

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



**DETERMINACIÓN DE LA INOCUIDAD MICROBIOLÓGICA DE DOS
MARCAS DE ENSALADAS EMPACADAS LISTAS PARA CONSUMO,
COMERCIALIZADAS EN LOS SUPERMERCADOS DEL ÁREA
METROPOLITANA DE SAN SALVADOR.**

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

JOSUÉ GABRIEL HERRERA DÍAZ

GLORIA GABRIELA TORRES SOLORZANO

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA.

SEPTIEMBRE 2008

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR.

MSc. RUFINO ANTONIO QUEZADA SÁNCHEZ

SECRETARIO.

LIC. DOUGLAS VLADIMIR ALFARO CHÁVEZ

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANO.

LIC. SALVADOR CASTILLO ARÉVALO

SECRETARIA.

MSc. MORENA LIZETTE MARTÍNEZ DE DÍAZ

COMITÉ DE TRABAJO DE GRADUACIÓN

COORDINADORA GENERAL.

Lic. María Concepción Odette Rauda Acevedo.

ASESORA DE ÁREA DE APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES

MSc. Sonia Maricela Lemus Martínez

ASESORA DE ÁREA DE ANÁLISIS DE ALIMENTOS EN MICROBIOLOGÍA.

MSc. María Evelyn Sánchez de Ramos

DOCENTE DIRECTORA.

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz

AGRADECIMIENTOS

A Dios todopoderoso por permitirnos concluir satisfactoriamente nuestra carrera y habernos ayudado, guiado y sostenido en cada momento.

A nuestros padres por ayudarnos y hacer posible que lleguemos a este punto de éxito en nuestras vidas, gracias por sus esfuerzos y sacrificios.

Al resto de nuestra familia por darnos su apoyo, acompañarnos con sus oraciones y bendiciones.

Al comité de trabajos de graduación Lic. María Concepción Odette Rauda Acevedo. Coordinadora general. MSc. Sonia Maricela Lemus Martínez, MSc. María Evelyn Sánchez de Ramos, MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz Docente Directora. Por su ayuda en el proceso de graduación, guiarnos y aconsejarnos para culminar nuestras carreras con éxito.

Al resto de docentes por compartir con nosotros sus conocimientos, habilidades y ayudarnos en nuestra formación profesional.

Al personal de laboratorio, Administrativo y demás por brindarnos su colaboración durante el desarrollo de nuestra formación académica.

A nuestros amigos y compañeros que siempre estuvieron con nosotros, ayudándonos y con los cuales pasamos buenos momentos.

Gabriela y Josué

DEDICATORIA

A Dios todopoderoso que en cada momento de mi vida me ha ayudado, protegido y bendecido, y por el cual he podido llegar a este momento de mi vida y sin el cual nada es posible.

A mi querida madre Miriam Ernestina Díaz por darme mi estudio, su amor, darme el apoyo necesario, y siempre ayudarme en todo y cada una de las cosas que he necesitado, gracias por cubrir el excelente papel de madre.

A mi Tía Edith Rivera Pinto de Herrera que ha sido como una segunda madre para mí, siempre en la cual pude esperar su incondicional ayuda, su apoyo y su cariño y por lo cual le estoy ampliamente agradecido.

Al resto de mi familia por siempre darme apoyo, ánimo y ayudarme en los momentos cruciales de mi vida.

A mi compañera de tesis y amiga Gabriela Torres por ser la persona indicada con quien trabajar y siempre hacerlo de una forma excelente, por ser mi amiga ante todas las cosas y ser un pilar importante de apoyo.

A mis amigos y compañeros por ser ellos mismos, apoyarme siempre, ayudarme cuando lo necesite, y por los buenos momentos en los cuales desarrollamos nuestra amistad y compañerismo.

Josué Gabriel Herrera Díaz

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso por ser mi fortaleza y ayuda, por brindarme la oportunidad de culminar mi meta académica y por acompañarme y bendecirme en cada etapa de mi vida.

A mi madre Gloria de Torres por apoyarme incondicionalmente en cada etapa de mi vida, por ser un ejemplo y ser el pilar más fuerte e importante para mí. Y sobre todo por ser una gran amiga.

A mi padre Rigoberto Torres por su apoyo en los momentos de dificultad, consejo y oraciones que fueron fundamentales para que yo alcanzara esta meta.

A mis hermanos Mauricio y Alfredo por sus consejos y por compartir conmigo sus conocimientos.

Al resto de mi familia por creer siempre en mi y brindarme su apoyo.

A mi compañero de tesis y amigo Josue por brindarme su apoyo y comprensión en cada etapa de la carrera, por su impulso de aliento y fuerza pero sobre todo por su amistad incondicional.

A mis Amigos por su apoyo en cada momento, por su amistad valiosa y sincera.

Gabriela Torres

INDICE

	Pág.
Abreviaturas	
Resumen	
Capitulo I	
1.0 Introducción	xvii
Capitulo II	
2.0 Objetivos	19
Capitulo III	
3.0 Marco teórico	21
3.1 Hortaliza y verduras	22
3.1.1. Clasificación de hortalizas	22
3.2 Definición de ensaladas frescas	23
3.2.1 Definición de ensaladas frescas listas para consumir	23
3.2.2 Descripción de cada uno de sus componentes	
3.2.2.1 Lechuga	24
3.2.2.2 Cebolla	24
3.2.2.3 Apio	25
3.2.2.4 Zanahoria	25
3.3 Fuente y mecanismos de contaminación	25
3.3.1 Microflora de las hortalizas	26

3.3.2 Desinfección de verduras	27
3.4 Enfermedades asociadas al consumo de verduras y hortalizas	29
3.4.1 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS)	31
3.4.1.1 Infecciones Alimentarías	31
3.4.1.2 Intoxicaciones alimentarias	32
3.5 Microorganismos indicadores	32
3.5.1 Bacterias mesófilas aerobias (BMA)	33
3.5.1.1 Recuento	35
3.5.2 Coliformes totales	36
3.5.2.1 Desarrollo.	37
3.5.2.2 Sobrevivencia	37
3.5.2.3 Significado de los coliformes en los alimentos.	37
3.5.2.4 Recuento	38
3.5.3 Coliformes fecales	38
3.5.4 <i>Escherichia coli</i>	39
3.5.4.1 Características	39
3.5.4.2 Características bioquímicas	40
3.5.4.3 Tipos	40
3.5.4.4 Enfermedades producidas	41
3.5.4.5 Tratamiento	42
3.5.4.6 Identificación	42
3.5.5 <i>Salmonella</i>	42

3.5.5.1 Características del género	43
3.5.5.2 Clasificación o agrupación	43
3.5.5.3 Habitad y fuentes de aislamiento	44
3.5.5.4 Enfermedades producidas	46
3.5.5.4.1 Enteritis	47
3.5.5.4.2 Enfermedad sistémica	47
3.5.5.4.3 Colonización asintomatica	49
3.5.5.5 Aislamiento y selección de <i>Salmonella</i>	49
Cap. IV	
4.0 Diseño metodológico	51
4.1 Tipo de estudio	52
4.1.1 Campo	52
4.1.2 Experimental	52
4.1.3 Transversal	52
4.2 Investigación bibliográfica	52
4.3 Investigación de campo, universo y muestra	53
4.4 Cálculos estadísticos para la determinación del número total de muestra a analizar	56
4.5 Parte experimental	58
4.5.1 Procedimiento para el muestreo	58
4.5.2 Preparación de la muestra	58
4.5.3 Determinación de <i>Salmonella</i>	59

4.5.4 Determinación y recuento de Bacterias Mesófilas Aerobios	60
	61
4.5.5 Prueba para coliformes totales	61
4.5.6 Prueba par coliformes fecales	61
4.5.7 Prueba para <i>Escherichia coli</i>	61
Cap V	
	63
5.0 Resultados	
Cap. VI	72
6.0 Conclusiones	
Cap VII	75
7.0 Recomendaciones	
Bibliografía	
Glosario	
Anexos	

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N'

1. Tabla con el significado del contenido bacteriano de un alimento
2. Pruebas bioquímicas para **Salmonella**
3. Supermercados del área metropolitana de San Salvador
4. Mapa de la zona metropolitana de San Salvador
5. Materiales y métodos
6. Codificación de las muestras recolectadas
7. Ensayos y límites establecidos en Norma Oficial Mexicana
NOM-093- SSA1-1994
8. Tabla del Número Más Probable (NMP) por ml/g de muestra
9. Empaque de una ensalada lista para consumir marca Royal Antigua
10. Cartas dirigidas al Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social y
CONACYT

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura N°	pag.
1. Mapa de la zona metropolitana de San	95
2. Procedimiento para preparación de las muestras y Determinación de Coliformes totales y coliformes fecales	97
3. Procedimiento para identificación de <i>Escherichia coli</i>	98
4. Procedimiento para identificación de <i>Salmonella</i>	98
5. Procedimiento para el recuento de Bacterias mesófilas Aerobias	99
6. Foto de la determinación de Coliformes Totales	65
7. Foto de la determinación de Coliformes Fecales	66
8. Recuento de Bacterias Mesófilas aerobias	66
9. Prueba Presuntiva para <i>Escherichia coli</i>	67
10. Prueba para confirmas la presencia de <i>Escherichia coli</i>	67
11. Colonias de <i>Salmonella</i> en Agar SS	68
12. Pruebas bioquímicas para identificar <i>Salmonella</i>	69
13. Porcentaje de muestras que no cumplan con las normas	71
14. Empaque de una ensalada lista para consumir marca Royal antigua	102

ABREVIATURAS

BMA : Bacterias Mesófilas Aerobias

ETAS: Enfermedades Transmitidas por Alimentos

g: Gramos

K/A: Básico sobre ácido

ml: Mililitros

NMP: Número más probable

°C: Grados Celsius

OMS: Organización mundial de la salud

RM: Rojo de metilo

RPM: Revoluciones por minuto

UFC: Unidades formadoras de colonias

VP: Voges proskauer

RESUMEN

Las ensaladas son una fuente importante de nutrientes para la dieta equilibrada de una persona. Hoy en día han surgido en el mercado una serie de ensaladas listas para ser consumidas. Estas nuevas ensaladas están compuestas por diferentes clases de hortalizas como: lechuga, zanahoria, rábano, repollo morado. Además traen otra clase de alimentos como crutones y aderezos. Es importante destacar una peculiaridad de estas ensaladas y es que en su empaque se asegura su total desinfección y que no es necesario sanitizarlas antes de ingerirlas.

El objetivo del estudio fue determinar la inocuidad microbiológica de dos marcas de ensaladas empacadas listas para su consumo, que se comercializan en los supermercados de la zona metropolitana de San Salvador en el periodo de 2008.

Se realizó la determinación de bacterias coliformes totales; en caldo fluorocult LMX, procediendo luego a determinar las bacterias coliformes fecales; en tubos con caldo EC, se realizó el recuento de Bacterias Mesófilas Aerobias, utilizando el medio de cultivo Plate Count, así mismo se determinó la presencia de ***Escherichia coli*** a partir de los tubos positivos para coliformes totales, realizando la prueba de fluorescencia con lámpara UV y agregándole el reactivo de Kovac, además se realizó la identificación para ***Salmonella***, a partir del caldo tetrionato y caldo Rappaport, para luego sembrar en agar ***Salmonella-Shigella***, de las colonias que cumplieron con la descripción para ***Salmonella*** se

les realizaron pruebas bioquímicas para comprobar si las colonias sospechosas eran ***Salmonella***.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los análisis de las muestras, se encontró la presencia de ***Escherichia coli*, *Salmonella***; las cuales deben estar ausentes en un alimento. Se encontró una excesiva cantidad de coliformes totales y coliformes fecales. Para el recuento de Bacterias Mesófilas Aerobias, se presentaron valores altos de UFC. Por lo cual a partir de estos resultados se declara, que estas ensaladas no cumplen con las normas establecidas; debido a que no entran en los valores límites propuestos por las normas, y no son aptas para el consumo humano.

Por lo que se recomienda realizar un monitoreo más estricto en el proceso de elaboración de estas ensaladas y realizar una vigilancia microbiológica al producto por las autoridades competentes.

CAPITULO I
INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

La inocuidad de los alimentos, es un aspecto importante para la salud de las personas, ya que un alimento que sea inocuo tanto física, química, como microbiológicamente, asegura que al ser ingeridos no provocaran algún daño al consumidor.

Tal es el caso de las nuevas ensaladas lista para consumir, que aseguran en su etiqueta que han sido “desinfectadas con triple lavado”, estas se comercializan en algunos de los supermercados de el país; como “Súper Selectos”, “Dispensa de Don Juan”, las cuales se presentan en muchas variedades y traen consigo diferentes alimentos que lo hacen más atractivo al consumidor (aderezos, crutones) además de las diferentes hortalizas que la constituyen.

Las hortalizas que componen estas ensaladas son un grupo de alimentos que según estudios realizados anteriormente en el país, así como estudios internacionales, señalan a las hortalizas como alimentos de alto riesgo por los múltiples factores que los pueden contaminar, y por ser alimentos propicios para el buen desarrollo de los microorganismos.

Estas ensaladas declaran en su empaque la leyenda “listo para consumirse” y dan la seguridad de que pueden ser ingeridas sin necesidad de ser lavadas e higienizadas, en este punto es donde el estudio se centró, ya que fue necesario determinar la inocuidad microbiológica a estas ensaladas, por el hecho que el

consumidor ya no las prepara y por lo tanto no existe la garantía que no le provoque alguna enfermedad gastrointestinal luego de consumirlas.

Para realizar este estudio, se llevo a acabo una investigación bibliografica en las bibliotecas de la Facultad de Química y Farmacia, Central, de la Facultad de las Ingenierías, así mismo se hizo uso de Internet y libros particulares. Esta investigación bibliografica abarcó los diferentes aspectos microbiológicos de las ensaladas, como los microorganismos que pueden estar presentes en ellas y aspectos generales de estos microorganismos y de las hortalizas.

Seguidamente se realizó un estudio de campo, para determinar, el universo, el número de muestras a analizar e información relevante en la investigación.

Se llevo a acabo una prueba piloto, con el objetivo de obtener información estadística acerca de la muestra y así poder determinar un número de muestras adecuado que seria analizado, para obtener representatividad del universo y por lo tanto un resultado confiable en el estudio.

Las determinaciones de laboratorio que se les realizaron a las muestras analizadas fueron: determinación de coliformes totales, coliformes fecales, recuento de Bacterias Mesófilas Aerobias, identificación de ***Escherichia coli*** y ***Salmonella***, se llevaron acabo en el laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD). El estudio se realizó en el periodo de Enero a Agosto de 2008.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la inocuidad microbiológica de dos marcas de ensaladas empacadas listas para consumo, comercializadas en los supermercados del área metropolitana de San Salvador.

2.2 OBJETIVOS EPECIFICOS

2.2.1 Elaborar un plan de muestreo que permita la representatividad de las muestras a analizar de ensaladas de la marcas Royal Antigua y Baby Beluga.

2.2.2 Analizar la presencia de coliformes totales, coliformes fecales y recuento de Bacterias Mesófilas Aerobios en las ensaladas preparadas, según la norma oficial mexicana NOM-093-SSA-1994.

2.2.3 Identificar la presencia de microorganismos patógenos como la ***Salmonella*** y ***Escherichia coli*** en las muestras recolectadas.

2.2.4 Dar a conocer a las autoridades del Ministerio de Salud Publica y Asistencia Social, y CONACYT, los resultados obtenidos de la determinación de la calidad microbiológica de las ensaladas listas para consumir.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 HORTALIZA Y VERDURAS ⁽³⁰⁾

Las hortalizas son un conjunto de plantas cultivadas generalmente en huertas o regadíos, que se consumen como alimento, ya sea de forma cruda o preparada culinariamente. El término hortaliza incluye a las verduras y a las legumbres verdes como las habas y los guisantes. Dentro del concepto de hortalizas se excluyen a las frutas y a los cereales. Sin embargo esta distinción es bastante arbitraria y no se basa en ningún fundamento botánico, por ejemplo, los tomates y pimientos se consideran hortalizas, no como frutas, a pesar de que la parte comestible es la fruta. Estas son utilizadas como alimento en su forma natural, cocidas o tratadas con otro procedimiento. El interés fisiológico de las verduras en la alimentación reside ante todo en su contenido en vitaminas, sales minerales y tienen un menor contenido de hidratos de carbono, grasas y proteínas. Su contenido de celulosa es importante para la regulación del peristaltismo intestinal.

3.1.1. CLASIFICACIÓN DE HORTALIZAS. ⁽³⁰⁾

Según la parte de la planta comestible, las hortalizas se clasifican en:

1. Frutos: Berenjena, pimiento, tomate, calabaza.
2. Bulbos: Cebolla, puerro, ajo seco.

3. Hojas y tallos verdes: Acelgas, cardo, escarola, lechuga, espinacas, perejil, apio, col, brócoli, coles de bruselas.
4. Flor: Alcachofa, coliflor.
5. Tallos jóvenes: Espárrago.
6. Legumbres frescas o verdes: Guisantes, habas, judías verdes.
7. Raíces: Zanahoria, remolacha, rábano.

3.2 DEFINICIÓN DE ENSALADAS FRESCAS. ⁽¹¹⁾

Se conoce con el nombre de ensaladas a las elaboraciones hechas a base de géneros crudos, que normalmente se sazonan con una mezcla de grasas, sal y ácidos. Como características, podemos decir que se trata de un plato refrescante; se suele servir como entrante, aunque en algunos casos se sirven al final de la comida.

Es un plato rico en sales minerales, vitaminas y fibra, y en el caso de las ensaladas compuestas, se completan nutricionalmente añadiéndoles algún elemento proteico (pescados, carnes, legumbres y cereales).

3.2.1 DEFINICIÓN DE ENSALADAS FRESCAS LISTAS PARA CONSUMIR.

Son productos elaborados a partir de una mezcla de hortalizas, que han sido previamente tratadas y que por lo cual pueden consumirse directamente sin necesidad de limpiarlas, cortarlas y prepararlas.

3.2.2 Descripción de cada uno de sus componentes:

3.2.2.1 Lechuga: (33, 6)

Nombre científico: ***Lactuca sativa***

Familia: compositae

Valor nutritivo: vitaminas (folatos, provitamina A o beta-caroteno y cantidades apreciables de vitamina C, minerales y fibra

Descripción botánica: planta anual, glabra, con látex. Tallo muy corto, con numerosas hojas arrosetadas, que varían mucho en forma y tamaño según las diversas variedades. Las hojas son grandes, color verde brillante.

3.2.2.2 Cebolla: (35, 6)

Nombre científico: ***Allium cepa L.***

Familia: Amarilidaceae

Valor nutritivo: Escaso aporte calórico. Elevado contenido mineral y vitamínico. Buena fuente de potasio, y presentan cantidades significativas de calcio y magnesio. En cuanto a su contenido vitamínico, las cebollas son ricas en vitaminas del grupo B, como los folatos y las vitaminas B3 y B6. Presenta cantidades discretas de vitamina C y E, ambas con efecto antioxidante.

Descripción botánica: hierba con bulbos de color rojo o blanco y olor fuerte característico. Hojas basales largas generalmente lineales.

3.2.2.3 Apio: (6)

Nombre científico: *Apium graveolens*

Familia: umbelíferas

Valor nutritivo: contiene fibra, calcio, fósforo, vitamina A y ácido ascórbico

Descripción botánica: planta bianual, con numerosos tallos divididos en ramas difusas, huecos, nudosos. Las hojas son radicales, opuestos, acanalados.

3.2.2.4 Zanahoria: (34, 13)

Nombre científico: *Daucus carota*

Familia: Apiaceae

Valor nutritivo: contiene vitamina A, beta carotenos, y fósforo.

Descripción botánica: Planta bianual erecta de hasta un metro de altura, con la raíz endurecida el segundo año y tallos ramosos de medio metro de altura.

Hojas de sabor aromático y dividido en segmentos. Flores blancas o sonrosadas agrupadas en umbelas compuestas, cuyo centro en la variedad silvestre es de color púrpura. Fruto elipsoide y comprimido por el dorso.

3.3 FUENTE Y MECANISMOS DE CONTAMINACIÓN

La naturaleza y abundancia de la flora contaminante (bacterias, virus, hongos, levaduras y parásitos) es muy variable entre los diferentes productos, que para uno en particular.

Los tejidos vegetales cuentan con un pH de 5.0-7.0 (variable dependiendo de la especie) y condiciones de humedad adecuadas para el crecimiento de numerosas especies microbianas, la presencia de estos microorganismos en la mayoría de las veces se ve limitada a su parte externa (al igual que lo es para su crecimiento) ⁽²⁸⁾. Además estos alimentos desde el comienzo de su cultivo se ven expuestos a una amplia gama de factores contaminantes; como lo son la tierra, el agua de riego, la presencia de materia fecal humana o animal, el tipo de abono, el aire y las personas que cuidan de las tierras de cultivo. En su poscosecha destaca la maquinaria, equipo, los recipientes, animales domésticos y silvestres, los trabajadores, el polvo de la atmósfera y los vehículos. ⁽⁷⁾

También se encuentran aquellas que pasan desapercibidas como en el caso de una mala manipulación (como el uso utensilios contaminados) y falta de higiene por parte de las personas que las preparan.

3.3.1 MICROFLORA DE LAS HORTALIZAS.

La diversidad de la microflora presente en las hortalizas como hemos visto depende de muchos factores, pero generalmente la mayoría de las bacterias presentes dependen del entorno en que se encuentran.

La presencia de microorganismos patógenos están determinadas por las practicas que se sigan en la fertilización de la tierra y las condiciones sanitarias prevalentes incluida la cosecha de los productos. Pueden identificarse

microorganismos intestinales diversos: bacterias, virus, quistes y huevecillos de parásitos. Un ejemplo es que a partir de lechugas desarrolladas en tierras regadas con aguas negras es posible aislar serovares de **Salmonella** (7).

Entre las bacterias mas comunes en las verduras predominan los bacilos gram negativos aerobios como la **Escherichia coli**.

La concentración de Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA) varía de 4 (brócoli) a 10 (apio) \log_{10} UFC por gramo (7).

La carga total esta afectada por factores con frecuencia incontrolables; por ejemplo: la presencia de diminutas partículas de tierra o de materia orgánica ajena a la planta en una cierta porción examinada, puede conducir a cifras extremas en los recuentos. En hallazgos de coliformes totales y aun de fecales pocas veces tiene un significado sanitario consistente. Mejores evidencias se obtiene recurriendo a la determinación de la presencia y abundancia de **Escherichia coli** como indicador de contaminación fecal.

A partir de verduras crudas es posible recuperar una diversidad de bacterias patógenas; siendo de las enteropatógenas las más frecuentes en los terrenos expuestos a contaminación fecal.

3.3.2 DESINFECCIÓN DE VERDURAS (20)

Existe gran variedad de factores que contribuyen con la contaminación de frutas y hortalizas por microorganismos (protozoarios, virus y bacterias) y que son causantes de enfermedades en los seres humanos. Dentro de estos factores,

podemos mencionar el uso de aguas para riego contaminadas con heces, procesos inadecuados en los campos de cultivo, prácticas deficientes de lavado y desinfección, condiciones inapropiadas durante el empaque, higiene deficiente de los trabajadores y mala manipulación durante el almacenamiento, transporte.

Un buen manejo sanitario de verduras y hortalizas, permitirá asegurarnos su calidad e inocuidad, pero para esto se hace necesario conocer la existencia de microorganismos patógenos presentes, así como implementar las medidas de prevención o control que permitan reducir los riesgos de contaminación.

Una de estas practicas es el proceso de desinfección, que consiste en tratar los productos limpios con sustancias químicas para reducir sustancialmente las cantidades de microorganismos que implican un riesgo para la salud pública, sin que se afecte negativamente la calidad del producto o la seguridad del consumidor; aunque las reducciones son significativas la desinfección no asegura la eliminación total de los microorganismos.

La eficacia del tratamiento de desinfección, depende de la concentración del principio activo y del tiempo de exposición. La eficacia de los desinfectantes dependerá del tipo de verdura u hortaliza, de las características de su superficie, de la calidad y la temperatura del agua, del PH de la solución, de la concentración del desinfectante, del tiempo de contacto, la frecuencia de los recambios de agua, la acumulación de materia orgánica, el volumen del producto a desinfectar y del tipo de patógeno por eliminar.

Algunos de los agentes desinfectantes utilizados para tratar frutas y hortalizas son el cloro, dióxido de cloro, yodo, ozono, ácidos orgánicos (ácido acético, peroacético) o el peróxido de hidrógeno. Existen también otras alternativas como son las radiaciones gama y la ultravioleta.

Para la selección de agentes desinfectantes deben tenerse en cuenta varios aspectos: que eliminen un amplio espectro de microorganismos, que no sean tóxicos para el ser humano en las dosis utilizadas, que no afecten la integridad del producto, que no sean corrosivos, que sean estables, de acción rápida y que no inactiven fácilmente por materia orgánica.

Es muy importante que, luego de realizar cualquier proceso de desinfección se realice un cuidadoso manejo sanitario del producto, con el fin de evitar que este entre en contacto con agentes microbiológico, perjudiciales a la salud de los consumidores (contaminación cruzada). Esto por cuanto la superficie del producto desinfectado, queda prácticamente libre de microorganismos, lo que favorecería la multiplicación de aquellos que lo colonicen, siempre y cuando encuentre las condiciones favorables como nutrientes, humedad, temperatura y oxígeno.

3.4 ENFERMEDADES ASOCIADAS AL CONSUMO DE VERDURAS Y HORTALIZAS. (7)

Teóricamente cualquier fruto o verdura puede ser vehículo de bacterias, virus y parásitos patógenos al hombre. Existen registrados brotes de enfermedades por

muchas de ellas; en algunos casos es posible identificar la fuente de contaminación

1. uso para riego de agua contaminada con desechos humanos y animales
2. trabajadores portadores
3. equipo y recipientes mal saneados
4. uso de estiércol como fertilizante
5. fauna nociva y animales domésticos
6. uso de agua contaminada para su lavado
7. equipo y material usado en la cosecha
8. contaminaciones cruzadas
9. abuso de la temperatura inadecuada cocción

Los estudios epidemiológicos demuestran el papel de las frutas y verduras como vehículo de patógenos en varias enfermedades ya que se ha demostrado su presencia en los casos de los brotes de enfermedades causados por alimentos entre ellas las verduras como factor común entre ellas. Las llamadas ensaladas verdes que suelen ofrecerse en las barras de los restaurantes y prepararse en casi toda cocina, incluidos los hogares constituyen un riesgo especial debido a la contaminación que ellos suelen presentar y el hecho que se consumen generalmente crudas debido a la presencia de diversas bacterias entre las cuales se encuentran las siguientes bacterias patógenas:

Patógenos implicados en brotes por verduras:

-Exclusivamente humanos:

Salmonella typhi

Shigella

-zoonoticos típicos

Salmonella

3.4.1 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (ETAs)

ETAs o también conocidas como enfermedades transmitidas por alimentos, son muy frecuentes en la mayoría de los países. Pero pocas personas saben que los alimentos que consumen todos los días pueden causarle enfermedades. Estas son llamadas así porque el alimento actúa como vehículo en la transmisión de organismos patógenos (que nos enferman, dañinos) y sustancias tóxicas. (2)

Este tipo de padecimientos se presentan debido al consumo de alimentos que han estado expuestos a una pequeña o gran contaminación, debido a una amplia variedad de microorganismos, que pueden ser o no patógenos.

Las ETAs se dividen en dos grandes grupos:

3.4.1.1 Infecciones Alimentarías.

Son las ETAs producidas por la ingestión de alimentos o agua contaminados con agentes infecciosos específicos tales como bacterias, virus, hongos, parásitos, que en el intestino pueden multiplicarse y/o producir toxinas. (2)

3.4.1.2 Intoxicaciones Alimentarias

Este se emplea para referirse a un amplio grupo de enfermedades o condiciones clínicas que afectan al tracto gastrointestinal. ⁽⁹⁾

Son las **ETAs** producidas por la ingestión de toxinas producidas en los tejidos de plantas o animales, o productos metabólicos de microorganismos en los alimentos, o sustancias químicas que se incorporan a ellos de modo accidental o intencional en cualquier momento desde su producción hasta su consumo. Los síntomas se desarrollan durante 1-7 días y van a variar de acuerdo al tipo de agente responsable así como la cantidad de alimento contaminado que fue consumido.

Dentro de las bacterias de nuestro interés responsables de las enfermedades transmitidas por alimentos tenemos a, ***Salmonella***, ***Escherichia coli***, ***Staphylococcus aureus***, ***Campilobacter***, etc. ⁽⁹⁾

3.5 MICROORGANISMOS INDICADORES.

La presencia de determinados microorganismos en los alimentos puede ser de provecho para determinar la calidad microbiológica de los alimentos, ya que estos pueden y son utilizados como indicadores. Este tipo de microorganismos (como los coliformes) recibe la denominación común de microorganismos indicadores y su investigación y cuantificación nos puede aportar información sobre la seguridad sanitaria del alimento, su grado de alteración, su nivel de envejecimiento, la bondad de su proceso de elaboración, etc.

Los grupos microbianos indicadores de mayor aplicación en los alimentos son las Bacterias Mesófilas Aerobias, los organismos coliformes totales, los coliformes fecales, la ***Escherichia coli***, los hongos y levaduras.

3.5.1 BACTERIAS MESOFILAS AEROBIAS (BMA)

Las Bacterias Mesófilas Aerobias son un grupo heterogéneo de microorganismos, se incluye en él a todos aquellos que muestran capacidad para formar colonias visibles en las condiciones de ejecución de la prueba (medios de cultivo, y tiempo y temperatura de incubación) y queda claro que se puede incluir en este grupo de microorganismos indicadores a los patógenos (6).

Este grupo es de mucha utilidad para determinar la calidad microbiológica de los alimentos, existiendo criterios diferentes para cada alimento y límites de aceptabilidad, y así el recuento de BMA en el agua, alimentos y otros materiales relacionados puede tener según el caso aplicaciones de interés que pondrían de manifiesto lo siguiente: (7)

La exposición a fuentes de contaminación: esto tiene mucho significado debido a que la presencia de estos microorganismos en los alimentos en cantidades mayores a lo establecido; nos indica que posiblemente se haya violado una norma de trabajo, lo cual es considerado como inaceptable, así como nos indica que el tratamiento bajo el cual se preparo el alimento ha sido ineficiente.

Condiciones de almacenamiento: la presencia de BMA en los alimentos nos muestra la temperatura bajo la cual este se ha encontrado. Una temperatura entre 20-40° C favorecería el desarrollo de la microflora. De ahí que cifras elevadas de BMA, son sugestivas de productos conservados bajo condiciones de abuso de temperatura. (7)

Un elevado número de BMA en un alimento admite tres interpretaciones: (16)

1. Intensa exposición a la contaminación.
2. Una discreta contaminación seguida de condiciones de conservación que favorezca la actividad microbiana.
3. Intensa contaminación y almacenamiento inadecuado.

Nivel de frescura: como se sabe la pérdida de frescura de un alimento implica la presencia de actividad microbiana, en algunos alimentos cifras mayores de 10^{6-7} UFC / g o mL se acompaña de signos de deterioro, en tanto que otros cifras y aun mayores son la regla bajo normas sanitarias aceptables de comercialización. En general se puede decir que dependiendo de la cantidad del contenido microbiano en un alimento se le puede otorgar un significado (ver anexo 1). (7)

La eficiencia de tratamientos antimicrobianos: esta claro que al realizar un tratamiento a un alimento, el objetivo es el de eliminar la mayoría o en su

totalidad la carga microbiana y por lo tanto midiendo esta carga microbiana podemos evaluar el tratamiento realizado y su eficiencia.

Predicción de vida de anaquel: al realizar un recuento de BMA en un alimento, tiene significado para estimar el tiempo, que bajo condiciones definidas de almacenamiento, habrá de transcurrir antes que se presente signos de deterioro.

El cumplimiento de normas microbianas y la calidad microbiológica. Con estos términos se hace referencia a la condición un tanto vaga que resume la lista anterior de causas y factores que finalmente definen la presencia y número de bacterias en un alimento. Generalmente para productos no cultivados o madurados, una elevada carga de BMA expresa una imagen negativa de su calidad microbiológica.

3.5.1.1 Recuento.

El procedimiento se realiza a través del medio agar plate count, primeramente se inocula de las diluciones preparadas, en una placa y luego se procede a agregar el medio de cultivo (aproximadamente 15 mL), se realiza la homogenización, se incuban a $35 \pm 1^\circ \text{C}$ $24-48 \pm 2$, luego por medio de un cuanta colonias se determina el número de UFC/ g o mL.

3.5.2 COLIFORMES TOTALES.

Coliforme significa con forma de coli, refiriéndose a la bacteria principal del grupo, la ***Escherichia coli***, descubierta por el bacteriólogo alemán Theodor von Escherich en 1860.

Este grupo es conocido originalmente como “bacterias coliaerogenes de origen fecal”, estos son microorganismos bacilos Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, con característica de fermentar la lactosa con producción de gas dentro de 48 horas de incubación a 35° C. (6).

Estos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y colonizan el tracto intestinal del hombre y, en general, de los animales de sangre caliente. Los coliformes totales son bacterias de los géneros ***Escherichia***, ***Enterobacter***, ***Citrobacter*** y ***Klebsiella***. La mayoría de estos organismos se encuentran en el medio ambiente y materia en descomposición, excepto el género ***Escherichia*** que vive solo en organismos, como el hombre y animales de sangre caliente. (5)

Los coliformes son el grupo indicador con mayor tradición en la microbiología sanitaria siendo desde sus inicios asociados a la presencia con contaminación fecal en el agua. Y en aquellos alimentos que han recibido un tratamiento sugieren que estos han tenido contacto con materiales sucios y por tal razón su presencia en los alimentos nos ayuda a vigilar la calidad sanitaria del agua y los alimentos. (7)

3.5.2.1 Desarrollo.

Se desarrollan fácilmente en medios de cultivo ordinarios, facultad que se presenta en muchos alimentos y que se suprime fuera de los siguientes límites: pH entre 4.0 y 8.5, temperatura entre 4 y 46° C, o actividad de agua menor de 0.935. (7)

3.5.2.2 Sobrevivencia.

Cuando sufren congelación estos se reducen notablemente pero este número persisten por periodos largos.

Son inactivados al ser sometidos a tratamientos térmicos moderados como lo es el caso de la pasteurización. Además son inactivados en presencia de luz ultravioleta, de sustancias químicas como los yodóforos y compuestos clorados.

3.5.2.3 Significado de los coliformes en los alimentos.

Su presencia en los alimentos indica el posible contacto con materia fecal, así como contacto con el medio ambiente y en caso de ser encontrados luego de un tratamiento de desinfección, no indica que han tenido contacto con alguna clase de materia sucia o que simplemente el tratamiento realizado no fue efectivo.

3.5.2.4 Recuento.

El recuento se realiza por el NMP (numero mas probable) la cual es laboriosa, lenta y requiere mayor volumen de material de laboratorio, pero siendo muy sensible. El NMP se determina consultando tablas especialmente diseñadas en las que se indica la concentración estimada de coliformes por 100 mL de muestra. (7) ver anexo 8

3.5.3 COLIFORMES FECALES.

Se define como coliformes fecales a aquellos que fermentan la lactosa a 44,5 – 45,5 ° C, o de 44 a 45° C (7 y 32), análisis que permite descartar a **Enterobacter**, puesto que ésta no crece a esa temperatura. Si se aplica este criterio crecerán en el medio de cultivo principalmente **Escherichia coli** (90%) y algunas bacterias de los géneros **Klebsiella** y **Citrobacter**. La prueba de coliformes fecales positiva indica un 90% de probabilidad de que el coliforme aislado sea **Escherichia coli**.

Y al igual que en el caso de los coliformes totales, estos no sirven como indicadores aun mas confiables que los totales apoyado en que un porcentaje mayor de coliformes aislados de materia fecal humana y de animales de sangre caliente fermentan la lactosa a estas temperaturas, con respecto a los coliformes proveniente de fuentes no fecales. (7)

Su presencia en verduras nos da indicio que puede existir la presencia de otros microorganismos, como la **Salmonella**, **Shigella** y otros. (12)

3.5.4 Escherichia coli

Escherichia coli parte importante de la microbiota intestinal del hombre, coloniza el intestino dentro de las primeras horas de vida y a partir de entonces se convierte en un residente permanente, estableciendo una relación de mutuo beneficio con su hospedero, sin embargo, algunas cepas han desarrollado capacidad para provocar enfermedad en el hombre, principalmente infecciones gastrointestinales, urinario y del sistema nervioso central.

3.5.4.1 Características

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa que pertenece a la familia enterobacteriaceae, la cual fue aislada y caracterizada por primera vez por Teodoro Escherich en 1885.

Escherichia coli es un bacilo no esporulado, puede poseer flagelos peritricos o ser inmóvil y es anaerobio facultativo. La temperatura mínima para su crecimiento es de 2.5 °C y la máxima de 45 °C; puede sobrevivir a temperaturas de refrigeración y de congelación. El rango de pH en el cual se ha observado crecimiento es de 4.4 a 9.0 y la mínima actividad de agua para su desarrollo es de 0.95. (29)

3.5.4.2 Características bioquímicas ⁽²⁹⁾

Entre las características metabólicas de *Escherichia coli* se encuentra su capacidad para utilizar azúcares simples como fuente de carbono y desarrollar en medios basales mínimos; además, fermentar la glucosa y otros carbohidratos con producción de piruvato.

Entre su comportamiento bioquímico destacan cuatro características importantes que se usan como base para su identificación : la producción de indol a partir del metabolismo del aminoácido triptófano, la producción de ácidos por la vía de fermentación ácido mixta sin producción de acetilmetilcarbinol y la no utilización de citrato como única fuente de carbono. Estas características se utilizan como un conjunto de pruebas diferenciales denominado IMVIC, cerca del 95% de las cepas de *Escherichia coli* presentan el patrón IMVIC + +- - y se clasifican como biotipo 1, mientras que el porcentaje restante presenta el patrón IMVIC -+- - y se denominan biotipo 2.

3.5.4.3 Tipos ⁽²⁹⁾

Los serotipos de la especie que son patógenos para el hombre se les denominan genéricamente con el término de *Escherichia coli* patógena y su capacidad para producir enfermedad esta determinada por factores de virulencia que le permiten infectar a sus huéspedes y sobreponerse a los mecanismos de defensa, como la producción de adhesinas, enterotoxinas, citotoxinas y otras proteínas que le permiten al microorganismo sobrevivir en condiciones ambientales adversas.

Las cepas patógenas que causan diarrea se transmiten de manera directa a través de los alimentos y causan distintos síndromes clínicos; las heces de animales de sangre caliente, el agua no tratada y los portadores infectados suelen ser la fuente de contaminación más común a los alimentos.

En la actualidad ***Escherichia coli*** patógena asociada al consumo de alimentos se agrupan en cinco categorías: enteropatógenas (EPEC), enteroinvasivas (EIEC), enterotoxigénicas (ETEC) enterohemorrágicas (EHEC) y enteroagregativa (EAGGEC).que se distinguen entre si por sus propiedades de virulencia, las interacciones que establecen con la mucosa intestinal, los síndromes clínicos que originan, así como por las diferencias epidemiológicas y de serogrupos O:H que presentan.

3.5.4.4 Enfermedades producidas ⁽²⁹⁾

Escherichia coli forma parte de la flora intestinal y sólo unas cepas específicas de transmisión feco-oral son las causantes de brotes infecciosos

El período de incubación promedio de EHEC es de tres a cuatro días; la enfermedad tiene una duración de dos a nueve días; al inicio el cuadro se caracteriza por dolor abdominal repentino, vómito, fiebre ligera o ausente y desarrollo de diarrea sin presencia de sangre.

Dentro de las siguientes 24 horas se presenta diarrea acuosa profusamente sanguinolenta y dolor abdominal sumamente intenso, a tal grado que pueden

ser más agudos que el de un cuadro de apendicitis; este segundo periodo tiene una duración de cuatro a diez días y se conoce como colitis hemorrágica.

3.5.4.5 Tratamiento

La base del tratamiento es de apoyo. Aunque la *Escherichia coli* es sensible a los antimicrobianos de uso más común.

Los antibióticos no han demostrado aliviar los síntomas, reducir el transporte por el organismo o prevenir el síndrome hemolítico uremico. Se sospecha que las fluoroquinolonas aumentan la liberación de enterotoxinas.

3.5.4.6 Identificación

La identificación de la *Escherichia coli* se realiza por medio de la determinación de coliformes totales en caldo LMX al dar color verde azulado, nos indica coliformes totales positivas.

A los tubos que presentan coliformes positivas se les realiza la fluorescencia con lámparas UV, la presencia de esta nos indica *Escherichia coli* positiva y su confirmación se realiza con el reactivo de Kovac que es prueba positiva si se forma un anillo violeta.

3.6.0 Salmonella

En la actualidad la salmonelosis es la principal causa de enfermedad transmitida por alimentos en la mayoría de los países desarrollados y en los

subdesarrollados, una de las mas importantes causas de muertes. El genero ***Salmonella*** fue creado definitivamente en 1900 por Lignieres y se le denomino así en honor del Doctor D.E Salmon. (29).

3.6.1 Características del género.

Este género ha sido extensamente estudiado, especialmente en alimentos; de los cuales suele aislarse y su descripción corresponde al típico bacilo Gram negativo de la familia enterobacteriaceae. Móviles y algunos serovares inmóviles con flagelos peritricos que rodean al microorganismo y no desarrolla cápsula ni espora. Producen sulfuro de hidrógeno (H₂S). Fermentan glucosa pero no lactosa, y no producen ureasa., con una rica composición antigénica que se emplea como base para la identificación de sus miembros en serotipos, o serovares.

Hasta 1994 se reconocían 2375 serovares distribuidos en especies y subespecies (4), aunque todos son considerados potencialmente patógenos al humano, solo 200 son asociadas con enfermedades humanas (29).

3.6.2 Clasificación o agrupación. (29)

Con fines epidemiológicos la OMS considera que se le puede agrupar en tres grupos:

1. Los que afectan solamente a personas: incluyendo a ***Salmonella typhi***, ***Salmonella paratyphi A***, ***Salmonella paratyphi B*** ***Salmonella paratyphi C***.
2. Los que pueden adquirirse por consumir alimentos: ***Salmonella gallinarum***, ***Salmonella dublin***, ***Salmonella abortus-equis***, ***Salmonella abortus-ovis*** y ***Salmonella Cholerae –suis***.
3. Serovares inadaptados (sin preferencia de hospedador) son patógenos para humanos y otras especies animales, e incluye a la mayoría de las serovares transmitidos por alimentos.

3.6.3 Habitación y fuentes de aislamiento

Como fiel representante de la familia enterobacteriaceae, esta se encuentra de forma parasita en el tracto intestinal de animales y el hombre; siendo este solo un eslabón de la cadena contaminante.

Esta se libera al medio ambiente a través de los desechos fecales de animales y del hombre, permanece activa en los materiales con los cuales tiene contacto e inclusive se puede multiplicar cuando existen las condiciones favorable: como el pH, la temperatura, actividad del agua, potencial de oxido-reducción, exposición a agentes germicidas, la composición del material en que se encuentra y la humedad ambiental, tal es el caso especial de los alimentos; como lo son las carnes, verduras, algunas frutas y una gran variedad de alimentos, en los cuales dichas condiciones se cumplen perfectamente. (29)

No siempre la contaminación fecal es el antecedente único y directo de casos o brotes de salmonelosis humana, tal es el caso de huevos de aves puestos incluso en condiciones sanitarias que excluyen la presencia de materia fecal, puede ser portadores del patógeno (7).

-Las Fuentes de aislamiento pueden ser:

-Medio ambiente: Agua, tierra, atmósfera

-Vegetales: Silvestres, cultivados

-Animales: Silvestres, de explotación, acuáticos, domésticos fauna nociva.

-Humana: asintomáticos, enfermos, convalecientes.

-Utensilios.

-Fomites.

La sobre vivencia en el medio ambiente es muy significativo, claro ejemplo es el suelo; a pesar de que su tendencia natural es a ser inactivada en este material, se sabe que el germen puede ser recuperado del 90 % de muestras de lodos de cloacas y sobrevivir 72 semanas en los terrenos en donde estos se descargan. (6)

Así mismo el agua es una fuente de especial sobrevivencia y transmisión, ya que ninguna agua natural sobre la superficie de la tierra se puede considerar libre de este microorganismo. Se han presentado casos en que ha sido aislada en áreas boscosas con nula actividad humana y en condiciones pocamente propicias para su desarrollo (7).

De manera natural al igual que en agua y suelo, los vegetales y frutas se pueden contaminar con **Salmonella**, ya sea directa o indirectamente con materia fecal animal o humana.

Este tipo de alimentos reúnen las características propuestas para ser clasificados como alimentos de alto riesgo, ya que son alimentos mínimamente procesados, que se consumen crudos, su preparación al ser consumidos implica el contacto directo con las manos, el pH permite el desarrollo o facilita la sobrevivencia de patógenos, no suelen utilizarse ningún agente germicida que asegure la eliminación del patógeno, etc. (13). Así mismo es de mucha importancia conocer que la **Salmonella** no requiere componentes especiales en los alimentos para desarrollarse (7).

3.6.4 Enfermedades producidas.

La salmonelosis humana es una enfermedad infectocontagiosa, comprende un conjunto de cuadros clínicos, donde una de las principales manifestaciones es la gastroenteritis aguda, una de las intoxicaciones alimentarias más comunes causadas por agua y alimentos contaminados

La **Salmonella** no causan solamente un padecimiento o síndrome clínico como ya se menciono, esto dependerá del tipo de serovar que realizo la infección,

cada uno presentará manifestaciones propias de su comportamiento, virulencia, capacidad invasiva, etc.

Se puede presentar:

3.6.4.1 Enteritis.

En donde los síntomas principales son, fiebre ligera, náuseas, vómito, dolor abdominal y diarrea durante unos pocos días, pero, en algunos casos puede persistir durante una semana o más; mialgias y dolor de cabeza son comunes. (29). El periodo de incubación puede ser de las 12-48 después de la ingesta, o ser entre 6-48 horas, con un promedio de 12 a 36 horas (9) y habitualmente, el trastorno es leve o asintomático y persiste de 1 a 4 días, el tratamiento incluye reposición de líquidos y sales; no se aconsejan antibióticos, ya que prolongan la excreción del microbio (31).

Este es el tipo de salmonelosis más corriente con una mortalidad de 0.1 % a 0.2 % y con grupos de edad más afectados a los niños y ancianos (29).

3.6.4.2 Enfermedad sistémica.

Enfermedad infecciosa sistémica provocada por ***Salmonella typhi*** y ***Salmonella paratyphi***, los cuales son más invasivos. Esta enfermedad es conocida como fiebre tifoidea, y posee un periodo de incubación de 3 a 56 días, aunque esta comprendida entre 10 y 20 días (29).

La **Salmonella** atraviesa el epitelio intestinal y posteriormente son transportados a los ganglios linfáticos mesentéricos. Después de multiplicarse en los macrófagos son liberados para entrar a la corriente sanguínea y diseminarse por todo el organismo. (29).

Luego del periodo de incubación aparecen de forma gradual fiebre, dolor de cabeza y articulaciones, estreñimiento, dolor abdominal y falta de apetito. La fiebre se mantiene alta (39-40° C) durante otras 1 ó 2 semanas, y en 1 de cada 10 pacientes aparecen brotes de manchas rosadas en el tronco (roséola). Finalmente, al evolucionar las lesiones en el intestino, aparece diarrea abundante con sangre en la cual va una gran cantidad de bacterias. La convalecencia puede durar meses. (29). en los casos mas graves puede haber hemorragias de ulceras y perforación del intestino que puede provocar peritonitis. En los casos mas benignos las ulceras sanan, la fiebre desciende y el enfermo se restablece transcurridas cuatro o cinco semanas. (29).

El tratamiento requiere terapia con cloranfenicol, ampicilina o trimetropin sulfametoxazol, pero debido a la resistencia llevado al desarrollo de nuevos fármacos como cefalosporinas y quinolonas de tercera generación (28), además se debe mantener una buena rehidratación, nutrición, reposo y evitar laxantes enemas. (36)

3.6.4.3 Colonización asintomática.

Luego de darse la enfermedad sintomática, las **Salmonellas** son mantenidas en los portadores humanos, entre el 1 y 5 % de los pacientes experimentan colonización crónica durante más de un año. ⁽³¹⁾ Estos portadores pueden difundir la enfermedad y producir brotes como en el caso conocido de Mary Mallon, también conocida como María Tifoidea, fue la primera persona en ser identificada como una portadora sana de fiebre tifoidea en los Estados Unidos ⁽³¹⁾

Dosis infectante: la dosis infectante es de 10^8 a 10^9 , aunque se sabe que esto no es regla y que algunos estudios retrospectivos han demostrado dosis bajas, dependiendo del tipo de alimento, de la cepa de **Salmonella** y muchos otros factores.

3.6.5 Aislamiento y selección de *Salmonella*.

Para realizar el aislamiento e identificación de *Salmonella* se utilizan primeramente los medios de enriquecimiento, los cuales ayudan al desarrollo de la **Salmonella**, ejemplo de ellos son: Caldo tetracionato, Rappaport ⁽¹²⁾ o caldo selenito.

En el caso de estos medios, inhiben la replicación de ciertas bacterias y permiten la multiplicación de las **Salmonellas**, debido a que las **Salmonellas** son resistentes a ciertas sustancias como el tetracionato, componente de unos de los caldos antes mencionados.

Luego de realizar el enriquecimiento para que la bacteria se desarrolle se hace uso de medios selectivos de cultivo; como Agar Salmonella-Shigella, Bismuto-selenito ⁽³¹⁾ y Rambac ⁽⁸⁾, luego de aislar el microorganismo sospechoso se realiza la identificación por medio de pruebas bioquímicas y los resultados obtenidos son comparados con la tabla N° 2 ^(ver anexo 2) y así concluir con los resultados, por ultimo se realizan pruebas de aglutinación con suero específico.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLÓGICO

4.0. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 **Tipo de estudio:** campo, experimental, transversal.

4.1.1 **Campo:** estudio de las muestras y su recolección, que se realizó en los supermercados Selectos, Despensa de don Juan, Europa e Hiper Europa del área metropolitana de San Salvador.

4.1.2 **Experimental:** determinación de coliformes totales, coliformes fecales, recuento de Bacterias Mesófilas Aerobias, *Escherichia coli* y *Salmonella*, que se desarrolló en los laboratorios de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD)

4.1.3 **Transversal:** estudio debido al surgimiento de nuevos productos alimenticios en los cuales se puede presentar intoxicaciones alimentarias por dichos productos.

4.2 Investigación bibliográfica:

La investigación bibliográfica se realizó en las bibliotecas de:

-Facultad de Química y Farmacia Dr Benjamin Orozco

-Biblioteca de las Ingenierías.

-Central de Universidad de El Salvador.

-Bibliografía particular.

-Internet.

4.3 Investigación de campo, universo y muestra:

El universo fueron todos los supermercados: Selectos, Despensa de Don Juan, Europa e Hiper Europa del área metropolitana de San Salvador. (Ver anexo 3)

Muestras: se seleccionaran las muestras existentes, por medio de un muestreo dirigido puntual.

De las ensaladas listas para consumirse: las marcas existentes en el mercado son 2:

1. Royal Antigua: que cuenta con los estilos;

*Estilo Americano

*Estilo Cesar

(Estas ensaladas contienen: lechuga Iceberg, lechuga Romana, lechuga Escarola, zanahoria, rábano, repollo morado, aderezo)

2. Baby Beluga (Contiene: lechuga Escarola, rábano, repollo morado, zanahoria)

Se realizó un muestreo aleatorio sistemático en los supermercados que se encuentran en el área metropolitana de San Salvador. Se realizó al azar la selección de los supermercados, entre aquellos que comercializan las ensaladas listas para consumirse, específicamente en “El Selectos” y “Despensa de Don Juan”.

Para obtener el número total de muestras a analizar, fue necesario utilizar una herramienta estadística; una prueba piloto con diez muestras, y luego a partir

de los resultados obtenidos en la prueba piloto, se determino el número de muestras a analizar.

Muestreo

Los supermercados en donde si se venden este tipo de productos son:

Cuadro Nº 2: Supermercados “Súper Selectos”, en los cuales se comercializa las ensaladas listas para consumo

San Luís	Caribe	Miralvalle
Olímpica	Escalón	Santa Emilia
Bethoveen	Feria rosa	San Benito
Metrocentro	La Cima	Trigueros
Metrosur	Los Santos	Miralvalle 2
Autopista Sur	Masferrer	

Cuadro Nº 3: Supermercados “Dispensa de Don Juan”, en los cuales se comercializa las ensaladas listas para consumo

Escalón Norte
San Benito
Cumbres de la Escalón
La Cima
Terrazas
Metrocentro

En la prueba piloto, las muestras se tomaron aleatoriamente de los supermercados “Selectos” y “Despensa de Don Juan”, para lo cual se dividió el área metropolitana en 6 zonas: Zona Rosa (zona 1), Metrocentro (zona 2), Escalón y San Benito (zona 3), San Luís (zona 4), Salvador del Mundo y Caribe (zona 5), Santos y Olímpica (zona 6); esto se dividió dependiendo de la existencia del producto y de la zona en que esta ubicada la sucursal. (Ver anexo 4)

El número de muestras para la prueba piloto fueron 10, repartidos de la siguiente forma para el muestreo:

1. Zona Rosa; dos muestras en El Selectos “Zona Rosa”,
2. Metrocentro; una muestra en El Selectos “Metrocentro” y una muestra en la Despensa de Don Juan de “Metrocentro”,
3. Escalón y San Benito; una muestra en El Selectos “Escalón” y una muestra en la Despensa de Don Juan “San Benito”,
4. San Luís: una muestra en El Selectos “Centro Comercial San Luis”,
5. El Salvador del Mundo y Caribe; una muestra en El Selectos “Caribe”,
6. Santos y Olímpica: una muestra en El Selectos, “Los Santos” y una muestra en el Selectos la “Olímpica”.

4.4 Cálculos estadísticos para la determinación del número total de muestra a analizar

Para conocer el número de muestras que se necesitaban para el estudio, se realizó la prueba piloto y a través de los datos obtenidos, se resolvió la siguiente formula, que corresponde a un muestreo aleatorio sistemático:

Formula a utilizar:
$$n = \frac{Z^2 pq}{d^2}$$

Donde:

Z= Grado de confianza del 95%

Pq= Desviación típica o estándar de la población.

d= Error muestral máximo permisible en la investigación.

Datos obtenidos a partir de la prueba piloto

Z= 1.96 (valor obtenido a través de las de tablas de áreas bajo la curva normal.)

Pq: desviación estándar.

p = muestras que dieron positiva la prueba = 10 muestras \approx 1.0 (muestras a las cuales se les determino que no cumplen con las normas)

q=muestras que dieron negativa la prueba = 0 muestras \approx 0.0 (muestras a las cuales se les determino que si cumplen con las normas).

d= 0.9 (valor equivalente a la unidad, que representa el % de error que en el estudio se permite, que en este caso seria el 10 % de error y por lo tanto equivale a 90 %, y como corresponde a la unidad es igual a 0.9)

Sustituyendo en la formula:

$$N = \frac{Z^2 pq}{d^2}$$

$$N = \frac{(1.96)^2 (1.0) (0.0)}{(0.9)^2} = (0) / (0.9)^2$$

N = 0 muestras

Numero de muestras a muestrear y analizar = **cero muestras**

Interpretación: según los resultados obtenidos en la prueba piloto, y sustituyendo en la formula estos datos, demuestra que la representatividad de las muestras analizadas en la prueba piloto son suficientes para la determinación de la inocuidad microbiológica, ya que al dar un 100.0 % de pruebas positivas y un 0.0 % de muestras negativas a la prueba, se llega a un resultado de 0.0 en la resolución de la fórmula que nos da el número de muestras necesarias para analizar, según el estudio y herramienta estadística.

Y por lo tanto ya no fue necesario realizar un análisis posterior a la prueba piloto, por ser esta lo suficientemente representativa, con respecto a la parte

estadística para determinar la inocuidad microbiológica de ensaladas lista para consumir.

4.5 Parte experimental

(Ver anexo 5, materiales y métodos (marcha analítica))

4.5.1 Procedimiento para el muestreo:

Las muestras fueron tomadas (ver anexo 6, codificación de muestras), en cada uno de los supermercados y se colocan en una hielera desinfectada, de tal forma que no se altere la microflora y características de la muestra, luego se trasladan a las instalaciones del laboratorio de microbiología de alimentos en el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD).

Esta metodología fue retomada de los lineamientos establecidos por la APHA (3), AOAC (1) y Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994(24).

4.5.2 Preparación de la muestra: (25)

-Se prepara la dilución 10^{-1} , pesando 25 g de muestra de una forma aséptica en una bolsa plástica. Luego se adicionan 225 mL de agua peptonada (diluyente) a la bolsa con los 25 g de muestras y esta se trasfiere al Stomacher, en el cual se agitará por 2 minutos a 260 rpm. Luego se pasa un frasco y esta es la dilución 10^{-1} .

-Luego se prepara la dilución 10^{-2} , tomando 10 mL de la dilución 10^{-1} , con una pipeta estéril, estos 10 mL se adicionan a un frasco de dilución que contiene 90 mL de la solución diluyente estéril (agua peptonada).

-De la misma forma se prepara la dilución 10^{-3} .

Nota: Para la preparación de las diluciones se debe agitar en el frasco cada una previamente.

4.5.3 Determinación de *Salmonella* (27)

-A partir de la dilución 10^{-1} de la preparación de la muestra, se toman dos asadas con asa de platino, a un tubo con Caldo tetratonato y dos asadas para un tubo con Caldo Rappaport vassilidius.

-Seguidamente se incuban dichos tubos a 35° C por 24 horas. Este es el enriquecimiento para *Salmonella*.

-A partir del tubo con Caldo Rappaport se siembra por estrías en una placa con Agar *Salmonella- Shigella*, y del tubo con Caldo Tetratonato a otra placa con Agar *Salmonella- Shigella*, y se incuban a 35° C por 24 horas.

-Luego, se selecciona después de este periodo de incubación, las colonias resultantes; incoloras y/o transparentes y así mismo aquellas que tienen un centro negro en agar S-S para realizar pruebas bioquímicas (15). Sembrando a la bacteria sospechosa de ser *Salmonella* en TSI, Citrato, Movilidad, Voges-prokauer, Rojo de Metilo, Indol.

- Se incuban a 35°C por 24 horas y se realiza la lectura de los resultados.
- Posteriormente se comparan los resultados obtenidos con tablas de pruebas bioquímicas (anexo 2). Los cultivos que presenten una base amarilla con gas en agar TSI y H_2S positivas, rebordes sin alteración o rojo, indica presencia de ***Salmonella sp*** ⁽⁵⁾

4.5.4 Determinación y Recuento de Bacterias Mesófilas Aerobios ⁽²³⁾

- A partir de las diluciones preparadas 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , se toma 1.0 mL con pipeta y se adiciona a una placa de petri (se realiza por duplicado).
- De la dilución 10^{-3} , se toma 0.1 mL (representa la dilución 10^{-4}) y se coloca en un placa de petri (por duplicado)
- Luego se le agrega a las placas el medio de cultivo Agar plate count.
- Se homogeniza y se deja solidificar.
- Después que se solidificó el medio se invierte la placa y se incuba de 24-48 horas a $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Luego de incubar las placas, se determina el número de colonias a través del uso de un cuenta colonias.
- Retomado de Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994 cuyo límite máximo permisible es de: Ensaladas verdes. Crudas o de Frutas. Cuenta total de mesofílicos aerobios 150 000 UFC/g, ⁽²⁴⁾

4.5.5 Prueba para coliformes totales: ⁽²⁶⁾

-De las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , se toma 1 mL para cada uno de 3 tubos (un total de 9 tubos, 3 por dilución) que contiene caldo LMX (Fluorocult).

-Se incuba los tubos a 35 ± 1 °C por 24 horas.

-Posteriormente se realiza la lectura transcurrido este periodo de incubación, y se observa si existe presencia de coloración verde azulada, lo cual indica prueba positiva para coliformes totales.

- Valor máximo permisible para coliformes totales 100 NMP/g. ⁽²⁴⁾

4.5.6 Prueba para coliformes fecales: ⁽²⁶⁾

-A partir de los tubos con caldo LMX que dieron positivo, se toman 3 asadas con asa de platino, inoculando en tubos que contienen caldo EC con campanas de Durham.

-Se Incuban estos tubos a 44.5° C por 24 horas en baño de agua.

-La prueba es positiva si al cabo de este periodo los tubos presentan formación de gas.

- Valor máximo permisible para coliformes fecales 100 NMP/g. ⁽²⁴⁾

4.5.7 Prueba para *Escherichia coli*.

-A los tubos con caldo LMX, que dieron prueba positiva para coliformes totales, se les observa la posible presencia de fluorescencia por medio de una lámpara de luz ultravioleta.

- Luego para confirmar la presencia de ***Escherichia coli*** son agregadas dos gotas del reactivo de Kovac, una coloración roja-violeta indicó prueba positiva.
- Para 25 gramos de muestra debe de estar ausente.

CAPITULO V
RESULTADOS
Y
DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El análisis del recuento de bacterias mesófilas aerobias, determinación de coliformes totales y coliformes fecales son determinaciones cuantitativas; debido que a partir de los resultados obtenidos (numero de tubos positivos, numero de colonias, etc.) se determina la cantidad en la que se encuentran presentes en las ensaladas. Así mismo las identificaciones de *Escherichia coli* y *Salmonella* son pruebas cualitativas, por ser instrumentos para evidenciar o determinar su posible presencia.

Cuadro N° 4: Resultados de análisis a muestras de ensaladas

N° de Muestra de ensaladas	Bacterias Mesófilas Aerobias	Coliformes Totales	Coliformes Fecales	<i>Escherichia coli.</i>	<i>Salmonella</i>
Muestra 1	660,000 UFC/ g	>1100 NMP/g	>1100 NMP/g	positivo	positivo
Muestra 2	700,000 UFC/ g	>1100 NMP/g	>1100 NMP/g	positivo	positivo
Muestra 3	600,000 UFC/ g	>1100 NMP/g	>1100 NMP/g	positivo	positivo
Muestra 4	660,000 UFC/ g	>1100 NMP/g	>1100 NMP/g	Positivo	Negativo
Muestra 5	500,000 UFC/ g	>1100 NMP/g	>1100 NMP/g	Positivo	Positivo
Muestra 6	600,000 UFC/ g	>1100 NMP/g	>1100 NMP/g	Positivo	Positivo
Muestra 7	620,000 UFC/ g	>1100 NMP/g	>1100 NMP/g	Positivo	Negativo
Muestra 8	550,000 UFC/ g	>1100 NMP/g	>1100 NMP/g	Positivo	Negativo
Muestra 9	690,000 UFC/ g	>1100 NMP/g	>1100 NMP/g	Positivo	Positivo
Muestra 10	670,000 UFC/ g	>1100 NMP/g	>1100 NMP/g	Positivo	Positivo

Para todas las muestras analizadas, se obtuvieron resultados similares. En el caso de coliformes totales dio positiva la prueba, encontrándose un valor mayor a 1100 NMP g/mL para cada una de las muestras, valor que sobrepasa lo declarado por la Norma Oficial Mexicana NOM-093- SSA1-1994 (anexo 7) , debido a que el limite establecido debe ser no mas de 100 NMP g/mL.



Figura N ° 6: Determinación de coliformes totales.

En la figura se observa la coloración verde adquirida por los tubos con caldo Fluorocult LMX, luego de la realización del análisis, lo cual indica prueba positiva.

Se obtuvo un valor mayor de 1100 NMP g de muestra para coliformes fecales, valor que sobrepasa lo declarado por la Norma Oficial Mexicana NOM-093- SSA1-1994 (anexo 7), ya que indica como valor máximo permisible para coliformes fecales de 100 NMP g/mL.



Figura N ° 7: Determinación de coliformes fecales.

En la figura de la izquierda se observa los tubos con caldo EC que dieron positivo durante el ensayo, y en la figura de la derecha se observa la producción de gas que se dio en uno de los tubos, de prueba positiva, en la campana de Durham.

Para Bacterias Mesófilas Aerobias un recuento que va desde un valor mínimo de 500,000 a un máximo de 700,000 UFC/g, que sobrepasa los límites declarados por la Norma Oficial Mexicana NOM-093- SSA1-1994 (anexo 7), en el cual se especifica que no debe ser mayor de 150,000 UFC/g.

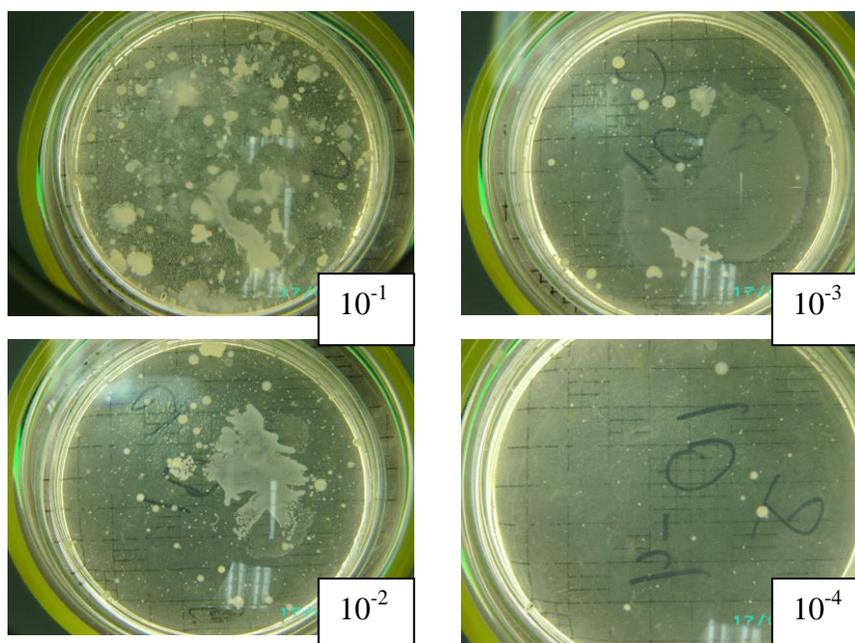


Figura N ° 8: Recuento de Bacterias Mesófilas Aeróbias.

Se encontró la presencia de *Escherichia coli* en todas las muestras, la cual debe estar ausente en 25 g de muestra, según normas correspondientes y lineamientos microbiológicos de calidad.



Figura N ° 9: Prueba presuntiva par *Escherichia coli*.

En la imagen se observa la fluorescencia con ayuda de una lámpara de luz UV, en los tubos prueba positiva para coliformes totales, lo cual nos indica la posible presencia de *Escherichia coli*.

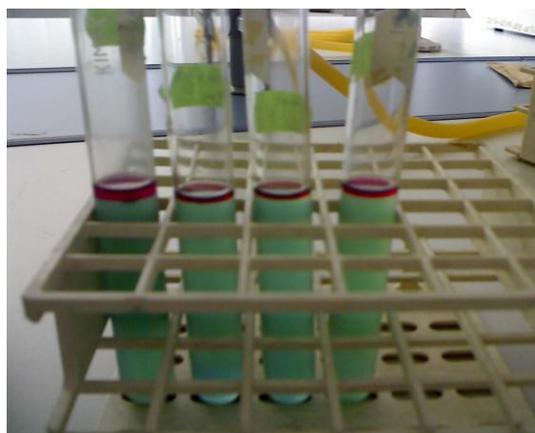


Figura N ° 10: Prueba para confirmar la presencia de *Escherichia coli* con el reactivo de Kovac.

En la figura se observa los tubos con caldo LMX, a los cuales se les agrego el reactivo de Kovack, formándose un anillo rojo-violáceo, que indica prueba positiva.

Y en el caso de **Salmonella** pudo ser aislada de la mayoría de las muestras, a excepción de las muestras 4, 7 y 8, ambos microorganismos deben estar ausentes en un alimento (anexo7).

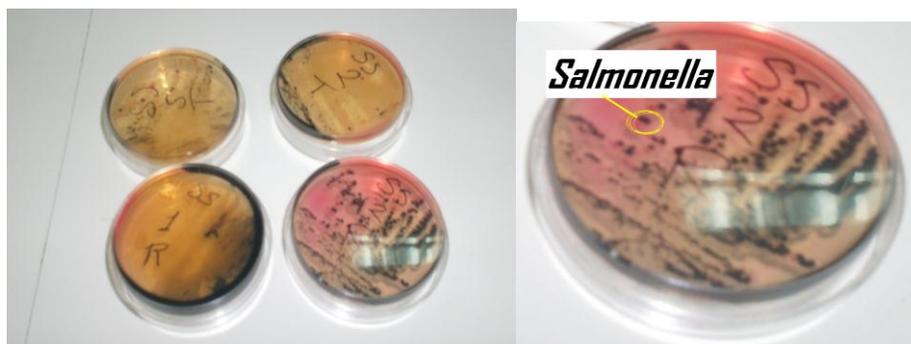


Figura N ° 11: Colonias de **Salmonella** en Agar SS.

Las colonias transparentes con un fondo negro, las que presentan coloración negra, son colonias de bacterias sospechosas de ser **Salmonella**.



Figura N ° 12: Pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de **Salmonella**.

De izquierda a derecha se encuentra: TSI; Voges Proskauer, Indol, Rojo de Metilo, Citrato y movilidad. Todos estos componen los medios usados para pruebas bioquímicas, y en cada uno concuerdan con las especificaciones para **Salmonella**.

Según los resultados obtenidos en el análisis de las muestras, para cada una de las pruebas realizadas, se obtiene información acerca del tipo de contaminación que ha sufrido y así: para el recuento de Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA); estos nos indican que este alimento ha tenido una intensa exposición a contaminación por el medio ambiente en el que han sido cultivados y procesados, también nos da indicio de que el proceso de desinfección de las ensaladas fue inefectivo y que por lo tanto pudo haber una proliferación de las bacterias durante su almacenamiento.

Con respecto a los MOS coliformes totales podemos decir que durante su cultivo han sido expuestas a contaminación fecal y ambiental, y refuerzan el hecho de que estas ensaladas pudieron haber sido expuestas a una fuente de contaminación luego del proceso de desinfección o simplemente que el proceso fue inefectivo.

En el caso de las coliformes fecales estas nos dan indicio que la contaminación es de origen fecal humano o animal, además de reforzarnos en un 90 % la potencial presencia de ***Escherichia coli***, se debe mencionar que la existencia de coliformes fecales nos indica la posibilidad de encontrar MOS patógenos tales como ***Salmonella***.

Se encontró a ***Escherichia coli*** presente en las muestras , esto nos confirma los resultados para coliformes totales y fecales, siendo este MOS un indicador claro de la inocuidad microbiológica en alimentos, y su hallazgo en un alimento no puede ser aceptable.

Al encontrar **Salmonella** en la mayoría de las muestras, a excepción de las ensaladas # 4, 7 y 8, demuestran que no cumplen con parámetros de inocuidad y calidad microbiológica.

Todos los resultados indican que las ensalada listas para consumir, no son aptas para el consumo humano, ya que no cumplen con los requerimiento para coliformes totales y fecales, por encontrarse en una proporción mayor a 100 NMP/g; para ambos casos, Bacterias Mesófilas Aerobias en cantidad mayor a 150,000 UFC/g, por ultimo y teniendo en cuenta que los parámetros anteriores son suficientes para declarar que las ensaladas no cumplen con la norma, se encontraron las bacterias **Escherichia coli** y **Salmonella**, teniendo que estar ausentes en 25 g de muestra, según las normas establecidas.

A partir de los resultados anteriores se presentar el siguiente cuadro, que muestra el % en el que no cumplen las muestras con las normas correspondientes:

Cuadro N° 6: % de muestras analizadas que cumplen y no cumplen con las normas.

Muestras que no cumplen con las Normas correspondientes	
No cumplen	Si cumplen
100%	0%

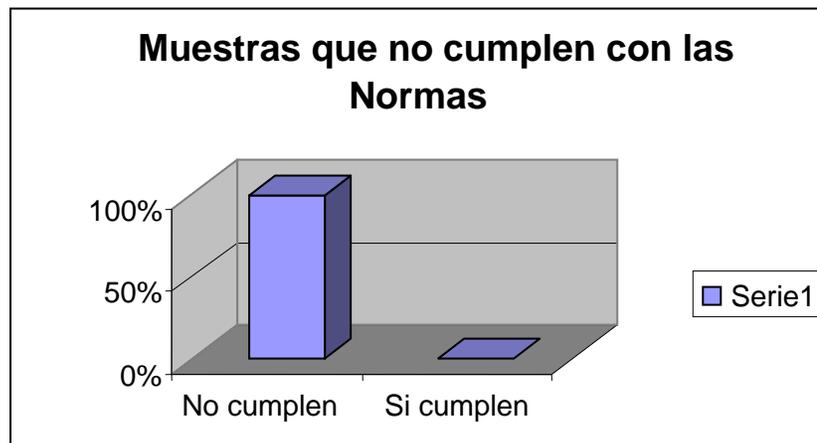


Figura N ° 13: Porcentaje de muestras que no cumplen con las normativas correspondientes

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. En la determinación de la presencia de ***Escherichia coli***, dio positiva en todas las muestras analizadas, mostrando que las ensaladas no poseen una adecuada calidad microbiológica, por lo cual, bajo este parámetro el producto alimenticio no es apto para su consumo.
2. La alta concentración de Bacterias Mesófilas Aerobias en las ensaladas, muestra la posibilidad que exista una alta contaminación del lugar en donde se producen estos alimentos y condiciones inadecuadas de trabajo. Además se puede evidenciar por la alta cantidad de Bacterias Mesófilas Aerobias que los procesos de desinfección realizados a las hortalizas que componen las ensaladas son deficientes.
3. En el 70 % de las muestras analizadas se encontró la presencia de ***Salmonella***, la cual debe estar ausente en cualquier alimento, por ser un microorganismo patógeno y por lo tanto, las ensaladas lista para consumir, pueden provocar brotes de salmonelosis convirtiéndose en un alimento de alto riesgo para la salud.
4. Este producto alimenticio no supera estándares de calidad e inocuidad microbiológica, debido a la alta contaminación que presenta, y esto

puede deberse a que el fabricante realiza tratamientos inefectivos de desinfección, malas prácticas de manufactura, de transporte y almacenamiento.

5. Se observa que las malas prácticas agrícolas por parte de los agricultores, son reflejadas en este alimento, debido a la alta contaminación en las hortalizas utilizadas en la preparación de las ensaladas y por lo tanto no se puede declarar en la etiqueta que estas ensaladas “son listas para consumir”.
6. Se determinó que la cantidad de Bacterias coliformes totales, coliformes fecales y Bacterias Mesófilas Aerobias, encontrados en las ensaladas, están fuera de los límites establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994, y por lo tanto no cumplen con lineamientos de inocuidad y calidad microbiológicas; declarando que no son aptas para el consumo humano.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Que se realicen monitoreos por medio de instituciones competentes a los procesos de desinfección de las hortalizas en las industrias que las preparan, para conocer fallas en sus procedimientos; así también realizar pruebas a los agentes químicos utilizados en la desinfección de las ensaladas, para tener constancia de su eficacia.
2. Que el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, a través de las áreas especializadas en este rubro, realice controles microbiológicos mensuales, con el fin de conocer la carga microbiológica de las ensaladas y concluir si son aptas para su comercialización.
3. Que las empresas responsables de la elaboración de las ensaladas, retiren la leyenda “listos para consumirse” o se aseguren que cumpla con lo que declara la etiqueta.
4. Que las personas que frecuentemente consumen este tipo de alimentos como lo son las hortalizas, las laven cuidadosamente con agua y jabón, luego las sanitizen utilizando agentes como el cloro u otras sustancias químicas comerciales destinados para esto, antes de ingerirlos para evitar el posible brote de enfermedades por su consumo.

5. Que la empresa fabricante monitoreen las condiciones de transporte y almacenamiento del producto; para tener las adecuadas condiciones de refrigeración, y así poder ofrecer una buena calidad de sus alimentos al público en general.

6. Que los agricultores apliquen las buenas practicas agrícolas (BPA) y reciban de parte de las instituciones competentes la capacitación, ayuda y vigilancia adecuada para cumplir con estas, así de esta forma asegurar que las hortalizas sean inocuas desde su origen.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. AOAC (Official Methods of analysis of the association of official analytical chemists). 40ª edición USA, 1984
2. Aluffi. L y otros 2006. Enfermedades Transmitidas por Alimentos -ETAs- consultado el 21 de febrero de 2008. Disponible en http://www.calidadalimentaria.net/que_son_las_etas.php.
3. APHA, AWWA, WPCF: 1992 Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales. Editorial Díaz de Santos. 17ª edición Madrid, España.
4. Castro J. y otros. 2006 Calidad sanitaria de ensaladas de verduras crudas listas para su consumo. Páginas 1-13. Consultado el 16 de febrero de 2008 disponible en [www.alfa-editores.com/alimentaria/ Julio-Agosto06/Calidad.pdf](http://www.alfa-editores.com/alimentaria/Julio-Agosto06/Calidad.pdf).
5. Cazarez G. y otros 2004. Presencia y supervivencia de coliformes fecales, *Salmonella spp* y *Listeria spp*. en agua de uso agrícola del valle de Culiacán. Pág. 2-13 consultado el 20 de febrero de 2008 disponible en [http://www.femisca.org/publicaciones/XIV congreso /XIVC NIS015. pdf](http://www.femisca.org/publicaciones/XIV_congreso/XIVC_NIS015.pdf)

6. De Mena. M y otros 1994. Obtención y aprovechamientos de extractos vegetales de la flora salvadoreña. Editorial Universitaria. Universidad de El Salvador. El Salvador. Páginas: 172, 173,295-297, 503.
7. Escartín E. 2000 Microbiología e inocuidad de los alimentos. Primera edición. Universidad Autónoma de Querétaro, México.
8. Espinoza C.1999 Evaluación de la calidad microbiológica de ensaladas frescas elaboradas artesanalmente los comedores de los mercados del área de San Salvador y Antiguo Cuscatlán. Tesis. lic. F.Q.F San Salvador. Universidad de El Salvador. Centro América.
9. Forsythe S. J y otros. 2002. Higiene de los Alimentos, Microbiología y HAAC, segunda edición, Editorial Acribia ,S.A. Zaragoza España paginas 23-40.
10. Fuentes. A. y otros. 2006. Calidad sanitaria de alimentos disponibles al público de la ciudad de Obregón, Sonora, México. Consultado el 8 de marzo de 2008. disponible en la revista on-line: http://www.respyn.uanl.mx/vi/3/articulos/calidad_sanitaria.htm
11. Fundación EROSKI. Diferentes tipos de ensaladas, consultado el 16 de marzo 2006, disponible en la página on-line <http://www.consumer.es/>

web/es/alimentacion/en_la_cocina/trucos_y_secretos/2004/07/23/105596
.php.

12. González. C. 2006. Rastreabilidad de Hortalizas para determinar su inocuidad biológica El Salvador. Tesis de Maestría, Universidad de El Salvador, San Salvador. Centro América.
13. Infoagro, 2008. Zanahoria, zanahorias. Consultado el 5 de marzo de 2008. Disponible en: <http://www.fichas.infojardin.com/hortalizas-verduras/zanahoria-zanahorias.htm>.
14. Jawetz E., y otros 2005 Microbiología Médica. Manual moderno 18ª edición. México
15. Konema E. y otros. 2003 Diagnóstico microbiológico. 5ª edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Página 197
16. Lind. D. y otros 2005 Estadística Aplicada a los negocios y a la economía. 12ª edición editorial Mc Graw Hill México
17. Merck KGaA. Manual Merck de medios de cultivo 1994. España, paginas 194-195, 205-210, 271-272.

18. Nekane 2007. Apuntes de análisis clínicos. Sección de microbiología. Medios de cultivo. Páginas 1-5 disponible en: <http://laboratoriodenekane.spaces.live.com>
19. Ortega E. y otros. 2000 El apio criollo. Valor nutritivo y medicinal. Consultado el 5 de marzo de 2008. Disponible en: <http://www.ceniap.gov.ve/pbd/revistatecnicas>
20. Rodríguez. J. 2004. La Desinfección de Frutas y Hortalizas Frescas. Consultado el 20 de febrero de 2008. Disponible en: http://www.mercanet.cnp.go.cr/calidad/poscosecha/boletines/documentospdf./2004_boletines/2004-33desinfecci%c3%133n.pdf.
21. Romero G. Y otros. Contaminación bacteriológica en agua y plantas de lechuga en Puebla, Mexico, consultado el 17 de Febrero de 2008. Disponible en <http://natres.psu.ac.th/link/soilcongress/bdd/symp21/2330-r.pdf>
22. SAZ Laboratorios de análisis. 2006 Tabla del número más probable NMP. Consultado el 1 de Abril de 2008. Disponible en <http://usuarios.lycosses/zandoli/index.htm#sz1>.
23. Secretaria de la Salud. México. Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en

placa. Consultado el 8 Marzo de 2008 disponible en la página on-line [http:// www. salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/092 ssa14.html](http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/092_ssa14.html).

24. Secretaria de la Salud. México. Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994, Bienes y servicios. Practicas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos. Consultado el 8 Marzo de 2008 disponible en la pagina on-line [http:// www.salud.gob.mx/unidades/ cdi/nom/093ssa14.html](http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/093ssa14.html). Autor Secretaria de la Salud. México

25. Secretaria de la Salud. México. Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Consultado el 8 Marzo de 2008 disponible en la página on-line. [http://www.salud.gob.mx /unidades/cdi/nom/110ssa14. Html](http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/110ssa14.html). Autor Secretaria de la Salud. México

26. Secretaria de la Salud. México. Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994, Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable. Consultado el 8 Marzo de 2008 disponible en la página on-line [http://www.salud.gob.mx /unidades/cdi/nom /112ssa14.html](http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/112ssa14.html).

27. Secretaria de la Salud. México. Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de **Salmonella** en alimentos. Consultado el 8 Marzo de 2008 disponible en la página on-line <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/114ssa14.html>.
28. The United State Pharmacopeial Convention, Inc. The United States Pharmacopeia. Twenty-seventh Revision and The National Formulary. Twenty-second Revision. USA, 2004. pag 2156.
29. Torres M. 1999 Agentes patógenos transmitidos por alimentos. Primera edición. Vol. 1 Universidad de Guadalajara, México. 174-206p APHA, AWWA, WPCF: 1992 Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales. Editorial Díaz de Santos. 17ª edición Madrid, España
30. Wikipedia. 2008. Hortalizas. Consultado el 16 de marzo de 2008 disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Hortaliza>.
31. Wikipedia. 2008. Salmonelosis. Consultado el 8 de febrero de 2008 disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Salmonelosis>.
32. Wikipedia. 2008. Coliforme. Consultado el 8 de febrero de 2008. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Coliforme>.

33. La lechuga. Consultado el 5 de marzo de 2008 disponible en:

<http://www.consumer.es>.

34. Zanahoria. Consultado el 5 de marzo de 2008. Disponible en

<http://www.herbogeminis.com/zanahoria.html>.

35. Cebolla blanca. Consultado el 5 de marzo de 2008. Disponible en:

<http://www.hoticasa.es>

36. Diccionario de enfermedades. Consultado el 21 de febrero de 2008

disponible en <http://www.sanitas.es/>

GLOSARIO

GLOSARIO (2), (7), (15), (29), (31), (32)

- 1. Bacterias Mesófilas Aerobias:** son todas las bacterias capaces de crecer en un medio de agar nutritivo
- 2. Coliformes fecales:** bacterias pertenecientes al grupo Coliforme, bacilos Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, que fermentan la lactosa a 44.5-45.5 con producción de gas.
- 3. Coliformes totales:** bacterias coliaerogenes de origen fecal, microorganismos bacilos Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados. Poseen la característica de fermentar la lactosa con producción de gas dentro de 48 horas de incubación a 35°C.
- 4. Desinfección:** La reducción del número de microorganismos presentes en el medio ambiente, por medio de agentes químicos y/o métodos físicos, a un nivel que no comprometa la inocuidad o la aptitud del alimento.
- 5. Ensaladas frescas:** elaboraciones hechas a base de géneros crudos, que normalmente se sazonan con una mezcla de grasas, sal y ácidos. Es un plato rico en sales minerales, vitaminas y fibra y en el caso de las ensaladas compuestas, se complementan nutricionalmente añadiéndoles algún elemento proteico (pescados, carnes, legumbres y cereales)
- 6. Ensaladas listas para consumirse:** son productos elaborados a partir de una mezcla de hortalizas, que han sido previamente tratadas y que

por lo cual pueden consumirse directamente sin necesidad de limpiarlas, córtalas y prepararlas.

7. ***Escherichia coli***: una bacteria que se encuentra generalmente en los intestinos animales —incluido el humano— y por ende en las aguas negras. Es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción de Gram, es anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa y su prueba de IMVIC es ++--.

8. **ETAs**: Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs).

Las ETAs son un conjunto de enfermedades que resultan de la ingestión de alimentos y/o agua contaminados en cantidades suficientes como para afectar la salud del consumidor.

Los agentes contaminantes pueden ser:

- Ø Agentes biológicos (bacterias y/o sus toxinas, hongos, virus, parásitos)
- Ø Agentes químicos (plaguicidas, fertilizantes, veneno, etc.)
- Ø Agentes físicos (metales, vidrio, madera, etc)

La contaminación bacteriana suele ser la que se produce con mayor frecuencia.

9. **Fuentes de contaminación**: los alimentos están expuestos a muchos factores contaminantes como por ejemplo: el aire, el suelo, los animales e incluso el mismo ser humano

10. Hortalizas: son un conjunto de plantas cultivadas generalmente en huertas o regadíos, que se consumen como alimento, ya sea de forma cruda o preparada culinariamente. El término hortaliza incluye a las verduras y a las legumbres verdes como las habas y los guisantes. Dentro del concepto de hortalizas se excluyen a las frutas y a los cereales.

11. Infecciones alimentarias: son las ETAs producidas por la ingestión de alimentos o agua contaminados con agentes infecciosos específicos tales como bacterias, virus, hongos, parásitos, que en el intestino pueden multiplicarse y/o producir toxinas.

12. Inocuidad alimentaria: es un proceso que asegura la calidad en la producción y elaboración de los productos alimentarios. Garantiza la obtención de alimentos sanos, nutritivos y libres de peligros para el consumo de la población

13. Intoxicaciones alimentarias: son las ETAs producidas por la ingestión de toxinas producidas en los tejidos de plantas o animales, o productos metabólicos de microorganismos en los alimentos, o sustancias químicas que se incorporan a ellos de modo accidental o intencional en cualquier momento desde su producción hasta su consumo.

14. Mialgias: consisten en dolores musculares que pueden afectar a uno o varios músculos del cuerpo y pueden estar producidos por causas muy diversas.

15. **Microflora:** población de microorganismo, ya sean bacterias, hongos, levaduras, virus, parásitos, etc. que existen en un determinado hábitat; como en superficies de objetos, animales, personas, alimentos, etc.
16. **Serovares:** un tipo de microorganismo infeccioso clasificado según los antígenos que presentan en su superficie celular. Los serovares permiten diferenciar organismos a nivel de subespecie, algo de gran importancia en epidemiología
17. **Síndrome hemolítico uremico:** La enfermedad es producida por una bacteria: la *Escherichia coli* enterohemorrágica, Es una enfermedad que afecta principalmente al riñón, con otras alteraciones en la sangre, especialmente en los glóbulos rojos y plaquetas y en menor medida otros órganos como el hígado y cerebro.
22. **Zoonoticos típicos:** la enfermedad o infección que se transmite de los animales al hombre, y viceversa, de una forma directa o indirecta.

ANEXOS

ANEXO N° 1

Tabla 1: Significado del contenido bacteriano de un alimento (muy general)

Log 10 UFC/g	Significado
0-2	Bajo
3-4	Intermedio
5-6	Alto
7	Índice de deterioro
8	Malos olores
9	Mucosidad
12	Saturación

ANEXO N° 2

Tabla N ° 2: pruebas bioquímicas para *Salmonella*

	<i>Salmonella</i>
H ₂ S	+
TSI BISEL/FONDO	K/A GAS (+/-)
INDOL	-
VP	-
RM	+
CITRATO	+
MOVILIDAD	+

ANEXO N° 3

Supermercados del área metropolitana de San Salvador:

Cuadro N° 1: listado de supermercados del área metropolitana de San Salvador.

SUPER SELECTOS			
Antel centro	Arce	Autopista sur	Bethoveen
Caribe	Centro 1	Centro Libertad	Escalón
España	Feria rosa	La cima	Los Santos
Masferrer	Metro sur	Metro centro	Miralvalle
Morazán	San Jacinto	San Miguelito 1	Santa Emilia
San José	San Miguelito 2	San Benito	San Luís
Trigueros	Olímpica	Miralvalle 2	

Total = 27 sucursales

DESPENSA DE DON JUAN			
Centro Libertad	Escalón Norte	San Benito	Cumbres Escalón
General Arce	San Jacinto	Darío	La Cima
Terraza	Metrocentro		

Total = 9 sucursales

EUROPA E HIPER EUROPA			
Centro	Bernal	Hiper Europa	Las Piletas
Plaza Merliot			

Total = 5 sucursales

**Total de supermercados de la zona metropolitana de San Salvador = 41
supermercados**

ANEXO N° 4

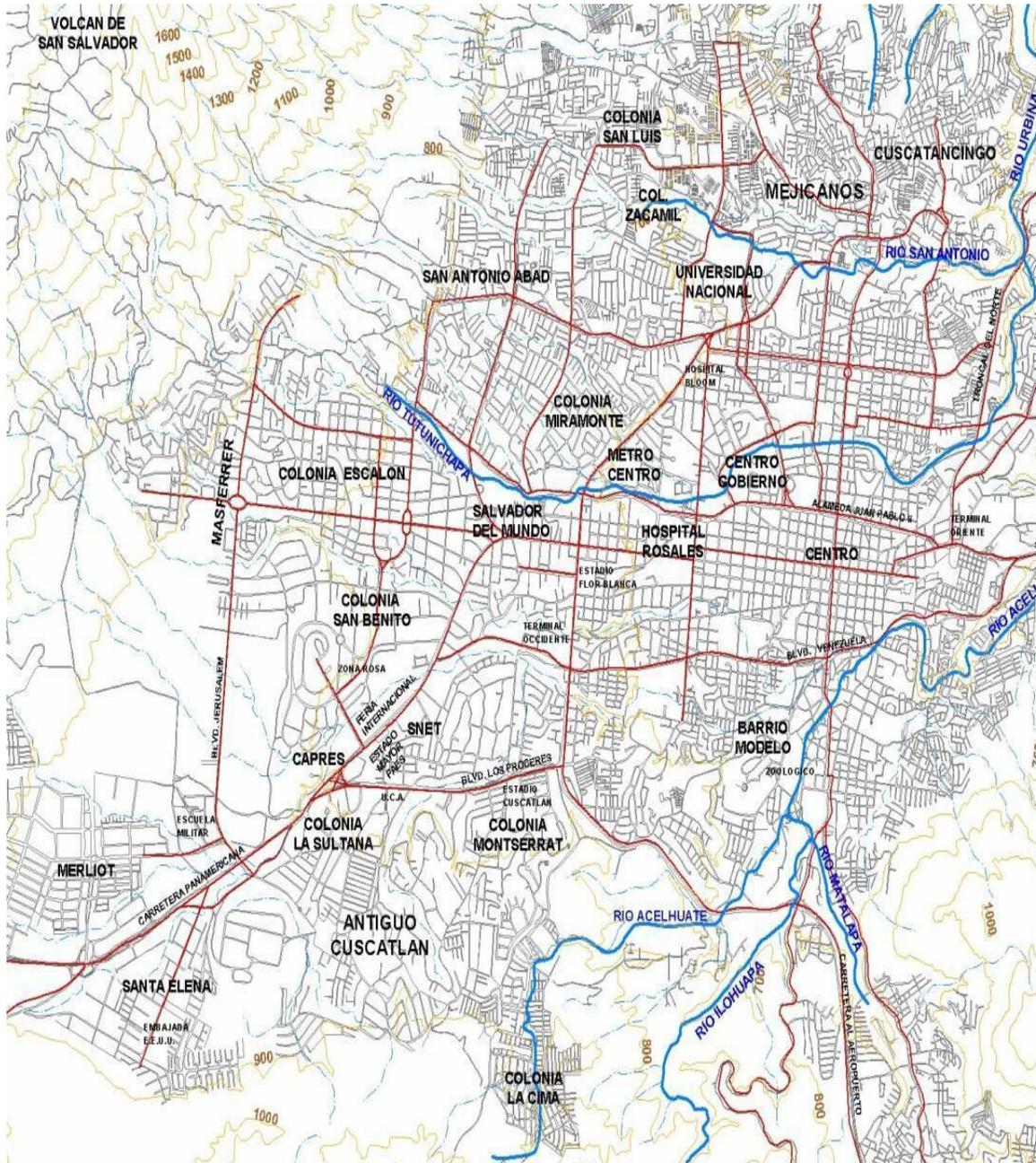


Figura N° 1: mapa de la zona metropolitana de San Salvador.

ANEXO N° 5

Material.

Cristalería

- 81 campanas de Durham
- 182 tubos con tapón de rosca
- 81 placas de petri
- 27 pipetas de mohr de 1 mL
- 18 tubos pequeños con rosca
- 30 frascos de vidrio para dilución
- Gradillas para tubos
- Asas de platino con punta y sin punta
- Bolsas plásticas de 5 libras.

Medios de cultivos.

- 100 mL de tetracionato
- 100 mL de Rappaport
- 840 ml de Agar estándar método
- 5 L de agua peptonada

Reactivos.

- Reactivo de kovac
- KOH
- Alfa naftol
- Rojo de metilo
- Reactivo de Erlich

Equipo.

- Incubadora
- Estufa
- Autoclave
- Campana de flujo laminar
- Pipeteadores
- Balanza semi-analítica
- Esterilizador de asas
- Stomacher
- Hieleras

MARCHA ANALÍTICA (METODOS)



PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

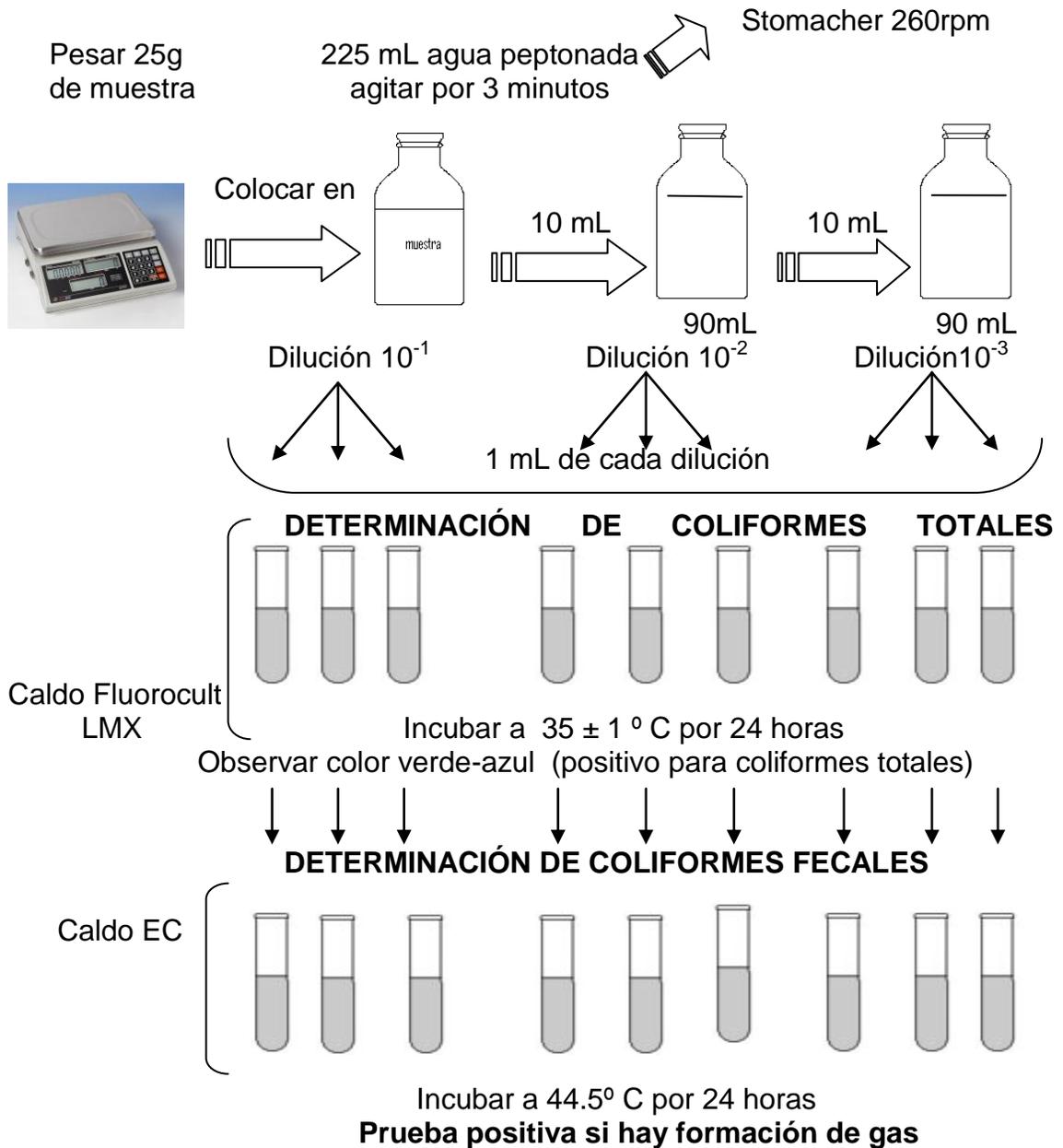


Figura N° 2: Procedimiento para preparación de muestra y determinación de Coliformes totales y coliformes fecales.

DETERMINACIÓN DE *ESCHERICHIA COLI*.

Tubos positivos en caldo Fluorocult LMX

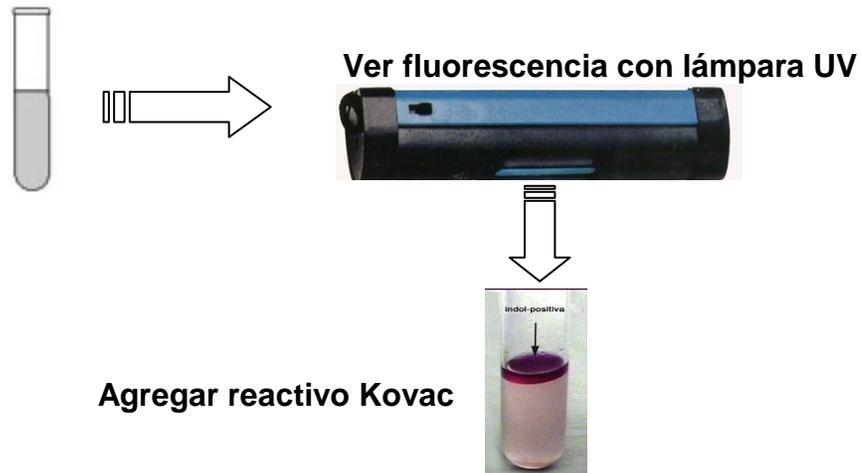


Figura N ° 3: Procedimiento para la identificación de *Escherichia coli*

DETERMINACIÓN DE *SALMONELLA*

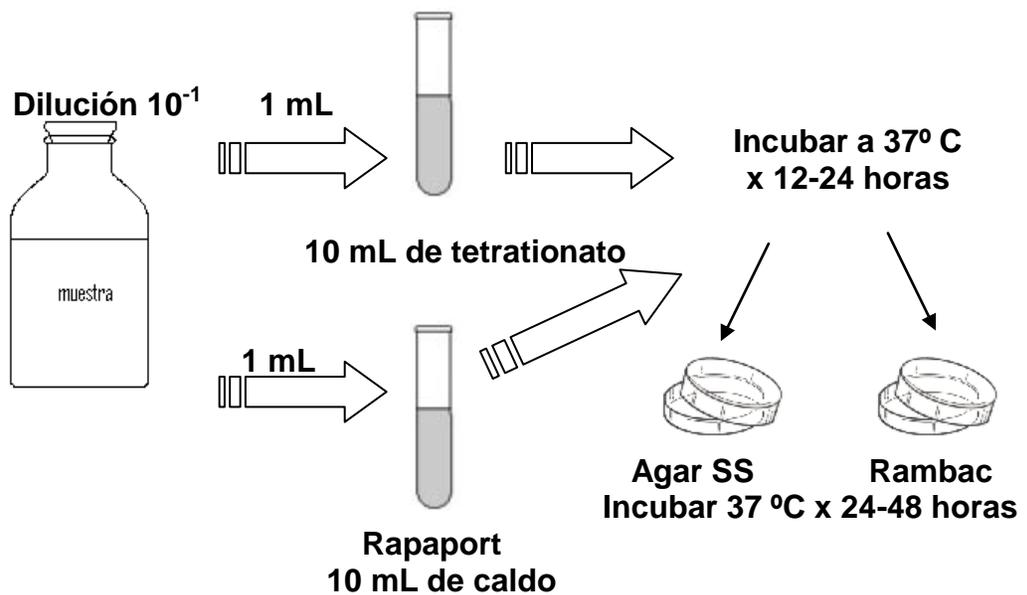


Figura N ° 4: Procedimiento para la identificación de *Salmonella*.

RECuento DE BACTERIAS MESOFILAS AEROBIAS

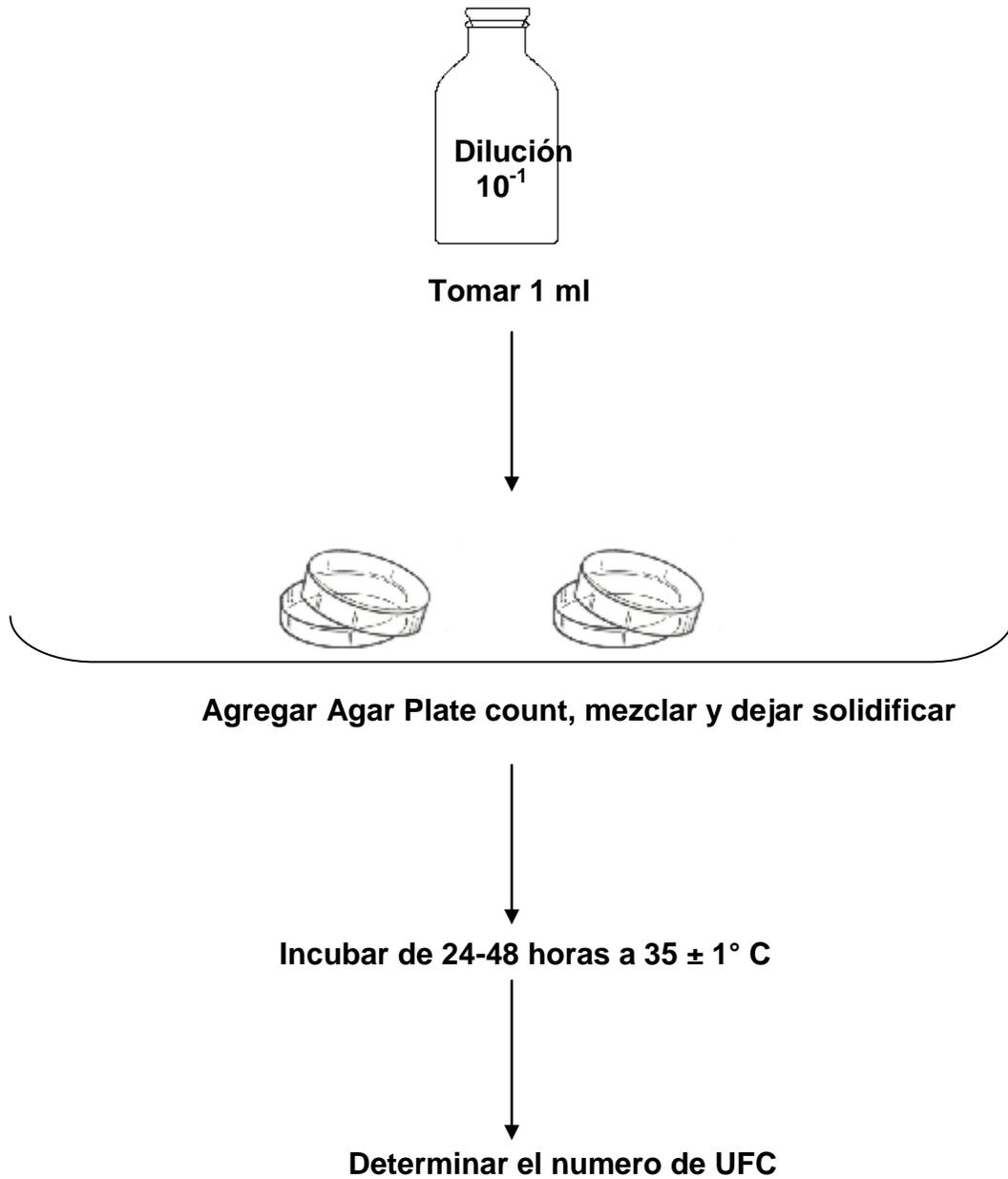


Figura N° 5: Procedimiento para el recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas

ANEXO N° 6

Cuadro N° 5: Codificación de las muestras recolectadas:

N° de Muestra	Lugar de recolección	Marca de la ensalada
Muestra 1	Selectos "San Luis"	Royal antigua
Muestra 2	Selectos "Los Santos"	Royal antigua
Muestra 3	Selectos "La Olímpica"	Royal antigua
Muestra 4	Selectos "Caribe"	Baby Beluga
Muestra 5	Dispensa de Don Juan "San Benito"	Royal antigua
Muestra 6	Selectos "Escalón"	Royal antigua
Muestra 7	Selectos "Zona Rosa"	Baby Beluga
Muestra 8	Selectos "Zona Rosa"	Baby Beluga
Muestra 9	Selectos "Metrocentro"	Royal antigua
Muestra 10	Dispensa de Don Juan "Metrocentro"	Royal antigua

Anexo N° 7.

Tabla N° 3: Ensayos y límites establecidos en Norma Oficial Mexicana NOM-093- SSA1-1994

Ensayo	Limite establecido
Coliformes Totales	100 NMP / g
Coliformes Fecales	100 NMP / g
Recuento de Bacterias Mesófilas Aerobias	No mas 150,000 UFC / g
Determinación de <i>Salmonella</i>	Ausente en 25 g de muestra
Determinación de <i>Escherichia coli</i>	Ausente en 25 g de muestra

Anexo Nº 8

Tabla Nº 4: Tabla del Número Más Probable (NMP) por ml/g de muestra, utilizando series de tres tubos inoculados con 10, 1.0, 0.1 ml respectivamente. (12)

10	1	0.1	NMP/ml
3	3	3	>1100
3	3	2	1100
3	3	1	500
3	3	0	200
3	2	3	290
3	2	2	210
3	2	1	150
3	2	0	90
3	1	3	160
3	1	2	120
3	1	1	70
3	1	0	40
3	0	3	95
3	0	2	60
3	0	1	39
3	0	0	23
2	3	3	53
2	3	2	44
2	3	1	36
2	3	0	29

ANEXO N° 9

Figura N° 14: Empaque de una ensalada lista para consumir marca Royal Antigua



ANEXO Nº 10

Carta dirigida al Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social



FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR



San Salvador, 22 de Agosto de 2008.

Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social
Doctor
Santiago Ghiringhella Chávez

De la manera mas atenta, hacemos del conocimiento que el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social ha recibido los resultados de la investigación: "Determinación de la inocuidad microbiológica de dos marcas de ensaladas empacadas listas para consumo que se comercializan en los supermercados del área metropolitana de San Salvador" periodo 2008; la cual fue realizada por: Gloria Gabriela Torres Solórzano y Josué Gabriel Herrera Díaz, egresados de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de EL Salvador. Esta investigación fue realizada en los laboratorios de Microbiología de alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la universidad en mención.

Atentamente.

Doctor Santiago Ghiringhella Chávez

Carta dirigida a las autoridades del CONACYT



FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR



San Salvador, 22 de Agosto de 2008.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Ingeniero
Carlos Roberto Ochoa Córdova
Director Ejecutivo

De la manera mas atenta, hacemos del conocimiento que el consejo Nacional de Ciencia y Tecnología ha recibido los resultados de la investigación: "Determinación de la inocuidad microbiológica de dos marcas de ensaladas empacadas listas para consumo que se comercializan en los supermercados del área metropolitana de San Salvador" periodo 2008; la cual fue realizada por: Gloria Gabriela Torres Solórzano y Josué Gabriel Herrera Díaz, egresados de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de EL Salvador. Esta investigación fue realizada en los laboratorios de Microbiología de alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la universidad en mención.

Atentamente.


Ing. Carlos Roberto Ochoa Córdova
Director Ejecutivo.