° 8

### TABLA DE LECTURA

TABLA DE LECTURA

TESTS	COMPONENTES ACTIVOS	CANTIDAD (mg/cúp)	REACCIONES/ENZIMAS	RESULTADOS	
				NEGATIVO	POSITIVO
ONPG	2-nitro-fenil-βD-galactopiranosida	0,223	β-galactosidasa (orto-nitrofenil-βD-galactopiranosidasa)	incoloro	amarillo (1)
ADH	L-arginina	1,9	Arginina-dihidrolasa	amarillo	rojo/anaranjado (2)
LDC	L-lisina	1,9	Lisina Decarboxilasa	amarillo	rojo/anaranjado (2)
ODC	L-ornitina	1,9	Ornitina Decarboxilasa	amarillo	rojo/anaranjado (2)
CIT	citrato trisódico	0,756	utilización del CITrato	verde pálido/amarillo	azul-verde/azul (3)
H <sub>2</sub> S	tiosulfato sódico	0,075	producción de H <sub>2</sub> S	incoloro/grisáceo	depósito negro/fin liserado
URE	urea	0,76	UREasa	amarillo	rojo/anaranjado (2)
TDA	L-triptófano	0,38	Triptofano DesAminasa	<u>TDA / inmediato</u>	
				amarillo	marrón-rojizo
IND	L-triptófano	0,19	producción de ÍNDole	<u>JAMES / inmediato</u>	
				incoloro verde pálido/ amarillo	rosa
VP	piruvato sódico	1,9	producción de acetoína (Voges Proskauer)	<u>VP 1 + VP 2 / 10 min</u>	
				Incoloro / rosa pálido	Rosa / rojo (5)
GEL	Gelatina (origen bovino)	0,6	Gelatinasa (GELatina)	no difusión	difusión pigmento negro
GLU	D-glucosa	1,9	fermentación/oxidación (GLUcosa) (4)	azul/azul verdoso	amarillo/amarillo grisáceo
MAN	D-manitol	1,9	fermentación/oxidación (MANitol) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
INO	inositol	1,9	fermentación/oxidación (INOsitol) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
SOR	D-sorbitol	1,9	fermentación/oxidación (SORbitol) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
RHA	L-ramnosa	1,9	fermentación/oxidación (RHAmnosa) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
SAC	D-sacarosa	1,9	fermentación/oxidación (SACarosa) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
MEL	D-melibiosa	1,9	fermentación/oxidación (MELibiosa) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
AMY	amigdalina	0,57	fermentación/oxidación (AMYgdalina) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
ARA	L-arabinosa	1,9	fermentación/oxidación (ARAbinosa) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
OX	(ver ficha técnica del test de oxidasa)		citocromo-OXidasa	(ver ficha técnica del test de oxidasa)	

(1) Un color amarillo muy ligero también implica resultado positivo.

(2) La aparición de un color naranja tras 36-48 H de incubación debe considerarse negativa.

(3) Lectura en la cúpula (zona aerobia).

(4) La fermentación comienza en la parte inferior de los tubos, mientras que la oxidación empieza en la cúpula.

(5) Una ligera coloración rosa, que aparece tras 10 minutos, debe ser leída como negativa.

- Las cantidades indicadas pueden ser ajustadas en función de los títulos de las materias primas.
- Ciertas cúpulas contienen componentes de origen animal, en concreto peptonas.

**Figura N°12.** Tabla de lectura de la galería api® 20 E™.32

## ANEXO N° 9

### HOJA DE RESULTADOS

**api® 20 E** CE 07223 C

REF : \_\_\_\_\_

Origine / Source / Herkunft /  
Origen / Origen / Προέλευση /  
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

BIOMÉRIEUX

1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
ONPG	ADH	LDC	ODC	LCIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	LVP	LGEL	GLU	MAN	IND	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	MOB	McC	OF-O	OF-F						

Autres tests / Other tests / Andere Tests /  
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /  
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /  
Andre tests / Inne testy :

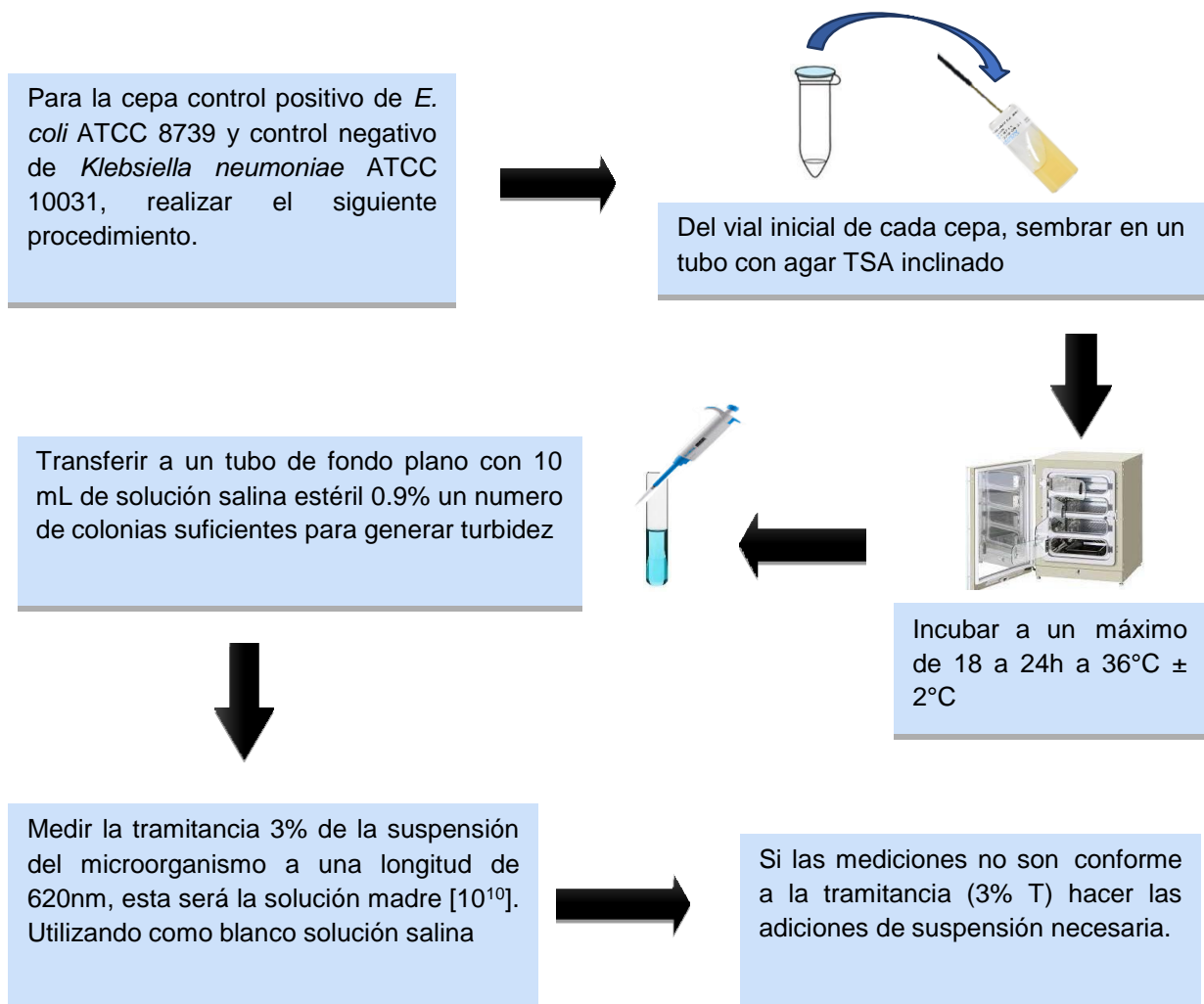
Ident. / Ταυτοποίηση :

Imprimé en France / Printed in France

Figura N°13. Hoja de resultados de galería api® 20 E TM.32

## ANEXO N° 10

### ESTANDARIZACIÓN DE MICROORGANISMOS



**Figura N° 14.** Representación esquemática de protocolo de estandarización de microorganismos.

Fuente: Elaboración Propia.

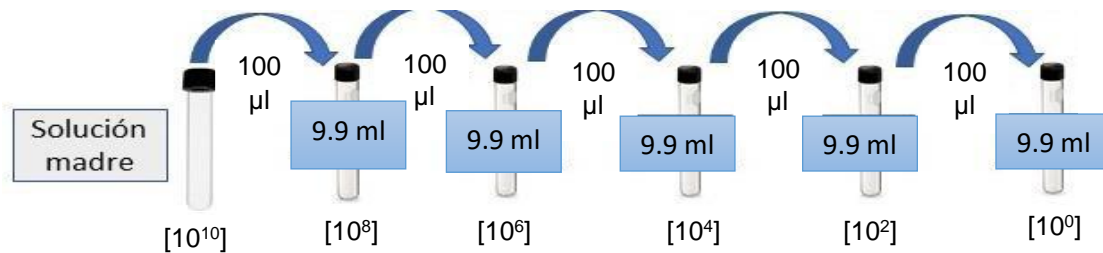
**ANEXO N° 11**

**RECuento DE MICROORGANISMOS**

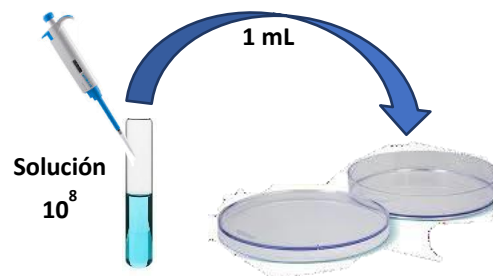
De la solución madre, transferir 100µl con micropipeta a 9.9 ml de solución salina 0.9% en un tubo estéril de fondo plano (solución con concentración  $10^8$ ).



Hacer cuatro soluciones seriadas tomando 100 µL de la solución anterior a 9.9 mL de solución salina 0.9%, hasta llegar a la concentración  $10^0$ . Homogenizar bien cada



Tomar un inóculo de 1 ml de la solución con concentración  $10^8$ , y transferir a una placa estéril de 100 X 15 mm. Desde este paso realizar el mismo procedimiento con las concentraciones  $10^6$ ,  $10^4$ ,  $10^2$  y  $10^0$ . Llevar todo por duplicado

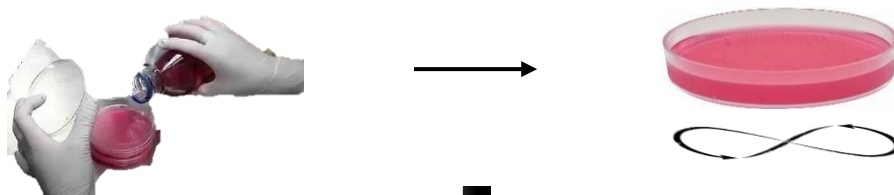


**Figura N°15.** Protocolo de verificación del recuento de microorganismos en la suspensión estandarizada.

Fuente: Elaboración propia.

Figura N°15 (continuación).

Agregar 10 ml de agar VRBA-MUG a temperatura no mayor a 45° C y agitar en forma de ocho moderadamente sin movimientos bruscos, dejar solidificar.



Incubar a un máximo de 18 a 24h a 36°C ± 2°C

Realizar el recuento



**NOTA 1:** Con el control positivo *E. coli* ATCC 8739 seleccionar la dilución en la cual se evidencia apropiadamente las características del microorganismo, en la cual se puede llevar a cabo un recuento que permita comprobar la concentración de la solución madre

**NOTA 2:** Realizar el mismo procedimiento para el control negativo de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 y seleccionar la dilución que evidencia las características en agar VRBA-MUG, con la diferencia que esta no da fluorescencia.

**ANEXO N° 12**

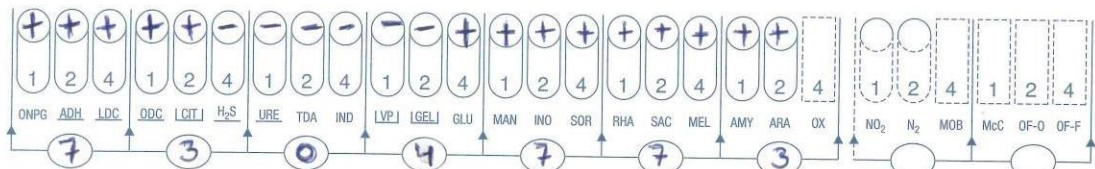
**HOJAS DE RESULTADOS DE LAS PRUEBAS API 20E**

**api® 20E**



07223 C

REF : 20231211-05 | 20,24 | 0,3 | 0,6  
Origine / Source / Herkunft /  
Origen / Origen / Προέλευση /  
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :  
**Ensalada Fresca**



Autres tests / Other tests / Andere Tests /  
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /  
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /  
Andre tests / Inne testy :

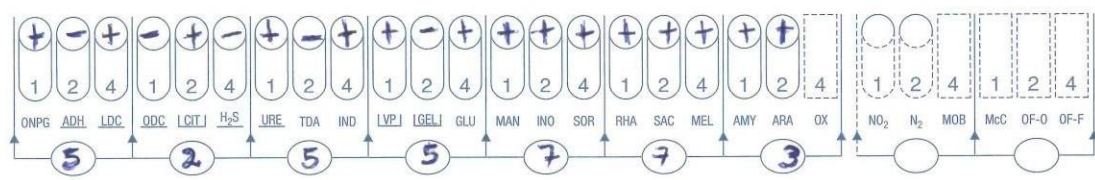
Ident. / Ταυτοποίηση :  
**7304773 Serratia Fonticola**

**api® 20E**



07223 C

REF : 20231218-10 | 20,23 | 0,3 | 0,6  
Origine / Source / Herkunft /  
Origen / Origen / Προέλευση /  
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :  
**Ensalada Fresca**



Autres tests / Other tests / Andere Tests /  
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /  
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /  
Andre tests / Inne testy :

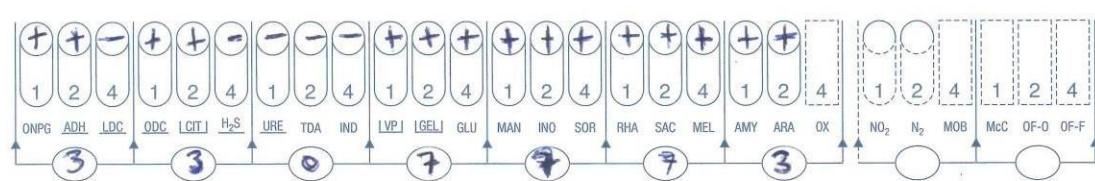
Ident. / Ταυτοποίηση :  
**5255773 Klebsiella oxytoca**

**api® 20E**



07223 C

REF : 20231218-14 | 20,24 | 0,3 | 0,6  
Origine / Source / Herkunft /  
Origen / Origen / Προέλευση /  
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :  
**Ensalada Fresca**



Autres tests / Other tests / Andere Tests /  
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /  
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /  
Andre tests / Inne testy :

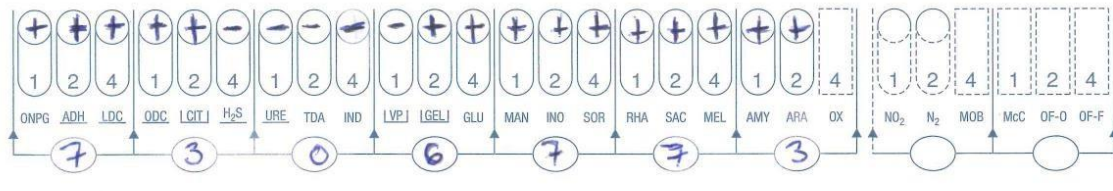
Ident. / Ταυτοποίηση :  
**3307773 Enterobacter cloacae**

**Figura N°16.** Ficha de resultados de identificación de la tabla de lectura API® 20E™ para las muestras 20231211-05, 20231218-10 y 20231218-14.

API® 20E



07223 C REF : 2024 0109-16 20,24 / 03 / 06  
Origine / Source / Herkunft /  
Origen / Origen / Προέλευση /  
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :  
Ensalada Fresca



Autres tests / Other tests / Andere Tests /  
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /  
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /  
Andre tests / Inne testy :

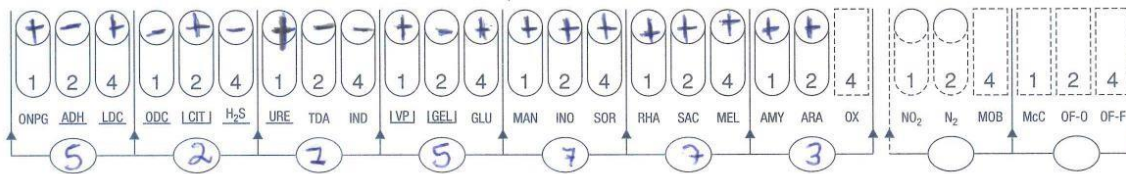
Ident. / Ταυτοποίηση :  
7306773  
Serratia liquefaciens.

API® 20E



07223 C REF : 20240109-19 20,24 / 02 / 29  
Origine / Source / Herkunft /  
Origen / Origen / Προέλευση /  
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :  
Ensalada Fresca

BIOMÉRIEUX



Autres tests / Other tests / Andere Tests /  
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /  
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /  
Andre tests / Inne testy :

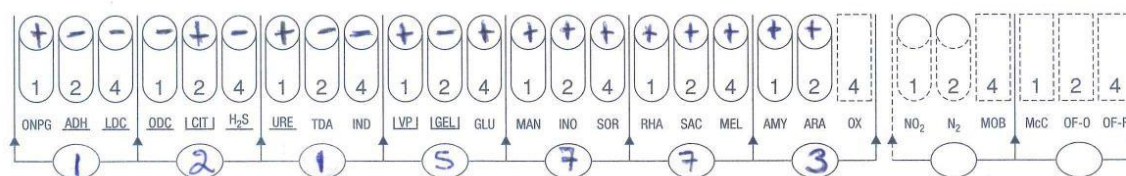
Ident. / Ταυτοποίηση :  
5215773 Klebsiella  
pneumoniae  
spp  
pneumoniae 1.

API® 20E



07223 C REF : 20240115-23 20,24 / 02 / 29  
Origine / Source / Herkunft /  
Origen / Origen / Προέλευση /  
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :  
Ensalada Fresca

BIOMÉRIEUX



Autres tests / Other tests / Andere Tests /  
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /  
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /  
Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση :  
1215773 Klebsiella  
pneumoniae spp  
pneumoniae 1

Figura N°17. Ficha de resultados de identificación de la tabla de lectura API® 20E™ para las muestras 20240109-16, 20240109-19 y 20240115-23.

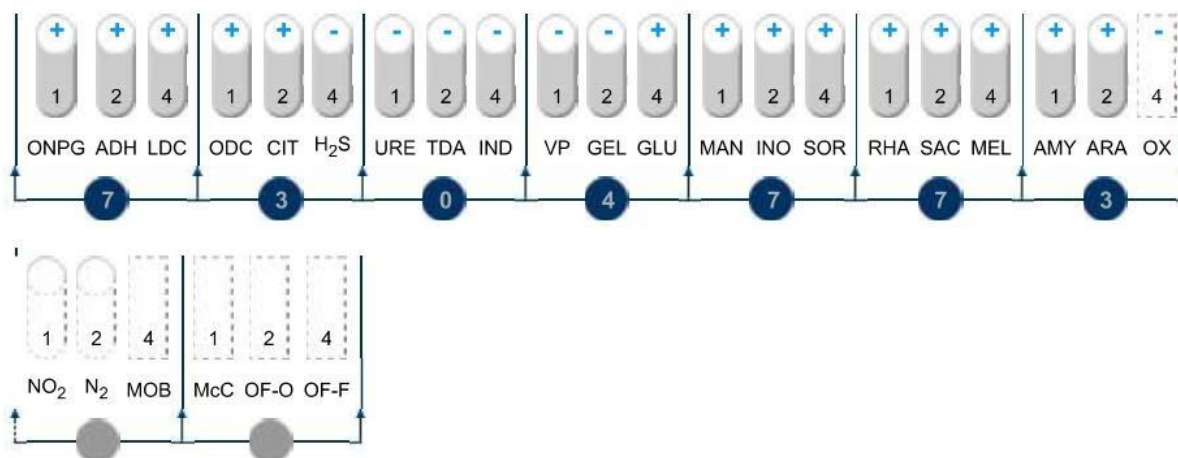




**ANEXO N° 13**

**PERFIL NÚMÉRICO DE CADA MUESTRA, LECTURA DE BIONÚMEROS CON  
APIWEB**

API 20 E V5.0



REFERENCIA

Facultad de Química y Farmacia-CENSALUD

FECHA

21/03/24

COMENTARIO

20231211-05

PERFIL DUDOSO

Galería	API 20 E V5.0
Perfil	7 3 0 4 7 7 3
Nota	

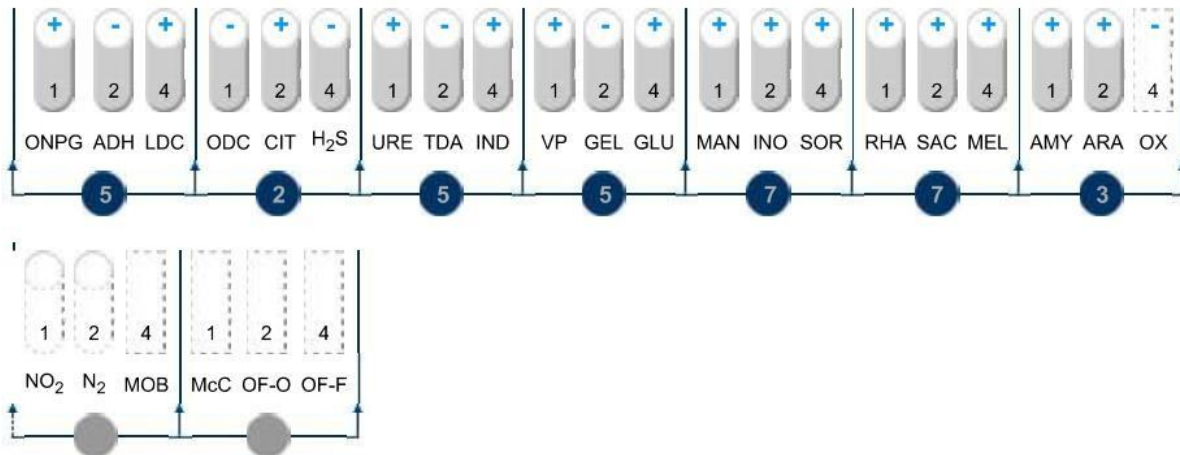
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Serratia fonticola</i>	40.5	0.44	ADH	0%		
<i>Enterobacter aerogenes</i>	30.4	0.38	ADH	0%	VP	85%
<i>Enterobacter cloacae</i>	23.4	0.41	LDC	1%	VP	85%
					INO	12%

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Serratia liquefaciens</i>	2.4	0.33	ADH	1%	RHA	2%

Pruebas complementarias(s)	ROJO METILO	CELac	ADONITOLac	ESC (HYD.)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	6%	100%	98%	98%
<i>Enterobacter cloacae</i>	6%	98%	24%	30%
<i>Serratia fonticola</i>	100%	6%	100%	100%

Figura N°20. Hoja de resultados de identificación APIWEB y generación de bionúmeros a través de pruebas bioquímicas API 20E, para la muestra 20231211-05.

API 20 E V5.0



REFERENCIA

Facultad de Química y Farmacia-CENSALUD

FECHA

21/03/24

COMENTARIO

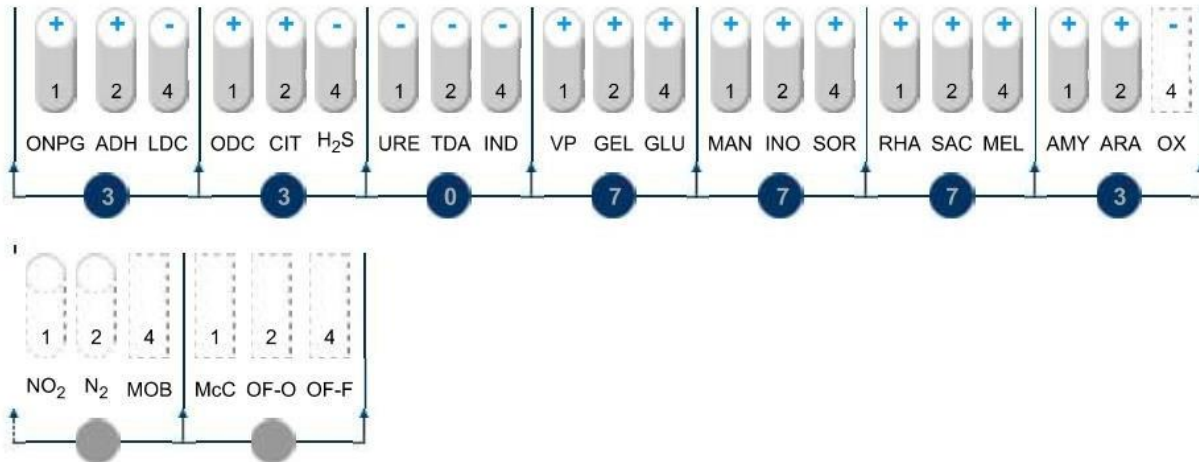
20231218-10

BUENA IDENTIFICACION

Galería	API 20 E V5.0		
Perfil	5 2 5 5 7 7 3		
Nota	POSIBILIDAD DE Raoultella planticola		
<b>Taxón significativo</b>	<b>% ID</b>	<b>T</b>	<b>Pruebas en contra</b>
Klebsiella oxytoca	97.3	1.0	
<b>Taxón siguiente</b>	<b>% ID</b>	<b>T</b>	<b>Pruebas en contra</b>
Raoultella ornithinolytica	2.4	0.72	ODC 99%
<b>Pruebas complementarias(s)</b>	<b>ROJO METILO</b>		
Klebsiella oxytoca	20%		
Raoultella planticola	100%		

Figura N°21. Hoja de resultados de identificación APIWEB y generación de bionúmeros a través de pruebas bioquímicas API 20E, para la muestra 20231218-10.

API 20 E V5.0



REFERENCIA

Facultad de Química y Farmacia-CENSALUD

FECHA

21/03/24

COMENTARIO

20231218-14

BAJA DISCRIMINACION

Galería	API 20 E V5.0				
Perfil	3 3 0 7 7 7 3				
Nota	POSIBILIDAD DE <i>Enterobacter cloacae</i>				

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra		
<i>Enterobacter cloacae</i>	51.0	0.53	GEL 1%	INO 12%	
<i>Cronobacter spp</i>	47.5	0.52	GEL 10%	SOR 1%	

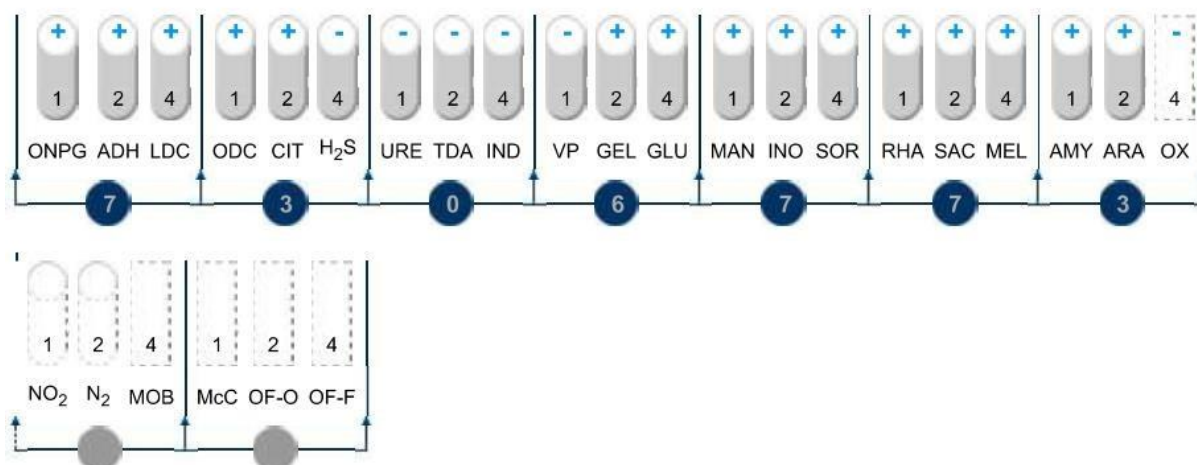
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra		
<i>Serratia liquefaciens</i>	1.1	0.34	ADH 1%	RHA 2%	

Pruebas complementarias(s)	AMARILLO	ESC (HYD.)
<i>Enterobacter cloacae</i>	0%	30%
<i>Cronobacter spp</i>	98%	100%

Figura N° 22. Hoja de resultados de identificación APIWEB y generación de bionúmeros a través de pruebas bioquímicas API 20E, para la muestra 20231218-14.

API 20 E V5.0



REFERENCIA

Facultad de Química y Farmacia-CENSALUD

FECHA

21/03/24

COMENTARIO

20240109-16

PERFIL DUDOSO

Galería	API 20 E V5.0
Perfil	7 3 0 6 7 7 3
Nota	

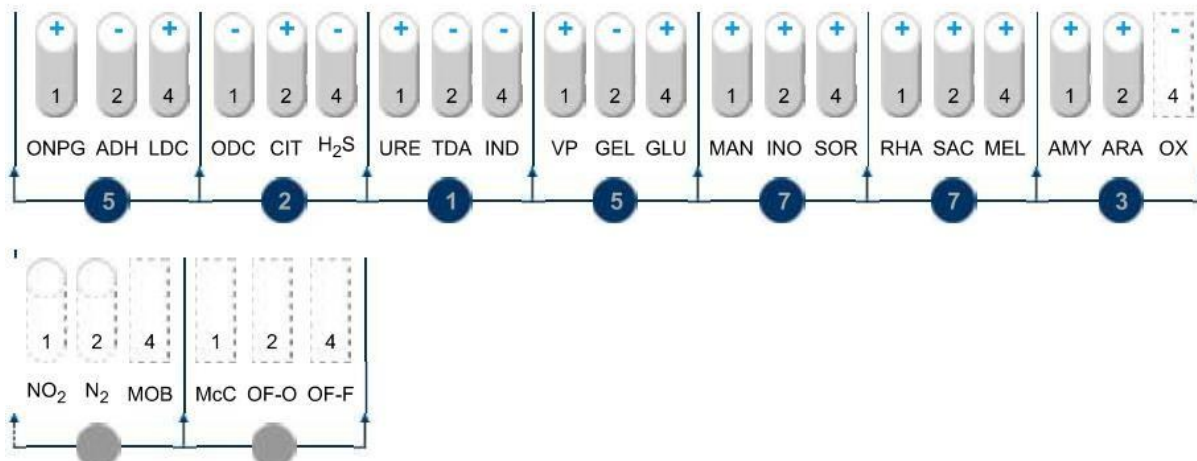
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Serratia liquefaciens</i>	63.9	0.37	ADH 1%	RHA 2%		
<i>Serratia odorifera</i> 1	29.8	0.22	ADH 0%	IND 99%		

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Enterobacter cloacae</i>	3.7	0.08	LDC 1%	VP 85%	GEL 1%	INO 12%

Pruebas complementarias(s)	5KG	CELac	LACTOSAac	GLUCOSA <sub>g</sub>
<i>Serratia liquefaciens</i>	98%	6%	9%	76%
<i>Serratia odorifera</i>	0%	100%	83%	7%

Figura N°23. Hoja de resultados de identificación APIWEB y generación de bionúmeros a través de pruebas bioquímicas API 20E, para la muestra 20240109-16.

API 20 E V5.0



REFERENCIA

Facultad de Química y Farmacia-CENSALUD

FECHA

21/03/24

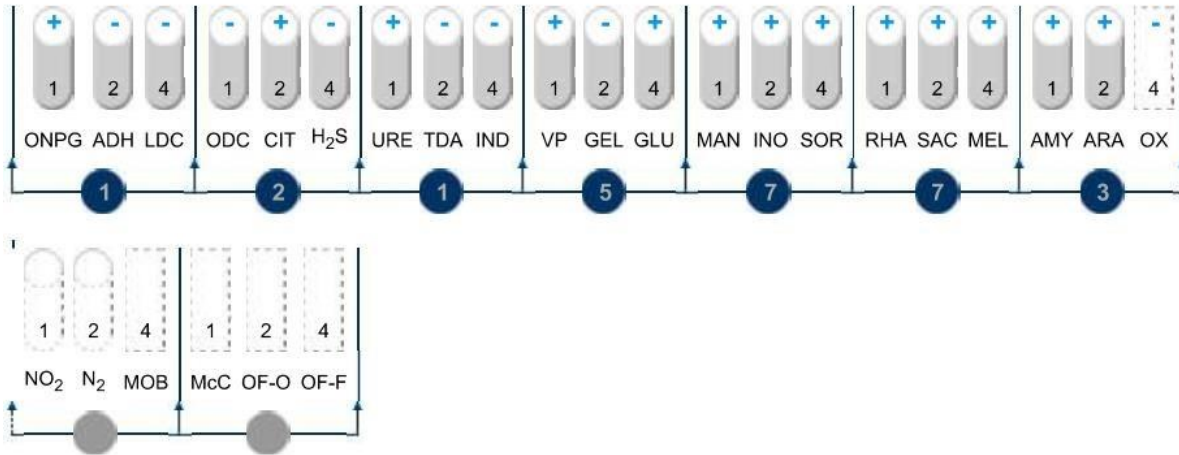
COMENTARIO

20240109-19

BUENA IDENTIFICACION			
Galería	API 20 E V5.0		
Perfil	5 2 1 5 7 7 3		
Nota	POSIBILIDAD DE Raoultella planticola		
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra
<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 1</i>	97.3	1.0	
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.7	0.72	IND 99%
Pruebas complementarias(s)	5KG	ROJO METILO	
<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	2%	9%	
<i>Raoultella terrigena</i>	91%	60%	
<i>Raoultella planticola</i>	98%	100%	

Figura N°24. Hoja de resultados de identificación APIWEB y generación de bionúmeros a través de pruebas bioquímicas API 20E, para la muestra 20240109-19.

API 20 E V5.0



REFERENCIA

Facultad de Química y Farmacia-CENSALUD

FECHA

21/03/24

COMENTARIO

20240115-23

BUENA IDENTIFICACION

Galería	API 20 E V5.0
Perfil	1 2 1 5 7 7 3
Nota	POSIBILIDAD DE Raoultella planticola

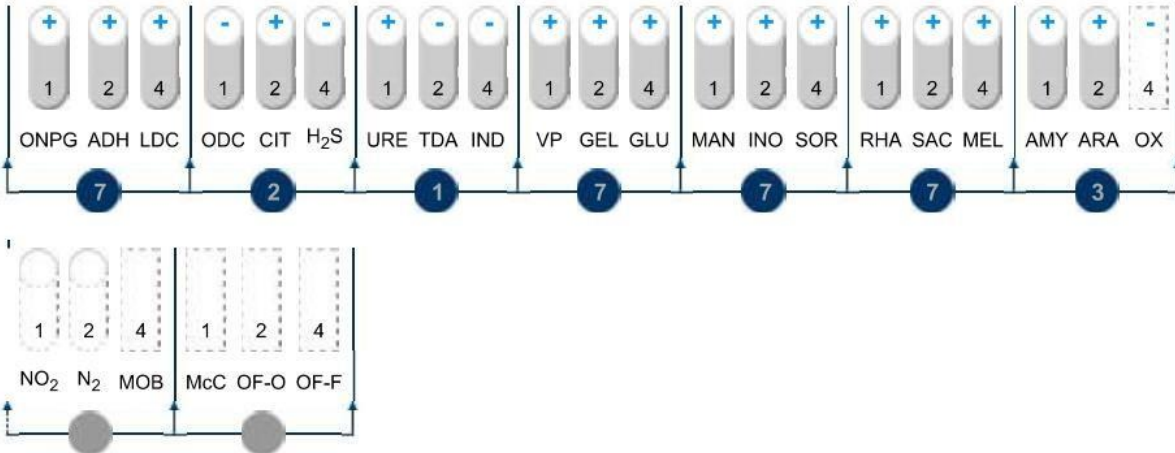
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> 1	98.2	0.93			

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra		
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1.2	0.62	LDC 80%	IND 99%	

Pruebas complementarias(s)	5KG	ROJO METILO		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i>	2%	9%		
<i>Raoultella terrigena</i>	91%	60%		
<i>Raoultella planticola</i>	98%	100%		

Figura N°25. Hoja de resultados de identificación APIWEB y generación de bionúmeros a través de pruebas bioquímicas API 20E, para la muestra 20240115-23.

API 20 E V5.0



REFERENCIA

Facultad de Química y Farmacia-CENSALUD

FECHA

21/03/24

COMENTARIO

20240115-26

PERFIL DUDOSO

Galería	API 20 E V5.0
Perfil	7 2 1 7 7 3
Nota	POSIBILIDAD DE <i>Raoultella planticola</i> POSIBILIDAD DE <i>Raoultella terrigena</i>

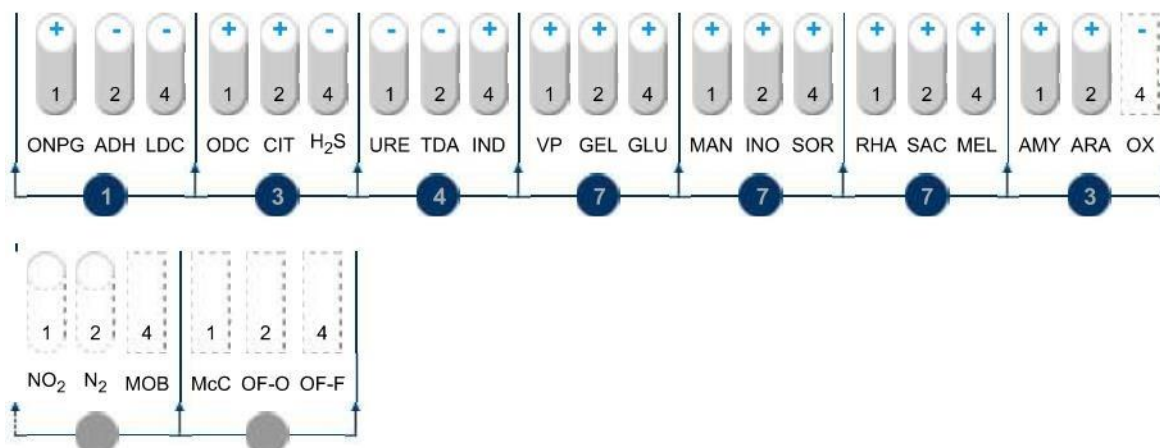
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 1</i>	90.7	0.18	ADH	1%	GEL	0%
<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 2</i>	8.4	0.02	ADH	1%	URE	1%

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra							
<i>Serratia liquefaciens</i>	0.2	0.0	ADH	1%	ODC	98%	URE	2%	RHA	2%

Pruebas complementarias(s)	5KG	ROJO METILO
<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	2%	9%
<i>Raoultella terrigena</i>	91%	60%
<i>Raoultella planticola</i>	98%	100%

Figura N°26. Hoja de resultados de identificación APIWEB y generación de bionúmeros a través de pruebas bioquímicas API 20E, para la muestra 20240115-26.

API 20 E V5.0



REFERENCIA

Facultad de Química y Farmacia-CENSALUD

FECHA

21/03/24

COMENTARIO

20240115-28

EXCELENTE IDENTIFICACION

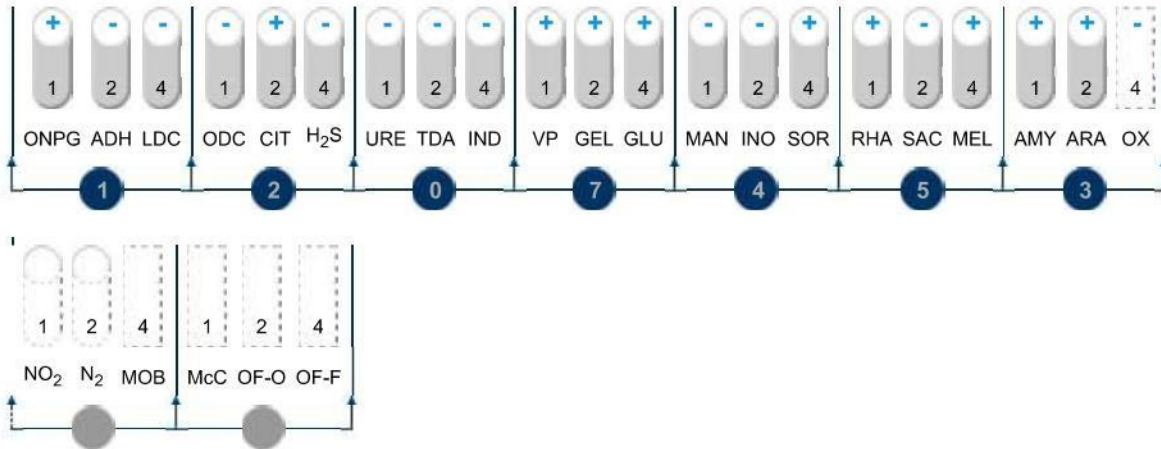
Galería	API 20 E V5.0
Perfil	1 3 4 7 7 7 3
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
<i>Serratia odorifera</i> 1	99.9	0.8	LDC	95%		

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra							
<i>Cronobacter</i> spp	0.1	0.22	ADH	96%	IND	25%	GEL	10%	SOR	1%

Figura N°27. Hoja de resultados de identificación APIWEB y generación de bionúmeros a través de pruebas bioquímicas API 20E, para la muestra 20240115-28.

API 20 E V5.0



REFERENCIA

Facultad de Química y Farmacia-CENSALUD

FECHA

21/03/24

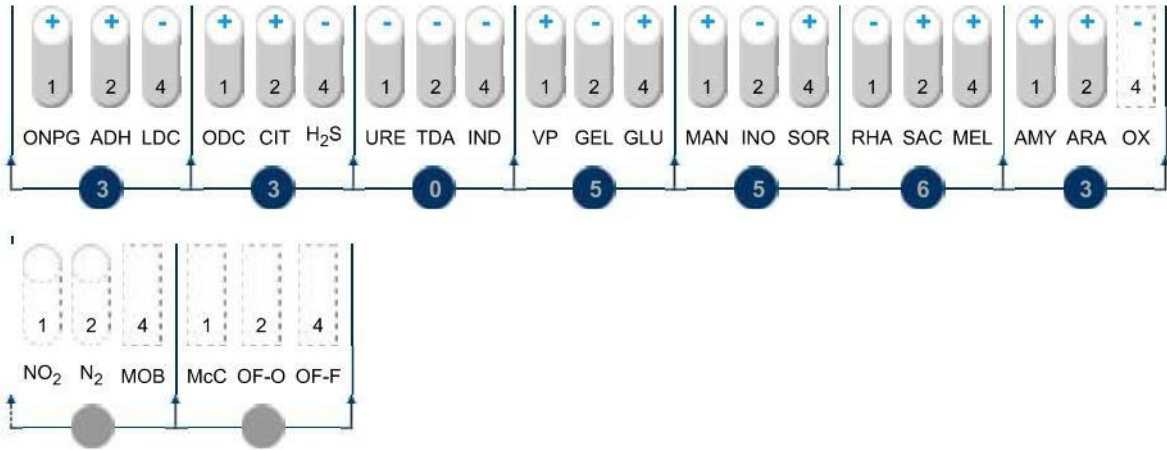
COMENTARIO

20240122-30

PERFIL DUDOSO						
Galería	API 20 E V5.0					
Perfil	1 2 0 7 4 5 3					
Nota						
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra			
Serratia ficaria	86.1	0.35	MAN 100%	SAC 99%		
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra			
Pantoea spp 2	8.7	0.23	GEL 4%	MAN 99%	SAC 98%	

Figura N°28. Hoja de resultados de identificación APIWEB y generación de bionúmeros a través de pruebas bioquímicas API 20E, para la muestra 20240122-30.

API 20 E V5.0



REFERENCIA

Facultad de Química y Farmacia-CENSALUD

FECHA

21/03/24

COMENTARIO

20240122-33

MUY BUENA IDENTIFICACION

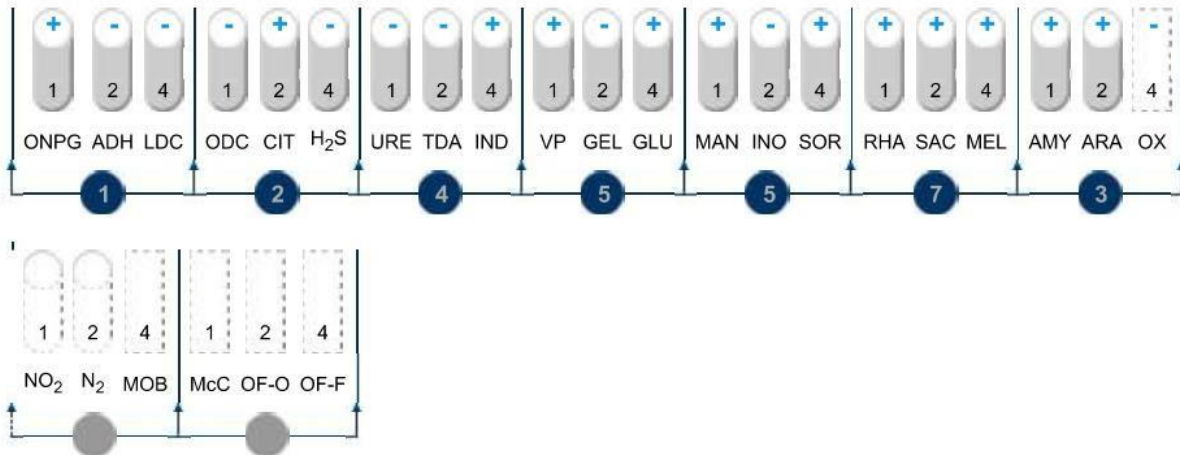
Galería	API 20 E V5.0
Perfil	3 3 0 5 5 6 3
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra
Enterobacter cloacae	99.3	0.88	RHA 85%

Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra
Enterobacter asburiae	0.2	0.44	ADH 25% VP 10% MEL 1%

**Figura N°29.** Hoja de resultados de identificación APIWEB y generación de bionúmeros a través de pruebas bioquímicas API 20E, para la muestra 2024012-33.

API 20 E V5.0



REFERENCIA

Facultad de Química y Farmacia-CENSALUD

FECHA

21/03/24

COMENTARIO

20240129-36

BUENA IDENTIFICACION									
Galería	API 20 E V5.0								
Perfil	1 2 4 5 5 7 3								
Nota	POSIBILIDAD DE <i>Erwinia spp</i>								
<b>Taxón significativo</b>	<b>% ID</b>	<b>T</b>	<b>Pruebas en contra</b>						
<i>Pantoea spp 2</i>	98.7	1.0							
<b>Taxón siguiente</b>	<b>% ID</b>	<b>T</b>	<b>Pruebas en contra</b>						
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0.5	0.53	LDC	80%	URE	78%	INO	99%	

Figura N° 30. Hoja de resultados de identificación APIWEB y generación de bionúmeros a través de pruebas bioquímicas API 20E, para la muestra 2024012-36.

## ANEXO N° 14

### PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS



**Figura N° 31.** Procesamiento de las muestras en el laboratorio del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador.  
Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO N° 15**

**HOJA DE COTEJO UTILIZADA EN LOS DIFERENTES ESTABLECIMIENTOS**

Hoja de Evaluación de Buenas Prácticas Higiénicas en la Dispensación de Ensaladas Frescas												
Estrato	Norte			Sur			Este			Oeste		
Establecimiento N°	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Fecha de Evaluación:	Lunes 18 de diciembre de 2023.											
Evaluador:	Andrea Abigail Vides Martínez.											
No.	Inspección			C	NC	Observaciones						
<b>1</b>	<b>INSTALACIONES</b>											
1.1	Pisos de fácil limpieza			X								
1.2	Ventilación adecuada			X								
1.3	Iluminación correcta			X								
1.4	Techos sin presencia de plaga			X								
1.5	Abastecimiento de agua potable			X								
1.6	Drenajes sanitarios			X								
1.7	Servicios sanitarios limpios			X								
1.8	Instalaciones para lavado de manos			X								
1.9	Programas de limpieza visibles			X								
1.10	Control de plaga			X								
<b>2</b>	<b>EQUIPOS Y UTENSILIOS</b>											
2.1	Equipo adecuado al proceso y en buenas condiciones			X								
2.2	Equipo limpio			X								
2.3	Materiales de los equipos son de acero inoxidable			X								
<b>3</b>	<b>PERSONAL</b>											
3.1	Aplicación de BPM según manual			X								
3.2	Vestimenta adecuada para cocina			X								
3.3	Uso de redcilla y cubrebocas			X								
3.4	Lavado de manos constante por parte del personal			X								
<b>4</b>	<b>CONTROL EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN</b>											
4.1	Clasificación de ingredientes por separado			X								

**Figura N° 32.** Lista de cotejo digital aplicada al establecimiento uno del estrato Sur.  
Fuente: Elaboración propia.

**Figura N°32** (Continuación).

4.2	Refrigeración adecuada antes de mezclar ingredientes.	X		
4.3	Limpieza y orden del área de trabajo	X		
<b>5</b>	<b>ALMACENAMIENTO Y DISTRIBUCIÓN</b>			
5.1	Producto terminado empacado higiénicamente	X		
5.2	Envase adecuado al producto dispensado	X		
5.3	Adecuada manipulación posterior al empacado.	X		

Hoja de Evaluación de Buenas Prácticas Higiénicas en la Dispensación de Ensaladas Frescas												
Estrato	Norte			Sur			Este			Oeste		
Establecimiento N°	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Fecha de Evaluación:	Lunes 15 de enero de 2024.											
Evaluador:	Andrea Abigail Vides Martínez.											
No.	Inspección			C	NC	Observaciones						
<b>1</b>	<b>INSTALACIONES</b>											
1.1	Pisos de fácil limpieza			X								
1.2	Ventilación adecuada				X							
1.3	Iluminación correcta				X							
1.4	Techos sin presencia de plaga			X								
1.5	Abastecimiento de agua potable			X								
1.6	Drenajes sanitarios			X								
1.7	Servicios sanitarios limpios				X							
1.8	Instalaciones para lavado de manos			X								
1.9	Programas de limpieza visibles				X							
1.10	Control de plaga			X								
<b>2</b>	<b>EQUIPOS Y UTENSILIOS</b>											
2.1	Equipo adecuado al proceso y en buenas condiciones			X								
2.2	Equipo limpio			X								
2.3	Materiales de los equipos son de acero inoxidable			X								
<b>3</b>	<b>PERSONAL</b>											
3.1	Aplicación de BPM según manual			X								
3.2	Vestimenta adecuada para cocina			X								
3.3	Uso de redcilla y cubrebocas				X	No utilizan cubrebocas						
3.4	Lavado de manos constante por parte del personal				X							
<b>4</b>	<b>CONTROL EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN</b>											
4.1	Clasificación de ingredientes por separado				X							

**Figura N° 33.** Lista de cotejo digital aplicada al establecimiento dos del estrato Este.  
Fuente: Elaboración propia.

**Figura N°33** (Continuación).

4.2	Refrigeración adecuada antes de mezclar ingredientes.		X	
4.3	Limpieza y orden del área de trabajo	X		
5	ALMACENAMIENTO Y DISTRIBUCIÓN			
5.1	Producto terminado empacado higiénicamente	X		
5.2	Envase adecuado al producto dispensado	X		
5.3	Adecuada manipulación posterior al empacado.	X		

## ANEXO N° 16

### AGUA PEPTONADA BUFFERADA

britannia<sup>▲</sup>

britannialab.com

REF B0219305 REF B0219306

# Agua Peptonada Bufferada

#### USO

Medio de cultivo empleado para el preenriquecimiento de microorganismos a partir de diferentes muestras. Es ampliamente utilizado en los protocolos de control higiénico de alimentos para la búsqueda de *Salmonella* spp.

#### FUNDAMENTO

Edel y Kampelmacher observaron que las diversas técnicas de conservación de alimentos tales como el calor, la desecación, el uso de conservantes, la alta presión osmótica o las modificaciones de pH causan problemas en la recuperación de las células dañadas de *Salmonella*.

La idea de utilizar un caldo de preenriquecimiento como medio no selectivo les permitió una mejor recuperación de *Salmonella*.

El Agua Peptonada Bufferada mantiene un pH alto durante el período de preenriquecimiento y anula los efectos del daño celular que pueden ocurrir a pH ácido. Esto es particularmente importante en las muestras de vegetales que tienen una baja capacidad reguladora. También puede ser utilizado para evaluar alimentos de aves de corral.

En el medio de cultivo, la peptona es la fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y los fosfatos forman un sistema buffer que regulan el pH del medio.

En los protocolos de búsqueda de *Salmonella* spp., subcultivar en Selenito Cistina Caldo (britannia<sup>▲</sup>) y/o en Tetratiónato Caldo Base (britannia<sup>▲</sup>).

#### CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

Código B0219305: envase x 100 g

Código B0219306: envase x 500 g

#### FÓRMULA (en gramos por litro)

PEPTONA DE CARNE .....	10.0
CLORURO DE SODIO .....	5.0
FOSFATO DISÓDICO.....	3.5
FOSFATO MONOPOTÁSICO.....	1.5
pH FINAL: 7.2 ± 0.2	

#### INSTRUCCIONES

Disolver 20 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Reposar 5 minutos. Mezclar calentando hasta ebullición durante 1 minuto y distribuir en recipientes apropiados.

Esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 minutos.

#### CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

Medio de cultivo deshidratado: color beige claro, homogéneo, libre deslizamiento.

Medio de cultivo preparado: color ámbar claro.

#### ALMACENAMIENTO

Medio de cultivo deshidratado a 10-35 °C.

Medio de cultivo preparado a 2-8 °C.

#### PROCEDIMIENTO

##### Siembra

Materia fecal: a un tubo conteniendo 10 ml de Agua Peptonada Bufferada, agregar 1 gramo o 1 ml de una suspensión de materia fecal o descargar el contenido del hisopo.

Alimentos: suspender 25 g o agregar 25 ml del alimento en 225 ml de Agua Peptonada Bufferada.

##### Incubación

En aerobiosis, a 33-37 °C durante 18-24 horas.

En el caso de utilizarse para el preenriquecimiento de especies de *Salmonella*, subcultivar en Selenito Cistina Caldo (britannia<sup>▲</sup>) o en Tetratiónato Caldo Base (britannia<sup>▲</sup>).

#### INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El crecimiento microbiano se observa por la turbidez del medio de

#### CONTROL DE CALIDAD

MICROORGANISMOS	CRECIMIENTO
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Satisfactorio
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Satisfactorio
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Satisfactorio
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	Satisfactorio
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Satisfactorio
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Satisfactorio

Figura N° 34. Ficha técnica del Agua Peptonada Bufferada.<sup>48</sup>

# ANEXO N° 17

## VRBA-MUG



HOJA TÉCNICA  
TS 610187  
Rev.1 / 27.04.2017  
Página 1 de 2

### Violet Red Bile Agar MUG

Medio para la detección de *Escherichia coli* y coliformes totales en agua, alimentos y derivados lácteos.

FÓRMULA	(g/l)
Peptona	7.0
Lactosa	10.0
Cloruro Sódico	5.0
Extracto de Levadura	3.0
Sal de bilis Número 3	1.5
Violeta de cristal	0.002
Rojo neutro	0.03
MUG	0.1
Agar	15.0

pH final 7.4 ± 0.2 a 25°C

#### DESCRIPCIÓN

Violet Red Bile Agar MUG es un medio utilizado para la detección de organismos coliformes y para la detección fluorogénica de *E. coli*.

#### PRINCIPIO

La Peptona proporciona nitrógeno, carbono, minerales y otros componentes necesarios para el crecimiento de los microorganismos. La Lactosa es la fuente de energía. El extracto de Levadura sirve como fuente de vitaminas, especialmente de vitaminas hidrosolubles del grupo B. La mezcla de sales de bilis y el violeta de cristal inhiben a las bacterias Gram-positivas. El rojo neutro es el indicador de pH. El MUG (4-metilumbeliferil-β-D-glucuronido) es un sustrato para la detección de la actividad de la glucuronidasa. El Agar es el agente solidificante.

#### PREPARACIÓN

Suspender 41,6 g del polvo deshidratado en 1 litro de agua destilada o desionizada. Mezclar bien. Calentar hasta la ebullición (evitando un sobrecalentamiento) removiendo frecuentemente hasta la completa disolución  
NO AUTOCLAVAR. Enfriar hasta 45-50°C. Dispensar asépticamente en placas Petri

#### TÉCNICA

Inocular e incubar las placas a 35 ± 2°C durante 22-26 horas.

#### INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los microorganismos fermentantes de la Lactosa producen colonias rojo-rosáceas rodeadas normalmente de una zona roja de precipitado de bilis. Los microorganismos no fermentantes de la Lactosa producen colonias incoloras. Las cepas Beta-glucuronidasa positivas de *E. coli* se muestran con halos fluorescentes cuando se controlan bajo una luz UV.

#### ALMACENAMIENTO

El polvo deshidratado es muy higroscópico, almacenar a 10-30°C, en un entorno seco, en su frasco original correctamente cerrado. Almacenar el material preparado a 2-8°C fuera del contacto de la luz. No utilizar el producto fuera de la fecha de caducidad descrita en la etiqueta o si el producto presenta alguna muestra de deterioro o contaminación.

#### ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Este producto no contiene sustancias peligrosas en concentraciones que excedan los límites fijados por la legislación actual y no está clasificado como peligroso. Se recomienda de todas formas la lectura de la hoja de seguridad para el uso apropiado. El producto está pensado para un uso exclusivo profesional y debe ser utilizado sólo por operadores debidamente adiestrados.

#### DESECHO DE RESÍDUOS

El desecho de los residuos debe realizarse según la regulación nacional y local vigente.

#### REFERENCIAS

1. American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Dairy Products, APHA, Washington, D.C.
2. APHA Technical Committee on Microbiological Methods for Foods. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, APHA, Washington, D.C.
3. American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, APHA, Washington, D.C.
4. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. AOAC, Arlington, VA.

**Figura N°35.** Ficha técnica de Agar de Bilis Rojo Violeta con MUG.<sup>39</sup>

**ANEXO N° 18**

**AGAR TSA**

# Tripteína Soya Agar

IVD

## USO

Medio utilizado para propósitos generales, favorece el desarrollo y aislamiento de una gran variedad de microorganismos aerobios, y anaerobios facultativos y estrictos.

Al ser suplementado con sangre permite el crecimiento de microorganismos exigentes y la clara visualización de reacciones de hemólisis.

Su fórmula cumple con los requerimientos de la Armonización de Farmacopeas Europea, Japonesa y de los Estados Unidos de Norteamérica (EP, JP y USP respectivamente).

## FUNDAMENTO

En el medio de cultivo, la tripteína y la peptona de soya aportan nutrientes ricos en péptidos, aminoácidos libres, bases púricas y pirimídicas, minerales y vitaminas. La peptona de soya además es fuente de hidratos de carbono que estimulan el crecimiento de diversos microorganismos. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el agar es el agente solidificante.

Puede ser utilizado como base a la cual se suplementa con nutrientes o con antimicrobianos, lográndose un medio enriquecido o selectivo de acuerdo al aditivo.

El agregado de 5-10 % sangre ovina desfibrinada estéril (**Britasheep**) promueve el desarrollo de bacterias exigentes en sus requerimientos nutricionales y la adecuada observación de las reacciones de hemólisis.

El agregado de extracto de levadura en concentración 0,6 % favorece el crecimiento de especies de *Listeria*.

Es un medio adecuado para cultivar y mantener cepas de *Aeromonas*, y aumentando el porcentaje de cloruro de sodio, para mantener cepas de algunos *Vibrios* (excepto *V. cholerae*).

## CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

Código B0210205: envase x 100 g.

Código B0210206: envase x 500 g.

## FÓRMULA (en gramos por litro)

TRIPTEÍNA.....	15.0
PEPTONA DE SOYA.....	5.0
CLORURO DE SODIO.....	5.0
AGAR.....	15.0
pH FINAL: 7.3 ± 0.2	

## INSTRUCCIONES

Disolver 40 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Mezclar y dejar reposar 5 minutos. Calentar agitando suavemente y hervir durante 1 o 2 minutos hasta su disolución total. Distribuir en recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 118-121 °C durante 15 minutos.

Preparación de Agar Sangre: agregar 5-10 % de sangre ovina desfibrinada estéril (**Britasheep**) al medio esterilizado, fundido y enfriado a 45-50 °C. Homogeneizar y distribuir en placas de Petri estériles.

## CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

Medio de cultivo deshidratado: color beige claro, homogéneo, libre deslizamiento.

Medio de cultivo preparado: color ámbar.

Suplementado con sangre: color rojo cereza.

## ALMACENAMIENTO

Medio de cultivo deshidratado a 10-35 °C.

Medio de cultivo preparado a 2-8 °C.

## PROCEDIMIENTO

### Siembra

Por inoculación directa del material en estudio, sobre la superficie del medio de cultivo.

### Incubación

El tiempo, la temperatura, y la atmósfera de incubación, dependerán del microorganismo que se quiera recuperar.

### En general se recomienda:

Bacterias de fácil crecimiento: en aerobiosis, a 33-37 °C durante 18 a 24 horas.

Bacterias exigentes en sus requerimientos nutricionales: en atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub> a 33-37 °C durante 24-48 horas.

## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Observar las características de las colonias.

Para el medio de cultivo conteniendo sangre, observar las reacciones de hemólisis:

Figura N°36 (continuación)

**Hemólisis alfa:** lisis parcial de los glóbulos rojos. Se observa un halo de color verdoso alrededor de la colonia en estudio. Es debido a la oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina (compuesto de color verdoso) por el peróxido de hidrógeno generado por los microorganismos.

**Hemólisis beta:** lisis total de los glóbulos rojos. Se observa un halo claro, brillante alrededor de la colonia en estudio.

**Hemólisis gamma:** ausencia de lisis de los glóbulos rojos. El medio de cultivo no presenta modificaciones de color y aspecto alrededor de la colonia en estudio.

**CONTROL DE CALIDAD**

MICROORGANISMOS	CRECIMIENTO
Escherichia coli ATCC 8739	Satisfactorio
Staphylococcus aureus ATCC 6538	Satisfactorio
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	Satisfactorio
Enterococcus faecalis ATCC 29212	Satisfactorio

**Tripteína Soya Agar suplementado con 5% de sangre ovina:**

MICROORGANISMOS	CRECIMIENTO	HEMÓLISIS
Streptococcus pyogenes ATCC 19615	Satisfactorio	Beta
Streptococcus pneumoniae ATCC 6305	Satisfactorio	Alfa
Streptococcus pneumoniae ATCC 49619	Satisfactorio	Alfa

CONTROL DE ESTERILIDAD	RESULTADO
Medio sin inocular	Sin cambios

**MATERIALES NECESARIOS NO PROVISTOS**

Equipos y material de laboratorio, microorganismos para control de calidad, reactivos y medios de cultivo adicionales según requerimiento.

**PRECAUCIONES**

- Solamente para uso diagnóstico in vitro. Uso profesional exclusivo.
- No utilizar el producto si al recibirlo su envase está abierto o dañado.
- No utilizar el producto si existen signos de contaminación o deterioro, así como tampoco si ha expirado su fecha de vencimiento.
- Utilizar guantes y ropa protectora cuando se manipula el producto.
- Considerar las muestras como potencialmente infecciosas y manipularlas apropiadamente siguiendo las normas de bioseguridad establecidas por el laboratorio.
- Las características del producto pueden alterarse si no se conserva apropiadamente.
- Descartar el producto que no ha sido utilizado y los desechos del mismo según reglamentaciones vigentes.

**REFERENCIAS**

- MacFaddin. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
- Holt, Krieg, Sneath, Staley and Williams (ed.). 1994. Bergey's Manual™ of determinative bacteriology, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
- Murray PR, Baron, Pfaller, Tenover and Tenover. 1999. Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Farmacopea Nacional Argentina, Codex Medicamentarius Argentino, Séptima Edición, volumen 1. 2003. Control Microbiológico de Productos no Obligatoriaamente Estériles.
- United States Pharmacopeia (USP 31). 2008. (61) Microbiological Examination of Nonsterile products: Microbial Enumeration Tests. Harmonized Method.
- United States Pharmacopeia (USP 31). 2008. (62) Microbiological Examination of Nonsterile products: Tests for Specified Microorganisms. Harmonized Method.

**INDICACIONES AL CONSUMIDOR**

Utilizar el producto hasta su fecha de vencimiento.  
Conservar el producto según las indicaciones del rótulo.

**AUTORIZACIÓN ANMAT**

PM -1292 - 22  
Dir. Técnico: Bioq. Alejandro Rossi

03/2021 - REV. 02

**SÍMBOLOS UTILIZADOS**

 IVD	 REF	 ELABORADOR	 STERILE	 N° DE DETERMINACIONES	 LOTE N°	 FECHA DE VENCIMIENTO	 LÍMITE DE TEMPERATURA	 INSTRUCCIONES DE USO
DIAGNÓSTICO IN VITRO	CÓDIGO N°	ELABORADOR	ESTÉRIL	N° DE DETERMINACIONES	LOTE N°	FECHA DE VENCIMIENTO	LÍMITE DE TEMPERATURA	INSTRUCCIONES DE USO