

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIRIQUÍ
VICE RECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POST GRADO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL

TESIS DE MAESTRÍA

**DETERMINACIÓN DE LA OCURRENCIA DE *ESCHERICHIA COLI* O157:H7
Y *SALMONELLA TYPHIMURIUM* EN *BRASSICA OLERACEA* LINNEO 1753
Y *LATUCA SATIVA* LINNEO 1753 PROCEDENTES DEL DISTRITO DE
TIERRAS ALTAS, EN CHIRIQUÍ, PANAMÁ,**

**PREPARADO POR
ÁNGELA ÁGUILA S.
4-192-481**

**DR. ORLANDO CÁCERES
ASESOR PRINCIPAL**

**M. SC. LUIS GONZÁLEZ
CO. ASESOR**

**M. SC. AMPARO CASTILLO
CO. ASESOR**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN
PRESENTADO COMO REQUISITO PARA
OPTAR POR EL TÍTULO DE MAGISTER
EN MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL**

**DAVID, CHIRIQUÍ
REPÚBLICA DE PANAMÁ
2017**

Hoja de aprobación de tesis

Esta tesis fue aprobada por la Comisión de Tesis de la Maestría en Microbiología Ambiental de la Universidad Autónoma de Chiriquí, siguiendo los criterios establecidos en el reglamento de Tesis de Maestría de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad Autónoma de Chiriquí.

M. Sc. Luis González Coordinador de la Maestría en Microbiología Ambiental



RIJTBOK

DEDICATORIA

A Dios

Por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por poner en mi camino aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio. Por permitirme llegar hasta este punto y darme salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi madre Eladia (QEPD)

Por su apoyo permanente, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mi esposo David

Por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en mi educación tanto académica como de la vida; por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo. *Todo este trabajo ha sido posible gracias a él.*

A mis familiares

A mi hermana Carmen por ser el ejemplo del cual aprendí aciertos y por estar a mi lado en momentos difíciles; a mis sobrinos Génesis y Joshua; mi cuñado Francisco, por su apoyo en momentos de ansiedad; en fin, a *todos* aquellos que participaron

directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis.

¡Gracias a ustedes!

A mis amigos

Por el apoyo mutuo en nuestra formación profesional, y realización de este trabajo.

Finalmente, a los profesores; aquellos que marcaron cada etapa de nuestro camino universitario, y que nos ayudaron en asesorías y dudas presentadas en la elaboración de la tesis.

Hoja de agradecimiento

Primero a Dios por darme la dicha de la Vida, porque en mis momentos de incertidumbre me inspiró para seguir adelante, por permitirme estar en donde estoy y ser un mejor ser humano.

Los señores de la finca de producción en Cerro Punta, que también colaboraron con algunos especímenes de *Brassica* y *Latuca* para la colección.

Al Lic. Diógenes Artunduaga de la empresa dos Pinos que me facilitó los medios de sorbitol microscan como tamizaje

Al Laboratorio microbiológica la Licenciada Dayra Icaza por su apoyo

Al Dr Rogelio Santanach que me ayudo a la identificación de los especímenes.

Al Dr. Orlando Cáceres por su atinado asesoramiento, lo cual me permitió la culminación de este trabajo

A los (las) Magisters Luis González y Amparo Castillo como coasesores

A todos los docentes por sus conocimientos impartidos durante esta maestría, mil gracias. A los compañeros de maestria por brindarme su amistad y apoyo desinteresado

INDICE GENERAL

Índice General

	Páginas
Portada	i
Dedicatoria	iii
Agradecimiento	v
Índice general	vi
Índice de cuadros	ix
Índice de figuras	x
Resumen	xi
Abstract	xiii
Abreviaturas	xv
CAPÍTULO I MARCO INTRODUCTORIO	
1. Introducción	2
1.1 Aspectos Generales del Problema	9
1.2 Identificación de las especies bacterianas	9
1.3 Objetivo general	12
1.4 Objetivos específicos	12
1.5 Limitaciones	12
1.6 Justificación	13
CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO	
2.1 REVISIÓN DE LITERATURA	15
2.1.1 <i>Brassica</i>	15
2.1.2 <i>Lattuca</i>	18

2.1.3	Contaminación bacteriana de lechuga y repollo	21
2.1.4	<i>Escherichia coli</i> spp	21
2.1.5	<i>Escheria coli</i> 0157:H7	24
2.1.6	<i>Salmonella enteritidis</i> var. Typhimurium	26
2.1.7	Medios de cultivo	29
2.1.7.1	Infusión Cerebro Corazón (BHI)	29
2.1.7.2	Agar Maconkey	30
2.1.7.3	Agar Eosina-Azul De Metileno	31
2.1.7.4	Medio Xilosa-Lisina-Desoxicolato (Agar XLD)	33
2.1.7.5	Agar <i>Salmonella-Shigella</i>	35
2.1.7.6	Agar Triple Azucar – Hierro (TSI)	37
2.1.7.7	Agar Citrato	39
2.1.8	Importancia del control y medidas de prevención de estos patógenos en alimentos y agua	43
CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODO		
3.10	Descripción del área de estudio	46
3.11	Localización	46
3.12	Características del suelo	48
3.13	Características del clima	48
3.14	Precipitación	49
3.15	Selección de los sitios de muestreo	50
3.16	Recolección y transporte de la muestra	51
3.17	Preparación de las muestras	52

3.18	Cultivo de la muestra	52
3.19	Identificación de las muestras	53
3.20	Preservación de la muestra	53

CAPÍTULO IV ANALISIS DE RESULTADOS Y DISCUSION

4.1.1	Identificación	56
4.2	Presencia de <i>E. coli</i> y <i>Salmonella enteritidis</i> en repollo y lechiga	63

CAPÍTULO V CONSIDERACIONES FINALES

5.1	Conclusiones	66
5.2	Recomendaciones	67
	Referencias Bibliográficas	69
	Anexos	79
	Glosario	

ÍNDICE DE CUADROS

NO.		Página
1	Respuesta de algunas especies bacterianas a la prueba del citrato	10
2	Varietades de <i>B. oleracea</i> más conocidas a nivel mundial (INEC 2012)	17
3	Varietades de lechuga se destacadas	19
4	Pruebas de tipificación para <i>Salmonella enteritidis</i> var. Typhimurium	28
5	Coordenadas de los sitios de muestreo en Tierras Altas	46
6	Temperatura máxima, mínima y media de la zona de muestreo de dos estaciones cercanas a la zona de estudio	49
7	Datos del clima: temperatura, humedad, evaporación, velocidad del viento en la zona de muestreo	50
8	Muestras recolectadas y resultados de las pruebas bioquímicas preliminares utilizados para determinar la presencia de <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>Salmonella enteritidis</i> typhimurium	57
9	Número de muestras, de cada variedad, contaminadas con <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella enteritidis</i>	60

ÍNDICE DE FIGURAS

NO.		Página
1	Puntos de muestreo en la comunidad de Cerro Punta, distrito de Tierras Altas	47
2	Diferentes momentos en el desarrollo de este estudio	51
3	Momento de la preparación de las muestras para los análisis microbiológicos	54
4	Resultados de los cultivos del lavado de las muestras en el medio XLD.	58
5	Colonias, presuntamente, de <i>Salmonella</i> que serán confirmadas con otras pruebas. Los puntos negros en el medio XLD son un fuerte sugerente del género. Se señalan con la flecha las colonias objetivo	59
6	Grafica de los Resultados aplicados a los muestreos durante el estudio	61
7	Repollo de la variedad cero cultivado en una de las fincas donde se desarrolló el estudio	81
8	Repollo utilizado para la realización de las pruebas microbiológicas	81
9	Lechuga de la variedad beluga. Una muestra de las recolectadas para las pruebas microbiológicas en una de las fincas donde se desarrolló el estudio	82
10	Lechuga de la variedad romana. Una muestra de las recolectadas para las pruebas microbiológicas en una de las fincas donde se desarrolló el estudio	82
11	Esquema general del proceso de identificación de las especies bacterianas para saber si corresponden con las especies objetivo del estudio	83
12	Posicionador global utilizado para registrar las coordenadas de los puntos de muestreo en el distrito de Tierra Altas	83

- 13 Gráfica donde se resume el número de muestras de cada variedad de *Brassica* y *Latua* recolectada para el presente estudio

84

RESUMEN

El consumo de frutas y hortalizas frescas son de gran importancia y la disponibilidad de estos productos en el mercado local y mundial ha contribuido a un aumento en el consumo diario en la dieta de los habitantes. Cabe mencionar que el actual incremento reciente de los casos de enfermedades transmitidas por alimentos asociadas a las hortalizas frescas, en especial el repollo y lechuga, ha sido una preocupación entre los organismos de salud pública y los consumidores. En este sentido, el interés principal es la inocuidad de estos productos.

Las fuentes y mecanismos de contaminación de las frutas y hortalizas durante su cultivo, cosecha, procesamiento y empaçado deben apearse a prácticas sanitarias para minimizar el riesgo de contaminación por patógenos. Los vegetales son alimentos con una elevada carga bacteriana, no solo porque se cultivan en los suelos, sino también porque se consumen de forma directa, es decir, no se someten a ningún tratamiento previo a la ingesta con capacidad para eliminar posibles patógenos.

Como el resto de variedades de coles, el repollo es una buena fuente de vitamina C y folatos. Aporta cantidades apreciables de potasio, hierro, fósforo y, en menor cantidad, de calcio. También es importante su contenido en fibra (soluble e insoluble), lo que favorece el tránsito intestinal y ayuda a combatir el estreñimiento, además de contribuir a la prevención de diversas enfermedades. La lechuga es extremadamente nutritiva. Es rica en minerales, vitaminas y otros nutrientes

esenciales. Consumirla como parte del alimento diario dentro de la comida diaria brindar beneficios para la piel, el cabello y la salud integral. También puede ayudar a resolver problemas de salud.

Las bacterias más comunes son *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* y *Leptospira interrogans*, las cuales provocan fiebre tifoidea, gastroenteritis, cólera, diarreas y leptospirosis, respectivamente, entre otros padecimientos

Se identificaron especies *Salmonella* y *Escherichia coli* presente en lechuga y repollo del área de Tierras altas, Chiriquí. Para la determinación de la presencia de estas especies se utilizaron muestras de repollo de las variedades romana, híbrida, beluga, hoja de roble e iverna) y lechuga variedades Xerox, mejorado (Green boyer y lombardo). Mediante pruebas bioquímicas y serológica se logró la identificación doce cepas de *Escherichia coli* en repollo y lechuga y trece especies de *Salmonella* no *enteritidis*. De las especies de *Escherichia* encontradas no se detectó la variedad enterohemorrágica. Las muestras fueron positivas para *S. enteritidis* variedad *typhimurium* en todas las muestras recolectadas. Los resultados descartan el riesgo de salmonelosis o de Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) entre los consumidores de los productos hortícolas en cuestión.

Abstract

The consumption of fresh fruits and vegetables are of great importance, and the availability of these products in the national and global market, has contributed to an increase in daily consumption in the diet of the inhabitants. It should be mentioned

that the recent increase in cases of foodborne diseases associated with fresh vegetables, especially cabbage and lettuce, has been a concern among public health agencies and consumers regarding the safety of these products. A prominent pathogen in vegetables and fruits is *Salmonella*. The sources and mechanisms of contamination of fruits and vegetables during their cultivation, harvesting, processing and packaging must adhere to sanitary practices to minimize the risk of contamination by pathogens. Vegetables are foods with a high bacterial load, not only because they are grown in soils, but also because they are consumed directly, that is, they do not undergo any treatment prior to ingestion with the capacity to eliminate possible pathogens.

Like the other varieties of cabbages, cabbage is a good source of vitamin C and folates. It contributes appreciable amounts of potassium, iron, phosphorus and, in smaller quantity, of calcium. Also important is its fiber content (soluble and insoluble), which favors intestinal transit and helps combat constipation, as well as contributing to the prevention of various diseases. The lettuce is extremely nutritious. It is rich in minerals, vitamins and other essential nutrients. Consume it as part of the daily food within the daily meal to provide benefits for the skin, hair and integral health. It can also help solve health problems.

There is no clear explanation of how pathogens such as *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* or *E. coli* are hooked on the leaves of vegetables

The most common bacteria are *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* and *Leptospira interrogans*, which cause typhoid fever, gastroenteritis, cholera, diarrhea and leptospirosis, respectively, among other conditions.

Salmonella species and *Escherichia coli* present in lettuce and cabbage from the Highlands area, Chiriqui were identified. For the determination of the presence of these species, samples of cabbage of the varieties Roman, hybrid, beluga, oak leaf and iverna) and lettuce varieties Xerox, improved (Green boyer and Lombard) were used. By means of biochemical and serological tests, twelve strains of *Escherichia coli* in cabbage and lettuce and thirteen species of *Salmonella no enteritidis* were identified. Of the *Escherichia* species found, the *enterohemorrhagic* variety was not detected. The samples were positive for *S. enteritidis* variety *typhimurium* in all the samples collected. The results rule out the risk of salmonellosis or Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) among the consumers of the horticultural products in question.

ABREVIATURAS

EHEC	E. coli enterohemorrágica
EIEC	E. coli enteroinvasiva
EPEC	E. coli enteropatógena
ETAs	Enfermedades transmitidas por alimentos
ETEC	E. coli enterotoxigénica
FDA	Food and Drug Administration
SUH	Síndrome urémico hemolítico
UFC	Unidades formadoras de colonias
UFP	Unidades formadoras de placa
XLD	Xilosa lisina desoxicolato
BHI	infusión cerebro Corazón
TSI	Hierro-Triple Azúcar
SS	Salmonella – Shigela

CAPÍTULO 1 MARCO INTRODUCTORIO

1. INTRODUCCIÓN

El repollo, conocido por sus ventajas culinarias, es una planta que tiene una gran importancia económica y, por la forma de consumo en muchas culturas, en la salud de la población. La investigación histórica ha determinado que los cultivares actuales descienden de *Brassica* espontáneas, no formadoras de repollo, domesticadas en Asia Menor y en el Mediterráneo Oriental. Los antiguos griegos tenían en gran estima al cultivo del repollo.

Parece haberse originado a partir de *Lepidium campestre* (L.) modificando características como la longitud (supresión) del tallo, la longitud (supresión) de las hojas, mayor desarrollo floral etc. (Uva *et al.* 1997). Los celtas y, más tarde, los romanos diseminaron las coles por toda Europa. La palabra latina *Brassica*, que da nombre al género, procede del vocablo Celta *bresic*, que significa col. A lo largo de los siglos las formas con cabeza (repollos) se fueron desarrollando en el norte de Europa, en tanto que las formas sin cabeza (berzas) aparecieron hacia el sur. Un tercer tipo de coles (las coles de Bruselas) aparecieron posteriormente, hacia el siglo XVIII (Girard & Osorio 1980).

Las características de repollos que definen el grupo son: raíz axonomorfa, tallo semileñoso cubierto de cicatrices foliares. Hojas inferiores, pecioladas, lido – pinnatisectas, con uno o dos pares de segmentos laterales y uno superior lobado o entero, glaucas, con nervios prominentes cubiertas de ceras cuticulares. Flores en

inflorescencias, con pedicelos de uno a dos cm y pétalos de 1.5 cm, con nectarios medianos ovoides (Koch 2003).

La lechuga, del género *Lactuca*, es una fanerógama de la familia Asteraceae. Este género abarca más de 100 especies y varios miles de variedades, de las cuales solamente se cultivan unas pocas. La más conocida es la lechuga común (*Lactuca sativa*). El origen de la lechuga no está muy claro, podría proceder de la India o de las regiones templadas de Eurasia y América del Norte, a partir de la especie *Lactuca serriola*. Committee vol 24 (2006).

La lechuga comenzó a ser cultivada hace 2.500 años por persas, griegos y romanos quienes la consumían para conciliar mejor el sueño. Su consumo descendió en la edad media, pero volvió a adquirir importancia durante el Renacimiento.

Las primeras variedades de lechuga conocidas son las de hoja suelta, las variedades acogolladas se conocieron en Europa en el siglo XVI. Dos siglos más tarde se obtuvieron numerosas variedades gracias a los estudios llevados a cabo por horticultores alemanes. La descripción de características es: hierbas anuales, bienales o perennes, caulescentes. Hojas alternas, de enteras a pinnatisectas; las caulinares generalmente sagitadas, a veces decurrentes. Involucro con varias filas de brácteas, cilíndricas, frecuentemente cónicas en el fructificación. Receptáculo sin brácteas o escamas, glabro. Lígulas amarillas, azuladas o lilas. Aquenios

marcadamente comprimidos, de contorno obovado, ovado u oblongo, con pico y generalmente con costillas, pardo-pálidos o negros. Vilano formado por dos filas desiguales de pelos escábridos, blancos o amarillos (Dárraga *et al.* 2011)

En un estudio de Muñoz *et al.* (2013) para evaluar el grado de contaminación fecal en verduras de consumo crudo en Lima, Perú, se recolectaron 15 muestras de lechuga (*Lactuca sativa*), 15 de col (*Brassica oleracea*) y 15 de espinaca (*Spinacea oleracea*) por mercado en un año (n=180). Se demostró que el 18.9 % del total de verduras y el 22.2 % de verduras provenientes de, al menos uno de los puntos de muestra, presentaron niveles de coliformes fecales superiores a lo establecido por la International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), siendo la espinaca la más contaminada. El 2.2 % de verduras de otro de los puntos presentó niveles elevados de *E. coli* Tipo I (Típico) y el 10 % de las verduras presentó contaminación por *Salmonella* spp, especialmente el repollo. Es por eso que el monitoreo de los productos y la verificación de estas prácticas deben hacerse permanentemente, justificándose, por este motivo, la presente investigación. Oliveira *et al.* (2006) demostraron la conveniencia de utilizar procedimientos de control del crecimiento microbiológico de bajo costo y origen natural como el vinagre y el jugo de limón, logrando controlar el número de bacterias de *E. coli* y *Salmonella* spp. Para verificar la efectividad en condiciones diferentes y para reconocer la necesidad del uso de estos procedimientos es necesario llevar a cabo el monitoreo de la presencia de dichas bacterias en el producto recién cosechado.

Si se toma en cuenta los factores que promueven la preservación de las bacterias que colonizan el producto, en el caso del repollo, la rizósfera parece ser un factor importante en la sobrevivencia de *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella typhimurium* (*Salmonella enteritidis* variedad Typhimurium) en suelos enmendados con abono bajo condiciones de campo. Ongeng *et al.* (2001) experimentaron con semillas de repollo de tres semanas de edad que fueron trasplantadas y cultivadas por 120 días en suelos enmendados con abonos inoculados con cuatro a siete log de UFC/g de *E. coli* O157:H7 no virulentas y *Salmonella enteritidis* var. typhimurium. La rizosfera del repollo no afectó la supervivencia, en el suelo enmendado con abonos de inóculo de cuatro log UFC/g y las dos bacterias entéricas no fueron detectadas en, o entre, las hojas durante la cosecha, sugiriendo que las bacterias encontradas en el producto pudrían venir de contaminación de las hojas durante el procedimiento de cosecha. *E. coli* O157:H7 y *S. typhimurium* sobrevivieron en la masa del suelo por un máximo de ochenta a noventa y seis días respectivamente, pero los organismos permanecerán cultivables en la rizósfera del repollo hasta el momento de la cosecha. En el inóculo siete log CFU/g, *E. coli* O157:H7 y *S. typhimurium* la contaminación de las hojas del repollo se dio durante el cultivo. Los resultados anteriores demuestran que, bajo las condiciones de campo tropical, la rizósfera del repollo intensifica la persistencia de *E. coli* O157:H7 y *S. typhimurium* en suelos enmendados con inóculos de alta concentración y está asociado por contaminación de las hojas por largo tiempo (Ongeng *et al.* 2001). Probablemente, esta relación entre las dos especies de bacterias se mantenga con base en una interacción tipo *quorum*

sensing (Surette & Bassler1998). Este tipo de resultados han sido confirmados en varios otros estudios de diferentes autores (Baloda *et al.* 2001, Chang & Fang 2007, Franz *et al.* 2005).

La descripción de The Centre For Food Security And Public Health (2010) es muy completa. "La *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) es un conjunto de *E. coli* patógenas, que puede causar diarrea o colitis hemorrágica en los humanos. En ocasiones, la colitis hemorrágica deriva en síndrome urémico hemolítico (SUH), una causa importante de insuficiencia renal aguda en niños y morbilidad y mortalidad en adultos. En los ancianos, la tasa de letalidad por el SUH puede elevarse al 50%. La *E. coli* O157:H7 (ECEH O157:H7) ha sido reconocida como la causa de este síndrome desde la década de 1980. Los reservorios de la ECEH O157:H7 son los rumiantes, en especial el ganado bovino y las ovejas, que se infectan sin presentar síntomas y eliminan el organismo en las heces. Otros animales como conejos y cerdos también pueden transportar este organismo. Los humanos adquieren la ECEH O157:H7 por contacto directo con los portadores animales, sus heces y el suelo o agua contaminados, o a través de la ingestión de carne molida mal cocida, otros productos derivados de animales o vegetales y frutas contaminadas. La dosis infectiva es muy baja, lo cual incrementa el riesgo de contraer la enfermedad.

En el hombre, por su parte, *Salmonella enteritidis* produce intoxicación alimentaria que causa con dolor abdominal, náuseas, vómitos y diarrea luego de dos a tres

días de incubación (Ewing & Martin 1980). Los síntomas desaparecen luego de cuatro días si el paciente es inmunológicamente competente, pero en pacientes inmunocomprometidos o en condiciones de desnutrición o sin tratamiento, o cuando se carece de fuentes de rehidratación, puede culminar con la muerte (MacFaddin 1976, Lennette *et al.* 1980, MacFaddin 1980).

Escherichia coli y *Salmonella enteritidis typhimurium*, que podrían desarrollarse en conjunto en *B. oleracea* y *L. sativa*, en medio Luria-Bertani conteniendo glucosa secretan una pequeña molécula termolábil que está envuelta en la comunicación intracelular. Este factor no se produce cuando estas bacterias se cultivan en el mismo medio de Luria-Bertani sin glucosa. La mayoría de los ensayos fueron desarrollados en *E. coli* AB157 y *S. typhimurium* LT2. Sin embargo *E. coli* de la línea DH5alfa no produce el factor soluble indicando que esta línea altamente domesticada ha perdido el gen o la maquinaria biosintética necesaria para producir la molécula señal (Surette & Bassler 1998) teniendo mecanismos parecidos tanto en repollo como en lechuga (Franz *et al.* 2005).

Rodríguez *et al.* (2008) inocularon artificialmente un bioabono aplicado a un cultivo de *L. sativa* para determinar la capacidad de transferencia a las plantas, así como para establecer el efecto del uso de cubiertas de polietileno en la protección del cultivo frente a este patógeno. Ellos determinaron que *S. enteritidis* serovariedad typhimurium ATCC 13176 se transmite a la lechuga, a partir del bioabono contaminado, sin importar la concentración inicial del microorganismo en el

bioabono. Así mismo, encontraron que existe asociación entre la contaminación y la condición de cubierta del cultivo. Sin embargo, al analizar las raíces, ellos no encontraron asociación de transmisión del suelo al producto (Franz *et al.* 2005, Rodríguez *et al.* 2008). Esto podría ser un factor determinante en la identificación de la ruta de contaminación del producto. Es por esto que se busca inicialmente, determinar la presencia de ambas bacterias al momento de la cosecha, para establecer posteriormente una ruta de contaminación. Tanto *E. coli* H7:O157 como *S. e. typhimurium* son indicadoras de contaminación, pero, ambos serotipos, son en sí mismos serotipos patógenos. La determinación de su presencia en los alimentos, particularmente de los alimentos que se podrán consumir crudos, es de gran importancia.

1.1 ASPECTOS GENERALES DEL PROBLEMA

1.2 IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES BACTERIANAS

Un serotipo o serovariedad, según utilizaremos el concepto en este trabajo es un tipo de microorganismo infeccioso clasificado según los antígenos que presentan en su superficie celular, aunque nuestras pruebas serán llevadas a cabo basadas en características bioquímicas de los microorganismos aislados, en el caso de *Salmonella*, y con pruebas serológicas en el caso de *E. coli* O157:H7 (Sambrook *et al.* 1989).

Los serotipos pueden establecerse según factores de virulencia, lipopolisacáridos en bacterias gram-negativas, presencia de exotoxinas, plásmidos, bacteriófagos, u otras características que diferencian a dos elementos de la misma especie a través de varias pruebas. En el caso del grupo *Salmonella*, sin embargo, la especie *S. enteritidis* variedad Typhimurium es identificable por el hecho de que es la única que responde a todas las pruebas bioquímicas de la especie, pero da la prueba de Citrato de Simmons positiva (Hitchcock & Brown 1983). Se han desarrollado, por otra parte, para la identificación de *E. coli*, medios selectivos y diferenciales para la ECEH O157:H7, con base en la inactividad de β -glucuronidasa y la incapacidad de la mayoría de las cepas para fermentar el sorbitol. Con frecuencia, se utiliza agar MacConkey que contiene sorbitol al 1% (SMAC), a veces con cefixima y ramnosa o telurito de potasio. Se puede utilizar el agar de la colitis hemorrágica para aislar la ECEH O157:H7 de los alimentos. También están disponibles otros medios, incluyendo los agares cromogénicos

comerciales (por ejemplo, el agar Rainbow). Dado que otras cepas de *E. coli*, así como también otras bacterias, pueden crecer en estos medios, el enriquecimiento previo de *E. coli* H7:O157 ayuda en la detección (Ateba & Bezuidenhout 2008, Varela *et al.* 1991). El medio entonces vira al azul y esto es indicativo de la producción de citrato permeasa dando como resultados probables los descritos en el cuadro N° 1.

Cuadro N° 1. Respuesta de algunas especies bacterianas a la prueba del citrato.

Microorganismo	Citrato permeasa	Color del medio
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Positivo	Azul
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	Positivo	Azul
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Negativo	Verde
<i>S. flexneri</i> ATCC 12022	Negativo	Verde

Fuente: <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/simmonsцитagar.htm>

Puesto que las otras variedades de *S. enteritidis* dan resultados negativos para esta prueba, su respuesta positiva sugiere fuertemente la variedad *S. enteritidis typhimurium* en la muestra sin necesidad de utilizar las pruebas serológicas. Para el enriquecimiento, las muestras se pueden cultivar en un medio líquido de enriquecimiento, o se puede utilizar la separación inmunomagnética (IMS) para concentrar a los miembros del serogrupo O157 de *E. coli* antes de cultivarlas en placas. En la IMS, se utilizan esferas magnéticas recubiertas con un anticuerpo contra el antígeno O157 para unir estos organismos. Pruebas rápidas pueden

determinar si los patógenos potenciales están presentes en las muestras previos al aislamiento. Incluyen tecnologías con tiras reactivas y membranas, pruebas de aglutinación, ensayos en micro placas, inmunotransferencia de colonias, RCP, inmunofluorescencia y ELISA. Aunque la producción de verocitotoxina puede ayudar a la identificación.

El repollo es un producto de consumo común en Panamá, su uso por parte del consumidor incluye la preparación de platos para ser ingeridos directamente o como acompañamiento de otros alimentos a los que aporta alguna ventaja palatal. Lógicamente, en cualquier caso, en el cual sea consumido sin mucha cocción, el riesgo de que se convierta en un vehículo para bacteria patógenas es bastante elevado (Pérez *et al.* 2004, Tijerino *et al.* 2005).

Dada la afirmación anterior, se hace necesario evaluar una forma sencilla y económica de monitorear los alimentos que podrían transportar microorganismos patógenos, de manera que el procedimiento sea fácil y de bajo costo para asegurar una frecuencia de pruebas sostenible. Esta sostenibilidad se fundamenta en el tamizaje de pruebas bioquímicas antes de las costosas pruebas serológicas (Ver fig. 5).

1.3 OBJETIVO GENERAL

Determinar si los repollos y lechugas cultivados en Tierras Altas de la provincia de Chiriquí mantienen y transportan *E. coli* 0157:H7 y *S. enteritidis* serovar Typhimurium durante el proceso de la cosecha utilizando pruebas bioquímicas como tamizaje.

1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Determinar la ocurrencia de *E. coli* 0157:H7 y *S. enteritidis* serovar Typhimurium en crecimiento único o simultáneo en repollos y lechugas colectadas en el campo en Tierras Altas en la provincia de Chiriquí.
- b. Establecer la relación entre ambas especies/serotipos bacterianos, con los procedimientos de cultivo y cosecha.
- c. Verificar la factibilidad de monitorear la zona de producción mediante el algoritmo de pruebas bioquímicas como tamizaje de menor costo que otros métodos.

1.5 LIMITACIONES

Aunque el procedimiento mismo de evaluación reduce los costos de un monitoreo, es claro que el control por monitoreo implicaría el muestreo al azar para desarrollarlo, esto no puede desligarse de los costos de transporte y de la

dependencia de la disposición de los propietarios de las fincas para facilitar esas muestras. Por lo tanto, un de las limitaciones encontradas fue la negativa de algunos productores a facilitar las muestras. Así mismo, la recolección y transporte de las muestras hasta un sitio tan alejado como David, desde Cerro Punta, resulta algo difícil si no se ha programado bien el horario y ajustado a los horarios de trabajo en el laboratorio. De todos modos, superando estos puntos, se hace factible el método.

1.6 JUSTIFICACIÓN

En nuestro país, las hortalizas (repollo y lechuga) constituyen un alimento básico en la mayoría de la población. Aunque el consumo crudo de estas hortalizas lleva inherentemente implícito un riesgo de enfermedad de origen microbiano, de hecho se ha encontrado *Escherichia coli* y *salmonella* en repollo, lechuga, tomate, pepino entre otros.

Se considera los efectos que puede tener la dispersión de una infección alimentaria, y el impacto de una infección por patógenos de con la virulencia de *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* H7:0157, es importante para obtener información que contribuya al desarrollo de medidas de prevención para el control de enfermedades provocadas por estos productos

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1 REVISION DE LITERATURA

2.1.1 *Brassica oleracea* (Repollo)

El repollo, *Brassica oleracea* Linneo 1753, es una planta nativa de la costa del sur y del oeste de Europa. Pertenece a la clase Magnoliopsida, subclase Dilleniidae, orden Brassicales y la familia Brassicaceae. Su hábitat se reduce, en esos ámbitos, a suelos de caliza en acantilados (Balcaza 1997, CCI 2006), los cuales son más fáciles de encontrar acá en Panamá en los suelos calizos de andesita y basalto de las laderas y alrededores del Volcán Barú. Esto lo convierte en un producto importante del área de Cerro Punta, Volcán y Boquete, donde se produce el 90 % del repollo de la república de Panamá (IICA 1999, INEC 2012). *B. oleracea* es una planta bienal. En el segundo año de crecimiento se forma una inflorescencia amarilla de hasta dos metros de altura. En el primer año de crecimiento, el cuál es el más importante para los productores, forma una roseta de hojas, las hojas de las variedades comerciales son siempre carnosas y tienen proteínas capaces de hacerles almacenar agua y nutrientes.

Mujica *et al.* (2009), identificaron las principales plagas de insectos de este cultivo así como otros enemigos naturales del repollo, basándose en el comportamiento poblacional de los principales insectos y en las alternativas de control en las áreas agrícolas (CENSA) y demostraron con su trabajo la influencia de las prácticas de cultivo en el control de plagas y la llegada de bacterias a los cultivos. *B. oleracea*,

la cuales han sido cultivadas durante cientos de años por el hombre, en un amplio rango de variedades, como repollo, brécol, coliflor y otros, es de gran importancia en la alimentación. En cuanto a los requerimientos para su cultivo, Cecílio *et al.* (2011) realizaron un estudio para evaluar el efecto de la densidad de población en el crecimiento y producción de repollo *Astrus*. Según los datos obtenidos, la mayor producción se obtuvo con la dosis de nitrógeno más alta. Cabezas menores de repollo, preferidas comercialmente, se obtuvieron sin la aplicación de nitrógeno, independientemente de la población de plantas por lo que el control del tamaño puede ser llevado a cabo regulando los nutrientes disponibles. Se trata de una de las plantas más importantes empleadas como alimento humano (CCI 2006). Debido a su elevada exigencia con respecto a compuestos nitrogenados, la aplicación de fluidos ricos en ellos aumenta la posibilidad de adicionar, también, bacterias inmersas en estos aportes. *B. oleracea* está muy relacionada con otras cinco especies del género *Brassica*. Todas las variedades de *B. oleracea* están agrupadas en grupos de cultivares como se muestra en el cuadro N° 2.

Cuadro N° 2. Variedades de *B. oleracea* más conocidas a nivel mundial

ESPECIE	GRUPO	NOMBRE COMUN
Brassica	Alboglabra (<i>B. oleracea</i> var. <i>Alboglabra</i> (L. H. Bailey) Musil)	Kai-lam (brecol chino)
	Botrytis (<i>B. oleracea</i> var. <i>Botrytis</i> L.)	Coliflor y romanescu
	Capitata (<i>B. oleracea</i> var. <i>Capitata</i> L.)	Col o repollo o col repollo (lombarda, col puntiaguda)
	Costata (<i>B. oleracea</i> var. <i>Costata</i> DC.)	Col de pezón grueso o tronchud
	Gemmnifera (<i>B. oleracea</i> var. <i>Gemmnifera</i> DC.)	Col de Bruselas
	Gongylodes o Kohlrabi (<i>B. oleracea</i> var. <i>Gongylodes</i> L)	colirrábano
	Italica (<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> Plenck)	Brécol o brócoli
	Medullosa (<i>B. oleracea</i> var. <i>Medullosa</i> Thell)	Col de meollo, col medular o col meollosa
	Palmifolia (<i>B. oleracea</i> var. <i>Palmifolia</i> DC.)	Col de Jersey
	Ramosa (<i>B. oleracea</i> var. <i>Ramosa</i> DC.)	Col de mil cabezas
	Sabauda (<i>B. oleracea</i> var. <i>Sabauda</i> L.)	Col de Saboya o col de Milán
	Sabellica (<i>B. oleracea</i> var. <i>Sabellica</i> L.)	Col crespá o col rizad
	Viridis (<i>B. oleracea</i> var. <i>Virilis</i> L.)	Bersa común o col forrajera

Fuente: (INEC 2012).

En Panamá se siembran variedades de repollo de invierno de Norte América, Europa y Japón, los cuales, para su normal desarrollo y producción requieren de

temperaturas entre 15 °C y 20 °C, por lo que las tierras del distrito de Tierras Altas, Cerro Punta y Volcán, son las principales productoras de estas hortalizas. Las variedades producidas más comúnmente son el repollo verde (Greene boyer), el repollo morado (Eskazu) y el repollo chino (Xerox). Es importante mantener el suministro de agua durante todo el ciclo de cultivo. El repollo se puede cultivar en gran variedad de suelos, desde arenoso y limo arenoso hasta franco arenoso. Los suelos basáltico-andesíticos de las tierras altas de Chiriquí son, por tanto, ideales para su cultivo. El pH adecuado oscila entre 5,5 y 6,5; si es inferior a 5,5 se debe aplicar compuestos a base de calcio (Balcaza 1997). El híbrido Stonehead es actualmente una de las variedades más difundidas. Son de ciclo corto (60-70 días a cosecha después del trasplante), cabeza redonda y compacta y peso entre uno y 1,5 kg aproximadamente. Stone head es más resistente al rompimiento y de mayor compactación, lo que permite su transporte hasta otros sitios en el territorio de Panamá. Lo más importante es que el suelo esté suelto y mullido. Los surcos son adecuados para terrenos con poca pendiente y buen drenaje. Las siembras deben de trazarse siguiendo curvas de nivel.

2.1.2 *Lattuca* (Lechuga)

Latuca sativa Linneo 1753, pertenece a la clase Magnoliopsida, subclase Dilleniidae, orden Asterales y la familia Asteraceae. Es originaria de las regiones semi-templadas de Europa y Asia y se cultiva con fines alimentarios. Se puede consumir durante todo el año. Normalmente cruda, pero también cocida si es de las variedades más duras. Se utiliza como ingrediente de ensaladas y otros platos.

El nombre proviene de una alusión a la savia lechosa que sale del tallo al ser cortado. Es una planta con raíz pivotante y ramificada de unos 25 cm con crecimiento en roseta y las hojas se disponen alrededor de un tallo central, corto y cilíndrico que gradualmente se va alargando para producir las inflorescencias, formadas por capítulos de color amarillo (parecidos al diente de león) reunidos en corimbos. Según las variedades los bordes de las hojas pueden ser lisos, ondulados o aserrados como se mencionan en el cuadro N° 3 (Colom & Pons 2003).

Cuadro N° 3. Variedades de lechuga

La Beluga	De cogollos apretados y densos, semejantes a la col; carece casi por completo de sabor, pero goza de amplio uso por su crujiente textura y la facilidad para cortarla finamente. Es la variedad más habitual en las regiones donde no se da naturalmente la lechuga, puesto que puede cultivarse en tanques hidropónicos.
La Romana	De cogollo largo, con hojas aproximadamente lanceoladas, menos gruesas que las iceberg pero gruesas y crujientes. Se la conoce en España como oreja de mulo. Esta es la variedad más cultivada en las tierras altas de Chiriquí.
La Francesa	De cogollo redondo, hojas finas y textura mantecosa; tiene un sabor delicado pero intenso. Se la conoce también como Boston.
La Batavia	Similar a la francesa, de cogollo suelto, hojas rizadas y textura mantecosa.

Fuente: Colom & Pons 2003.

La raíz (rizósfera) de *L. sativa* es reducida si se compara con las hojas, lo que la hace muy sensible a la falta de humedad y soporta mal la sequía, aunque sea muy breve. La humedad relativa ideal es del 60 al 80 %, aunque en determinados momentos agradece menos del 60 %. Estos niveles de humedad pueden favorecer el crecimiento de bacterias. Es necesario mantener en la tierra continuamente un buen nivel de humedad mientras que en el ambiente no conviene tener una humedad exagerada, lo que la hace candidata ideal para el riego por manga exúdante o por goteo. El riego tipo lluvia, (manguera, o aspersores), es el menos indicado, pero, como es muy comúnmente utilizado en Volcán y Cerro Punta, debe aplicarse fuera de las horas de sol para que las hojas no se quemen con los rayos de sol. En Tierras Altas se utiliza, muchas veces, aguas servidas semi tratadas o crudas para regar los cultivos, por lo que podría haber contaminación bacteriana a partir de estas fuentes. Este cultivo, en ningún caso admite la sequía, aunque la superficie del suelo es conveniente que esté seca para evitar en todo lo posible la aparición de podredumbres de cuello (Celis *et al.* 2006).

Debido a la cercanía de la planta al suelo, a la separación de las hojas con respecto al cuerpo de la planta y a la necesidad de irrigación con aguas servidas tratadas por su riqueza de nutrientes, la lechuga es un alimento efectivo como vehículo de transporte de bacterias de todo tipo.

2.1.3 Contaminación bacteriana de lechuga y repollo.

El repollo, y la lechuga utilizada en la preparación de alimentos crudos puede ser vehículo de bacterias y otros microorganismos. En un estudio llevado a cabo en establecimientos de comida rápida en San Salvador, por los autores Avalos C. Y. & F. Santacruz. (2009), se demostró la presencia de coliformes totales, fecales y *Escherichia coli*, en las muestras de ensaladas analizadas, lo que es indicativo de posible contaminación con materia fecal humana o animal. Esta contaminación pudo deberse a diferentes factores como la inadecuada aplicación de buenas prácticas agrícolas, tomando en cuenta el lugar donde se cultivan las hortalizas, el agua de riego, transporte y manipulación, entre otras Avalos & Santacruz (2009), esta contaminación demostrada nos permite predecir la posibilidad de que una *E. coli* enterohemorrágica pueda encontrarse en este producto.

2.1.4 *Escherichia coli* spp

Dominio: Bacteria, Filo: Proteobacteria, Clase: Gammaproteobacteria, Orden: Enterobacteriales, Familia: Enterobacteriaceae, Género: *Escherichia*, Especie: *Escherichia coli* (*E. freundii*) Migula, 1895.

Escherichia coli es una Enterobacteriaceae que se encuentra generalmente en intestinos animales y aguas negras, pero se le puede encontrar en todas partes. Fue descrita por primera vez en 1885 por Theodore Von Escherich, un

bacteriólogo alemán, quien la denominó *Bacterium coli*. Posteriormente se le dio el nombre de *Escherichia coli*, en honor a su descubridor (Tannock 1995).

E. coli, y otras bacterias son necesarias para producir las vitaminas B₁₂ y K. Es un bacilo gramnegativo, es anaerobio facultativo, con flagelos peritricos, no esporulante, fermentador de glucosa y lactosa (Bray & Beavan 1948).

Bray (1945) y Bray & Beavan (1948) demostraron que cepas de *E. coli* del serogrupo O111 se asociaban a brotes epidémicos de enteritis graves en lactantes ingresados en hospitales (Griffin & Tauxe 1991). Otros serogrupos de colibacilos, como el O26, el O55, también fueron identificados como causantes de trastornos diarreicos graves y otras patologías, aunque no se pudo precisar el mecanismo de patogenicidad. A estas cepas se les llamó *E. coli* enteropatógena clásica (ECEP clásica). Luego, se identificó un grupo de cepas de *E. coli* de serogrupos diferentes de los anteriores, responsable de enteritis invasiva idéntica a la producida por de las *Shigella* (*E. Coli* enteroinvasora: ECEI). Aunque la cepa O157:H7, objeto de este estudio, es conocida desde mediados del siglo XIX y a finales del siglo XX, se confirmó sin lugar a dudas su importancia epidemiológica. Principalmente con el brote de Seattle, en Estados Unidos De América. En 1996, Seattle, se produjo un brote a causa de esta bacteria, que se encontró en botellas de jugo de manzana. Muchas personas murieron después de tomar el jugo. Las manzanas estaban contaminadas con excrementos de venados de la zona y no hubo ningún tipo de pasteurización.

A finales de los 60 se logró reconocer otros serogrupos que producen enteritis por medio de enterotoxinas de dos tipos, una termoestable (ST) y otra termolábil (LT), o sea, una que es resistente al calor y otra que es sensible al calor. Este grupo fue denominado *E. Coli* enterotoxigénica (ECET) (Levine 1987).

Los mecanismos implicados en el carácter patogénico de ECEI y de ECET se confirmaron *in vitro* desde los años ochenta (Kaper 1994). Al conocerse estos dos mecanismos de patogenicidad, muchas cepas de archivo de *E. Coli* enteropatógena clásica fueron estudiadas y se observó que ni eran invasoras ni producían toxinas, por lo que algunos expertos dudaron de su capacidad patógena, hasta que Levine *et al.* (1978) demostraron en voluntarios humanos el poder patogénico de algunas de estas cepas.

El criterio para diferenciar la *E. coli* enterohemorrágica u otras patógenas de los colibacilos comensales no patógenos es el serogrupo, que se basa en la determinación del antígeno O, pero esto es confuso pues solamente algunos serotipos, dentro de cada serogrupo, son patógenos. Estos microorganismos constituyen clonas patógenas dentro de la especie y que estas clonas, en términos generales, corresponden a un serotipo. Para saber con rigor si una cepa de *E. coli* es enteropatógena es necesario conocer el serotipo completo (antígenos O, K y H) o, todavía mejor, determinar experimentalmente, por pruebas de laboratorio, si la cepa tiene factores de patogenicidad (Feng *et al.* 2009, Freitas *et al.* 2014).

Existen varias técnicas para determinar la capacidad invasora de una cepa de *E. coli*, entre ellas está constatar su capacidad para producir queratoconjuntivitis en el ojo de cobaya o su capacidad para invadir, *in vitro*, las células de la línea *HeLa*. También la detección inmunológica de proteínas específicas promotoras de la invasión, localizadas en la membrana externa de la cubierta Gram negativa. Las enterotoxinas ST o LT pueden detectarse por técnicas inmunológicas. Los genes codificantes de estos factores de patogenicidad, invasores y toxigénicos, pueden detectarse por técnicas genéticas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

2.1.5 *Escherichia coli* O157:H7

Es una de cientos de cepas de la *E. coli*. Aunque la mayoría de las cepas son inocuas y viven en los intestinos de los seres humanos y animales saludables, esta cepa produce una potente toxina y puede ocasionar enfermedades graves como el síndrome urémico hemolítico (SUH). Fue reconocida inicialmente, en forma definitiva, como causa de enfermedad, durante un brote de diarrea aguda con sangre en Estados Unidos. Se determinó que el brote se debía a hamburguesas contaminadas. La mayoría de las infecciones se dan al comer carne de vaca picada insuficientemente cocida (Galli 2012).

A diferencia de las demás cepas de *Escherichia coli*, la cepa O157:H7 no fermenta el sorbitol (el sorbitol es un polialcohol de azúcar, uno de los tres glúcidos --

sacarosa, almidón y sorbitol -- principales producidos en ciertas plantas Rosaceae y Plantaginaceae. Se encuentra, junto a la fructosa, la glucosa y la sacarosa, en peras, manzanas, cerezas y melocotones o duraznos). La cepa O157:H7 no crece a 44 °C y no produce β -glucoronidasa. La combinación de letras y números en el nombre de la bacteria se refiere a los marcadores antigénicos específicos que se encuentran en su superficie y la distingue de otros tipos de *E. coli*: El antígeno somático O, proveniente del lipopolisacárido de la pared celular, y el antígeno flagelar H, compuesto por 75 polisacáridos (Gilligan *et al.* 1992). No se conocen los factores de patogenicidad del grupo de *E. coli* enteropatógena clásica, por lo que la mayoría de laboratorios utilizan el serogrupo como método para detectarlos. ECEP clásica se adhiere íntimamente a los enterocitos, borrando las microvellosidades de estas células y este proceso se correlaciona estrechamente con la presencia del gen *eae* - que codifica la "intimina", que produce las lesiones en el enterocito - y con la Tinción Fluorescente de Actina, que permite observar la desorganización de la actina intracelular en el lugar donde la bacteria se adhiere a la célula. *E. coli* O157:H7 puede causar infecciones intestinales y extra intestinales generalmente graves, tales como infecciones del aparato excretor, vías urinarias, cistitis, uretritis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía. Los niños menores de 5 años de edad con problemas de alimentación, así como los ancianos son los más susceptibles de sufrir complicaciones graves (Blanco *et al.* 1993).

2.1.6 *Salmonella enteritidis* var. *Typhimurium*

Theobald Smith fue el descubridor de la bacteria de tipo real *Salmonella typhimurium* variedad Choleraesuis en 1885, pero el género *Salmonella* fue nombrada por Daniel Elmer Salmon, un patólogo veterinario norteamericano. El Dr. Salmon fue el administrador del programa de investigación del United States Department of Agriculture y, por lo tanto, el organismo fue nombrado en su honor. Smith y Salmon habían buscado, cada uno por su cuenta, la causa del cólera porcino y propusieron a este organismo como el agente causal. Investigaciones posteriores, sin embargo, mostrarían que el organismo, ahora conocido como *Salmonella typhimurium*, rara vez causa síntomas entéricos en cerdos. Ellos demostraron, finalmente, que las bacterias del género *Salmonella* son causa de otras enfermedades infecciosas importantes.

Salmonella enteritidis variedad Typhimurium (Kauffmann & Edwards 1952) Le Minor & Popoff (1987) (también llamada simplemente *Salmonella typhimurium*) se encuentra a menudo en pollos y sus huevos y en reptiles como las tortugas. Es un bacilo gramnegativo de la familia Enterobacteriaceae. La causa más común del envenenamiento de comida por especies de *Salmonella*. Su nombre se debe a que causa una enfermedad parecida a la fiebre tifoidea ocasionada por el bacilo de Eberth en ratones (Rodriguez *et al.* 1990).

En humanos, *S. typhimurium* no causa una enfermedad tan severa y, normalmente, no es fatal. La enfermedad se caracteriza por causar diarreas, dolores abdominales, vómitos y náuseas, y suele durar unos siete días, pero, en personas inmunocomprometidas, como ancianos, personas bajo tratamiento farmacológico, o con infecciones virales intensas, la infección por la *Salmonella typhimurium* termina siendo fatal si no se trata a tiempo con antibióticos (Tauxe 1997).

La salmonelosis por enterobacterias del género *Salmonella* comprende cuadros clínicos cuya principal manifestación es la gastroenteritis aguda, causadas por agua y alimentos contaminados, especialmente carnes. Son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos de la familia Enterobacteriaceae. Se encuentran asociados a la biota intestinal y, por ello, a aguas y alimentos que han contactado con material fecal. Producen grandes cantidades de gas durante la fermentación de azúcares, y fermentación ácido mixta, produciendo gran cantidad de productos ácidos y gases (Lesser & Miller 2006).

La salmonelosis se caracteriza por la aparición de escalofríos, cefalea, náuseas, anorexia, tos y diarrea o estreñimiento. La fiebre es prolongada y varía de 38,5 °C a 40 °C. Entre un 20 % y un 40 % de los casos presentan dolor abdominal. Algunas veces, se presentan hepatoesplenomegalia, epistaxis, bradicardia relativa, y delirios. La roseola tifoidea aparece en una semana y dura alrededor de 3 días. Son marcas máculo-pápulosas color salmón que, en un cultivo, serán

positivas para *Salmonella*. Durante la tercera y cuarta semana, sobre todo si no se trata la enfermedad, hay aparición de las perforaciones intestinales y las enterorragias. Menos habituales, pueden aparecer abscesos, endocarditis, osteomielitis, meningitis o hepatitis (Vaishnavi *et al.* 2005, Tacchini *et al.* 2010). Como se puede observar en el cuadro N° 4., las respuestas a las pruebas bioquímicas por parte de *Salmonella enteritidis* variedad tiphymurium incluyen la respuesta positiva a citrato, lo que permite considerar esta respuesta como presuntiva de la variedad antes de hacer una confirmativa de Tiphymurium.

Cuadro N° 4. Pruebas de tipificación para *Salmonella enteritidis* var. Tiphymurium

Agar TSI	Acido / alcalino
Urea	-
Citrato	+
Indol	-
Fenilalanina	-
ONPG	-
Lisina	+
Ornitina	+
Arginina	+
Sorbitol	-
Rafinosa	-
Ramnosa	+
Arabinosa	+

Manosa	+
Trehalosa	+
Adonitol	-
Sucrosa	-
Manitol	+
SH ₂	+

Se muestran los resultados obtenidos para una batería bioquímica aplicada a *Salmonella enteritidis* variedad Tiphymurium. Api 20 E (Biomérieux) (Tacchini et al. 2010)

2.1.7 Medios de cultivo

Para la selección de las especies bacterianas sospechosas, se siembran en una batería de medios de cultivo que se complementan en la confirmación de la especie. Estos medios se describen a continuación.

2.1.7.1 Infusión Cerebro Corazón (BHI)

La infusión cerebro-corazón resulta efectiva en el cultivo de una amplia variedad de microorganismos, incluidos muchos tipos de patógenos y para el pre enriquecimiento y enriquecimiento de muestras selectivas de algunos grupos como *Salmonella*. Es utilizado como medio base para las nuevas fórmulas de medios de cultivo cuando se suplementa con sangre o agentes selectivos. Se recomienda para bacteriología aerobia y para la recuperación primaria. Las

peptonas y la infusión son fuentes de nitrógeno orgánico, carbono, azufre, vitaminas y sustancias de traza (RENALOA 2011). La glucosa es la fuente de carbohidratos que los microorganismos utilizan mediante fermentación. Se utiliza fosfato disódico como tampón en el medio. La composición del medio incluye: Infusión de cerebro y corazón de (sólidos), digerido péptico de tejido animal, digerido pancreático de caseína, cloruro sódico, glucosa, fosfato disódico de hidrógeno, agar, pH $7,4 \pm 0,2$

2.1.7.2 Agar Macconkey

En el medio de cultivo Agar MacConkey, las peptonas aportan los aminoácidos necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, y la mezcla de sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de gran parte de la flora Gram positiva. Por fermentación de la lactosa, disminuye el pH alrededor de la colonia. Esto produce un viraje del color del indicador de pH (rojo neutro), la absorción en las colonias, y la precipitación de las sales biliares. Los microorganismos no fermentadores de lactosa producen colonias incoloras.

Para la preparación, se suspenden 50 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Se calienta la mezcla con agitación frecuente y se hierve 1 a 2 minutos hasta disolver completamente. Luego se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se debe hacer la siembra en superficie: inoculando directamente la muestra por estría, o en profundidad, se inocula una alícuota de la muestra directa o de su

dilución. La incubación se desarrolla en aerobiosis, a 35-37 °C durante 18-48 horas. Para la interpretación de los resultados se identifican los microorganismos fermentadores de lactosa como colonias rosadas - rojizas. Puede observarse halo de precipitación biliar. Los microorganismos no fermentadores de lactosa forman colonias del color del medio a incoloras (García & Mendoza 2014).

2.1.7.3 Agar Eosina-Azul De Metileno

Este medio se considera adecuado para la búsqueda y diferenciación de bacilos entéricos a partir de muestras clínicas, alimentos y otros materiales de importancia sanitaria (García & Mendoza 2014).

La fórmula original de este medio de cultivo fue modificada por Levine, quien eliminó la sacarosa e incrementó la concentración de lactosa, logrando así una mejor diferenciación de cepas de *Escherichia coli*. Es un medio selectivo y diferencial, adecuado para el crecimiento de Enterobacterias. En el medio de cultivo, la peptona es la fuente nutritiva y la lactosa es el hidrato de carbono fermentable. La combinación utilizada de eosina y azul de metileno, inhibe el desarrollo de microorganismos Gram positivos y de bacterias Gram negativas fastidiosas, y también, permite diferenciar bacterias fermentadoras y no fermentadoras de lactosa. El agar es el agente solidificante. Los microorganismos fermentadores de lactosa, originan colonias de color azulado-negro, con brillo metálico o mucosas. Las colonias producidas por microorganismos no

fermentadores de lactosa son in coloras (Vila *et al.* 2005, García & Mendoza 2014).

Enterococcus spp. crece en este medio como colonias puntiformes y transparentes, mientras que *Acinetobacter* spp. y otras bacterias oxidativas se observan como colonias de color azul lavanda; esto puede ocurrir, aunque las cepas no sean capaces de acidificar a partir de lactosa al 0.5 % y ello se debe a la incorporación de azul de metileno a sus membranas. En este medio se obtiene, además, un buen desarrollo de especies de *Salmonella* y *Shigella*. Los componentes del medio son: peptona, lactosa, fosfato di potásico, eosina, azul de metileno, agar, agua purificada, pH final: $7,1 \pm 0.2$

Colocar los frascos cerrados en baño maría y llevar a ebullición para fundir el medio de cultivo sólido contenido en los mismos. Una vez que se ha fundido el medio de cultivo, retirar cuidadosamente los frascos del baño maría y dejar enfriar.

Cuando alcanzan temperatura 45-50 °C, abrirlos y distribuir aproximadamente 15 ml en placas de Petri estériles. Medio de cultivo color púrpura vinoso. El color púrpura se restaura por agitación. La presencia de un precipitado en el medio esterilizado es normal y no debe ser removido, ya que es parte esencial del mismo (Vila *et al.* 2005, García & Mendoza 2014).

Los microorganismos fermentadores de lactosa se presentarán como colonias de color negro azulado o amarronado y pueden tener centro oscuro y brillo metálico.

Microorganismos no fermentadores de lactosa desarrollarán colonias del color del medio, incoloras.

2.1.7.4 Medio Xilosa-Lisina-Desoxicolato (Agar XLD)

De acuerdo con el instructivo del fabricante en el envase de agar XLD (Xilosa, Lisina, Desoxicolato: (Difco ® Co.) es un medio selectivo diferencial, utilizado para el aislamiento y diferenciación de patógenos entéricos Gram negativos, especialmente del género *Shigella*.

Su composición incluye: Xilosa 3,75 g; L- Lisina 5,0 g; Lactosa 7,5 g; Sacarosa 7,5 g; Cloruro de Sodio 5,0 g; Extracto de Levadura 3,0 g; Rojo Fenol 0,08 g; Desoxicolato de Sodio 2,5 g; Tiosulfato de Sodio 6,8 g; Citrato Férrico de Amonio 0,8 g; Agar 15,0 g; Agua destilada c.s.p. 1000 mL; pH final $7,4 \pm 0,2$

Para su preparación se suspenden 57 g de medio en un litro de agua destilada. Se mezclan vigorosamente, se calienta con agitación suave hasta que el medio llegue a ebullición. Debe evitar el sobrecalentamiento ya que puede provocar la precipitación del medio. Este medio NO se puede esterilizar por autoclave. Enfriar a una temperatura entre 45-50°C en un baño maría y verter en placas de Petri estériles.

La degradación de los carbohidratos presentes en el medio (xilosa, lactosa y sacarosa) genera la producción de ácido haciendo virar el indicador (rojo fenol) de

rojo a amarillo. En este medio se incorpora la xilosa porque es prácticamente fermentada por todas las enterobacterias con excepción del género *Shigella*.

La lisina se incluye para aumentar la diferenciación de los microorganismos pertenecientes al género *Salmonella* ya que, sin la lisina, *Salmonella* rápidamente fermenta la xilosa produciendo la acidificación del medio y no se pueden diferenciar de otras especies no patógenas. Como la cantidad de xilosa es limitada, una vez que lo consume, *Salmonella* comienza a utilizar la lisina lo cual produce la alcalinización del medio; este hecho se evidencia porque el rojo fenol nuevamente vira a un color rojo. En el caso de los coliformes lisina positiva, para prevenir la alcalización del medio por la utilización de la lisina, se incorpora en el medio un exceso de lactosa y sacarosa.

El medio también tiene la capacidad de detectar la producción de H_2S , a través del sistema indicador tiosulfato de sodio y citrato férrico de amonio. Cuando el microorganismo produce H_2S se observan colonias con el centro negro. Los microorganismos no patógenos productores de H_2S no descarboxilan la lisina, por lo que, cuando están presentes estos microorganismos, la reacción ácida producida por la utilización de los carbohidratos previene el ennegrecimiento de las colonias. El desoxicolato de sodio es utilizado como un inhibidor de los microorganismos Gram positivos.

Las colonias sospechosas de *Shigella* sobre el agar XLD son transparentes y parecen rojas por el color del medio. Este género bacteriano al no fermentar la xilosa, la lactosa, ni la sacarosa, no da lugar a que el rojo fenol vire a amarillo. Como estos microorganismos tampoco tienen la capacidad de alcalinizar el medio por la descarboxilación de la lisina, no se produce color rojo púrpura alrededor de las colonias. Las colonias típicas de la *Salmonella* son de color rojo con el centro negro debido a la producción de H₂S. Mientras que las de *E. coli* son grandes, amarillas con o sin precipitado de bilis.

2.1.7.5 Agar *Salmonella-Shigella*

Medio de cultivo selectivo y diferencial utilizado para el aislamiento de *Salmonella* spp. Y de algunas especies de *Shigella* spp. a partir de heces, alimentos y otros materiales en los cuales se sospeche su presencia.

La peptona y el extracto de carne aportan nutrientes para el desarrollo microbiano, mientras que las sales biliares y el verde brillante inhiben el desarrollo de una amplia variedad de bacterias Gram positivas, de la mayoría de los coliformes y el desarrollo invasor del *Proteus* spp. La lactosa es el hidrato de carbono fermentable. El tiosulfato de sodio permite la formación de H₂S que se evidencia por la formación de sulfuro de hierro. El rojo neutro es el indicador de pH. Los pocos microorganismos fermentadores de lactosa capaces de desarrollar, acidifican el medio haciendo virar al rojo el indicador de pH, desarrollando colonias

rosadas o rojas sobre un fondo rojizo. *Salmonella*, *Shigella* y otros microorganismos no fermentadores de lactosa, crecen adecuadamente en el medio de cultivo, y producen colonias transparentes.

La producción de ácido sulfhídrico se evidencia como colonias con centro negro debido a la formación de sulfuro de hierro. Para aumentar la selectividad, se recomienda incubar previamente la muestra en Selenito Caldo (RENALOA 2014) u otro medio como BHI.

Se suspenden 60 g del polvo en un litro de agua purificada. Calienta con agitación frecuente y se hierve por un minuto para disolución total. NO esterilizar en autoclave. Enfriar y distribuir en placas de Petri estériles. Sembrar estriando directamente la superficie del medio de cultivo e incubar en aerobiosis a 35-37 °C durante 18-24 horas.

Los microorganismos fermentadores de lactosa se ven como colonias rosadas o rojizas. Microorganismos no fermentadores de lactosa producirán, por su parte, colonias del color del medio, incoloras. Microorganismos productores de H₂S, colonias con centro negro (García & Mendoza 2014, Vila *et al.* 2005).

2.1.7.6 Agar Triple Azucar – Hierro (TSI)

Este es un medio universalmente empleado para la diferenciación de enterobacterias basándose en la capacidad de fermentar hidratos de carbono específicos: glucosa, lactosa y sacarosa, y la de producir ácido sulfhídrico (RENALOA 2014).

En el agar TSI, el extracto de carne y la peptona aportan los nutrientes adecuados para el desarrollo bacteriano. La lactosa (1.0 %), sacarosa (0.1 %) y glucosa (0.1 %) son los hidratos de carbono fermentables y el tiosulfato de sodio es el sustrato necesario para la producción de ácido sulfhídrico, el sulfato de hierro y amonio, es la fuente de iones Fe^{3+} los cuales se combinan con el ácido sulfhídrico y producen sulfuro de hierro, de color negro. El rojo de fenol es el indicador de pH, y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. Por fermentación de azúcares, se producen ácidos que se detectan por medio del indicador rojo de fenol, el cual vira al color amarillo en medio ácido. El tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro.

Para su uso, se suspenden 62.5 g del polvo en un litro de agua purificada. Dejar reposar 5 minutos. Se mezcla bien, se calienta con agitación frecuente hasta disolución total. Distribuir en tubos, llenándolos con un volumen que ocupe hasta

la tercera parte de los mismos. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos. Enfriar y dejar solidificar el agar en pico de flauta profundo.

A partir de un cultivo puro del microorganismo en estudio, inocular el medio de cultivo, picando el fondo y extendiendo sobre la superficie del mismo. Incubación en aerobios, a 35-37°C durante 18 a 24 horas.

Observar el color del medio de cultivo y la producción de gas.

- 1- Superficie alcalina/profundidad ácida (pico rojo/fondo amarillo): el microorganismo solamente fermenta la glucosa.
- 2- Superficie ácida/Profundidad ácida (pico amarillo/fondo amarillo): el microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa.
- 3- Superficie alcalina/Profundidad alcalina (pico rojo/fondo rojo): el microorganismo es no fermentador de azúcares.
- 4- La presencia de burbujas o la ruptura del medio de cultivo indican que el microorganismo produce gas.

En el caso de *E. coli*, el tubo se presenta con fermentación completa de los tres azúcares y con producción de gas. *Salmonella* se muestra alcalinizando el inclinado y el fondo ácido y con producción de ácido sulfhídrico.

Los resultados de la prueba deben ser leídos luego de 18 a 24 horas de incubación. Si la lectura se efectúa a tiempos menores pueden existir falsos

positivos por la presencia de acidez o la acidez generada no sea suficiente para producir el viraje del indicador rojo de fenol del color rojo al amarillo. Si se lee luego de 24 horas se pueden obtener resultados falsos negativos por consumo de peptonas durante el crecimiento de los microorganismos con la consecuente alcalinidad del medio de cultivo.

Si la generación de H_2S es elevada puede llevar al ennegrecimiento de todo el fondo del medio de cultivo y dificultar la visualización de la acidez producida. Es necesario aclarar que, para que se produzca H_2S , debe existir un ambiente ácido. Por eso, si no se observa, se debe considerar igualmente acidez positiva.

Para la siembra utilizar aguja de inoculación. No utilizar asas de inoculación ya que pueden llevar a resultados falsos positivos de producción de gas por alteraciones mecánicas del medio de cultivo (Vila *et al.* 2005, García & Mendoza 2014)

2.1.7.7 Agar Citrato

Se utiliza para la diferenciación de enterobacterias con base en la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono y energía. En el medio de cultivo, el fosfato monoamónico es la única fuente de nitrógeno y el citrato de sodio es la única fuente de carbono. Ambos componentes son necesarios para el desarrollo bacteriano. Las sales de fosfato forman un sistema buffer, el magnesio es cofactor

enzimático. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, el azul de bromotimol es el indicador de pH, que vira al color azul en medio alcalino y el agar es el agente solidificante. El medio de cultivo es diferencial con base en que los microorganismos capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono usan sales de amonio como única fuente de nitrógeno, con la consiguiente producción de alcalinidad. El metabolismo del citrato se realiza, en aquellas bacterias poseedoras de citrato permeasa. A través del ciclo del ácido tricarboxílico, el desdoblamiento del citrato genera progresivamente, oxalacetato y piruvato. Este último, en presencia de un medio alcalino, da origen a ácidos orgánicos que al ser utilizados como fuente de carbono, producen carbonatos y bicarbonatos alcalinos. El medio entonces vira al azul y esto es indicativo de la presencia de citrato permeasa.

El medio de cultivo recién preparado es de color verde. Se siembra por estrías en la superficie del medio de cultivo. Se lleva a incubación en aerobiosis a 35-37 °C durante 24-72 horas. Algunos microorganismos pueden requerir hasta 7 días de incubación, pero *S. enteritidis* variedad *typhimurium* da resultados positivos en 24 a 48 horas, virando el medio a azul (García & Mendoza 2014, Vila *et al.* 2005).

Interpretación de los resultados: positivo con crecimiento bacteriano con un intenso color azul en el pico de flauta. Negativo en ausencia de crecimiento y permanencia del color verde del medio de cultivo.

Importancia de los estudios de microorganismos contaminantes en alimentos y agua

Cualquier fruto u hortalizas pueden ser vehículo de bacterias, virus y parásitos patógenos al hombre. Existen casos de brotes registrados por muchas de ellas, en algunos casos es posible identificar la fuente de contaminación. Es de esperar que el conjunto de microorganismos de las hortalizas cultivadas en el campo se refleje la incidencia de microorganismos. Como señala Badaway y col. (1985) que es un indicativo de la calidad sanitaria de las fases de tratamiento y el estado microbiológico en el producto crudo en el momento de tratarlo.

Mecanismos de contaminación frutas y hortalizas



Badaway y col. (1985)

Algunos de los factores que pudieran considerarse de riesgos en la calidad microbiológica de los productos frescos incluyen el agua de riego contaminada con heces de humanos y animales, procesos inadecuados en los campos de cultivos,

condiciones inapropiadas durante empaque, higiene deficiente de los trabajadores y m al manejo durante almacenamiento y transporte .

La patología ligada a *Salmonella* agrupa un conjunto de enfermedades denominadas salmonelosis y éstas pueden manifestarse bajo dos aspectos esenciales: - Fiebres entéricas que engloban principalmente las fiebres tifoideas, causadas por *Salmonella typhi* y las fiebres paratifoideas, causadas por *Salmonella paratyphi* A, B o C y que suelen ser menos agresivas que las primeras. - Gastroenteritis que puede estar causada por muchos serotipos, siendo los más comunes en las fiebres no tifoideas *Salmonella typhimurium* y *Salmonella enteritidis*

Uno de los factores que más afecta al crecimiento de *Salmonella* es la actividad de agua. Se desarrollan bien a valores de a_w de 0.93 a 0.999 y pueden sobrevivir años en alimentos con baja (Elika, 2013). Las salmonelas presentan una cierta sensibilidad al calor y su resistencia suele ser muy rara. Este factor se ve influenciado por la actividad de agua (se incrementa cuando la actividad de agua del substrato se reduce), por la naturaleza de los solutos y el pH del medio, ya que si se reduce este último factor se reduce la resistencia al calor (Trepal i Quílez, 2002). Soportan un pH entre 3 y 9 con un óptimo de 7 a 7.5. La presencia de ciertos ácidos es importante para *Salmonella*, ya que algunos, como el ácido clorhídrico y el cítrico, permiten su crecimiento a pH cercanos a 4 y otros como el ácido acético, propiónico o butírico lo impiden a pH inferiores a 5. El potencial de

óxido-reducción también afecta al crecimiento del microorganismo ya que puede verse inhibido por potenciales de óxido-reducción inferiores a - 30mV (Trepatt i Quílez, 2002).

2.1.8 Importancia del control y medidas de prevención de estos patógenos en alimentos y agua

Salmonella, y *Escherichia coli enterohemorrágica* figuran entre los patógenos de transmisión alimentaria más comunes que afectan a millones de personas cada año, a veces con consecuencias graves o mortales.

Por la importancia de control y las medidas preventivas de estos patógenos en los alimentos y en el agua se deben tomar medidas, y estas que los empleados sobre el terreno conozcan los riesgos relacionados con la inocuidad de los alimentos por medio de programas de capacitación en el sitio y deberían tener acceso a instalaciones sanitarias para asegurar que los residuos humanos no entren en el huerto. Además examinar la calidad microbiológica del agua utilizada para el riego y se deben tener controles antes de la cosecha y durante ella para reducir la posibilidad de contaminación.

Al igual que en la mayor parte de los cultivos hortícolas, la aplicación de buenas prácticas agrícolas se considera importante para reducir la posibilidad de que los patógenos que se transmiten por los alimentos contaminen los cultivos. Dichas

prácticas deberían empezar con una evaluación específica de los riesgos de contaminación para el cultivo, tomando medidas de control en todas las etapas de la cadena alimentaria, desde la producción agropecuaria en la granja hasta la elaboración, fabricación y preparación de los alimentos en las cocinas tanto de establecimientos comerciales como de los hogares WHO (2017)

Sin embargo el abastecimiento de las agua puede reducirse usando agua lo más limpia posible y protegiéndola de la contaminación. Algunas medidas son:

Recoger agua de la fuente más limpia que tengan.

No permitir bañarse, lavar ni defecar cerca de la fuente.

Ubicar las letrinas deben estar ubicadas a más de 10 metros y siempre aguas abajo de la fuente.

Impedir que los animales se acerquen a las fuentes de agua protegidas.

Recoger y almacenar el agua en recipientes limpios; vaciarlos y enjuagarlos todos los días; mantener el recipiente de almacenamiento cubierto y no permitir que los niños o los animales beban de ellos.

CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODO

3.1.0 Descripción del área de estudio

3.1.1 Localización

Se llevaron a cabo cuatro recolecciones de muestras que incluyeron 29 puntos diferentes en la zona de producción de Tierras Altas (Cerro Punta). Se registraban las coordenadas geodésicas de cada punto de muestreo utilizando un posicionador global (dispositivo GPS) MAGELLAN® modelo Garmin, con seis metros de confiabilidad (Ver Fig. 7). Las coordenadas de los puntos de muestreo se indican en la fig. 8 a partir de los datos del cuadro N° 4.

Cuadro N° 5. Coordenadas de los sitios de muestreo en Tierras Altas

8° 51' 09", 82° 32' 22"	8° 51' 40", 82° 34' 07"	8° 52' 06", 82° 33' 25"	8° 51' 27", 82° 35' 05"
8° 51' 16", 82° 34' 36"	8° 51' 42", 82° 34' 30"	8° 52' 07", 82° 34' 26"	8° 51' 28", 82° 34' 39"
8° 51' 16", 82° 35' 35"	8° 51' 43", 82° 34' 24"	8° 52' 07", 82° 33' 53"	8° 51' 32", 82° 33' 24"
8° 51' 22", 82° 33' 43"	8° 51' 45", 82° 33' 44"	8° 52' 08", 82° 34' 18"	8° 51' 59", 82° 34' 45"
8° 51' 24", 82° 34' 15"	8° 51' 58", 82° 34' 35"	8° 52' 10", 82° 34' 41"	8° 52' 03", 82° 35' 20"
8° 51' 25", 82° 34' 49"	8° 51' 59", 82° 33' 42"	8° 52' 11", 82° 34' 57"	8° 52' 05", 82° 34' 45"
8° 51' 27", 82° 33' 57"	8° 51' 59", 82° 34' 07"	8° 52' 11", 82° 35' 03"	8° 52' 12", 82°

			34' 38"
			8° 52' 40", 82° 34' 59"

En el cuadro se presentan las coordenadas de cada uno de los puntos en los que se tomaron las muestras para los análisis para este estudio. Estas corresponden con los puntos marcados en el mapa de la figura 1.



Fuente : www.googlemap.com

Fig. 1. Se muestran la mayoría de los puntos de muestreo en la comunidad de Cerro Punta, distrito de Tierras Altas. Los puntos son señalados en naranja. El área de drenaje total de la Cuenca del Río Chiriquí Viejo es de 788 km², hasta Paso Canoas. La elevación promedio de la cuenca es de 920 MSNM, y el punto

más alto se localiza en Cerro Punta, en los linderos del Parque nacional Volcán Barú, ubicado al norte de la cuenca, con una elevación máxima de 2400 MSNM.

3.1.2 Características del suelo

El suelo de la región de tierras altas consiste, principalmente, de suelos volcánicos con vocación para la agricultura y la agroforestería. Pero se han utilizado para el pastoreo por muchos años.

3.1.3 Características del clima

Por los datos obtenidos de las estaciones y la elevación sobre el nivel del mar, se considera un clima agradable, pero con frecuentes lluvias, inclusive en la época seca, diferenciándose del resto de la vertiente del Pacífico, donde casi no llueve en la época seca.

Se tomaron como referencia las temperaturas obtenidas de la estación de Cerro Punta, la cual se calculó con base en la diferencia de elevación; las mismas se calcularon para el área de estudio y se muestran en el cuadro 5.

Cuadro N° 6. Temperatura máxima, mínima y media de la zona de muestreo e dos estaciones cercanas a la zona de estudio.

Temperaturas	Bajo Grande (2300 msnm)	Cerro Punta (1,830.00 msnm)
Máxima	19.3 (1999)	26.0
Mínima	10.4(1999)	10.6
Media	14.9(1999)	18.3

Los datos son tomados del boletín sección 121 de la serie clima de la Dirección General de ingresos. Contraloría General de la República. 2012.

3.1.4 Precipitación

Para analizar el régimen de lluvia en la región se tomaron dos estaciones, la de Cerro Punta y Bajo Grande, en Boquete, el período más crítico se da en los meses de mayo a octubre y son estas precipitaciones las que más afluirán a la cuenca de este río, la precipitación más alta se dio en los meses de mayo y octubre. En este sector se da un período seco más corto que en el resto del país, en la vertiente del Pacífico.

Tormenta máxima probable. Los meses de mayor probabilidad de tormenta se pueden dar desde el mes de mayo a octubre, que es cuando se han registrado las mayores precipitaciones.

Cuadro N° 7. Datos del clima: temperatura, humedad, evaporación, velocidad del viento en la zona de muestreo.

Temperatura												
Las temperaturas Máxima, Mínima y Promedio registradas por mes en la estación de Cerro Punta en el último registro, para 1999 fueron (en grados Celsius):												
	ene	feb	mar	abr	may	jun	jul	ago	sep	oct	nov	dic
Máxima	21.2	20.9	27.9	22.5	26.3	28.0	27.8	27.0	26.6	21.2	21.4	21.2
Mínima	6.0	6.5	10.7	6.8	10.8	12.1	13.2	12.0	11.7	10.5	9.9	9.4
Media	13.6	13.7	19.3	14.7	18.6	20.1	20.5	19.5	19.2	15.9	15.7	15.3
Humedad												
La humedad relativa registrada por mes en la estación de Cerro Punta expresada en porcentaje:												
Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	
3.3	3.5	4.6	4.7	4.4	3.9	3.1	5.8	3.0	4.4	3.5	2.5	
Velocidad del viento:												
La velocidad del viento registrada en la estación de Cerro Punta en el año 2003 (en metros por segundo) fue de:												
Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	
1.5	1.7	1.7	1.7	1.2	1.1	1.3	1.3	0.9	0.9	1.4	1.1	
Evaporación promedio												
El promedio de evaporación mensual (en milímetros) registrado en la estación de Cerro Punta fue de												
Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	
182	237	115	198	127	107	117	119	110	120	116	116	
Para los años 2002 y 2003, en la estación de Cerro Punta, la precipitación mensual fue como se muestra a continuación (en milímetros):												
Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Total
13.5	9.5	121.0	73.0	319.5	312.0	223.5	216.5	259.5	300	239	226.5	2313
Toda la información meteorológica fue tomada de: DIRECCION NACIONAL DE ESTADISTICA Y CENSO (Contraloría General De La República), Años 2002-03, Situación Física, Meteorología, Sección Clima.												

3.1.5 Selección de los sitios de muestreo

Los sitios de muestreo fueron seleccionados utilizando el criterio de disponibilidad del propietario del cultivo a permitir el muestreo, la accesibilidad al sitio mediante vehículo de tracción sencilla y la cercanía entre un punto y otro a fin de tomar varias muestras en una sola gira.

3.1.6 Recolecta y transporte de las muestras

Los repollos y lechugas se recolectaron en diferentes fincas del distrito de Tierras Altas en la provincia de Chiriquí. La recolección de los especímenes de trabajo se hizo de manera aleatoria, para garantizar la representatividad de las muestras. La unidad de análisis consistió en un repollo o una lechuga, dependiendo de cada caso, y fueron cosechados en campo por el personal de la empresa o por la autora utilizando guantes estériles para evitar la contaminación de las muestras (ver fig. 2)



Fig. 2. Se muestran diferentes momentos en el desarrollo de este estudio. En (a) se puede apreciar el campo de lechugas en el momento de la cosecha. En (b) un cultivo de repollos Xerox. En (c) el momento justo antes del desarrollo de las primeras pruebas.

Cada unidad de análisis fue puesta en una bolsa plástica estéril y colocada en una nevera portátil con hielo. Luego fueron transportadas al laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Universidad Autónoma de Chiriquí.

3.1.7 Preparación de la muestra

Las muestras se cortaron con una navaja estéril, se pesaron para obtener 25 g de las hojas. Posteriormente se colocaron en 275 ml agua peptonada estéril y otros 25 g de hojas en 275 ml de caldo Vassiliadis-Rappaport, o con caldo de cultivo BHI.

3.1.8 Cultivo de la muestra

Se utilizó el agua del lavado en tubos estériles e incubados por dos a cuatro horas para enriquecer la muestra, para potenciar el crecimiento de *Salmonella* y *E. coli*. (E. P. A. 2007). El contenido del tubo con caldo de enriquecimiento se sembró en medios como Agar Nutritivo, Agar Maconkey, Agar Eosina-Azúl de Metileno, medio Xilosa-Lisina-Desoxicolato, Agar *Salmonella-Shigella*, Agar Triple Azúcar-Hierro, Agar Citrato y en placas de análisis MicroScan. En un medio de agar nutritivo con 0.3 % de glutamato, se hizo un cultivo para verificar la presencia de *E. coli*, según Tsoraeva & Muñoz. (2005) (ver fig. 10). todas las muestras se incubaron a 37° C por un periodo de 24 horas.

3.1.9 Identificación de muestras

Para identificar las muestras (pasaporte) se tomó en cuenta las variables que serían, variedades de repollo o variedades de lechuga, sitio de identificación positiva de la presencia de las bacterias como en superficie o en la axila de la hoja, etc

La identificación y/o confirmación de las colonias presuntivas de *Salmonella* se realiza mediante pruebas bioquímicas que utilizan medios diferenciales como el agar nutritivo y el agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)., las colonias típicas de este microorganismo son rosadas, pudiendo presentar o no un centro negro debido a la producción de ácido sulfhídrico (H₂S) en agar XLD y verdosas o verde azuladas. En algunos casos son completamente negras. Simultáneamente, se puede llevar a cabo en medios como el agar triple hierro (TSI). Pruebas como urea, de producción de indol, crecimiento en caldo KCN, fermentación de dulcitol o la utilización del malonato de sodio también sirven como pruebas bioquímicas complementarias (González *et al.*, 2014). *E. coli* O157:H7 se determinó utilizando el Kit ELISA ECEH de BBL© o el Kit de identificación de 3M®.

3.10 Preservación de muestras

Las muestras positivas se colocaron en medios de preservación y se mantuvieron en frío a 4 °C como cepas Cas de referencia.



Fig. 3. En la figura se muestra el momento de la preparación de las muestras para los análisis microbiológicos. En a), el lavado de las muestras con caldo cerebro corazón para activación de las colonias bacterianas. En b), inoculación de los medios con las soluciones bacterianas.

CAPÍTULO IV
ANALISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.11 Identificación

Para determinar la ocurrencia de *Escherichia coli* 0157:H7 y *Salmonella enteritidis typhimurium* se analizaron un total de 12 muestras en repollo y 12 de lechuga, durante el año 2015- 2016. Las muestras estaban representadas por cinco variedades de lechuga y tres variedades de repollo. La mayor cantidad de muestras de lechuga fueron "romana" y las de repollo fueron variedad "Xerox". (ver Anexo Grafica N0. 13.)

Los métodos para el aislamiento de *E. coli typhimurium*, *Salmonella enteritidis typhimurium*, el aislamiento de las bacterias está dividido en tres etapas

1. Preenriquecimiento en medio no selectivo
2. Medio de enriquecimiento selectivo
3. Medios de cultivos selectivos y diferenciales

Con la utilización de pruebas como Agar Nutritivo, Agar Maconkey, Agar Eosina-Azúl de Metileno, medio Xilosa-Lisina-Desoxicolato, Agar *Salmonella-Shigella*, Agar Triple Azúcar-Hierro, Agar Citrato y en placas de análisis MicroScan , se logró identificar las bacterias *E. coli* y *Salmonella* y su distribución de acuerdo al periodo de muestreo Ver cuadro 8

Cuadro N° 8. Muestras recolectadas y resultados de las pruebas bioquímicas preliminares utilizadas para determinar la presencia de *E. coli* O157:H7 y *Salmonella enteritidis* tiphymurium

N	Especie y variedad	Fecha	XLD		ACKONKE		EMB		SORBITOL		TSI		Cit de Sim		Especie bacteriana
			Se	Ec	Se	Ec	Se	Ec	Se	Ec	Se	Ec	Se	Ec	
1	Lechuga Romana	14/09/15	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
2	Repollo xerox	14/09/15	n	p	n	p	n	p	p	P	n	p	n	n	<i>E. coli</i>
3	Lechuga híbrida	14/09/15	p	p	n	p	n	p	p	P	p	p	n	n	<i>E. coli, S. enteritidis</i>
4	Repollo xerox	14/09/15	n	p	n	p	n	p	n	P	n	p	n	n	<i>E. coli</i>
5	Lechuga Romana	14/09/15	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
6	Repollo Mejorado	21/09/15	n	p	n	p	n	p	n	P	n	p	n	n	<i>E. coli</i>
7	Lechuga Beluga	21/09/15	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
8	Repollo xerox	21/09/15	n	p	n	p	n	p	n	P	n	p	n	n	<i>E. coli</i>
9	Lechuga Beluga	21/09/15	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
10	Repollo xerox	21/09/15	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	p	n	
11	Repollo xerox	26/06/16	n	p	n	p	n	p	n	P	n	p	n	n	<i>E. coli</i>
12	Lechuga Beluga	27/06/16	n	p	n	p	n	p	n	p	n	p	n	n	<i>E. coli</i>
13	Lechuga iverna	28/06/16	p	p	n	p	n	p	p	P	p	p	n	n	<i>E. coli, S. enteritidis</i>
14	Lechuga romana	29/06/16	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	p	n	
15	Lechuga hoja de roble	30/06/16	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	p	n	
16	Lechuga beluga	01/07/16	n	p	n	p	n	p	n	P	n	p	p	n	<i>E. coli</i>
17	Repollo xerox	02/07/16	n	p	n	p	n	p	n	P	n	p	n	n	<i>E. coli</i>
18	Repollo lombarda	03/07/16	n	p	n	p	n	p	n	P	n	n	n	n	<i>E. coli</i>
19	Repollo xerox	04/07/16	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	p	n	
20	Repollo lombarda	05/07/16	n	p	n	p	n	p	p	P	p	p	n	n	<i>E. coli, S. enteritidis</i>
21	Repollo lombarda	25/07/16	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	p	n	
22	Lechuga hoja de roble	25/07/16	n	p	n	p	n	p	n	P	n	p	n	n	<i>E. coli</i>
23	Repollo xerox	25/07/16	n	p	n	p	n	p	n	P	n	p	n	n	<i>E. coli</i>
24	Lechuga iverna	25/07/16	n	n	n	n	p	n	n	n	n	n	n	n	

Se presentan los resultados de las pruebas bioquímicas a las que fueron sometidas las muestras de *Brassica* y *Latuca* recolectadas en la comunidad de Cerro Punta, distrito de Tierras Altas

En los mismos medios XLD, las colonias observadas en los platos, en la zona amarilla, nos indican como resultado, la presencia de *E. coli*, la cual es asumida

como objeto de búsqueda para la determinación de su condición de patogenicidad en otros medios indicadores (ver Fig. 4 y 5).

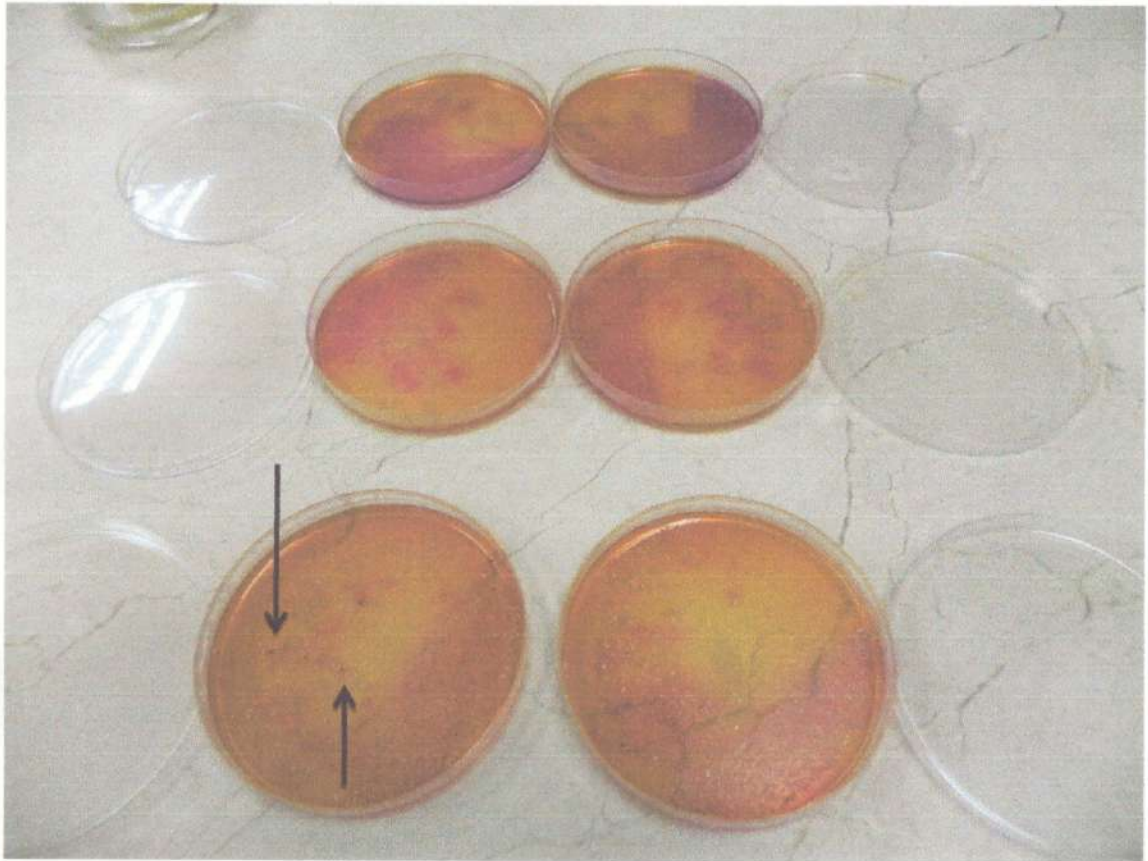


Fig. 4. Resultados de los cultivos del lavado de las muestras en el medio XLD. El patrón de respuestas para estos platos sugiere la presencia de *Shigella* (la cual no es parte de nuestros objetivos de búsqueda), *Escherichia coli* (las colonias en la zona amarilla) y *Salmonella* (caracterizada por las colonias con el punto negro señalado con la flecha). Las pruebas adicionales confirmarían o descartarían las especies diagnosticadas.

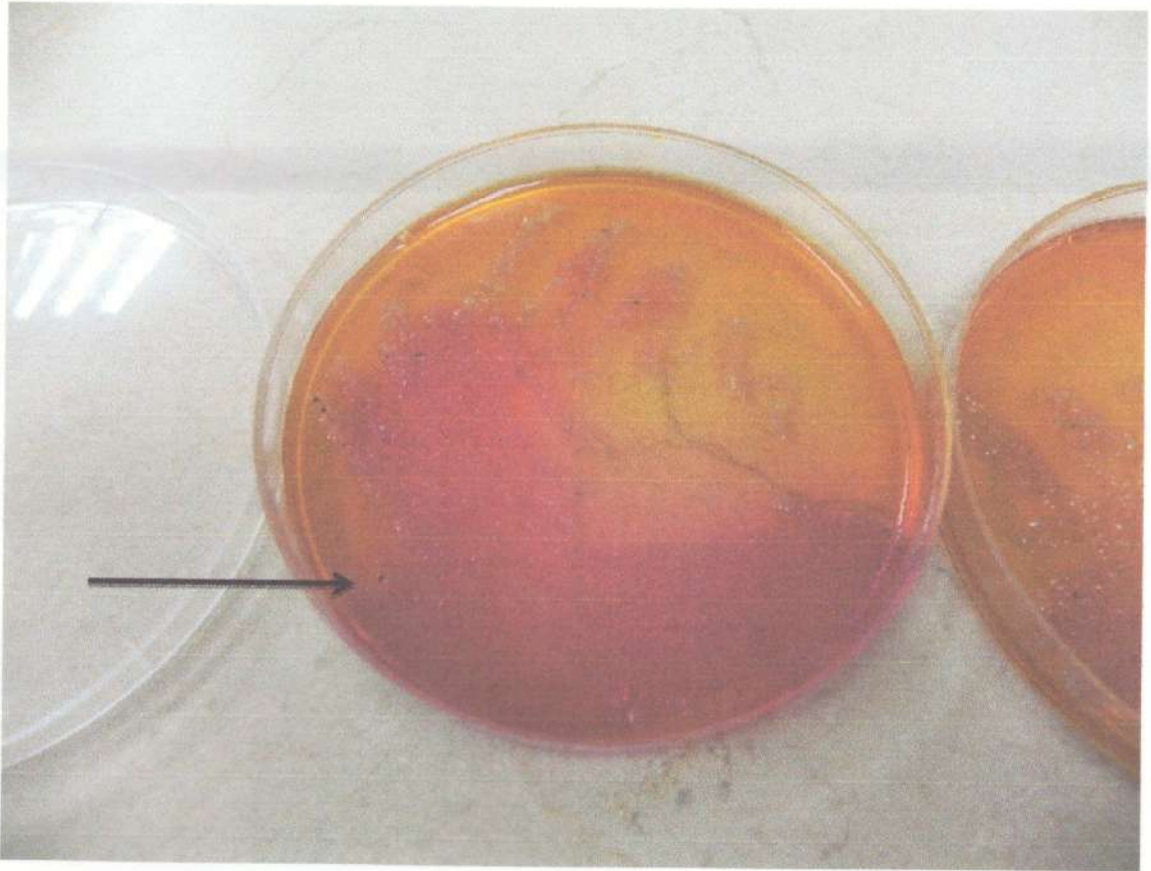


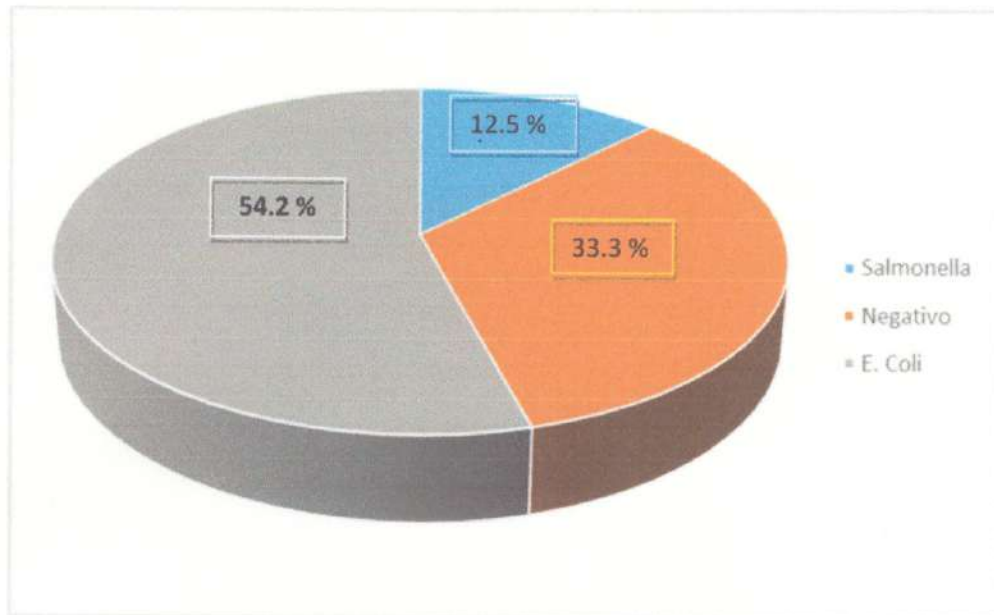
Fig. 5. Colonias, presuntamente, de *Salmonella* que serán confirmadas con otras pruebas. Los puntos negros en el medio XLD son un fuerte sugerente del género. se señalan con la flecha las colonias objetivo.

Cuadro 9. Número de muestras, de cada variedad, contaminadas con *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*

Hortalizas	Libres	Contaminados		Patógenos
		<i>E. coli</i>	Salmonella	<i>E. coli</i> 0157:H7 <i>Salmonella enteritidis</i> <i>tiphymurium</i>
Lechuga beluga	2	2	0	0
Lechuga hibrida	0	1	1	0
Lechuga hoja de roble	0	1	0	0
Lechuga iverna	1	1	1	0
Lechuga romana	3	0	0	0
Repollo lombardo	1	1	1	0
Repollo mejorado	0	1	0	0
Repollo xerox	2	6	0	0

En el cuadro se muestran los resultados de las pruebas de determinación de presencia de las especies bacterianas en las lechugas y repollos analizados. La columna "libres" se refiere al número de muestras que dieron negativo para ambas especies. La columna "contaminados" se refiere a las que dieron positiva la presencia de ambas especies simultáneamente. La columna "patógenos" se refiere a las variedades patógenas de las especies detectadas.

Figura 6 Resultado de las pruebas bioquímicas aplicadas a las muestras de repollo y lechuga durante el estudio



De las 24 muestras, trece dieron positivo para *Escherichia coli* representando un 54.2 %, 12.5 % dio positivo para *Salmonella* y un 33,3 % resultaron negativas. Esto valores nos indican que en su mayoría estas legumbres están contaminadas por microorganismos potencialmente patógenos. Resultados similares fueron encontrados por Heaton and Jones. (2007), que demostró la presencia de *E. coli* en muestras de lechuga, al igual que la presencia de especie de *Salmonella* fue en vegetales.

Los datos en el Cuadro N° 6 (ver cuadro) del clima de la zona objeto del estudio, nos permiten percatarnos del hecho las lluvias son bastante constantes en cuanto a la frecuencia durante los meses de la temporada lluviosa desde abril hasta fines de noviembre. La lluvia es menos frecuente durante la temporada seca que va

desde diciembre a marzo generalmente. La falta de lluvias y los niveles de evaporación, así como los otros factores ambientales presentados en el cuadro N° 6, explican la necesidad de riego constante durante estos meses.

La utilización de aguas residuales, de lluvia o de riachuelos (comentario de agricultor de la zona), puede ser un factor que contribuye a la contaminación de los cultivos con microorganismos patógenos

Temperatura

La temperatura es uno de los factores más relevantes en el crecimiento de los microorganismos- El factor ambiental que más afecta el desarrollo de los microorganismos, a pesar de que los microorganismos existentes son capaces de proliferar a diferentes intervalos. Desde -8° a $+90^{\circ}\text{C}$ ($17,6$ a 194°F), la temperatura óptima para casi todos los patógenos es 35°C (95°F). La temperatura puede afectar la duración de la fase latente, la velocidad de crecimiento, las exigencias nutricionales y la composición química y enzimática de las células de los microorganismos.

En los días de más baja precipitación, y con las temperaturas más elevadas de la estación seca (entre diciembre y marzo) los agricultores se ven forzados al uso de fuentes alternas de irrigación, aumentando la posibilidad de que estas lleven consigo los microorganismos provenientes de desechos humanos o de animales (ver el cuadro 6). Factores ambientales, como radiación, humedad relativa, etc,

pueden determinar el uso de otras estrategias por parte de los cultivadores, pero no se pueden vincular con seguridad a los resultados de este estudio.

4.2 Presencia de *E. coli* y *Salmonella enteritidis* en repollo y lechuga

En Panamá no se han reportado brotes de infección por *Escherichia coli* O157:H7, pero el género *Salmonella* ha sido relacionado con varios brotes e incluso hay un serotipo relacionado con brotes de diarrea, desordenes respiratorios y meningitis en territorio de Los Estados Unidos y Taiwán (Then - Li *et al.* 2005, Heysell *et al.* 2008, CDC 2011). La existencia de una variedad reconocida de *Salmonella* serotipo implica que su presencia en nuestro territorio deberá ser vigilada tanto como sea posible. Se observa que 15 muestras de lechuga y repollo (cuadro 8), dieron positivas para las especies buscadas, pero no para los serotipos patógenos, aunque se han dado brotes en muchos lugares por contaminación de productos de hortalizas con *E. coli* enterohemorrágica y *Salmonella* serotipo tiphymurium, así como de otras especies de patógenos (Rincón *et al.* 2010, Barrantes & Achí 2011, Puig *et al.* 2014, Rodríguez *et al.* 2015). Esto puede deberse a los mecanismos de control de patógenos ejercidos por las autoridades panameñas encargadas de llevar a cabo los controles de ingreso de los productos desde el exterior.

El monitoreo con procedimientos serológicos y moleculares constante en busca de microorganismos patógenos es costoso para ser desarrollado de rutina. La utilización de una batería bioquímica permite aumentar el número de muestreos y

hace sostenibles los procedimientos de monitoreo al azar. El único problema es el acceso de los laboratorios no gubernamentales a los patrones de control positivo a fin de verificar la efectividad de los procedimientos, pero este es un obstáculo a veces salvable a través de las vías legales administrativas.

CAPÍTULO V
CONSIDERACIONES FINALES

5.1 Conclusiones

- Actualmente, no hay contaminación con bacterias de las especies *Escherichia coli* O157:H7 ni con *Salmonella enteritidis* variedad tiphymurium en los cultivos de *Brassica oleracea* y *Latuca sativa* de la comunidad de Cerro Punta, en el distrito de Tierras Altas, Chiriquí, Panamá.
- Que los productos de estos cultivos no salen contaminados con especies de patógenos de las áreas de cultivo.
- La presencia de *E. coli* y *Salmonella* sp. es un indicativo de la necesidad de un mayor control de microorganismos contaminantes que pueden afectar la salud del consumidor.
- La revisión bibliográfica sugiere que el riesgo de contaminación y la consecuente generación de brotes infecciosos debido a las condiciones de trabajo en los campos donde estos son desarrollados es elevada.
- Existe una constante vigilancia, por parte de los comerciantes distribuidores de los productos, exigiendo la inocuidad de los productos para sacarlos al mercado.
- La estrategia de monitoreo por muestreo al azar y evaluación de tamizaje por batería bioquímica tiene resultados aceptables y sostenibles para el objetivo de aumentar la bioseguridad en los productos que se van a utilizar para la venta y consumo local.

5.2 Recomendaciones

A partir de la información generada y compilada en esta investigación, podemos hacer las siguientes recomendaciones:

- Establecer una zonación experimental de las áreas de producción de las hortalizas de más alto riesgo de contaminarse con bacterias patógenas y hacer un plan de muestreo regular de análisis microbiológico utilizando la estrategia de tamizaje por baterías bioquímicas a fin de abaratar los costos del análisis.
- Entablar un convenio entre las instituciones de salud y las universidades como la UNACHI a fin de colaborar en la tarea de desarrollar el plan de análisis de monitoreo incluyendo una reserva de positivo patrón para el control de calidad de los análisis.
- Promover la elaboración de tesis patrocinadas basadas en análisis moleculares y serológicos en búsqueda de los patógenos principales, de manera que se mantenga una base de datos de distribución para la comparación de los resultados de la estrategia de tamizaje bioquímico en comparación con los resultados de análisis utilizando técnicas más avanzadas, pero más costosas.
- Elaborar un programa de salud ocupacional, en el cual se cuente con actividades de: formación y capacitación a trabajadores, sobre los riesgos potenciales en su sitio de trabajo, Las capacitaciones se deben realizar con una empresa certificada.

- Tener acceso a instalaciones sanitarias para asegurar que los residuos humanos no entren en el huerto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ateba C. N. & C. C. Bezuidenhout** (2008) Characterization of *Escherichia coli* H7:O157 strains from humans, cattle and pigs in the North-West Province, South Africa. *Int J Food Microbiol.* 2008;128(2):181-8.
- Avalos C. Y. & F. Santacruz.** (2009). *Determinación de contaminantes microbiológicos en las ensaladas frescas que se comercializan en establecimientos de comida rápida del distrito dos de la zona metropolitana de San Salvador.* Trabajo de graduación para optar por el título de Licenciado en Química y Farmacia. 126 págs. Universidad De El Salvador.
- Balcaza L.** (1997). *Hortalizas de hoja: La fertilización de cultivos y pasturas.* Editorial Hemisferio Sur. España. p. 207-210.
- Baloda S., L. Christensen & S. Trajcevska.** (2001). *Persistence of a Salmonella entérica serovar Typhimurium DT12 clone in a piggery and in agricultural soil amended with Salmonella-contaminated slurry.* *Appl Environ Microbiol.* 67:2859-2862
- Barrantes K. & R. Achí.** (2011). *Calidad microbiológica y análisis de patógenos (Shigella y Salmonella) en lechuga.* *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* (31)1. versión impresa ISSN 1315-2556
- Blanco J, M. Blanco, J. E. Blanco, M. P. Alonso & A. Escribano.** (1993) *Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico de las infecciones producidas por Escherichia coli enterohemorrágicos productores de verotoxinas.* *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1993; 11: 324-334.

- Bray J.** (1945). *Isolation of antigenically homogeneous strains of Bacterium coli neapolitanum from summer diarrhoea of infants.* J Pathol. 57:239-247.
- Bray J & T. E. D. Beavan.** (1948). *Slide agglutination of Bacterium coli in summer diarrhoea.* J Pathol. 60:395-401.
- CCI - Corporación Colombia Internacional.** (2006). *Perfil productivo de las hortalizas.* Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá. Colombia.
- Cecilio A. B., R. Luiz, J. C. Caetano & J. W. Mendoza.** (2011). *Crecimiento y producción de repollo en función de la densidad de población y nitrógeno.* Agrociencia vol.45 no.5 México. Versión impresa ISSN 1405-3195
- Center for Disease Control and Prevention (CDC)** (2011) *Multistate Outbreak of Salmonella Panama Infections Linked to Cantaloupe* (Final Update)
- Centre For Food Security And Public Health.** (2010). *E. coli enterohemorrágica.* 12 págs.
- Celis J., M. Sandoval, E. Zagal & M. Briones.** (2006). *Efecto de la adición de biosólidos urbanos y de salmonicultura sobre la germinación de semillas de lechuga (Lactuca sativa L.) en un suelo patagónico.* R.C. Suelo Nutr. Veg. 6 (3) 2006 (13-25). <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-27912006000300002>
- Chang J. & T. Fang.** (2007). *Survival of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella enterica serovars Typhimurium in iceberg lettuce and the antimicrobial effect of rice vinegar against E. coli O157:H7.* Food Microbiol. 03:(005):2-7.
- Colom M. & R. Pons.** (2003). *El cultivo de la lechuga en Mallorca.* España, Govern De Les Illes Balears. p. 20-52.

- Dárraga A., R. D. C. Ortiz, R. Callejas & M. Merello.** (2011). *Flora de Antioquia. Catálogo de las Plantas Vasculares*, vol. 2. Listado de las Plantas Vasculares del Departamento de Antioquia. Págs. 1 – 939.
- E. P.A. - Environmental Protection Agency.** (2007). *Method 1682: Salmonella in Sewage Sludge (Biosolids) by Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) Medium*. Disponible en línea en el sitio de consulta: <http://www.epa.gov/waterscience/methods/biosolids/EPA.Method.1682>; 2006.
- Ewing W. H. & W. J. Martin.** (1980). *Enterobacteriaceae Manual of clinical microbiology*. Editors 2nd ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C., USA, p. 207.
- Feng P., S. D. Weagant & M. A. Grant.** (2009). *Enumeration of Escherichia coli and the coliform bacteria. [Database on the Internet]* In: *Bacteriological Analytical Manual online*. Food and Drug Administration (FDA). c 2002 [updated 2009 Apr. 11]. Available from <http://www.cfsan.fda.gov/>.
- Flora of North America Editorial Committee.** (2006). *Magnoliophyta: Asteridae, part 6: Asteraceae*. Part 1. 19: 1 - 24. In *Fl. N. Amer.* Oxford University Press, New York.
- Franz E., A. Van Diepeningen, O. J. De Vos & A. H. C. Van Bruggen.** (2005). *The effect of cattle feeding regime and soil management type on the fate of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella enterica serovar Typhimurium in manure, manure-amended soil and lettuce*. *Appl Environ Microbiol.* 71:6165-6174.
- Freitas E. G., M. R. A. Ferreira, J. F. N. Pinto, F. R. Conceição & C. N. Moreira.** (2014). *Escherichia coli enterohemorrágica O157: H7 em bovinos leiteiros*

saudáveis no Centro-Oeste do Brasil: ocorrência e caracterização molecular. *Pesq. Vet. Bras.* vol.34 no.1. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2014000100004>. Print version ISSN 0100-736X.

Galli L. (2012). *Estudio de los factores de adherencia de cepas de Escherichia Coli productoras de toxina Shiga aisladas de bovinos.* p. 119. Consultado el 3 de feb. de 2015.

García P. & A. Mendoza. (2014). *Pruebas bioquímicas tradicionales y de alta resolución para identificación manual de enterobacterias.* *Acta Bioquímica clínica latinoamericana.* Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires. 48(2):249-254.

Gilligan P. H., J. M. Janda, M. A. Karmali & J. M. Miller. (1992). *Cumitech 12A, Laboratory diagnosis of bacterial diarrhea.* Coordinating ed, Nolte FS. Washington DC. American Society for Microbiology.

Girard E. & J. Osorio. (1980). *Generalidades de la producción de repollo en Colombia.* Hortalizas. Manual de Asistencia Técnica. No. 28 ICA Bogotá. 25p.

Griffin P. M., R. V. (1991) Tauxe. *The epidemiology of infections caused by Escherichia coli O157:H7, other enterohemorrhagic E. coli, and the associated hemolytic uremic syndrome.* *Epidemiol Rev.* 13:60-98

Heaton J. C. and K. Jones. (2007). Microbial contamination of fruits and Vegetables and behavior of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *J. Appl. Microbiol.* 104:613- 626.

- Heysell S. K, T. A. Thomas, A. R. Morrison & M. Barry.** (2008). *Salmonella panama and Acute Respiratory Distress Syndrome in a Traveler Taking a Proton Pump Inhibitor.* Journal of Travel Medicine. 15 (6):460-463
- Hitchcock P. J. & T. M. Brown.** (1983). *Morphological heterogeneity among Salmonella lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels.* J Bacteriol. 154(1): 269-77.
- IICA. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.** (1999). *Análisis de la producción consumo de hortalizas en Panamá.* Red Colaborativa de Investigación y Desarrollo de las Hortalizas para América Central. Panamá – República Dominicana. Pág. 9.
- Instituto Nacional de Estadística y Censo (INEC) Contraloría General de la República de Panamá.** (2012). *Promedio anual de los precios recibidos por el productor agropecuario de papa, cebolla, repollo, zanahoria, lechuga americana, sorgo y caña de azúcar en la república, por finca y plaza, según provincia: años 2011-12.*
- Kaper J. B.,** (1994) *Molecular pathogenics of enteropathogenic E. coli.* En: Miller V. L., J. B. Kaper, D. A. Portnoy & R. R. Isberg eds. *Molecular genetics of bacterial pathogenesis.* Washington DC: ASM Press. Págs. 173-195.
- Koch M.** (2003) *Molecular phylogenetics, evolution and population biology in Brassicaceae.* In: Sharma A. K. & A. Sharma (eds.) *Plant genome: biodiversity and evolution.* Vol. 1a (Phanerogams). Science Publishers, Enfield, N. H. USA, pp. 1-35.

- Lennette E. H., Spaulding & J. P. Traunt.** (1980). *Enterobacteriaceas Manual of clinical microbiology*. Edition 2nd. American Society for Microbiology. Washington, D.C., USA, p. 207.
- Lesser C. F. & S. I. Miller.** (2006). *Salmonellosis*. En Harrison G. (2006). Ed. *Principios de medicina interna*. McGraw-Hill Interamericana
- Levine M. M., E. J. Bergquist, D. R. Nalin, D. H. Waterman, R. B. Hornick & C. R. Young.** (1978). *Escherichia coli strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive*. Lancet 1978; 1:1119-1122.
- Levine M. M.** (1987). *Escherichia coli that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent*. J Infect Dis 1987; 155:377-389.
- MacFaddin J. F.** (1976). *Biochemical test for Identification of Medical Bacteria*. The Williams & Wilkins Co. Baltimore, USA.
- MacFaddin J. F.** (1980). *Biochemical test for identification of Medical Bacteria*. USA, pp. 220-226.
- Ministerio de Salud, Red Nacional de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos de Argentina.** (2011). *Análisis microbiológico de los alimentos. Metodología analítica oficial. Microorganismos patógenos. Volumen 1*. 175 págs.
- Mujica Y., M. Martínez, J. Alemán & J. Ravelo.** (2009). *Fluctuación poblacional de plagas de la col (Brassica oleracea) y otros enemigos naturales en dos agroecosistemas*. Cultrop v.30 n.4 La Habana. Versión ISSN 0258-5936

Muñoz S., M. Vilca, D. Ramos & J. Lucas. (2013). *Frecuencia de enterobacterias en verduras frescas de consumo crudo expandidas en cuatro mercados de Lima, Perú.* Rev. Investig. vet. Perú vol.24 no.3 Lima ago. 2013. versión impresa ISSN 1609-9117

Oliveira Y., R. Comastri, A. G. Guimarães & P. F. Almeida. (2006). *Hygienic-sanitary quality of vegetables and evaluation of treatments for the elimination of indigenous E. coli and E. coli O157:H7 from the surface of leaves of lettuce (Lactuca sativa L.).* Ciênc. Technol. Aliment. vol.30 no.4 Campinas Oct./Dec. 2010. Print version ISSN 0101-2061. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612010000400038>

Ongeng D.1., C. Muyanja, J. Ryckeboer, A. H. Geeraerd & D. Springael. (2001). *Rhizosphere effect on survival of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella enterica serovar Typhimurium in manure-amended soil during cabbage (Brassica oleracea) cultivation under tropical field conditions in Sub-Saharan Africa.* Int J Food Microbiol. 15;149(2):133-42. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.06.009. Epub 2011 Jun 25.

Pérez E., P. Aguiar, R. Salvatella, A. Ribetto & A. Castro. (2004). *Vigilancia de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA): su importancia en la caracterización de riesgos.* Asociación Argentina de Microbiología. Disponible en: www.aam.org.ar/actividades/T_ETAs.pdf.

Puig Y., V. Leyva, A. Rodríguez, J. Carrera, P L. Molejón, Y. Pérez & O. Dueñas. (2014) *Calidad microbiológica de las hortalizas y factores asociados a la*

contaminación en áreas de cultivo en La Habana. Rev haban cienc méd (13)1.

Versión On-line ISSN 1729-519X

Rincón G., M. Ginestre, S. Romero, M. Castellano & Y. Ávila. (2010). *Calidad microbiológica y bacterias enteropatógenas en vegetales tipo hoja.* Kasmera (38)2

versión impresa ISSN 0075-5222

Rodríguez D. C., R. V. Tauxe & B. Rowe. (1990). *International increase in Salmonella enteritidis: A new pandemic?* Epidemiol Infect 105:21-27.

Rodríguez D. M., F. E. Torres, E. V. Gutiérrez, M. P. López, M. M. Martínez & A. K. Carrascal. (2008). *Determinación de Salmonella typhimurium en compost inoculado artificialmente en un cultivo de lechuga.* Acta Biol. Col. Vol. 12. Núm. 3. 61 – 72

Rodríguez M., M. E. Zapata, M. A. Solano, D. Lozano, F. Torrico, M. C. Torrico. (2015). *Evaluación de la contaminación microbiológica de la lechuga (lactuca sativa) en la cadena alimentaria, provincia de Quillacollo, Cochabamba, Bolivia.* Gac Med Bol (38)2 versión On-line ISSN 1012-2966

Sambrook J., E. F. Fritsch & T. Maniatis. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual.* 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press. 25-32.

Surette M. G. & B. L. Bassler. (1998). *Quorum sensing in Escherichia coli and Salmonella typhimurium.* Proc Natl Acad Sci U S A. Jun 9;95(12):7046-50.

Tacchini M. D. M., A. Caraffini, M. S. Montamat, N. Spitale, Y. Bosio & A. Minguez (2010). *Empidema causado por Salmonella typhimurium.* Rev Chil Enferm Respir. 26(2): 91-94. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-73482010000200004>. ISSN 0717-7348

- Tannock G. W.** (1995). *Normal Microflora*. London. Chapman and Hall editores. 654 págs.
- Tauxe R. V.** (1997). *Emerging foodborne diseases and envolving public health challenge*. *Emerg Infect Dis.* (3)4:425-434
- Te-Li C., T. Peck-Foong, L. Shu-Chin, F. Chang-Phone & L. K. Siu.** (2005). *First Report of Salmonella enterica Serotype Panama Meningitis Associated with Consumption of Contaminated Breast Milk by a Neonate*. *Journal Of Clinical Microbiology*. Print ISSN: 0095-1137. Online ISSN: 1098-660X American Society for Microbiology
- Tsoraeva A. & J. L. Muñoz.** (2005). Aplicación de la prueba rápida de glutamato descarboxilasa para la confirmación de *Escherichia coli* aisladas a partir de muestras clínicas. *Rev Cubana Med Trop* v.57 n.3. Versión On-line ISSN 1561-3054.
- Tijerino A., M. T. Acuña, L. M. Sánchez & J. Cascante.** (2005). *Vigilancia de laboratorio de Salmonella en alimentos de consumo humano o animal*. Centro Nacional de Referencia en Bacteriología, Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA) y LANASEVE, Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), Costa Rica. (Sin publicar)).
- Uva R. H., J. C. Neal & J. M. Ditomaso.** (1997) *Weeds of The Northeast*, (Ithaca, NY: Cornell University Press, 1997), Págs. 176 - 177.
- Vaishnavi C., R. Kochhar, G. Singh, S. Kumar, S. Singh, K. Singh.** (2005). *Epidemiology of typhoid carriers among blood donors and patients with biliary, gastrointestinal and other related diseases*. *Microbial Immunol* 49: 107-12.

Varela G., F. Schelotto, T. País, M. C. Pérez, L. Dell'Acqua & E. Zanetta. (1991). *Diarrea con sangre y síndrome urémico hemolítico en Montevideo, Uruguay.* Congreso Latinoamericano de Microbiología, 11. Buenos Aires.

Vila J. L., A. Lanza, P. Bonvehi, J. Nazar, & A. Mikietuk. (2005). *Utilidad del sistema VITEK en la identificación bacteriana y estudios de sensibilidad antimicrobiana.* Acta Bioquím Clín Latinoam. 39(1):19-25.

Vázquez Aguilar L. E.; Fernández Escartín E.; Arias Rios E. V. (2008) Incidencia de *enterobacteriaceae*, *Echerichia coli* y *Salmonella* en pepino colectado durante la precosecha y poscosecha Universidad Autónoma de Querétaro

WHO. (2011., 2017) *E. coli enterohemorrágica (EHEC)*, OMS Publishing

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/>

<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/166083/1/9789275329276.pdf?ua=1>

<http://ucfoodsafety.ucdavis.edu/files/163175.pdf>

<http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/simmonscitagar.htm>

ANEXO

Glosario

Enterobacterias productoras de verotoxinas: enterobacterias patógenos cuya patogenicidad está asociada a la producción de verotoxinas (con toxicidad hacia las células Vero en laboratorio). Entre ellas, pueden señalarse a diferentes serotipos de *Shigella* y de *Escherichia coli* patógenos.

Escherichia coli: Las bacterias de la especie *E. coli* son representantes de la familia Enterobacteriaceae, habitantes normales de la flora intestinal del mamífero adulto. Las cepas de *E. coli* se pueden diferenciar serológicamente unas de otras en base a los antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K). Si bien las bacterias *Escherichia coli* se consideran apatógenas y se utilizan como indicadores de contaminación fecal, existen cepas que sí son patógenos.

Escherichia coli patógenos: constituye entre los patógenos bacterianos productores de enfermedad diarreica aguda el más comúnmente aislado, provoca alrededor de 40 a 50 % de estas enfermedades. Las cepas de *Escherichia coli* asociadas con procesos diarreicos se clasifican en 5 categorías: enteropatógenos (EPEC), enterotoxigénico (ETEC), enteroinvasivo (EIEC), enteroadherente (EAEC) y productor de toxina Shiga (STEC).

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC): patógenos, relacionados con brotes de colitis hemorrágica en seres humanos. De acuerdo a diferentes nomenclaturas que consideran factores patogénicos o clínicos, este grupo también se denomina *E. coli* productor de toxinas tipo Shiga o verotoxinas (STEC o VTEC) o bien *E. coli* enterohemorrágico (EHEC, por sus iniciales en inglés) concepto que

se refiere a aquellas cepas que causan enfermedad en el hombre. La patogenicidad de las STEC está asociada a la producción de toxinas Shiga (Stx 1 y Stx 2, ambas con toxicidad hacia las células Vero en laboratorio) y a la presencia de factores de adherencia, de fijación y de destrucción de los enterocitos del huésped.

Serotipo: se denomina así a una variedad distintiva dentro de una especie bacteriana que se define por sus reacciones antigénicas in vitro.

Síndrome Urémico Hemolítico (SUH): Se denomina así al síndrome caracterizado por anemia hemolítica microangiopática, plaquetopenia, signos y síntomas de agresión multiparenquimatosa con localización preferente en riñón, tubo digestivo y sistema nervioso. Se ha descrito una fuerte relación entre SUH y la infección por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. Esta es la causa más frecuente en nuestro país. Existen, sin embargo, otras causas como por ejemplo: infecciones por *Shigella dysenteriae* tipo 1, *Salmonella typhi*, *Campilobacter jejuni*, Echovirus, Rotavirus; formas genéticas; asociado a drogas como anticonceptivos orales o ciclosporina A; asociado a trastornos del metabolismo de la cianocobalamina.

El SUH constituye la causa más frecuente de insuficiencia renal aguda en Argentina en pacientes pediátricos.

STEC: siglas para designar a las cepas de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (por sus iniciales en inglés: Shigatoxin-forming *Escherichia coli*)

ICMSF: International Commission on Microbiological Specifications for Foods

Fig. 7. Repollo de la variedad cero cultivado en una de las fincas donde se desarrolló el estudio. La foto fue tomada justo antes de cortarlo para trasladarlo al laboratorio



Fig. 8. Repollo utilizado para la realización de las pruebas microbiológicas. La muestra corresponde a un *Brassica oleracea* variedad *capitata*, llamado híbrido por los agricultores de tierras altas. La foto se tomó luego de hacer el lavado para los cultivos



Fig. 9 Lechuga de la variedad beluga. Una muestra de las recolectadas para las pruebas microbiológicas en una de las fincas donde se desarrolló el estudio. La foto fue tomada luego del lavado para los cultivos.



Fig. 10. Lechuga de la variedad romana. Una muestra de las recolectadas para las pruebas microbiológicas en una de las fincas donde se desarrolló el estudio. Foto tomada luego de hacer el lavado para los cultivos microbiológicos



Fig. 11. Se muestra el esquema general del proceso de identificación de las especies bacterianas para saber si corresponden con las especies objetivo del estudio

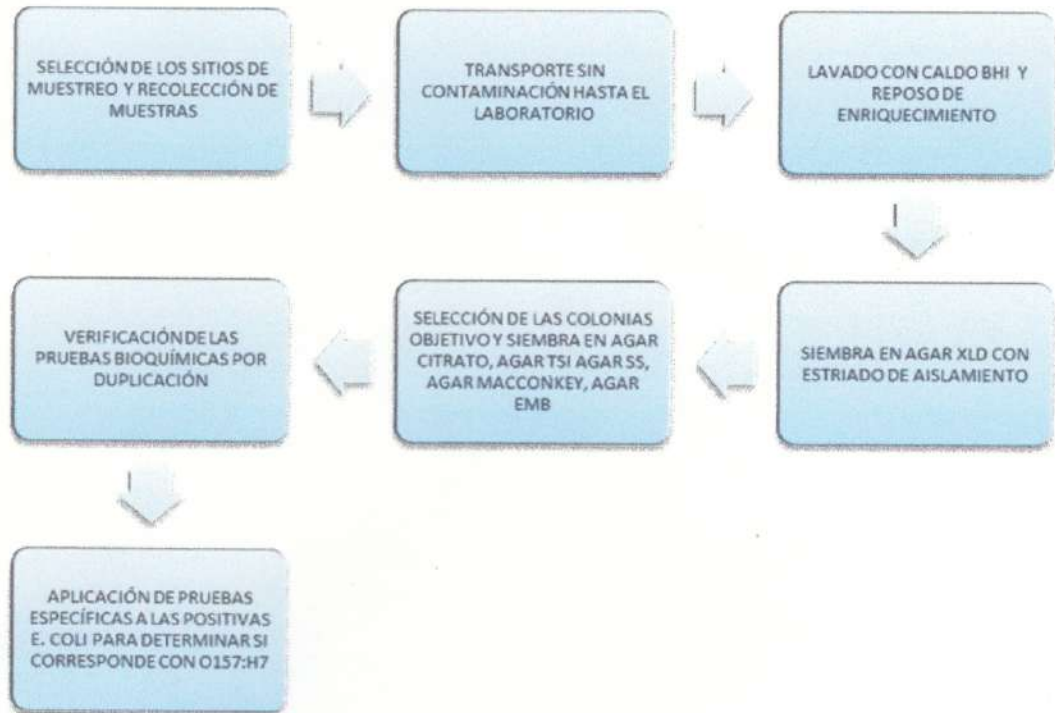
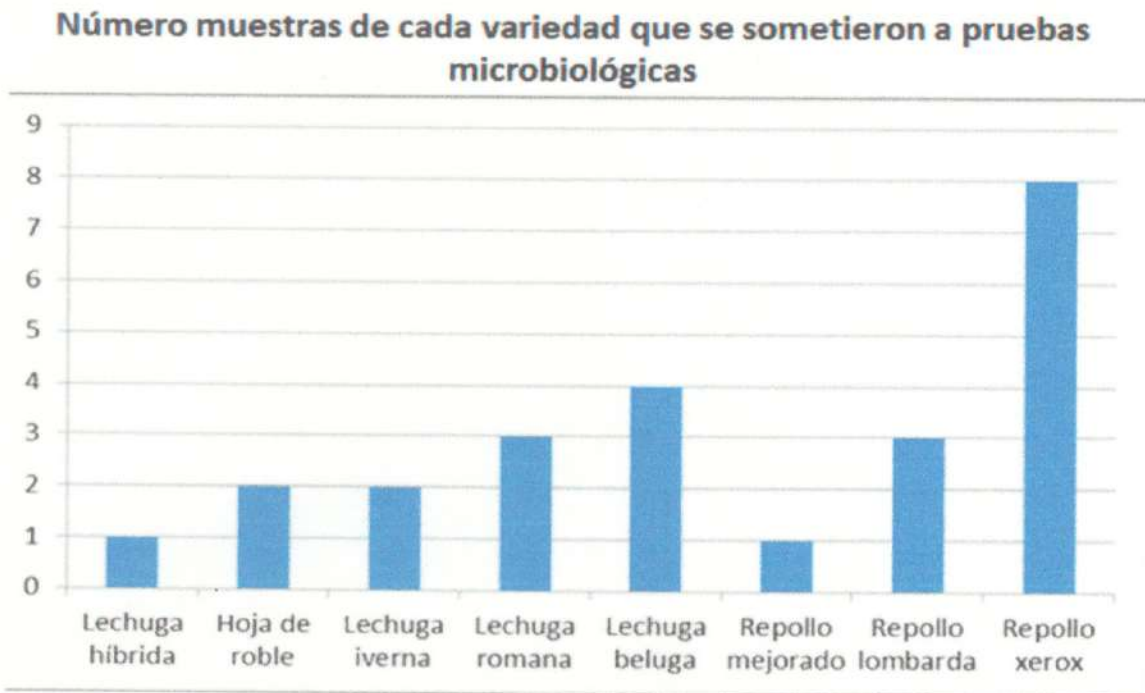


Fig 12. Posicionador global utilizado para registrar las coordenadas de los puntos de muestreo en el distrito de Tierra Altas.



Fig. 13.



Donde se resume el número de muestras de cada variedad de *Brassica* y *Lactu* recolectada para el presente estudio.