



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA

**TESIS MONOGRÁFICA PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN
MICROBIOLOGÍA.**

TEMA:

Detección de *Escherichia coli* y *Salmonella spp* en alimento listo al consumo: pollo asado expendido en distintos supermercados del distrito I y V de la ciudad de Managua, diciembre 2017 - enero 2018.

Autoras:

Bra. Miriam Anielka Huete Ulloa.

Bra. Perla Azucena Brenes Rivera

Tutor:

Ing. Benita Magali Jiménez.

Especialista de laboratorio de Salud (CNDR-MINSA)

Asesor metodológico

Lic. Roberto Enrique Flores Díaz.

Docente Dpto. Bioanálisis Clínico

Managua, Abril del 2018

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a Dios primeramente por brindarme sabiduría y fortaleza en los momentos más difíciles de mi vida y mi carrera.

A mis padres por todo el sacrificio que han realizado por mi educación, bienestar y por brindarme la oportunidad de culminar mis estudios, a mi hermano por estar conmigo incondicionalmente, a mi esposo por apoyarme a lo largo de este estudio.

Dedico esta tesis especialmente a mi hija **Ariadna Solange Quintanilla Huete** por ser mi mayor motivación para seguir adelante y culminar esta importante etapa de mi vida, y ser su ejemplo de superación.

MIRIAM ANIELKA HUETE ULLOA

DEDICATORIA

A Dios todo poderoso que sin el nada fuera posible, por permitirme llegar hasta aquí y culminar mi carrera, ya que nada es imposible si confió en él.

A mis padres quienes por medio de sus esfuerzos y brindar su apoyo para terminar con éxito mis estudios, a mis hermanos quienes me han apoyado de gran manera en trabajar mi tesis. Y a todos los profesores de la UNAN-MANAGUA quienes me ayudaron en mi proceso profesional.

PERLA AZUCENA BRENES RIVERA

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios por darnos sabiduría y estar con nosotras en cada etapa de nuestras vidas.

A nuestros padres y familiares por el esfuerzo y apoyo en nuestros estudios y nuestra vida cotidiana.

A la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua, Instituto politécnico de la salud (POLISAL), por darnos la oportunidad y espacio para nuestra formación académica.

A nuestros Maestros por compartir con nosotros sus conocimientos, habilidades y valores durante nuestra formación profesional.

Al CDNR (MINSA) por brindarnos apoyo en nuestra investigación y llevar a cabo nuestra tesis.

Al laboratorio del Departamento de microbiología de Agua y Alimentos por su apoyo y permitirnos concluir nuestro estudio. **Al departamento de preparación de medios de cultivo** por facilitarnos los medios requeridos para el proceso de nuestro estudio.

Agradecemos especialmente a nuestra tutora Ing. **Benita Magali Jiménez** por apoyarnos en este estudio, por su paciencia y dedicación, igualmente agradecemos a nuestro asesor **Lic. Roberto Enrique Flores Díaz** por transmitirnos sus conocimientos y orientarnos en el transcurso de nuestro estudio.

VALORACIÓN DE TUTOR

En la actualidad la necesidad de encontrar en los supermercados alimentos listos para el consumo se ha venido incrementando, debido al ritmo de vida que lleva la mayoría de la población. Por tal razón surge la necesidad de estudiar la calidad higiénica sanitaria de estos alimentos (pollo asado), para de alguna forma garantizar la salud pública.

Esta investigación tiene como título:

Detección de *Escherichia coli* y *Salmonella spp* en alimentos listos para el consumo: pollo asado, expendidos en distintos supermercados del distrito I y V de la ciudad de Managua en el periodo diciembre 2017 - enero 2018.

Ha sido elaborada con esfuerzo y dedicación por parte de las autoras que día a día han sido motivadas con este estudio y de esta manera colaborar con el ministerio de salud garantizando a la población alimentos libres de contaminación microbiológica.

Como tutor apruebo esta que esta investigación sea de provecho para fines académicos.

Ing. Benita Magaly Jiménez Pérez
Especialista en laboratorio de salud
Dep. de Microbiología de Aguas y Alimentos
CNDR-MINSA

OPINIÓN DEL ASESOR METODOLÓGICO

Una de las principales bacterias patógenas causantes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos la representan *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*, principalmente en lo referido a alimentos cárnicos como el pollo crudo. Debido al incremento en la demanda de alimentos listos para el consumo es necesario saber si los pollos asados distribuidos en diferentes supermercados, luego de recibir un proceso térmico terminal, se encuentran exentos de contaminación microbiológica, particularmente de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*

Por tanto, el tema “**Detección de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* en alimento listo al consumo: pollo asado expendido en distintos supermercados del distrito I y V de la ciudad de Managua, diciembre 2017 - enero 2018.** Presentado por las estudiantes de la carrera de Microbiología Miriam Anielka Huete Ulloa y Perla Azucena Brenes Rivera cumple con los requisitos científicos y metodológicos para ser presentado en defensa monográfica.

Dado en la ciudad de Managua a los 16 días del mes de abril de 2018.

Roberto Enrique Flores Díaz
Docente Dpto. de Bioanálisis Clínico
UNAN-Managua

RESUMEN

Escherichia coli y *Salmonella spp* son bacterias patógenas causantes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos, según investigaciones en el año 2013 en la ciudad de Managua se encontró *Salmonella spp* en un 63.3% en pollo crudos expendidos diferentes mercados. Por lo que nos inquieta saber si los pollos después de ser sometidos a un proceso térmico, estos se encuentran exentos de contaminación microbiológica en este caso por *Escherichia coli* y *salmonella spp*.

Por esta razón se realizó esta investigación que consiste en determinar la presencia de *Escherichia coli* y *Salmonella spp* en pollo asado expendido en distintos supermercados del distrito I y V de la ciudad de Managua en el periodo diciembre 2017 - enero 2018.

El presente estudio es descriptivo, prospectivo de corte transversal, no probabilístico por conveniencia, el universo está conformado por 10 supermercados expendedores de pollo asado, se procesaron 30 muestras de pollos que correspondieron a diferentes lotes de producción en diferentes fechas de elaboración.

No se detectó la presencia de *Escherichia coli* a través del método Número más probable y no se detectó la presencia de *Salmonella spp* tanto en el método convencional como en PCR-tiempo real, pero se determinó la presencia de otras enterobacterias en un 23% de las muestras analizadas (7/30) a través del aislamiento convencional para *Salmonella spp* según FDA-BAM lo cual se confirmó la presencia de *Escherichia coli* en un 3%(1/30) a través de pruebas bioquímicas.

Como principal recomendación a la universidad, motivar a los estudiantes a realizar estudios relacionados a la salud pública, correspondiente a los alimentos que consume la población, ya que implica un riesgo a estos no llevar una buena práctica higiénico sanitaria, comprometiendo así la salud de la población.

INDICE

RESUMEN

Capítulos

I. INTRODUCCIÓN	9
II. ANTECEDENTES	10
III. JUSTIFICACIÓN	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
IV. OBJETIVO GENERAL	13
V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
VI. MARCO TEÓRICO	14
6.4 Generalidades de <i>Escherichia coli</i>	16
6.4.1 Características morfológicas y bioquímicas.....	16
6.4.3 Patogenia.....	17
6.4.5 <i>Escherichia coli</i> y bacterias coliformes termotolerantes	18
6.5 Generalidades de <i>Salmonella</i>	18
6.5.1 Características morfológicas y bioquímicas.....	18
6.5.3 Transmisión.....	19
6.5.5 Patogenia	20
6.5.6 Mecanismo de invasión	21
6.6 Métodos convencionales según la FDA-BAM	22
VII. DISEÑO METODOLÓGICO	29
VIII. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	39
IX. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	46
X. CONCLUSIONES	53
XI. RECOMENDACIONES	54
XII. BIBLIOGRAFÍA	55
XIII. ANEXOS	59

I. INTRODUCCIÓN

Los alimentos listos para el consumo son alimentos procesados que pueden ser crudos o cocidos, venderse calientes o fríos, o consumirse sin ningún tratamiento térmico adicional. En los últimos años la popularidad de este tipo de alimentos se ha incrementado, ya que representan una opción fácil y rápida para el consumidor. (Evelyn Rodríguez, 2010). Hoy en día es común encontrar en las estanterías de los supermercados y tiendas, alimentos que solo demandan abrir el envase, calentar y consumir, u otros que simplemente se abren y consumen de manera directa. Son los llamados alimentos de alta gama, cuya presencia en la ciudad de Managua se incrementa cada día como consecuencia del cambiante estilo de vida en el que estamos inmersos. (Alimentos de alta gama: Listos para consumir, 2016)

La demanda mundial de carne de pollo se ha incrementado en los últimos años debido a su precio comparativamente bajo con otras carnes además de ser una excelente fuente de proteína. El problema es la eventual contaminación cruzada por vía de utensilios, tablas de cortar, Manipuladores, etc. entre la canal fresca de pollo y otros alimentos desprovistos de dicha flora protectora. Constituye un grave error higiénico manipular el pollo crudo y el pollo cocinado en la misma zona de la cocina. (FAO, 2008)

El 96% de la producción de carne de pollo es aportado por la industria nacional. La fortaleza de la industria de pollo nicaragüense también se ha evidenciado al enfrentar la libre importación de pollo americano permitido por el tratado de libre comercio entre Nicaragua y Estados Unidos, lo que no ha desplazado las preferencias de los consumidores. El presente estudio tiene como propósito determinar, si existe la presencia de *Escherichia coli* y *Salmonella spp* en pollos asados expendidos en supermercados del distrito I y V de la ciudad de Managua, siendo el pollo un alimento de mayor consumo para la población.

II. ANTECEDENTES

En el 2005 un hombre de 90 años, ingresado en un hospital de Valencia-España, se convirtió en el primer fallecido tras comer el pollo asado contaminado con *Salmonella* que ha distribuido una empresa de Toledo. La cifra de afectados en el brote supero los 700 casos, según 12 comunidades autónomas, hubieron 86 personas hospitalizadas. El Ministerio de Sanidad prevé que el número de casos comenzará a remitir y pidió a quienes tuvieran un pollo asado de las marcas **Sada o Pimpollo** se devuelvan. La empresa desconoce cómo llegó la bacteria a uno de los tubos que dosifica la salsa sobre el pollo. (PAIS, 2005)

En el año 2013 en Camino Real San Francisco- California se retiraron 14,093 unidades adicionales de productos de pollo asado (ROTISSERIE) que estaban contaminados con *Salmonella Heidelberg*; el Departamento de Salud Pública de California descubrieron, mediante investigaciones de seguimiento a las cadenas expendedoras: 13,455 pollos asados marca **Rotisserie**, 638 pollos asados marca **Kirkland Farm Rotisserie, Leg Quarters, and Rotisserie Chicken Salad**. (AVICOLA, 2013)

En el año 2013, los estudiantes de quinto año de la carrera de Bioanálisis Clínico realizaron un estudio en pollos crudos en distintos mercados de la ciudad de Managua para determinar la presencia de *Salmonella spp* en este tipo de productos. Como resultado encontraron que un 63.3% de estos fueron positivos para *Salmonella spp* a través de PCR tiempo real, por lo cual nos surge la inquietud de conocer si esta bacteria sobrevive después del proceso de asado en los pollos que se expenden en los supermercados de la ciudad de Managua. (KARLA BELLO, 2013)

En el año 2016 y 2017 En California-USA, Se realizó un estudio en una cuarta parte de los pollos asado expendido en un supermercado encontrando *Escherichia coli*. Los autores recolectaron muestras de orina de más de 1.000 pacientes. Asimismo, analizaron 200 productos de pollo asado de diversos supermercados cercanos a la universidad de California en la que se llevó a cabo la investigación. Según los análisis de ADN bacteriano detectado en las muestras de orina y de carne de pollo asado el 38% de estos productos estaban contaminados con *Escherichia coli*. (MENDEZ, 2017)

III. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades diarreicas representan el 95% de las enfermedades transmitidas por alimentos, las cuales están asociadas con *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* Como consecuencia del cambio de vida y hábitos alimenticios ha surgido el alto consumo de alimentos listos al consumo, y a la vez preocupación por saber si la población está consumiendo alimentos libres de contaminación microbiológica. A pesar de su amplia aceptación, los alimentos listos al consumo pueden representar un riesgo para la salud pública, debido a su contaminación con microorganismos patógenos como consecuencia de una inadecuada manipulación durante su preparación. (OMS, 2008)

La elaboración de Alimentos listos para el consumo es un entorno productivo complejo que incorpora procesos automatizados y manuales y combina un amplio rango de ingredientes perecederos de distinta naturaleza y de gran variedad de orígenes. Esta complejidad, los cambios frecuentes en la línea y la producción de múltiples productos acabados utilizando los mismos equipos de proceso implican un riesgo significativo de contaminación cruzada de aromas, colores, alérgenos y microorganismos. El pollo es uno de los alimentos de mayor consumo en Nicaragua debido a su bajo costo en comparación con otros tipos de carne además es rico en nutrientes y existen numerosas formas de elaboración para su consumo. En especial, porque estos se ofrecen en numerosos y diferentes puntos para el consumo directo. Algunos microorganismos como *Escherichia coli* y *Salmonella spp* pueden estar en este tipo de alimentos debido a que proceden de una materia prima sensible a la contaminación. (Booster, 2010)

El propósito de este estudio consiste en determinar la presencia de *salmonella spp* y *Escherichia coli* en pollos asados de los supermercados por su alta demanda por parte de los consumidores.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Están exentos de *Escherichia coli* y *Salmonella spp* los pollos asados expandidos en los distintos supermercados del distrito I y V de la ciudad de Managua en el periodo de Diciembre 2017- Enero 2018?

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de *Escherichia coli* y *Salmonella spp* en pollos asados expendidos en distintos supermercados del distrito I y V de la ciudad de Managua, Diciembre 2017 - Enero 2018.

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Semi cuantificar la presencia de *Escherichia coli* a través del método Numero Más Probable.
2. Detectar la presencia de *Salmonella spp* a través de PCR-Tiempo real.
3. Determinar la presencia de *Salmonella spp* a través de aislamiento convencional según la FDA-BAM.

VI. MARCO TEÓRICO

6.1. Definición de alimento:

Toda sustancia o mezcla de sustancias naturales, elaboradas e ingeridas por el hombre esta sea por hábito, costumbre o coadyuvantes, aportan a su organismo los materiales y la energía necesarios para el desarrollo de sus procesos biológicos.

6.2 Alimento listo para el consumo:

Los alimentos listos para el consumo son alimentos procesados que pueden consumirse sin ningún tratamiento térmico adicional, lo que ha incrementado su popularidad. (Ready to eat foods, microbiological quality, fecal contamination, food safety., 2010)

6.3 Alimentos de alta gama: listos para consumir

A la hora de adquirir los alimentos encontramos diferentes tipos de productos según el tratamiento que hayan recibido y que determinan las diferentes **gamas**:

1. I Gama.
2. II Gama.
3. III Gama.
4. IV Gama.
5. V Gama.

6.3.1 Alimentos listos para el consumo de la I Gama.

Está constituida por alimentos frescos, tales como frutas, hortalizas, carnes, pescados, mariscos, huevos y otros productos conservados mediante métodos tradicionales como la deshidratación, la salazón y la fermentación. Se trata de alimentos no transformados que no han sufrido ningún tratamiento higienizante. Por tanto, en general, son alimentos de riesgo, muy perecederos y que en la mayoría de los casos precisan refrigeración. Centrándonos en frutas y hortalizas, en la I Gama encontramos, además de productos frescos, frutas y hortalizas deshidratadas y encurtidas.

6.3.2 Alimentos listos para el consumo de la II Gama.

Está constituida por alimentos que han sido sometidos a un tratamiento térmico para su conservación, normalmente una esterilización y que se han envasado en recipientes adecuados, herméticamente cerrados, ya sean latas o envases de vidrio. Son las llamadas conservas y semiconservas. Algunas semiconservas, como por ejemplo las anchoas, necesitan además refrigeración.

6.3.3 Alimentos listos para el consumo de la III Gama.

Son los alimentos conservados por frío, es decir, por congelación o ultra congelación. En estos casos los alimentos son sometidos a un proceso de congelación en crudo, por lo que es necesaria su descongelación para cocinarlo antes de ingerirlo. En estos productos es imprescindible que no se rompa la cadena de frío, por lo que se deben transportar en condiciones isotermas y respetando las condiciones de almacenamiento y uso.

6.3.4. Alimentos listos para el consumo IV Gama.

La IV Gama es una línea de hortalizas y frutas frescas, preparadas mediante diferentes operaciones unitarias tales como selección, pelado, cortado, lavado y envasado. Son conservadas, distribuidas y comercializadas bajo cadena de frío y están listas para ser consumidas crudas sin ningún tipo de operación adicional durante un periodo de vida útil de 7 a 10 días. En la actualidad, hay una gran variedad de productos, hojas de lechuga, de una sola clase o de varias, champiñón laminado, frutas cortadas, etc.

Tanto la preparación inicial como la conservación posterior deben ir acompañadas de temperaturas reducidas, por encima del punto de congelación, para mantener el producto con sus características de frescura durante la distribución y congelación y, como es lógico, en el momento de su consumo. Con este sencillo proceso el producto mantiene sus propiedades naturales y de frescura, pero con la diferencia de que llega al consumidor, lavado, troceado y dentro de un envase.

6.3.5 Alimento listos para el consumo de la V Gama.

La V Gama está formada por aquellos productos cuyas formas comerciales implican haber recibido dos modos diferentes de manipulación tecnológica, es decir, un tratamiento térmico y un envasado, además del complemento del frío para su buena conservación.

Los alimentos de la V gama son productos tratados por calor, listos para consumir y que se comercializan refrigerados. Incluyen una amplia variedad de productos, desde verduras cocidas hasta platos preparados a base de carne, pescado, pasta, arroz, etc. Para su consumo sólo necesitan una mínima preparación o un calentamiento previo, en microondas u horno convencional. Generalmente se envasan en material plástico, pudiendo ir también en atmósferas protectoras. El almacenamiento es estanco por lo que no hay riesgo de re contaminación tras la cocción. (Nutricion, 2009)

6.4 Generalidades de *Escherichia coli*

6.4.1 Características morfológicas y bioquímicas

Es una bacteria común que vive en los intestinos de animales y humanos. Son bacilos Gram negativos, No forma esporas, Móviles (flagelos peritricos), Miden 0.5 μ de ancho por 3 μ de largo, Catalasa positiva, Oxidasa negativos, Reducen nitratos a nitritos, Producen vitamina B y K, No exigente, Fermenta glucosa y lactosa con producción de gas, Es anaerobio facultativo.

Por su especificidad está considerado como un buen índice de contaminación fecal. Tiene el inconveniente de vivir poco tiempo en el ambiente extra entérico, por lo que su residencia en los alimentos indica contaminación reciente.



6.4.2 Características generales

Escherichia coli es una bacteria mesófila, su óptimo de desarrollo se encuentra en el entorno de la temperatura corporal de los animales de sangre caliente (35-43 °C). La temperatura límite de crecimiento se sitúa alrededor de 7 °C, lo que indica que un control eficaz de la cadena de frío en las industrias alimentarias es esencial para evitar el crecimiento de *Escherichia coli* en los alimentos. La congelación tiene pocos efectos sobre la población de la bacteria en el alimento, y no garantiza la destrucción de un número suficiente de ellas viables para asegurar su inocuidad.

Existen muchas cepas de '*Escherichia coli*', inofensivas en su mayoría, aunque existe una variedad, '*Escherichia coli*' 0157: H7 que produce una potente toxina (Shiga) y puede ocasionar enfermedades graves como el Síndrome Urémico Hemolítico, que puede acabar en fallo renal (facmed.unam., 2010).

6.4.3 Patogenia

Escherichia coli coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se considera de flora normal, pero hay descritos seis grupos de *Escherichia coli* productora de diarrea: **Enterotoxigénica (ETEC)**, **Enterohemorrágica (EHEC)**, **Enteroinvasiva (EIEC)**, **Enteropatógena (EPEC)**, **Enteroagregativa (EAEC)** y **de adherencia difusa (DAEC)**.

La bacteria se puede aislar e identificar tradicionalmente con base en sus características bioquímicas o serológicas, pero también se pueden estudiar sus mecanismos de patogenicidad mediante ensayos en cultivos celulares o modelos animales y, más recientemente, empleando técnicas de biología molecular que evidencian la presencia de genes involucrados en dichos mecanismos. (G, 2002).

6.4.4 *Escherichia coli* y contaminación de los alimentos

Los seres humanos pueden contraer una infección con cepas patógenas mediante el consumo de alimentos y agua directamente contaminados con heces o contaminados como consecuencia de la contaminación cruzada con otras fuentes alimentarias. *Escherichia coli* no tienen una resistencia

especial al calor, aunque la presencia de grasas en carne aumenta ligeramente la tolerancia termal. Además, existe la posibilidad de contaminación a partir del contacto humano directo durante la preparación de los alimentos. La epidemiología de *Escherichia coli* patógena transmitida por los alimentos varía a través del mundo. En comunidades con condiciones de higiene y saneamiento deficientes, las ECET, ECEI y ECEP son prevalentes. Sin embargo, la *Escherichia coli* patógena transmitida por los alimentos también ha aparecido en comunidades con sistemas de higiene y saneamiento mejor organizados.

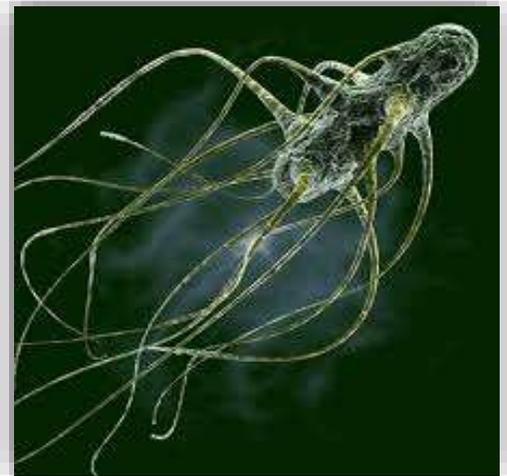
6.4.5 *Escherichia coli* y bacterias coliformes Termotolerantes

Las bacterias del grupo de los coliformes totales que son capaces de fermentar lactosa a 44-45 °C se conocen como coliformes termotolerantes. En la mayoría de las aguas, el género predominante es *Escherichia*, pero algunos tipos de bacterias de los géneros *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter* también son termotolerantes. *Escherichia coli* se puede distinguir de los demás coliformes termotolerantes por su capacidad para producir indol a partir de triptófano o por la producción de la enzima β -glucuronidasa. *Escherichia coli* está presente en concentraciones muy grandes en las heces humanas y animales.

6.5 Generalidades de *Salmonella*

6.5.1 Características morfológicas y bioquímicas

Es un género de bacterias, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, integrado por células en forma de bacilo, no esporulados y habitualmente móviles mediante flagelos peritricos. Son bacterias Gram-negativas, de metabolismo anaerobio facultativo, que reducen los nitratos a nitritos y fermentan la glucosa produciendo ácido y gas. (Velarde, 2012). Forman colonias típicas sobre medios de cultivos sólidos y poseen características bioquímicas y serológicas



definidas.

Raramente fermentan la lactosa o la sacarosa, son citocromo-oxidasa negativas y normalmente catalasa positiva, ureasa negativa, lisina descarboxilasa negativa e indol negativo. Infeccionan muchas especies animales distintas.

6.5.2 Características generales.

Son termolábiles, resisten la congelación, y algunos agentes químicos, poseen una rica composición antigénica empleada para identificación antigénica de serotipos o serovares. Su crecimiento varía entre 5 °C y 47°C. El pH: 4.5-9 óptimo 6.5-7.5. Son viables en diferentes condiciones ambientales sobreviven a la refrigeración y congelación y mueren por calentamiento mayor a los 70°C. (RENALOA, 2011)

6.5.3 Transmisión

La principal forma de transmisión es a través de alimentos o agua contaminada y hasta objetos infectados por moscas o ratas. La *salmonella* se encuentra en comidas sin cocer de origen animal (pollo y otras carnes, huevos, leche no pasteurizada).

La bacteria se puede transmitir de la carne cruda y sus jugos y huevos crudos si éstos tocan comidas preparadas (ensaladas, pan, queso, etc.) o si tocan la superficie donde se prepara comida y los utensilios (platos, cuchillos, etc.), o si los toca con las manos.

6.5.4 Mecanismos de transmisión

a) Transmisión vertical de *Salmonella*

Los huevos pueden contaminarse por transmisión vertical, desde los ovarios y oviductos infectados durante la formación del huevo. El concepto de transmisión vertical considera la contaminación de la superficie del cascarón al pasar el huevo por la vagina, contaminación de la yema en el ovario o contaminación durante el pasaje por el oviducto contaminado. Se ha establecido claramente que *Salmonella* Enteritidis se aloja de manera permanente en los tejidos reproductivos de las gallinas, donde el contenido del huevo puede ser infectado antes de que se forme el cascarón. Las gallinas

ponedoras raramente presentan signos de la enfermedad cuando se infectan y continúan su postura y alimentación normalmente, de esta manera las infecciones en el ovario con *Salmonella* Enteritidis resultan en la postura de huevos contaminados y en la eclosión de huevos infectados

b) Transmisión horizontal de *Salmonella*

La transmisión horizontal, se lleva a cabo cuando *Salmonella* Enteritidis u otros microorganismos penetran el cascarón que ha sido contaminado con las heces de la gallina depositadas en el exterior del huevo al pasar a través de la cloaca lo que se ha demostrado en estudios que presentan una correlación positiva entre heces contaminadas de manera artificial con *Salmonella* Enteritidis y la presencia de la misma en el interior de los huevos. Adicionalmente, *Salmonella* Enteritidis puede penetrar los poros del cascarón (si está presente en la superficie del huevo) a medida que este se va enfriando, antes de que se seque la cutícula. Después de que está formado el cascarón, *Salmonella* spp. Se establece en el interior del huevo antes de que se desarrolle en la superficie la barrera de proteína que previene la invasión de bacterias, lo cual permite que este microorganismo colonice y sobreviva en el contenido interno del huevo.

6.5.5 Patogenia

La principal puerta de entrada de la *Salmonella* es la vía oral, por contacto con heces de animales infectados. Resistente al pH del estómago, sales biliares y peristaltismo, coloniza el intestino delgado e invade los ganglios linfáticos mesentéricos, provocando una infección localizada. La *Salmonella* evade las defensas intracelulares de las células intestinales sin ser destruida y comienza a dividirse dentro de la célula. Posteriormente, pasa a la sangre y produce una infección sistémica, multiplicándose en macrófagos, y localizándose en hígado, bazo, médula ósea, etc. Se elimina por las heces, y se multiplica en el ambiente, donde es muy resistente. En caso de entrada por vía aerógena, se produce una invasión en las amígdalas y los pulmones. Emplea una mezcla de toxinas e invasividad y otros factores de virulencia para producir la enfermedad. Se comporta como un patógeno intracelular facultativo que, dependiendo del serotipo, el inóculo, los factores de virulencia expresados por la cepa, el hospedador involucrado, y el estado inmunológico del

paciente puede ocasionar desde una infección gastrointestinal media a severa hasta una infección sistémica que puede comprometer la vida del paciente.

La salmonelosis es una infección de origen alimentario, transmitida a humanos por consumo de alimentos de origen animal, causada por *salmonella* spp. (No tifoidea) consiste en una gastroenteritis que se caracteriza por causar diarrea (hasta 20 evacuaciones en un periodo de 24 horas), dolor abdominal, fiebre, dolor de cabeza y calambres intestinales. La media de duración de la enfermedad es de 7 días (3-20 días, variaciones relacionadas con la edad, estado inmunológico y concentración de microorganismo). (Social, 2011)

6.5.6 Mecanismo de invasión

Después de la ingestión de agua y alimento contaminado, *Salmonella* inicia su ciclo de infección invadiendo al hospedero a través de tejido linfoide, incluyendo las placas de Peyer y tonsilas cecales en las aves. Se adhiere apicalmente a las células epiteliales del íleon y a las células M que debido a la ausencia del borde de cepillo así como de glicocalix, representan una puerta de entrada ideal para las enterobacterias. Muchos microorganismos patógenos son capaces de entrar y sobrevivir dentro de las células eucarióticas. *Salmonella* dirige su arribo a células hospederas que no son normalmente fagocíticas como la superficie de la capa mucosa de células epiteliales. Presumiblemente, esta técnica de invasión asegura un nicho celular protegido para que el microbio se replique o persista.

Salmonella invade las células del hospedero por un mecanismo conocido como disparo (trigger). La bacteria envía señales a las células epiteliales que inducen re arreglos del cito esqueleto dando lugar a la formación de ondulamiento (ruffling) en su superficie, como respuesta al contacto. Se reconocen varias proteínas efectoras de la SPI-1, involucradas en los re arreglos del citoesqueleto:

SipA, SopE, SopE2 y SopB.

- **SipA** es una proteína de unión a actina, que inhibe la despolimerización de F-actina y activa T-plasmina, su chaperona es SicA (SipE en *S. entérica* serovar Typhi).
- **SopE** se comporta como GEF (guanine exchange factor) en las proteínas RhoGTPasas: CDC42 y Rac induciendo ruffling de la membrana, que permite la internación de *Salmonella* además estimula MAP cinasas (Mitogen-activated protein), Erk (quinasa

reguladora por señales extracelulares), JNK (quinasa terminal) y p38.38,65 Es codificada por un fago temperado defectuoso de la familia P2, localizado en el centisoma 60 del cromosoma de *Salmonella*; análisis de la secuencia del ADN aledañas a *sopE*, revelaron marcos abiertos de lectura (ORF) con secuencias significativamente similares a la cola de fagos y recombinasa sitio específico.

- La proteína **SopE2** muestra un 69% de homología con la secuencia de *SopE*, activa a CDC42, la cual actúa con la familia de proteínas del síndrome de Wiskott-Aldrich (WASP) para activar al complejo Arp2/3, compuesto de 7 subunidades, incluyendo dos proteínas relacionadas con actina y la proteína p41-Arc. Este complejo inicia la polimerización de actina y ramifica filamentos de actina.
- El gen responsable de codificar dicha proteína se encuentra localizado en el centisoma 40-42. **SopB** (*Salmonella* outer protein), como se conoce para *S. entérica* serovar Dublin, o *SigD* (*Salmonella* invasión genes) para *S. entérica* serovar Typhimurium, por su actividad de inositol fosfato fosfatasa, también reorganiza el citoesqueleto de actina.
- La proteína **SptP** (*Salmonella* protein tirosinphosphatase) es una tirosin fosfatasa, que independientemente de esta actividad, se comporta como GAP (GTPasa activating protein), es decir, cambia Rac·GTP a Rac·GDP, con lo que evita el ruffling estimulado por *SopE* además antagoniza la activación de JNK; su porción amino-terminal comparte secuencias similares con *YopE*, en su porción carboxi-terminal es semejante a *YopH* así como al dominio catalítico de algunas tirosinas fosfatasas de células eucarióticas. (Inda Marcela Figueroa Ochoa, 2007)

6.6 Métodos convencionales según la FDA-BAM

6.6.1 Método convencional para detección de *Escherichia coli* según FDA-BAM.

Número más probable (NMP)

Fundamento:

La determinación de microorganismos coliformes totales por el método del Número más Probable (NMP), se fundamenta en la capacidad de este grupo microbiano de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas al incubarlos a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24-48 h., utilizando un medio de cultivo que contenga sales biliares. Esta determinación consta de dos fases, la fase presuntiva y la fase confirmativa. (NOM-145-SSA1-1995., 2006).

Terminología

- **Grupo coliformes:** El grupo coliformes incluye bacilos gram negativos, aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa formando ácido y gas dentro de 24- 48 horas. a 35°C . Este grupo incluye a los géneros: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter*.

- **Grupo coliformes fecales:** Coliformes fecales se definen como bacilos gram negativos aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa formando ácido y gas dentro de 24 -48 horas. a $45,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ para análisis de alimentos.

- ***Escherichia coli*:** es una bacteria cuyo hábitat es el intestino del hombre y animales y debido a esto se ha usado como índice de contaminación fecal. Dentro del grupo coliformes, es el microorganismo de mayor significado sanitario. Su recuperación se hace de acuerdo a la metodología establecida para la enumeración de coliformes por el método NMP. (chile, 2012)

a) Prueba presuntiva para coliformes (Caldo Lauril sulfato de sodio):

El medio de cultivo que se utiliza es el caldo lauril sulfato de sodio (CLS) el cual permite la recuperación de los microorganismos dañados que se encuentran presentes en la muestra y que sean capaces de utilizar a la lactosa como fuente de carbono.

b) Prueba confirmativa para coliformes (Caldo Lactosado Bilis Verde Brillante):

Se utiliza como medio de cultivo el caldo lactosado bilis verde brillante el cual es selectivo y solo permite el desarrollo de aquellos microorganismos capaces de tolerar tanto las sales biliares como el verde brillante. La determinación del número más probable de

microorganismos coliformes fecales se realiza a partir de los tubos positivos de la prueba presuntiva y se fundamenta en la capacidad de las bacterias de fermentar la lactosa y producir gas cuando son incubados a una temperatura de 44.5 C por un periodo de 24 a 48 h.

c) Prueba confirmativa para *Escherichia coli*

Se utiliza caldo E.C. para confirmar la presencia de *Escherichia coli* en alimentos se incuban de 24 a 48 horas a 44.5°C.

Al término del período de incubación observar el crecimiento (turbidez) producción de gas y fluorescencia. Usando luz ultravioleta a 366 nm de onda. (CHILE, 2012)

6.6.2 Método convencional para aislamiento de *Salmonella spp*

a) Pre enriquecimiento con APB (Agua peptona Bufferada)

La muestra es enriquecida en un medio nutritivo no selectivo, que permite restaurar las células de *Salmonella* dañadas, logrando de esta manera una condición fisiológica estable.

b) Enriquecimiento selectivo (Caldo Rappaport):

Se logra a partir de un medio de cultivo que conjunte dos condiciones, por un lado debe incrementar las poblaciones de *salmonella* y por otro inhibir otros microorganismos presentes en la muestra.

c) Aislamiento diferencial en medio solido (Agar HK, XLD, SB):

Este punto se deriva directamente del anterior y se utilizan medios selectivos, que restringen el crecimiento de otros géneros diferentes a *salmonella* y que permitan el reconocimiento visual característico de colonias sospechosas.

d) Identificación bioquímica complementaria (TSI, LIA, UREA):

En el cual se da la identificación genérica de los cultivos de *salmonella* y la eliminación de cultivo sospechosos falsos.

e) Identificación bioquímica confirmativa (MIO,CITRATO, MALONATO, VP,):

Este paso permite la identificación genérica de los cultivos de *Salmonella* y la eliminación de cultivos sospechosos falsos.

d) Serotipificación:

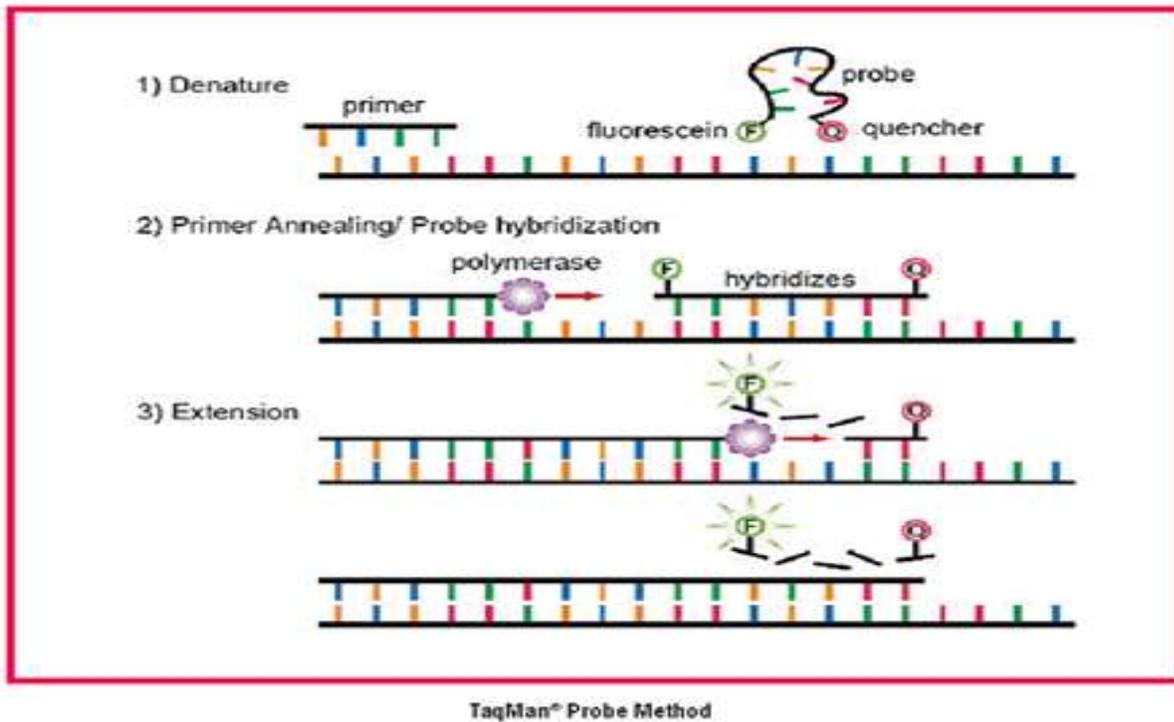
Es una técnica inmunológica (antígeno-anticuerpo) que permite la identificación específica de un microorganismo. (OMS, 2008)

6.6.3 Detección de *Salmonella spp.* A través del método PCR en tiempo real

• **Método molecular. PCR en tiempo real.**

PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), detecta el tiempo real de la amplificación del genoma en cada ciclo; en tiempo real se utilizan sondas marcadas con fluorocromos; las sondas de hidrolisis, que frecuentemente son empleadas en la técnica son oligonucleótidos que presentan fluorocromos en ambos extremos y tienen una secuencia complementaria a parte del fragmento de ADN que se requiere amplificar. (Medicina molecular, 2007)

Además de cuantificar la cantidad de ADN en la muestra, a diferencia de PCR punto final que no cuantifica el ADN amplificado.

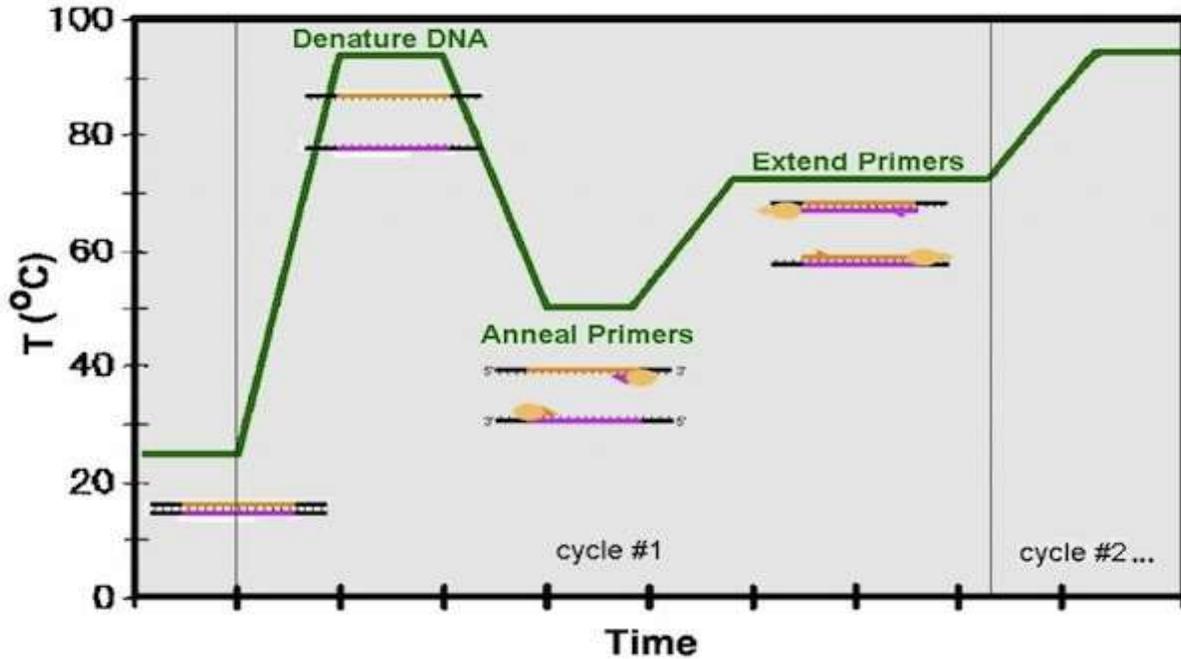


El gen más ampliamente utilizado, en PCR convencional y PCR real time, para la detección de *Salmonella spp.* Es el **invA**. Se trata del primer gen del locus **inv** de *Salmonella spp.*, que permite la entrada de la bacteria en las células epiteliales. Se han descrito algunos serovares **invA** negativos, considerados no invasivos o que utilizan otros mecanismos. A pesar de estas pequeñas discordancias este gen se ha utilizado en la validación de un método de PCR para la detección de *Salmonella spp.* A nivel europeo (121, 125, 129). (Maetsu, 2013)

- **Etapas de PCR**

- Primer etapa del ciclo de PCR se llama desnaturalización donde las hebras de ADN se separan, esto se da porque se rompen los puentes de hidrogeno que las une debido a la alta temperatura en que se da la reacción de 94-95°C, durante 20-30 segundos. La desnaturalización también va dependiendo de la proporción de guanina y citosina que contenga la cadena o el largo de la misma.
- Segunda etapa del ciclo es hibridación: o también llamada anillamiento donde el primer o cebador se une al ADN molde, es la etapa donde el primer se une a su secuencia complementaria, permitiendo alineamiento, se necesita la temperatura de hibridación correcta que oscila entre 50-

60°C durante 20-40 segundos, la polimerasa une híbrido de cadena molde y cebador y sintetiza



ADN; los cebadores actúan como límites de la región de la molécula que va a ser amplificada.

- La tercera etapa es elongación: La polimerasa sintetiza una hebra de ADN a partir del ADN del primer anclado a una temperatura de 72°C durante 5 a 15 minutos. Extendiendo las cadenas para dirección de la síntesis de ADN de 5' a 3'. Creando cadenas completas de ADN. (VAILES, 2006)

Etapas PCR en tiempo real

Componentes de PCR en tiempo real

- ❖ ADN el cual se quiere amplificar y obtendremos una copia de un fragmento, se le llama ADN molde.
- ❖ Tag polimerasa dirige la síntesis de ADN durante la replicación, termoestable y actúa en presencia de iones de magnesio.
- ❖ Cationes divalentes que son los cofactores de la polimerasa; en forma de cloruro de magnesio.
- ❖ Cebadores o primers: delimitan el fragmento a amplificar, nos indican la reacción.
- ❖ Nucleótidos que se encuentran en su extremo 3' libres del cebador que se ha unido a la cadena de ADN molde, los nucleótidos se añaden en forma de desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs). Creando una cadena complementaria a la cadena molde.
- ❖ Agua libre de nucleasas, grado PCR libre de RNAsas y DNAsas, provee el medio el cual llevará a cabo las reacciones necesarias para replicación del ADN.
- ❖ Sondas específicas para fragmentos del ADN.
- ❖ Sondas de hibridación.
- ❖ Son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador o reportero y un aceptor "quencher". El método se basa en transferencia de energía fluorescente mediante resonancia entre las dos moléculas; Las más utilizadas, denominadas como sondas Taqman.
- ❖ Sondas Taqman son sondas de hidrólisis que incrementan la especificidad de PCR cuantitativa, se hibrida con un amplicón blanco. Está formada por un fluoróforo unido covalentemente al extremo 5' de un nucleótido y un apagador fluorescente en el extremo 3', utilizando diferentes fluoróforos (como 6-carboxifluoresceína) y apagador o quencher

como tetrametilrodamina. Asiendo que el apagador inhibe la fluorescencia del fluoróforo cuando es excitado por la fuente de luz del termociclador, ya que al estar juntos, uno del otro no tendrá señal fluorescente. (Evelyn Rodríguez, 2010)

VII. DISEÑO METODOLÓGICO

Área de Estudio

Distritos I y V ubicados en la ciudad de Managua.

Tipo de Estudio

El presente estudio tiene un enfoque descriptivo, prospectivo y de corte transversal.

Universo y Muestra

El universo está compuesto por 10 supermercados distribuidores de pollo asado, 3 del distrito V y 7 del distrito I, de cada establecimiento (cada supermercado es un lote, se tomaron 3 submuestras de cada supermercado para un total de 30 muestras)

Tipo de muestreo:

No probabilístico por conveniencia.

Criterios de inclusión:

- Que el alimento sea pollo asado.
- Que los supermercados estén dentro del distrito I y V de la ciudad de Managua.
- Que sea del estante de exhibición del supermercado de donde adquieren todo los consumidores.
- Que este empacado.

Criterios de exclusión:

- Nos referimos a todo aquello que no cumpla con los criterios de inclusión.

Procesamiento de la información:

Con el objetivo de mantener la confidencialidad del origen de las muestras de alimentos (pollo asado) se utilizaron fichas de recolección de datos, asignando fecha y códigos a cada sector y cadena de supermercado del que procede, **el cual no será revelado.**

Las muestras fueron compradas por las autoras del estudio y transportadas al centro nacional de diagnóstico y referencia CNDR- MINSA, dando entrada a las muestras con código asignado por el CNDR-MINSA, estas fueron procesadas en el departamento de Microbiología de Agua y Alimentos, cuidando las normas de seguridad y utilizando los métodos de aislamiento microbiológicos según la (FDA-BAM) para la detección de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*

Instrumento de redacción:

Para la elaboración del documento se usaron los programas Microsoft Word para procesar los textos y Microsoft Excel para elaboración de las tablas y gráficos, Microsoft PowerPoint para el diseño de la presentación. Los datos fueron tabulados y presentados en tablas y gráficas de distribución en secuencia.

Ética de la información.

Los hallazgos o resultados provenientes de este estudio serán únicamente conocidos por las partes interesadas con fines académicos. **Las fuentes de donde provienen las muestras no serán**

divulgadas, formaran parte de información adicional al estudio y tendrán carácter de confidencialidad.

Procedimientos: Una vez con la autorización del centro nacional de diagnóstico y referencia y la dirección de docencia del Ministerio de salud, se procedió con las siguientes actividades.

1) Toma de muestras

Se compraron muestras de pollo “recién horneado” en diferentes presentaciones entero, medio pollo y en piezas. Se transportaron a temperatura ambiente en un tiempo máximo de una hora y media, al laboratorio del CNDR-MINSA donde fueron procesadas.

2) Transporte y almacenamiento de las muestras

En el transporte y almacenamiento de las muestras fue realizado por las autoras de este estudio cumpliendo las normas de higiene y bioseguridad de la muestra, trasladándose de forma directa del supermercado en estudio al laboratorio del ministerio de salud. El análisis de la muestra se inició tan pronto como fue posible tras la recepción de estas.

3) Procedimiento técnico

Materiales y equipos

- ✓ Bolsa Stomacher
- ✓ Balanza analítica calibrada Scout pro.
- ✓ Balanza portátil Metter Toledo.
- ✓ Centrifuga Eppendorf 5424.
- ✓ Stomacher 4000 circulator Seward
- ✓ Gabinete Bio clase I Labconco.
- ✓ Incubadora Thermoscientific
- ✓ Baño maría-ThermoPrecision
- ✓ Vortex Genie2-Scientific industries
- ✓ Termomixer confort- Eppendorf
- ✓ Thermomixer C- Eppendorf
- ✓ Mechero

- ✓ Pipetas automáticas y pipetas serológicas
- ✓ Espátulas
- ✓ Tijeras estériles.
- ✓ Navajas
- ✓ Mazo
- ✓ Gradilla

Medios de cultivo

Para coliformes totales, fecales y *Escherichia coli*:

- ✓ Caldo lauril sulfato Simple
- ✓ Caldo Bilis Verde Brillante
- ✓ Caldo E.C
- ✓ Agar EMB
- ✓ Agar Mac Conkey
- ✓ Agar tres azucres (TSI)
- ✓ Lisina Hierro Agar (LIA)
- ✓ Movilidad, Indol, Ornitina (MIO)
- ✓ Caldo VP(Voges-Proskauer)
- ✓ Rojo de metilo.

Para *Salmonella*:

- ✓ Agua peptonada bufferada (APB)
- ✓ Caldo Rappaport-Vassiliadis
- ✓ Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD)
- ✓ Agar Hektoen entérica (HE)
- ✓ Agar Sulfito de Bismuto (SB)
- ✓ Agar Hierro Tres Azucres (TSI)
- ✓ Lisina Hierro Agar (LIA)
- ✓ Movilidad, Indol, Ornitina (MIO)
- ✓ Urea de Crhistensen

- ✓ Citrato de Simmons
- ✓ Malonato Fenilalanina Deshidrogenasa
- ✓ Voges Proskauer (VP)

a) Método convencional para detección de coliformes totales, fecales y *Escherichia coli* en alimento

Por método NMP (Número más probable)

Cepas Control:

- ✓ **Control positivo:** cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922
- ✓ **Control negativo:** cepa de *Enterobacter aerogenes* o *Klebsiella pneumoniae*. ATCC 13883
- ✓ **Control negativo (coliformes fecales):** cepa de *Enterobacter aerogenes* ATCC 130

1. Prueba presuntiva- Caldo Lauril Simple:

Se pesó en bolsa stomacher 11 gr del alimento, y se mezcló 99 ml de agua peptonada, obteniendo la dilución 10^1 .

Se realizó tres series consecutivas de 5 tubos, con caldo lauril simple, transfiriéndose 1ml a cada tubo. Se incubo a 35 °C de 24 a 48 horas.

2. Prueba confirmativa para Coliformes totales:

De los tubos de caldo lauril simple con presencia de gas en campana de Durham y fermentación, se traspasaron 100 µl a caldo bilis verde brillante, se incubaron a una temperatura de 35°C de 24 a 48 horas. Y de igual se pasan los tubos positivos a caldo EC para la búsqueda de coliformes fecales

3. Prueba Confirmativa para Coliformes Fecales.

De tubos caldo bilis verde brillante con presencia de gas en campana de Durham y fermentación, se realizó pase de 100 µl a caldo E.C para confirmación de Coliformes fecales. Se incubaron a una temperatura de 45 °C por 24 a 48 horas.

b) Procedimiento de análisis para *Salmonella spp*

1. Pre enriquecimiento

En una bolsa stomacher estéril se pesaron 25 gramos de la muestra y se añadieron 250ml de agua peptonada bufferada, se mezcló y posteriormente se incubo por 18-24 horas a una temperatura de 35°C.

2. Enriquecimiento

Se transfirió 0.1 ml de la mezcla previamente incubada a un tubo con 10ml del medio Rappaport-Vassiliadis. Se incubo a 42°C por 24 horas en baño maría.

3. Aislamiento convencional

Cumplidas las 24 horas de incubación el caldo Rappaport, se mezcla el tubo con el vortex para posteriormente inocular en medios selectivos diferenciales (XLD, SB, HE), por estriado, luego se incubaron las placas a 35°C por 24 horas.

En los medios de cultivo:

(HE): Las colonias verdosas con o sin centro negro. Muchos cultivos de *Salmonella* pueden producir colonias con centros negros grandes, brillantes o pueden aparecer como colonias completamente negras.

(XLD): Colonias de color rosa con o sin centro negro. Muchos cultivos de *salmonella* pueden producir colonias con centros negros grandes, brillantes o pueden aparecer como colonias casi

completamente negros. Las colonias pueden aparecer rosadas o casi rosadas las no productoras de H₂S.

(SB): Colonia marrón gris o negra, algunas veces puede tener brillo metálico. Por más tiempo de incubación se ven más oscuras.

4. Identificación bioquímica:

- **TSI (Agar hierro triple azúcar o triple azúcar y hierro)**

Determina la capacidad de los bacilos Gram negativos en *Salmonella* para fermentar la glucosa, no fermenta la lactosa, produce poco gas por la enzima deshidrogenasa formica y H₂S (ácido sulfhídrico).

Procedimiento: Con un asa recta tomar una colonia característica del microorganismo del medio de cultivo, introducir 2-3mm antes de llegar al fondo del medio, y estriar en parte inclinada, incubar 35°C por 24 horas. (MINSA, MANUAL DE PROCEDIMIENTOS, 2004)

Reacción: K/A g+

- **LIA (Lisian hierro agar)**

Salmonella spp posee la enzima lisina descarboxilasa por lo que descarboxila la lisina, produce gas y H₂S.

Procedimiento: Con un asa recta tomar una colonia característica del microorganismo del medio de cultivo, e introducir 2-3 mm antes de llegar al fondo, tres veces haciendo vértices de un triángulo imaginario y estriarla parte inclinada. Incubar a 35°C por 24 horas.

Reacción: K/K g+

5. Pruebas bioquímicas confirmativas:

- **UREA**

Salmonella no posee la enzima ureasa por lo tanto no hidroliza la urea.

Reacción: Negativa

Procedimiento: Con un asa recta tomar una colonia característica del microorganismo del medio de cultivo, estriar la parte inclinada. Incubar a 35°C por 24 horas.

- **Prueba de MIO (Movilidad, Indol, Ornitina)**

Salmonella spp posee flagelos peritricos, por lo que es movilidad positiva. No posee la enzima triptofanasa por lo que no produce indol, si posee la enzima ornitina descarboxilasa, siendo ornitina positiva.

Procedimiento: Tomar con un asa recta una colonia característica del microorganismo del medio e inocular, a una profundidad de 0.5cm he incubar. **Reacción: M; +, I; -, O; +.**

- **Prueba de Voges Proskauer (VP):**

Se utiliza para la clasificación de las enterobacterias, evalúa la utilización de la glucosa como vía alternativa el ácido pirúvico.

Procedimiento: con un asa recta tomar el inculo del agar nutritivo o TSA, inclinar el tubo, en el ángulo agudo menusco formado en el tubo. Incubar por 24horas, Agregar 4 gotas de KOH al 40% luego 6 gotas de alfa-naftol. Leer la reacción después de 30 minutos.

Reacción (+): Anillo color zapote intenso en la superficie del medio.

Reacción (-): Anillo color amarillo en la superficie del medio.

- **Malonato:**

Evalúa la capacidad de los microorganismos de utilizar el malonato como única fuente de carbono y de la Desanimación de la fenilamina de forma combinada.

Procedimiento: con un asa recta tomar el inculo del agar nutritivo o TSA. Inclinar el tubo e inocularlo, tocando la superficie en el ángulo agudo menusco formado en el tubo.

Positivo: Viraje de color de verde a azul intenso.

Negativo: Sin viraje de color.

- **Citrato de Simmons:**

Determina la capacidad de un microorganismo de utilizar el citrato como única fuente de carbono.

Procedimiento: con un asa recta tomar el inculo del agar nutritivo o TSA. Estriar la superficie del agar desde el fondo hasta la parte superior con un movimiento de ida y vuelta.

Negativo: Viraje de color a azul.

Positivo: Sin viraje de color.

c) PCR en tiempo real para detección de *salmonella spp.*

La detección de *salmonella spp* se realizó a partir del medio de enriquecimiento Rappaport Vasiliadis después de 24 horas de incubación a 42°C.

- **Extracción de y purificación de ADN para *Salmonella spp.***

Kit de extracción NucleoSpin® Tissue

Los kits **NucleoSpin® Tissue** se han diseñado para la purificación rápida de DNA genómico, vírico o bacteriano de alta pureza a partir de muestras de tejido, colas de ratón, bacterias, levaduras, muestras forensicas (pelo, sangre seca, torundas bucales, filtros de cigarrillos), y clínicas (heces, orina).

Se obtienen hasta 35 µg de DNA genómico de alta pureza (rendimientos habituales a partir de tejido o células: 15-25µg). El DNA obtenido se puede usar directamente para PCR, Southernblotting o cualquier tipo de reacción enzimática. La lisis se realiza mediante la incubación de las muestras en una solución con SDS y proteinasa K a 56°C. Las condiciones apropiadas para la unión del DNA a la membrana de sílica de las columnas de **NucleoSpin® Tissue** se consiguen añadiendo al lisado grandes cantidades de sales caotrópicas (tampón B3) y etanol. El proceso de unión es reversible y específico para ácidos nucleicos. Los contaminantes se eliminan mediante un eficiente lavado con tampón.

- **Preparación de la muestra:**
 - ✓ Tomar a partir de caldo Rappaport 500µl y pasar a un vial correspondiente al código de la muestra.
 - ✓ Centrifugar por 5 minutos a 8000 rpm.
 - ✓ Descartar el sobrenadante, luego agregar 180 µl de Buffer T1, y 25 µl solución de proteinasa K, dar vortex.

- ✓ Incubar a 56°C, de 1-3 horas hasta completar la lisis.
 - ✓ Dar vortex a las muestras y añadir 200 µl de Buffer B3. Dar vortex, e incubar a 70°C por 10 minutos. Centrifugar por 5 minutos a alta velocidad 11mil xg.
 - ✓ Añadir 210 µl de etanol al 96% y dar vortex.
 - ✓ Transferir la muestra a la columna, centrifugar por 1 min a 11mil xg., Descartar sobrenadante.
- **Lavado de membrana sílica:**
- ✓ Primer lavado; Añadir 500 µl de buffer BW y centrifugar a 1 min a 11 xg., Descartar sobrenadante.
 - ✓ Segundo lavado añadir 600 µl de Buffer B5 a la columna y centrifugar por 1 min a 11mil xg.
 - ✓ Agregar 100 µl de pre-warmed Buffer BE a 70°C, incubar a temperatura ambiente por 1 minuto y centrifugar a 1 minuto a 11mi, xg

d) PCR en tiempo real para la detección de *Salmonella spp.*

Mezcla para PCR:

Reactivos	Reacción UI	Cantidad
FastStart Universal prove M	5	23
10x Exointernal pos	1	115
50x Exo IPC DNA	0.2	23
Sonda Salm ttr-5 10 uM	0.25	4.6
Primer trr-6 (forward) CTCACCAGGAGATTACAACATGG	0.4	5.75

Primer ttr-4 (reverse) AGCTCAGACCAAAAAGTGACCATC	0.4	9.2
Agua	1.75	9.2
Témlate	1	40.25
Total	10	

Posteriormente de la extracción de ADN a través de purificación por columna, se procedió con la preparación de la mezcla para PCR en tiempo real. **Sonda TaqMan®Fast Universal PCR Master Mix.**

La muestras se agregaron a una base de datos en el equipo Applied biosystems con los códigos de estas, asignados por el laboratorio del CDNR –MINSA y los controles (positivo y negativo).

Se realizó la amplificación para la detección de *Salmonella spp* lo cual duro un lapso de tiempo de una hora.

VIII. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variable	Sub-variable	Indicador	Valores	Criterio
			Turbidez y presencia de gas.	Positivo
	Coliformes totales	Caldo Lauril Lactosado Con campana de Durham (prueba	Sin turbidez ni presencia de gas	Negativo

**Detección de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* en pollo asado expendido en distintos supermercados
Diciembre 2017-Enero 2018**

Detección de <i>Escherichia coli</i>		presuntiva)			
		Caldo Bilis Verde Brillante con campana de Durham	Turbidez y presencia de gas	Positivo	
		(prueba confirmativa)	Sin turbidez ni presencia de gas	Negativo	
	Coliformes fecales		Caldo EC con campana de Durham	Turbidez y presencia de gas	Positivo
			(Prueba confirmativa)	Sin turbidez ni presencia de gas	Negativo
	<i>Escherichia coli</i>		Agar EMB	Colonias con brillo metálico	Positivo
Colonias sin brillo metálico				Negativo	

Detección de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* en pollo asado expendido en distintos supermercados
 Diciembre 2017-Enero 2018

		Agar Mac Conkey	Colonias Lactosa positiva	Colonias rosadas
			Colonias Lactosa Negativa	Colonias amarillas
	TSI		Superficie: Fermentación de la lactosa y sacarosa. Profundidad: Fermentación de la glucosa con producción de gas.	A/AG
			Superficie: No hay fermentación de la lactosa y sacarosa. Profundidad: Si hay fermentación de la glucosa.	K/A
			Superficie: Desanimación de la lisina negativa. Profundidad: Descarboxilación de la lisina positiva con poca producción de gas.	K/Kg
	LIA			

**Detección de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* en pollo asado expendido en distintos supermercados
Diciembre 2017-Enero 2018**

	Pruebas bioquímicas preliminares		Superficie: Desanimación de la lisina positiva. Profundidad: Descarboxilación de la lisina negativa, sin gas y sin H ₂ S.	K/A.
			Superficie: Desanimación de la lisina positiva. Profundidad: Descarboxilación de la lisina negativa con poco gas y H ₂ S.	R/Ag+.
	Pruebas bioquímicas complementarias	Caldo Urea	Viraje de color rosado. No hay viraje de color	Positivo Negativo
		Citrato de Simmons	Viraje a color azul	Positivo
			Sin viraje de color	Negativo
		Caldo VP	Anillo color zapote	Positivo
			Anillo amarillo o transparente	Negativo
		Agua peptonada	Crecimiento	Turbidez

**Detección de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* en pollo asado expendido en distintos supermercados
Diciembre 2017-Enero 2018**

Detección de <i>Salmonella spp</i> a través de aislamiento convencional	Pre Enriquecimiento	Bufferada (APB)	Sin crecimiento	Sin turbidez
	Enriquecimiento Selectivo	Caldo Rappaport	Crecimiento	Turbidez
			Sin crecimiento	Sin turbidez
	Aislamiento diferencial	Agar HK	Crecimiento característico de UFC	Colonias verdes azuladas con o sin punto negro.
			Sin crecimiento característico	Colonias amarillas o anaranjadas.
		Agar XLD	Crecimiento característico de UFC	Colonias rojas con punto negro.
			Sin crecimiento característico	Colonias amarillas.
		Agar SB	Colonias marrones o con brillo metálico	Positivo
		Sin brillo metálico, colonias verdes	Negativo	
			Superficie: Fermentación de la	

**Detección de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* en pollo asado expendido en distintos supermercados
Diciembre 2017-Enero 2018**

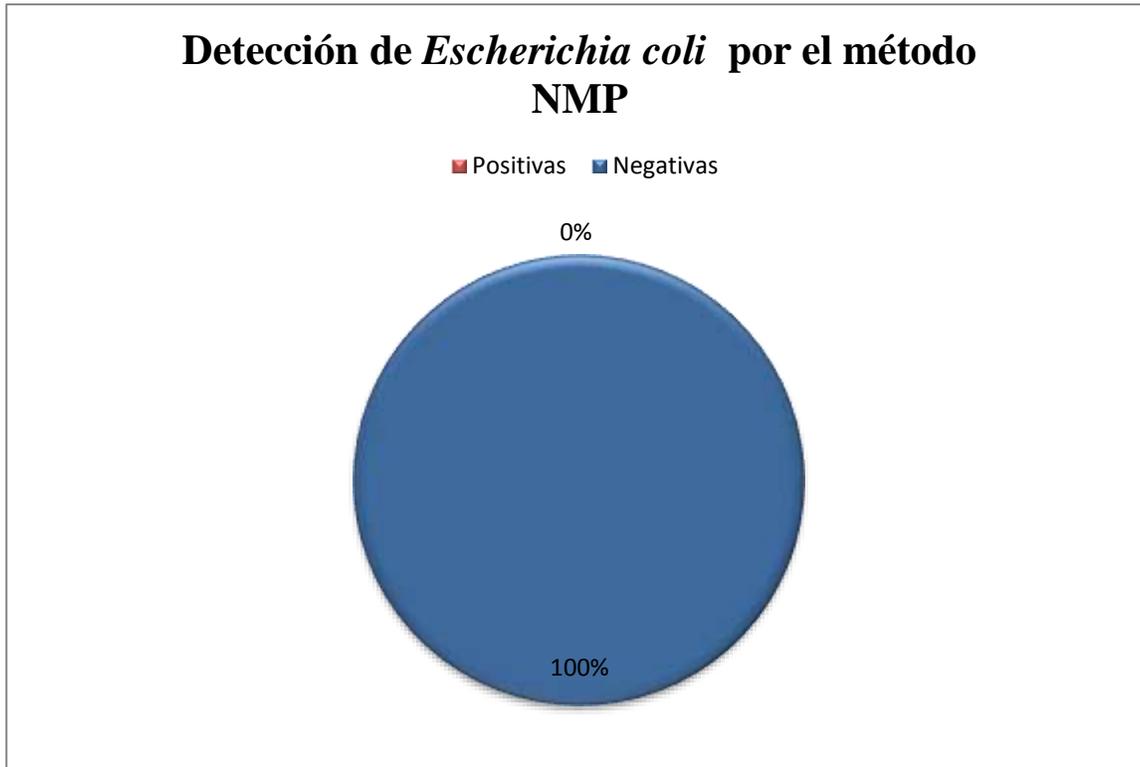
	Pruebas bioquímicas preliminares	TSI	lactosa y sacarosa. Profundidad: Fermentación de la glucosa con producción de gas.	K/A+H2S
			Superficie: No hay fermentación de la lactosa y sacarosa. Profundidad: No hay fermentación de la glucosa.	K/A
		LIA	Superficie: Desanimación de la lisina negativa. Profundidad: Descarboxilación: de la lisina positiva con poca producción de gas.	K/A+H2S
			Superficie: Desanimación de la lisina positiva. Profundidad: Descarboxilación de la lisina negativa, sin gas y sin H2S.	K/K
		UREA	Viraje de color rosado.	Positivo

**Detección de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* en pollo asado expendido en distintos supermercados
Diciembre 2017-Enero 2018**

			No hay viraje de color	Negativo	
			Citrato de Simmons	Viraje de color azul.	Positivo
				No hay viraje de color	Negativo
			Caldo VP	Anillo a color zapote.	Positivo
				Anillo amarillo o transparente.	Negativo
Malonato	Viraje de color azul.	Positivo			
	Sin viraje de color.	Negativo			

IX. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Gráfico N°1: Detección de *Escherichia coli* por el método NMP.

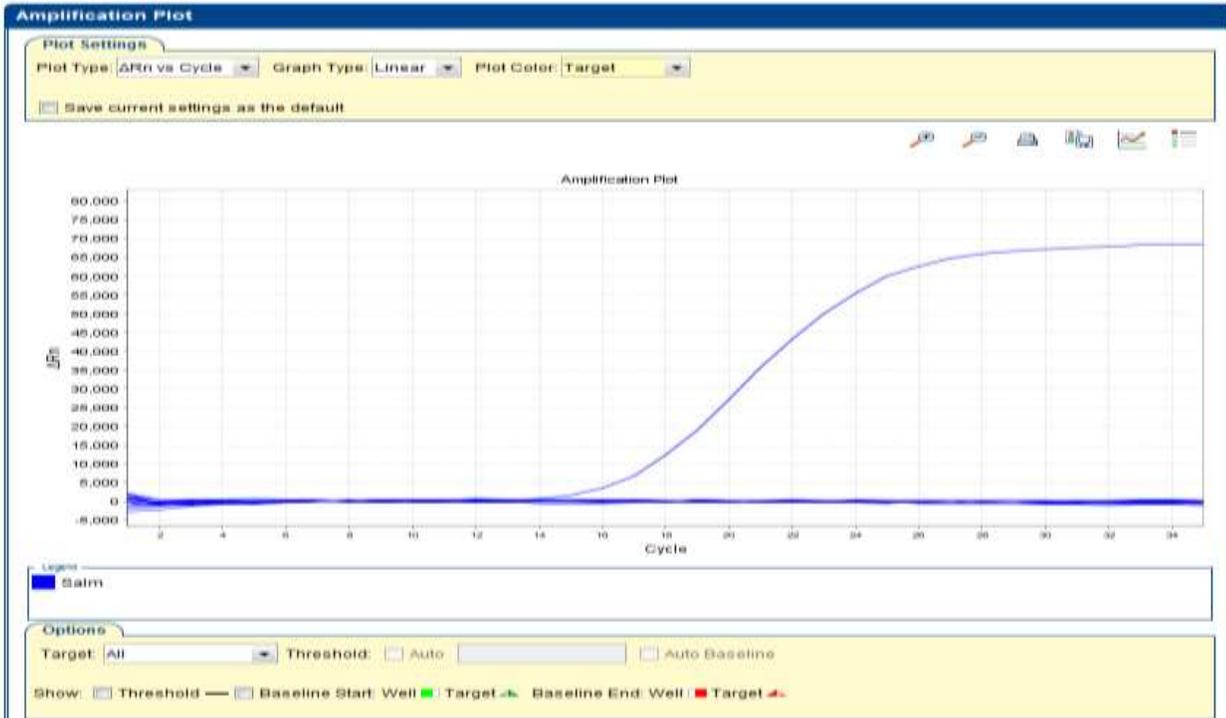
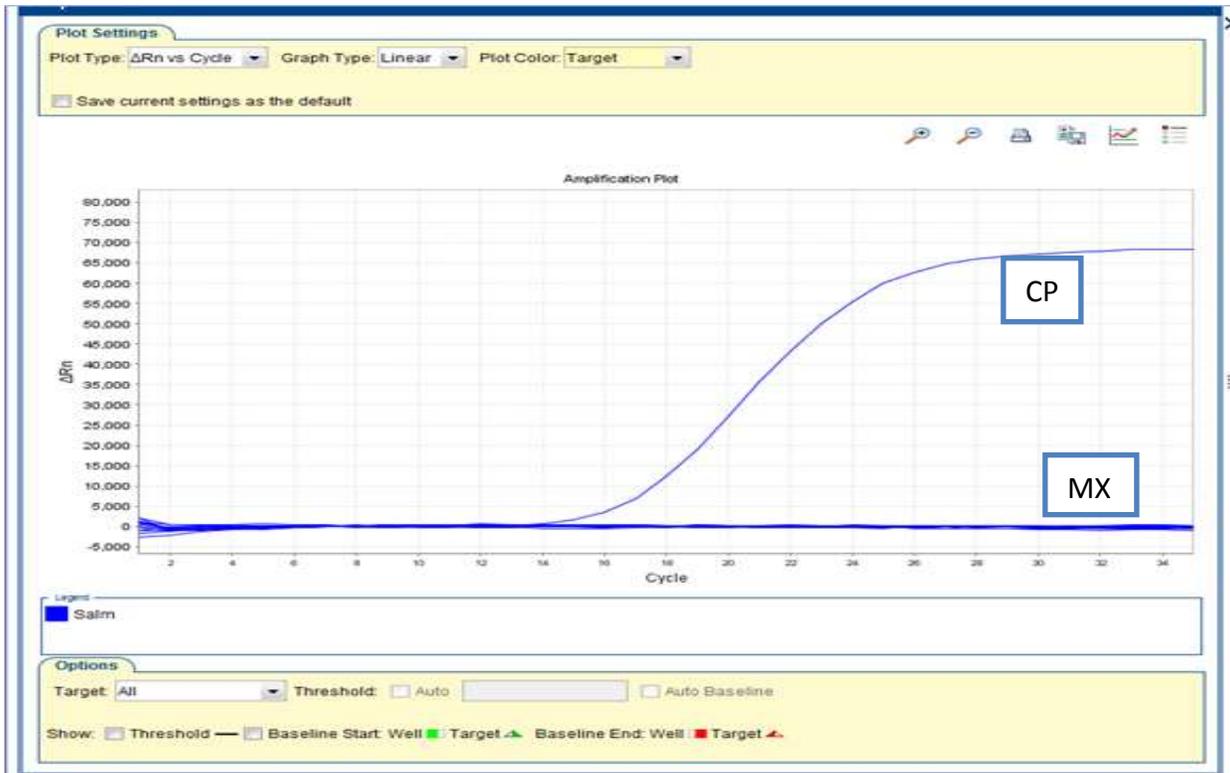


El método Número más probable (NMP) es un método semi cuantitativo que se basa en réplicas de diluciones en series.

Los resultados obtenidos a través del método NMP (Número Más Probable) fueron negativos para *Escherichia coli*. Sin embargo se detectaron coliformes totales en un 6.6% (2/30) a través de la prueba confirmativas para estas (Caldo Bilis Verde Brillante). Los efectos de los coliformes en los alimentos pueden tener diferentes significados, ya sea indicadores de malas prácticas sanitarias o mal manejo en la elaboración del alimento.

Cuando los productos alimenticios han recibido un tratamiento térmico (pasteurización, horneado, cocción, etc.) y ellos se encuentra la presencia de coliformes estos son considerados como indicadores de malas prácticas sanitarias.

Gráfico N° 2: Detección de *Salmonella spp* a través de PCR en tiempo real a partir de Caldo Rappaport-Vassiliadis



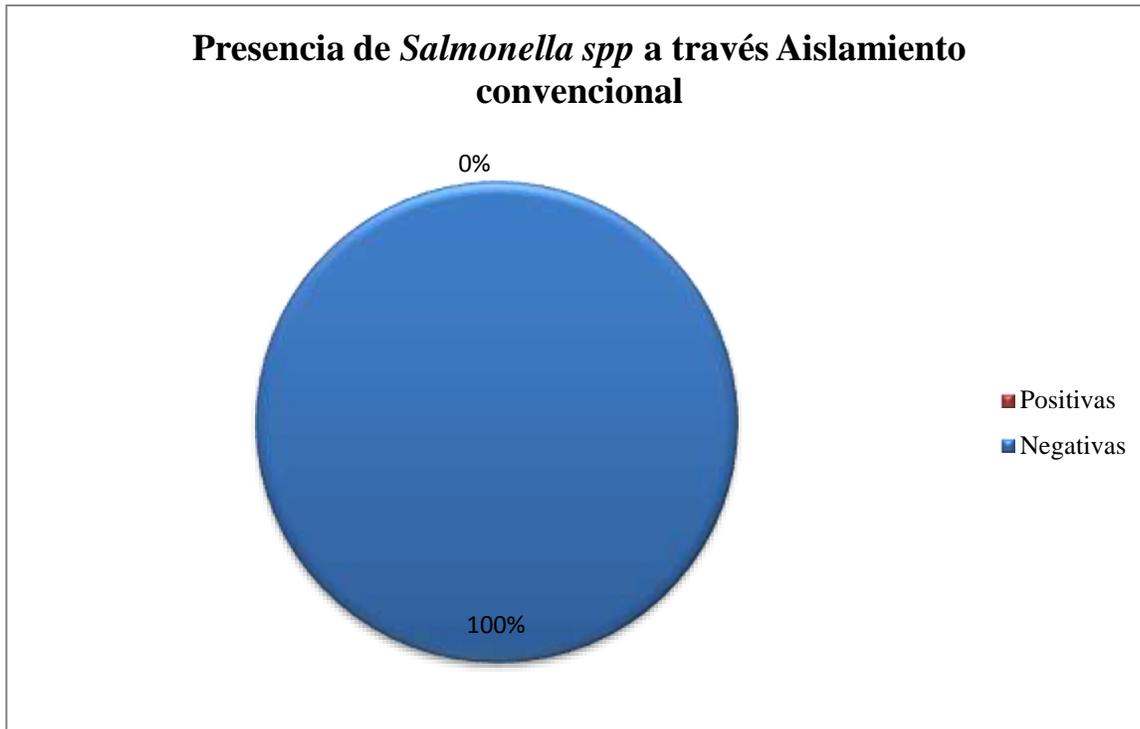
El resultado obtenido a través del método molecular PCR en tiempo real no se detectó la presencia de *salmonella spp.*

En la industria alimentaria es de vital importancia garantizar la ausencia de microorganismos patógenos en el mínimo plazo de tiempo, lo cual ha provocado el desarrollo de metodologías analíticas alternativas, que permitan una detección rápida y fiable. Estos métodos alternativos para el análisis microbiológico de alimentos ya están siendo empleados tanto por laboratorios clínicos como en laboratorios de control oficial de alimentos. En este sentido, el actual Reglamento relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios; La utilización del PCR en Tiempo Real permite la estandarización de los ensayos y la incorporación de sistemas de control de calidad internos que suponen un importante avance en cuanto a la fiabilidad de los resultados obtenidos. (AINIA, 2006)

A pesar de que la PCR es una técnica rápida, se ha desarrollado una modificación a ésta, en la cual no se realiza electroforesis, de tal forma que los resultados se obtienen simultáneamente con la amplificación del gen. El PCR en tiempo real es una buena alternativa para la detección de bacterias patógenas en alimentos como *Salmonella spp* debido a su rapidez, amplifica 10 veces más rápido, e incluso con una mayor sensibilidad y especificidad que el PCR convencional. (HENRRIQUEZ, 2004).

El uso de estos métodos permite obtener resultados más rápidos y seguros, por lo cual deberían utilizarse en la industria para tener un control de calidad más estricto y reducir el riesgo de distribución y venta de alimentos contaminados. De esta forma se podría disminuir la circulación de bacterias patógenas en los alimentos y reducir la generación de infecciones e intoxicaciones. (ROJAS, 2004)

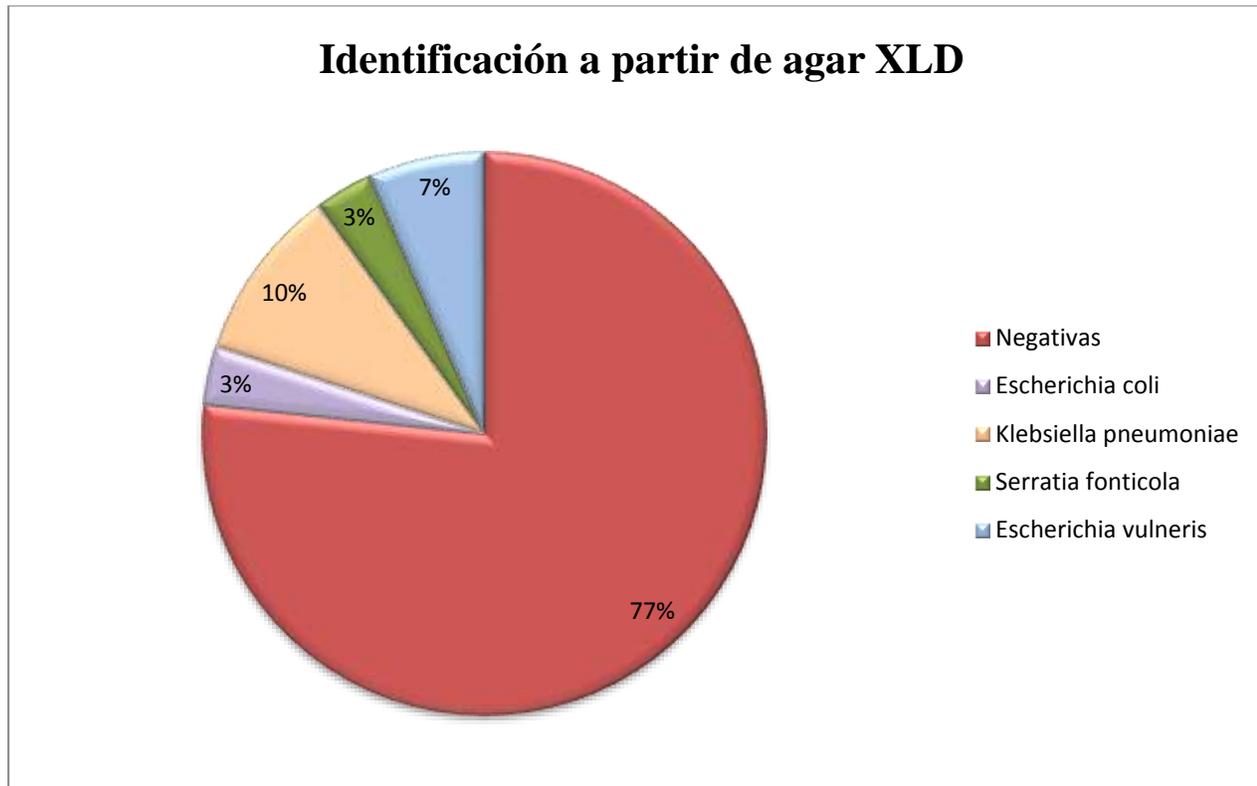
Gráfico N° 3: Aislamiento convencional de *Salmonella spp* en pollos asados.



La Salmonelosis es una de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) de mayor frecuencia y es producida por diferentes serotipos de *Salmonella*, a excepción de *Salmonella Typhi* que es causante de la fiebre tifoidea. Entre la flora microbiana de la carne de pollo es presumible encontrar patógenos intestinales como la *Salmonella*. (FORMAINOVABIO, *Salmonella* en carne de pollo, 2008)

Los resultados obtenidos en nuestro estudio, fueron negativos para *Salmonella spp* a través de método convencional. Sin embargo hubo crecimiento de otras enterobacterias, en los medios diferenciales (XLD, SB, HE) y por medio de las pruebas bioquímicas se logró identificar *Escherichia coli*, lo cual indica que la etapa de enriquecimiento con Agua Peptonada Bufferada ayudo a que las bacterias que estaba estresadas o dañadas por el proceso térmico al cual fueron sometidos permitió su desarrollo y recuperación en esta etapa.

Gráfico N° 4: Presencia de otras Enterobacterias a partir de Aislamiento convencional.



Se realizaron pruebas bioquímicas complementarias confirmativas de las colonias de enterobacterias a partir de agar XLD. Utilizando los flujogramas de identificación de enterobacterias.

Los resultados obtenidos a través del aislamiento convencional para *Salmonella spp.*, obtuvimos como resultados que el 23%(7-30) son enterobacterias: *Escherichia vulneris* 7%(2/30), *Klebsiella pneumoniae* 10%(3/30), *Escherichia coli* 3%(1/30), *Serratia fonticola* 3%(1/30), Estas bacterias se utiliza como indicador de la calidad microbiológica de alimentos. (COFEPRIS, 2012)

Su presencia en un número significativo, indicará un fallo y consecuentemente un riesgo para el consumidor. Esta singular familia comprende un número muy variado de géneros y especies bacterianos cuyo hábitat natural es el tubo digestivo del hombre y los animales. No todos los bacilos Gram negativos que tienen este hábitat forman parte de la familia Enterobacteriaceae. (BROMATOLOGIA, SEGURIDAD ALIMENTARIA, 2014)

La utilidad de los métodos de control de higiene de superficies debe considerarse como un eslabón crucial para la identificación de microorganismos tanto indicadores como patógenos. El desarrollo de nuevos métodos cuya ventaja respecto al método convencional es la rapidez de obtención de datos, se ajusta perfectamente a las necesidades reales de la industria de hoy en día. (VALLS, 2006)

X. CONCLUSIONES

1. Se analizaron un total de 10 lotes (30 muestras) en los cuales ninguna muestra resulto positiva para *Escherichia coli* a través del método NMP (Numero Más Probable).
2. No se detectó *Salmonella spp* a través del método PCR en tiempo real, lo cual indica que hay buen control de los tiempos y temperatura en la elaboración de este tipo de alimentos.
3. No se aisló *salmonella spp* por el método aislamiento en placa de BAM-FDA, pero si hubo crecimiento de colonias características de enterobacterias en un 23%(7/30), confirmándose la presencia de *Escherichia coli* en un 3% (1/30)

Cabe mencionar que los alimentos deberán estar refrigerados después de su preparación, para evitar la contaminación y proliferación de bacterias.

XI. RECOMENDACIONES

AI CNDR-MINSA:

En un futuro elaborar normativa y reglamentos que vigilen las prácticas higiénicas sanitarias para los supermercados y establecimientos que ofrezcan alimentos listos al consumo, con el fin de establecer un control periódico. Para que de alguna manera se garantice la salud de los consumidores.

A LA UNIVERSIDAD

Motivar a los estudiantes a realizar estudios relacionados a la salud pública, con el objeto de dar a conocer la importancia microbiológica y el buen manejo de transformación de alimentos ya que esto nos lleva al control de enfermedades.

A LOS CONSUMIDORES

A los consumidores tener los cuidados requeridos por los alimentos ya sea refrigeración o congelación o temperatura ambiente, revisar fecha de vencimiento y que el empaque esté debidamente sellado, para asegurar que no haya proliferación de bacterias.

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. 3M®. (2018). 3M® Caldo de Agua Peptonada Bufferada ISO BPW010.
2. AINIA. (2006). Detección de microorganismos patógenos mediante PCR a Tiempo Real. *Parque tecnologico de valencia*.
3. alfonso, G. (2006). Brote de salmonelosis asociado al consumo. *Administracion sanitario*.
4. ALIMENTARIAS, P. C. (2000). FAO/OMS. *PROGRAMA CONJUNTO FAO/OMS REGLAS ALIMENTARIAS*.
5. Alimentos de alta gama: Listos para consumir. (2016). *Universidad privada del norte, sp*.
6. AVICOLA, E. C. (2013). Retirada del pollo asado por contaminacion con salmonella.
7. BELLO, C. (2014). 45.
8. Booster, S. L. (2010). POLLO LISTO AL CONSUMO.
9. BRITANIA. (2015). AGUA PEPTONADA BUFERADA (PROSPECTO).
10. britanialab. (s.f.).
11. BRITANILAB. (s.f.).
12. BROMATOLOGIA. (2012).
13. BROMATOLOGIA. (2012).
14. BROMATOLOGIA. (2014). SEGURIDAD ALIMENTARIA.
15. Camacho, A. M. (2010).
16. CHILE. (2012). *Deteccionde loifrotos totales fecales atravez de NMP*.
17. chile, I. d. (2012). NMPpara la determiacion de coliformes totales y e. coli en alimentos. *Sección Microbiología de los alimentos*.
18. COFEPRIS. (2012). LEI. *LEI*.
19. Doyle. (2007).
20. ENCYCLOPEDIA, H. (2017). Infección por E. coli por los alimentos.

21. Evelyn Rodríguez, ,. C. (2010). Evaluación microbiológica de alimentos listos al consumo procesados por pequeñas industrias costarricenses. *Scielo*, 1-2.
22. facmed.unam. (2010). Enterobacterias_Medicine. *Enterobacterias_Medicine*.
23. FAO. (2008). SALMONELLA EN POLLOS.
24. FAO/OMS. (2000). PROGRAMA CONJUNTO FAO/OMS REGLAS ALIMENTARIASAAAAA.
25. FAO/OMS. (2001). Peligros microbiológico en los alimentos listos al consumo.
26. FORMAINOVABIO. (2008). Salmonella en carne de pollo.
27. FORMAINOVABIO. (2010). Pollo y Salmonella: una relación íntima. *CLAVES DE SEGURIDAD ALIMENTARIA*.
28. G, R.-A. (2002). Diagnosis and main characteristics. *Escherichia coli pathogenic groups*.
29. GOURMET, B. (2012). POLLO ASADO QUINTA GAMA. *PRODUCTOS BOST GOURMET*.
30. Guillermo Gutiérrez. (2006). Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. *FAO-Informe técnico sobre ingeniería agrícola y alimentaria*, 163-164.
31. HENRRIQUEZ, C. (2004). 61,62.
32. Inda Marcela Figueroa Ochoa, *. A. (2007). Mecanismos moleculares de patogenicidad de.
33. KARLA BELLO, E. C. (2013). COMPARACION DE PCR EN TIEMPO REAL CON METODO ISO6579. MANAGUA.
34. LEON, J. (2006). VALIDACION DEL METODO NMP EN MUESTRAS DE ALILMENTOS.
35. LEON, S. (2010).
36. LOPEZ. (2010). La presencia de los organismos coliformes no guarda relación cualitativa ni cuantitativa con la.
37. LOPEZ, N. (2010). Presencia Coliformes en muestras de alimento. *Univercidad Simo Bolivar*.
38. Maetsu, A. G. (2013). INDUSTRIA ALIMENTARIA. *APLICACIÓN DE LA PCR EN TIEMPO REAL PARA LA INDUSTRIA ALIMENTARIA*.
39. MANCHA, C.-L. (2005). SALMONELLA EN POLLO ASADO. *GRUPO SADA*.
40. *Medicina molecular*. (9 de octubre de 2007). Obtenido de Medicina molecular Fibao:
file:///D:/Monografia/PCR%20en%20tiempo%20real%20-%20Medicina%20molecular.html

41. MENDEZ, R. (2017). carne de pollo: un estudio asocia su consumo a infecciones urinarias. *EL ESPAÑOL*.
42. Miguel Parra, J. D. (julio de 2002). *Microbiología, patogenésis, epidemiología clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por Salmonella*. Obtenido de Dialnet-Revista MVC: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3297749>
43. MINSA. (2004).
44. MINSA. (2004). MANUAL DE PRCEDIMIENTOS.
45. MINSA. (2004). MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGIA.
46. MINSA. (2004). MANUEL DE PROCEDIMIENTOS.
47. MINSA. (2004). MANUELA DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGIA.
48. MUÑOZ, Y. G. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos. *Medicina Experimental de salud publica*.
49. natural, D. M. (2016.). Los Peligros Ocultos para la Salud de Comer Pollo Comercial. *MERCOLA*.
50. NOGUEZ, A. (2010). METODO NMP EN MUESTRAS SOLIDAS Y ALIMENTOS.
51. NOM-114-SSA1, N. O. (1994). Metodo de determinacion de salmonella en alimentos. *Bienes y Servicios*. .
52. NOM-114-SSA1-1994., N. O. (1994). Método para la determnacion de salmonella en alimentos.
53. NOM-145-SSA1-1995., N. O. (2006). Productos cárnicos curados y madurados. *NORMA OFICIAL MEXICANA. NOM-145-SSA1-1995*.
54. Nutricion, S. y. (2009). Tecnoconservasion de los alimentos. *Salud y Nutricion*, 1-4.
55. OMS. (2008). SALMONELLA SPP EN POLLOS DE GRANJA.
56. PAIS, E. (2005). Un hombre fallece en Valencia tras comer pollo asado contaminado con salmonela. *EL PAIS*.
57. Pollo congelado mal cocinado provoca 32 casos de Salmnella en EE.UU. (2008). *Eroski consumer, sp*.
58. PRT-712.02-004. (2012). Seccion de microbiologia de alimentos. *Instituto de salud publica*.

59. Ready to eat foods, microbiological quality, fecal contamination, food safety. (2010).
Evaluación microbiológica de alimentos listos para consumo procesados por pequeñas industrias.
60. RENALOA. (2011). Analisis de microorganismos patogenos en alimentos.
61. ROJAS, J. (2004). PATOGENOS EN ALIMENTOS.
62. SAS, E. (2017). investiga una intoxicación alimentaria con 35 personas afectadas. *DIARIO DE CADIZ.*
63. Social, M. d. (2011). Perfil de riesgo Salmonella spp. (no tifoideas) en pollo entero y en piezas. *Instituto Nacional de Salud INS, 39,40,41 etc.*
64. VAILS, N. (2006). Importance of hygienic control of surfaces to avoid cross contamination.
65. VALLS, N. (2006). Importance of hygienic control of surfaces to avoid cross contamination.
66. Velarde, O. y. (2012). Generalidades de salmonella. *upcommons.upc.edu.*

XIII. ANEXOS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, MANAGUA

INSTITUTO POLITECNICO DE LA SALUD

DR. LUIS FELIPE MONCADA

RECINTO UNIVERCITARIO RUBÉN DARÍO

FICHA PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS



**Detección de *Escherichia coli* y *salmonella spp* en
alimento listo al consumo: pollo asado expendido en distintos supermercados de los distritos I
y V de la ciudad de Managua Diciembre 2017-Enero 2018.**

I. Demanda de consumidores según el pollo

1. Preferencia del pollo a comprar
 - a) Pollo entero
 - b) Pollo a la mitad
 - c) Pollo en piezas
 - d) Otros -----
2. Porque tiene mayor tipo de demanda
 - a) Precio
 - b) Calidad
 - c) Presentación
 - d) Otros-----

II. Condiciones del establecimiento

- 1) ¿Conservación adecuada del producto?
 - i. SI
 - ii. NO
- 2) ¿Los manipuladores cumplen con las medidas adecuadas para evitar la contaminación del producto?
 - i. SI
 - ii. NO

OBSERVACIONES: -----

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, MANAGUA.



INSTITUTO POLITECNICO DE LA SALUD

DR. LUIS FELIPE MONCADA

RECINTO UNIVERCITARIO RUBÉN DARÍO



FICHA DE RECOLECCION DE RESULTADOS

DISTRITO I DICIEMBRE 2017	LOTES	SUB MUESTRAS POR FECHA	<i>ESCHERICHIA COLI</i>	<i>SALMONELLA SPP</i>	COLIFORMES TOTALES, FECALES
	Supermercado LCPE	LCPE 4-12	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
		LCPE 11-12	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
		LCPE 18-12	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	Supermercado PRSM	PRSM 4-12	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
		PRSM 11-12	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
		PRSM 18-12	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	Supermercado LUPV	LUPV 4-12	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
		LUPV 11-12	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
		LUPV 18-12	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
Supermercado LCCDO	LCCDO 4-12	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	
	LCCDO 11-12	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	
	LCCDO 18-12	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	

**Detección de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* en pollo asado expendido en distintos supermercados
Diciembre 2017-Enero 2018**

	Supermercado LCPI1	LCPI1 4-12	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
		LCPI1 11-12	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
		LCPI1 18-12	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	Supermercado LCGSD	LCGSD 4-12	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
		LCGSD 11-12	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
		LCGSD 18-12	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	Supermercado LCMTR	LCMTR 4-12	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
		LCMTR 11-12	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
		LCMTR 18-12	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
DISTRITO V ENERO 2018	Supermercado LCLGV	LCLGV 8-01	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
		LCLGV 15-01	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
		LCLGV 22-01	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
	Supermercado MXPLC	MXPLC 8-12	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
		MXPLC 15-01	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
		MXPLC 22-01	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	Supermercado MXPED	MXPED 8-01	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
		MXPED 15-01	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
		MXPED 22-01	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

Resultados obtenidos por muestra

Detección de *Escherichia coli* por el método NMP por muestra.

<i>Escherichia coli</i>	Positivo	Negativo
	0	30

Detección de *Salmonella spp* por PCR en tiempo real por muestra.

<i>Salmonella spp</i>	Positivo	Negativo
	0	30

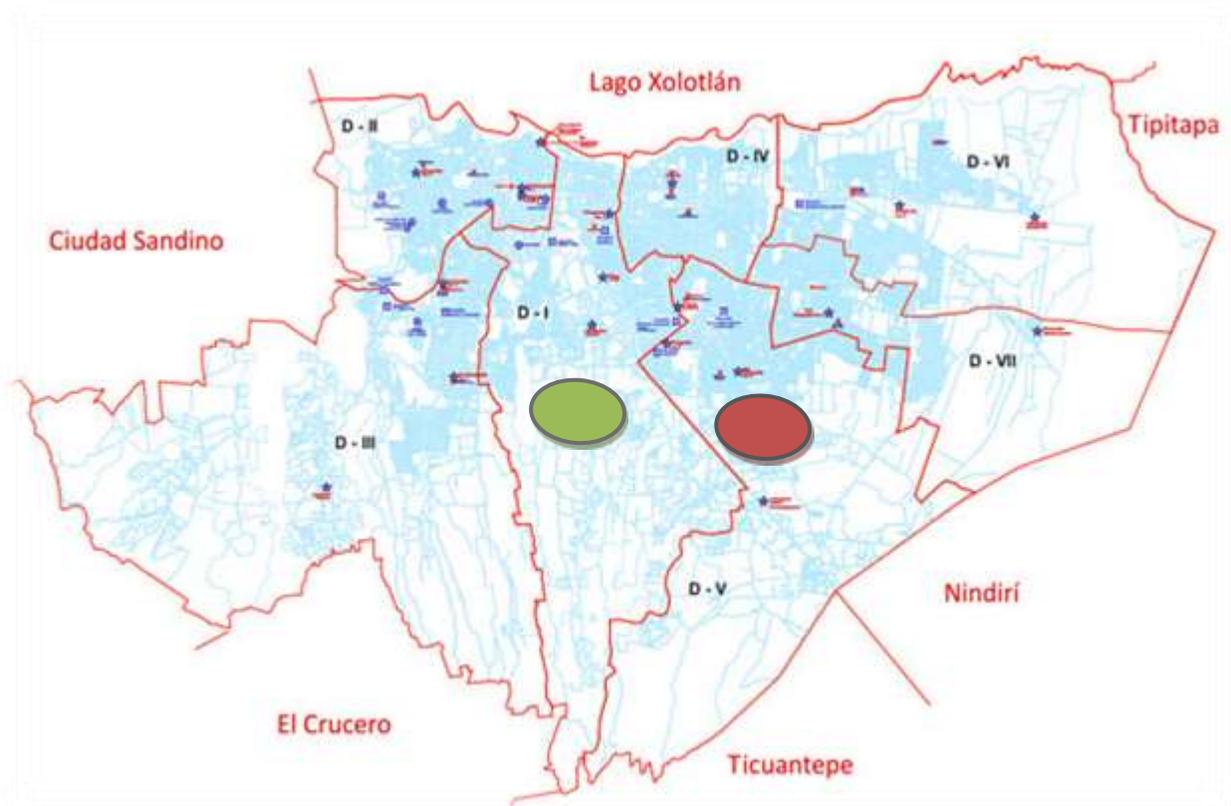
Detección de *Salmonella spp* por aislamiento convencional por muestra.

<i>Salmonella spp</i>	Positivo	Negativo
	0	30

Detección de otras Enterobacterias por muestra

Identificación a partir de XLD y pruebas bioquímicas	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Serratia fonticola</i>	<i>Escherichia vulneris</i>	Negativas	Total
	1	3	1	2	23	30

Mapa de Managua



Punto verde: Distrito I, siete supermercados expendedores de pollo asado.

Punto rojo; Distrito V, tres supermercados expendedores de pollo asado.

Alimento listo al consumo de la V Gama



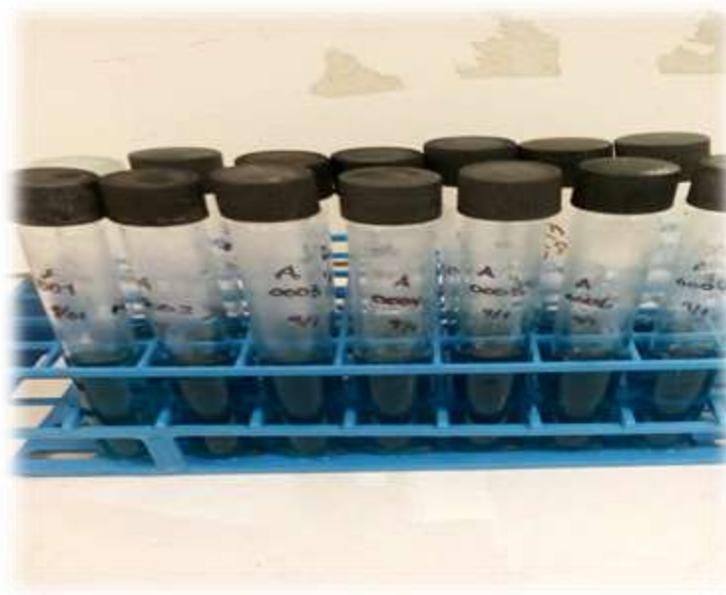
Nota: Fotos reales tomadas en los muestreos

Pre enriquecimiento
Agua peptonada Bufferada (APB) para *Salmonella spp*



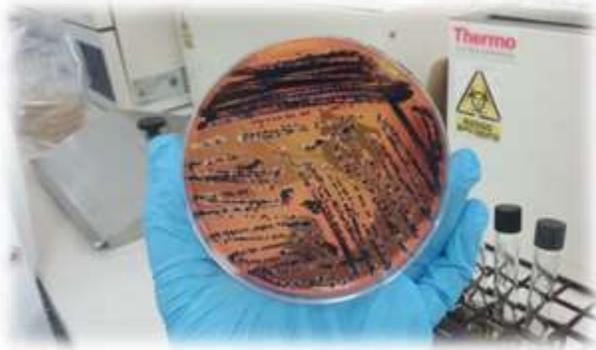
Enriquecimiento selectivo

Caldo Rappaport vassilias



Aislamiento selectivo

Agar XLD



Serratia Fonticula

Agar Hektoen

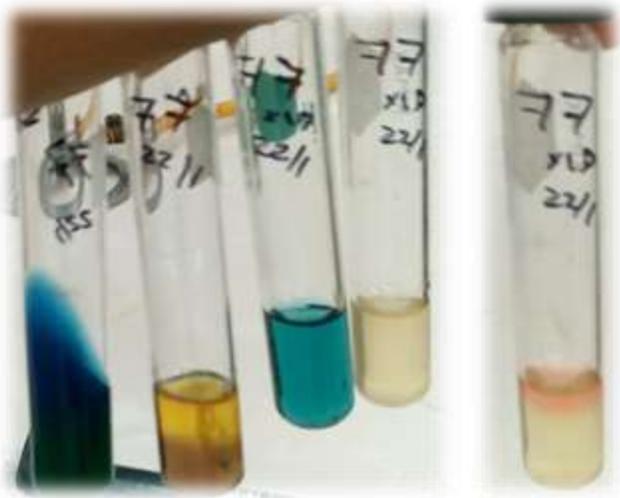


Pruebas bioquímicas complementarias



- ✓ TSI
- ✓ LIA
- ✓ MIO
- ✓ UREA

Pruebas bioquímicas confirmativas



Agua peptonada alcalina (APA) para *Escherichia coli*



Caldo Lauril Simple con campana de Durham



Equipos utilizados



Centrifuga



Thermomixer



Maxi mix plus



Stomacher®400Circulator

Kit de Extracción



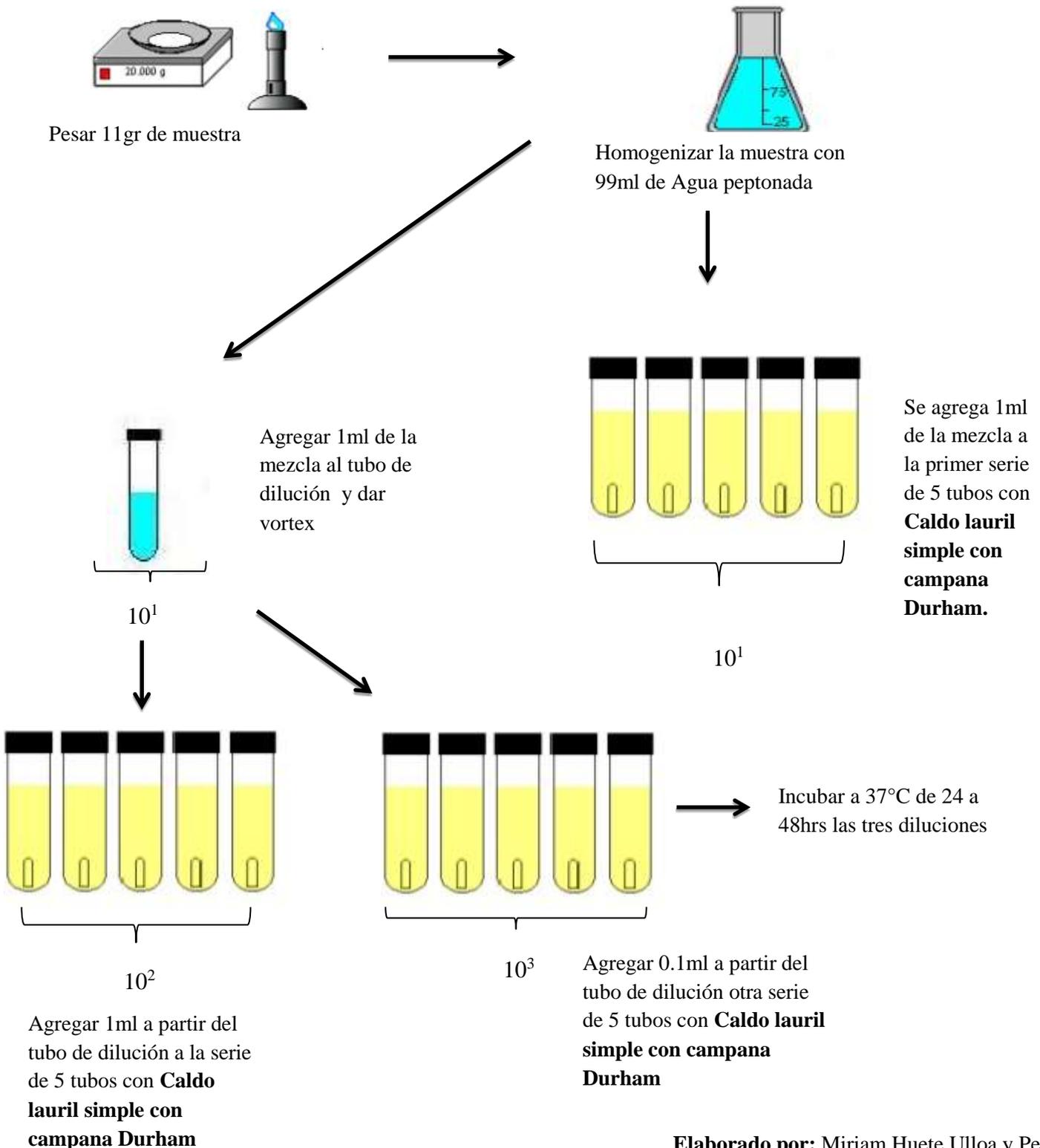
Kit de extracción

NucleoSpinTissue®



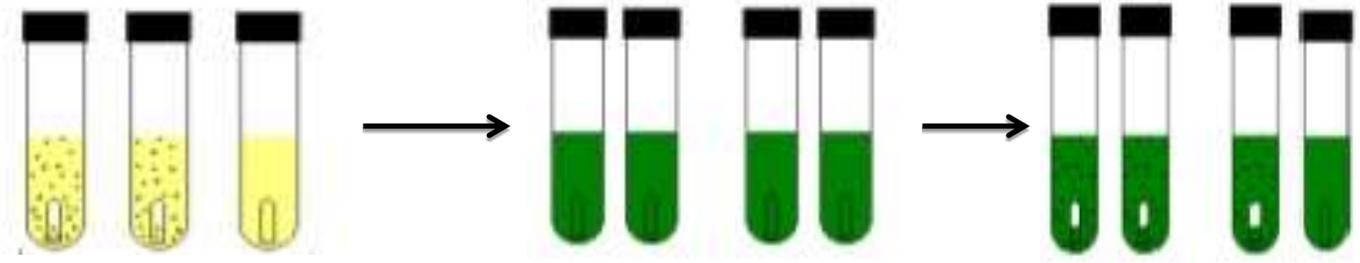
Sonda TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix

Flujo grama de detección de coliformes totales, fecales y *Escherichia coli* en Alimentos (Prueba Presuntiva Coliformes Totales)



Elaborado por: Miriam Huete Ulloa y Perla Brenes

Prueba confirmativa para Coliformes totales

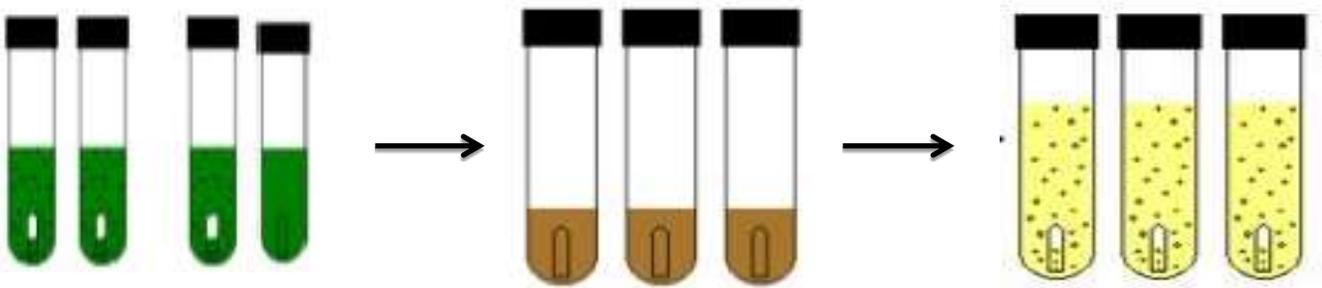


Los tubos que tengan presencia de gas y turbidez son positivos

Se transfieren 1ml a partir de los Caldo lauril positivos a **Caldo Bilis Verde Brillante con campana Durham**, incubar a 37°C de 24 a 48hrs.

Los tubos que tengan presencia de gas y turbidez son positivos para coliformes totales

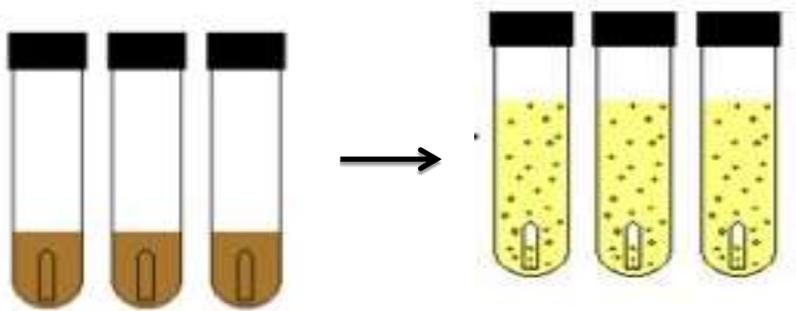
Confirmativa para coliformes Fecales y *Escherichia coli*



A partir del Caldo Bilis Verde Brillante, transferir 1ml a **Caldo EC con campana Durham**

Incubar a 44°C en Baño María de 24 a 48hrs

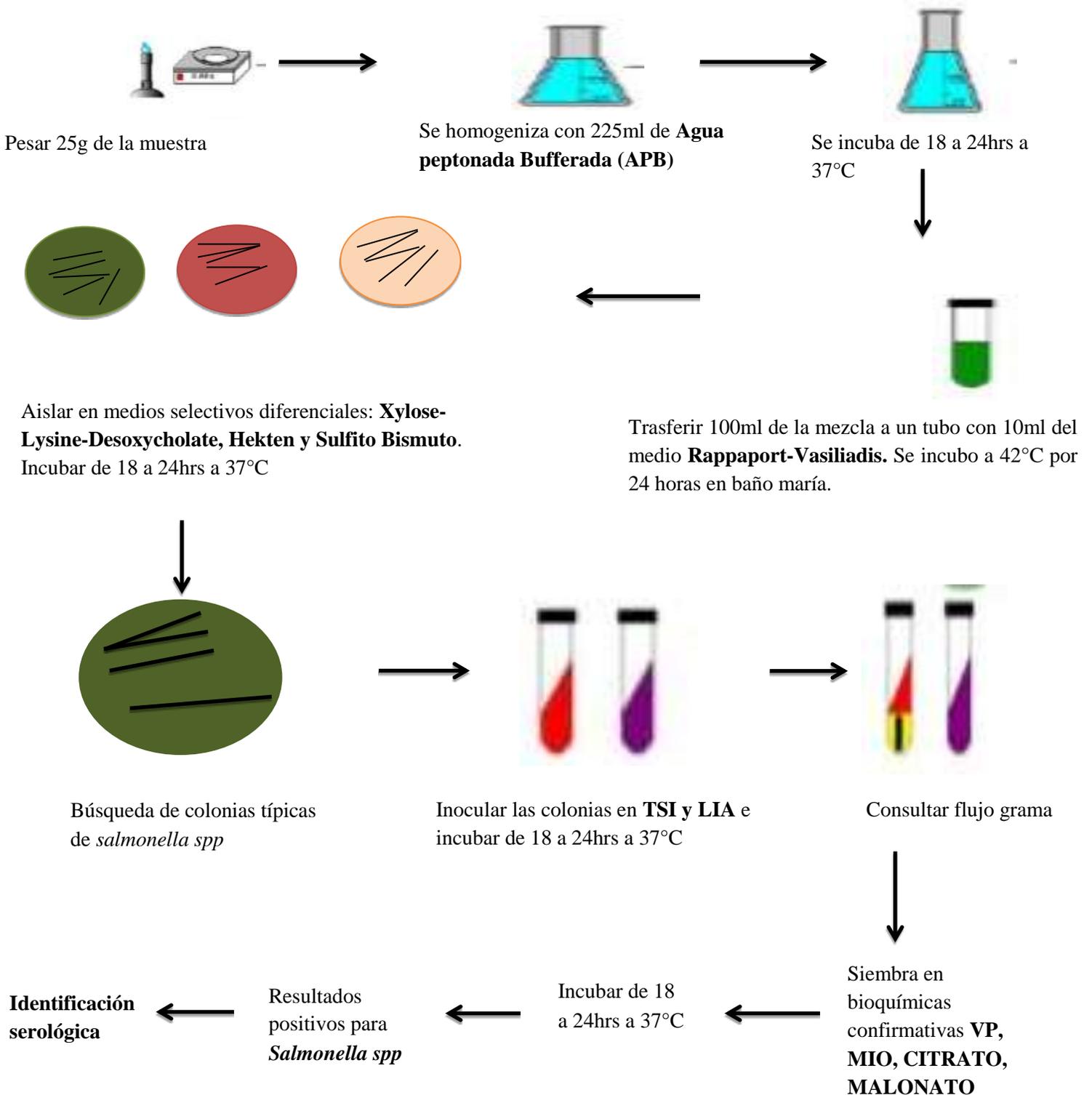
Los tubos que tengas **turbidez y presencia de gas** son positivos para Coliformes fecales



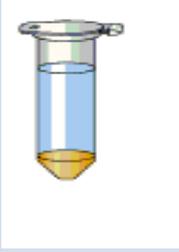
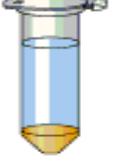
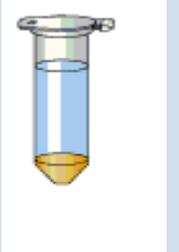
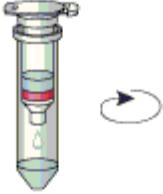
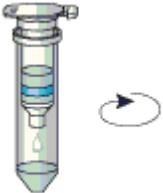
Agregar 1ml de Bilis Verde brillante a **Caldo EC+MUG** con campana Durham

Los tubos que tengan **turbidez y presencia de gas** son positivos para *Escherichia coli*. Y por la luz fluorescente leído bajo la luz ultravioleta.

Aislamiento de *Salmonella spp.* en alimentos



Extracción de ADN para *Salmonella spp* a partir de caldo Rappaport-Vassiliadis

NucleoSpin®Tissue		
Pre lisis de la muestra		180ul T1 25ul Proteinasa 56°C 1-3h
Lisis de la muestra		200 µL B3 70 °C 10 min
Ajuste del ADN a condiciones vinculantes		210 µL 96–100 % etanol
Enlace ADN		Centrifugar a 11,000 x g, 1 min
Lavado		1st wash wash500 µL BW 2nd 600 µL B5 11,000 x g, 1 min

Elaborado por: Miriam A. Huete Ulloa y Perla Brenes

Secar la membrana sílica		11,000 x g, 1 min
ADN puro		100 µL BE RT, 1 min 11,000 x g, 1 min
Corrida de PCR en tiempo real		

Cuadro de NMP para Coliformes termotolerantes y Coliformes fecales.

Código	Diluciones	Caldo Lauril Simple		Caldo Bilis Verde Brillante		Caldo E.C	
		24h	48h	24h	48h	24h	48h
0072	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
0073	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
0074	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
0075	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
0076	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
0077	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-

**Detección de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* en pollo asado expendido en distintos supermercados
Diciembre 2017-Enero 2018**

0078	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
0079	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
0080	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
0081	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
0082	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
0083	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
0084	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
0001	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-

**Detección de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* en pollo asado expendido en distintos supermercados
Diciembre 2017-Enero 2018**

0002	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
0003	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
0004	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
0005	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
0006	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
0007	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
0012	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
0013	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-

**Detección de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* en pollo asado expendido en distintos supermercados
Diciembre 2017-Enero 2018**

0014	10 ⁻¹	+	+	+	+	-	-
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
0015	10 ⁻¹	+	+	+	+	-	-
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
0016	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
0017	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
0018	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
0019	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
0020	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-
0021	10 ⁻¹	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-

Resultados de bioquímicas a partir de crecimiento de colonias en Agar Nutritivo-TSA

Código de muestra	TSI	LIA	MIO			UREA	CITRATO	MALONATO	VP	Resultado
			-	-	+					
074	k/k	k/k	-	-	+	+	+	-	-	No fermentadora
077-A	A/A	K/K	+	-	-	+	+	+	+	K. pneumoniae
077-B	k/k	k/k	-	-	+	-	-	-	-	No fermentadora
078	k/k	k/k	-	-	+	+	-	-	-	No fermentadora
079	k/k	k/k	-	-	+	-	-	-	+	No fermentadora
080	A/A	k/k	-	-	+	+	-	-	-	Enterobacteria
081	k/k	k/k	+	-	-	-	+	-	-	No fermentadora
082-A	k/k	k/k	-	-	+	+	-	-	-	No fermentadora
082-B	K/K	K/K	+	-	-	-	+	-	-	Enterobacteria
083	K/K	K/K	+	-	-	+	+	-	-	No fermentadora
084	A/A	K/K	+	-	-	+	+	+	+	K. pneumoniae
001-A	K/A	K/K	+	-	+	-	+	+	+	Enterobacteria
001-B	K/A	K/K	+	-	-	+	+	+	+	E. vulneris
003	A/A	K/K	+	-	-	+	+	+	+	K. pneumoniae
007	A/A	K/K	+	-	-	+	+	+	-	Enterobacteria
014-A	A/A	K/K	+	+	-	-	-	-	-	<i>Escherichia coli</i>
014B	K/K	K/K	-	-	+	+	+	-	-	No fermentadora
15-A	A/A	K/K	+	-	+	-	+	+	+	Enterobacteria
15-B	K/K	K/K	-	-	+	+	+	+	+	No fermentadora

Glosario

ALC: Alimentos listos para el consumo.

Coadyuvante: Que ayuda a la consecución de una cosa. (Factor coadyuvante)

Entérico: Relativo a los intestinos.

Estando: Que está completamente cerrado o no tiene comunicación con otras cosas.

Exentos: Que está o queda libre de una carga, obligación, culpa o compromiso.

FDA (siglas en inglés); Administración de medicamentos y alimentos.

Gama: Serie de cosas perteneciente a una misma clase o categoría, especialmente las que dentro de ella, están calificadas de acuerdo con la talla, precio, duración, etc.

Isoterma: Que tiene la misma temperatura que otra cosa de la misma naturaleza.

Mesenterio: Repliegue del peritoneo que mantiene en su posición a los intestinos uniéndolos a la pared posterior de la cavidad abdominal.

Morbilidad: Cantidad de personas que enferman en un lugar y un período de tiempo determinados con el total de población.

Peristaltismo: Conjunto de movimientos de contracción del tubo digestivo que permiten la progresión de su contenido desde el estómago hacia el ano.