



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO Y RESISTENCIA BACTERIANA
EN EL CEVICHE DE CHOCHO (*Lupinus mutabilis sweet*) Y SU
IMPACTO EN LA SALUD PÚBLICA DE RIOBAMBA – 2019”**

Trabajo de Titulación

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: LUCIANA VANESA CALVACHE ANDRAMUÑO

TUTORA: Dra. SANDRA NOEMÍ ESCOBAR ARRIETA

Riobamba – Ecuador

2020

©2020, Luciana Vanesa Calvache Andramuño.

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos por cualquier medio o procedimientos, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Luciana Vanesa Calvache Andramuño, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autora, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación; El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

Riobamba 03 de marzo de 2020

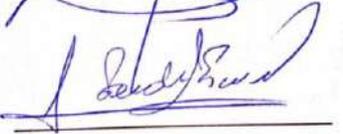
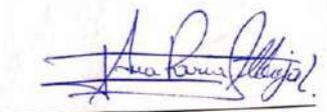


Luciana Vanesa Calvache Andramuño.

C.I. 060353410-8

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El tribunal de titulación certifica que: El trabajo de titulación: Tipo: Proyecto de investigación, “ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO Y RESISTENCIA BACTERIANA EN EL CEVICHE DE CHOCHO (*Lupinus mutabilis sweet*) Y SU IMPACTO EN LA SALUD PÚBLICA DE RIOBAMBA – 2019”, realizado por la señorita: Luciana Vanesa Calvache Andramuño, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del tribunal del trabajo de titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dr. Fabián Ernesto Arias Arias PRESIDENTE TRIBUNAL		2020-03-03
Dra. Sandra Noemí Escobar Arrieta DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN		2020-03-03
Dra. Ana Karina Albuja Landi MIEMBRO DE TRIBUNAL		2020-03-03

DEDICATORIA

A Dios por guiarme en el camino de mis anhelos y llevarme de la mano para convertirme en un mejor ser humano día a día. Enseñarme que con perseverancia mis propósitos se materializan y sin duda culminar mi carrera académica de tercer nivel es un gran logro que me abre las puertas de otra feliz faceta en mi vida.

A mi madre Janeth, el ser humano que es un ejemplo de lucha y amor puro, que ha dedicado toda su vida para ser mi punto de partida y de llegada; ha luchado de manera inalcanzable por formar y convertir la mujer que hoy en día soy.

“Es el primer peldaño para alcanzar mi felicidad”

Luciana

AGRADECIMIENTO

A Dios por ser mi guía en cada circunstancia de la vida, por obsequiarme amor, conciencia de lo hermoso que es vivir y compartir.

A mi madre, por sus enseñanzas y ardua dedicación, por ser el motor que me impulsa a ser alguien mejor.

A mis mejores amigos que son los hermanos que me ha dado la vida, quienes aportan alegría y apoyo en mi diario vivir.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por ser mi cuna académica y ser parte de mi formación humanística.

A mis maestros y equipo de investigación, Dra. Sandra Escobar, Dra. Anita Albuja, BQF. Yolanda Buenaño y Viviana Hernández, gracias por sus enseñanzas, soporte y confianza brindada en el transcurso de mi carrera universitaria y sobre todo en la realización de este trabajo de titulación.

Luciana

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiv
RESUMEN.....	xv
SUMMARY.....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1. Antecedentes.....	5
1.2. Bases teóricas.....	6
<i>1.2.1. Alimentos.....</i>	<i>6</i>
<i>1.2.2. Higiene.....</i>	<i>7</i>
<i>1.2.3. Inocuidad.....</i>	<i>7</i>
<i>1.2.4. Manipulación y alimento contaminados.....</i>	<i>7</i>
<i>1.2.5. Puntos críticos de contaminación de alimentos.....</i>	<i>8</i>
<i>1.2.6. Clasificación de los alimentos por el riesgo.....</i>	<i>8</i>
<i>1.2.7. Clasificación de los peligros en la inocuidad de alimentos.....</i>	<i>9</i>
<i>1.2.7.1. Alta.....</i>	<i>9</i>
<i>1.2.7.2. Moderada, Diseminación Potencialmente Extensa.....</i>	<i>10</i>
<i>1.2.7.3. Baja, Diseminación Limitada.....</i>	<i>10</i>
<i>1.2.8. Enfermedades de origen Alimentario.....</i>	<i>10</i>
<i>1.2.8.1. Enfermedades de Transmisión Alimentaria (ETAs).....</i>	<i>10</i>
<i>1.2.9. Clasificación de las ETA´s.....</i>	<i>11</i>
<i>1.2.10. Infecciones transmitidas por alimentos.....</i>	<i>12</i>

1.2.10.1. <i>Escherichia coli</i>	12
1.2.10.2. <i>Salmonelosis</i>	13
1.2.10.3. <i>Shigelosis</i>	13
1.2.11. Intoxicaciones transmitidas por alimentos	14
1.2.11.1. <i>Intoxicaciones estafilocócicas</i>	14
1.2.11.2. <i>Micotoxicosis</i>	15
1.2.12. Toxicoinfecciones de origen alimentario	15
1.2.12.1. <i>Chocho (Lupinus mutabilis sweet)</i>	15
1.2.12.2. <i>Proceso de desamargado del chocho</i>	15
1.2.12.3. <i>Composición química y valor nutricional del chocho (Lupinus mutabilis sweet)</i>	16
1.2.12.4. <i>Problemas que se producen por mala manipulación y almacenamiento incorrecto del Chocho</i>	17
1.2.13. Ceviche	17
1.2.14. Ceviche de chocho de la ciudad de Riobamba	18
1.2.14.1. <i>Cualidades que contiene los ingredientes principales del ceviche de chocho:</i>	18
1.3. Microbiología	19
1.3.1. Indicadores de la calidad microbiológica afines a este estudio	19
1.3.1.1. <i>Microorganismos aerobios mesófilos</i>	19
1.3.1.2. <i>Coliformes totales y coliformes fecales</i>	20
1.3.1.3. <i>Mohos y levaduras</i>	21
1.3.1.4. <i>Parásitos</i>	21
1.3.2. Medios de cultivo	21
1.3.2.1. <i>Tipos de medios de cultivo</i>	22
1.3.2.2. <i>Agar Eosina Azul de metileno EMB</i>	22
1.3.2.3. <i>Agar Standard Methods o PCA</i>	23
1.3.2.4. <i>Agar Manitol</i>	23
1.3.3. Diluyente	23
1.3.4. Agua de peptona	24
1.3.5. Tinción Gram	24

1.3.6.	<i>Resistencia antimicrobiana</i>	24
1.4.	Base legal	25

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	27
2.1.	Lugar de Investigación	27
2.2.	Factores de Estudio	27
2.2.1.	<i>Población de estudio</i>	27
2.2.2.	<i>Localización del muestreo</i>	27
2.2.3.	<i>Tamaño de la muestra.</i>	27
2.2.4.	<i>Método de muestreo</i>	28
2.3.	Materiales, equipos y reactivos	29
2.4.	Metodología	30
2.4.1.	<i>Métodos y técnicas</i>	30
2.4.2.	<i>Pre análisis de diluciones óptimas para el contaje microbiano.</i>	32
2.4.3.	<i>Recuento de aerobios mesófilos y <i>Staphylococcus aureus</i>.</i>	32
2.4.4.	<i>Preparación del medio de cultivo PCA (PLATE COUNT AGAR)</i>	33
2.4.5.	<i>Preparación del medio de cultivo Manitol salado.</i>	33
2.4.6.	<i>Prueba confirmatoria para <i>Staphylococcus aureus</i></i>	34
2.4.7.	<i>Determinación de microorganismos coliformes por la técnica del número más probable (NMP)</i>	35
2.4.8.	<i>Preparación del medio de cultivo EMB (eosina azul de metileno)</i>	36
2.4.9.	<i>Identificación de <i>Salmonella</i>.</i>	37
2.4.9.1.	<i>Preparación del caldo tetracionato (caldo para enriquecimiento)</i>	37
2.4.9.2.	<i>Preparación del agar SS</i>	37
2.4.10.	<i>Purificación de cepas</i>	38
2.4.11.	<i>Tinción Gram</i>	39
2.4.12.	<i>Antibiograma en agar Mueller Hinton</i>	39

2.4.13.	<i>Cualificación de mohos y levaduras</i>	40
2.4.14.	<i>Identificación de parásitos por la técnica de flotación:</i>	40
2.4.15.	<i>Análisis PCR</i>	41

CAPÍTULO III

3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
3.1.	Resultados del Check list de buenas prácticas de higiene (Anexo 1-1) aplicado a cada puesto de expendio.	42
3.2.	Medición de pH.	43
3.3.	Recuento de aerobios mesófilos	44
3.4.	Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i>.	45
3.5.	Recuento de Coliformes totales por el método del Número Más Probable	46
3.6.	Prueba confirmatoria de <i>Escherichia coli</i> en agar EMB.	46
3.7.	Cualificación de <i>Salmonella spp.</i>	48
3.8.	Cualificación de Mohos y Levaduras.	49
3.9.	Recuento parasitario	50
3.10.	Identificación de cepas	51
3.11.	Reporte del Antibiograma	57
	CONCLUSIONES	59
	RECOMENDACIONES	60

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Porcentaje de nutrientes en semilla cruda.....	17
Tabla 1-2: Materiales utilizados.....	29
Tabla 2-2: Equipos, Medios de cultivo y Reactivos usados en el análisis microbiológico.....	30
Tabla 1-3: Medición de pH.	43
Tabla 2-3: Recuento de aerobios mesófilos	44
Tabla 3-3: Recuento de Staphylococcus aureus.....	45
Tabla 4-3: Recuento de Coliformes totales por el método del Número Más Probable.....	46
Tabla 5-3: Resultados de confirmación de E. coli en agar EMB	46
Tabla 6-3: Resultado de la cualificación de Salmonella spp.....	48
Tabla 7-3: Resultados de Mohos y levaduras.	49
Tabla 8-3: Resultado del recuento parasitario.....	50
Tabla 9-3: Resultado de Identificación bacteriana en agar S.S.....	51
Tabla 10-3: Resultado de Identificación bacteriana en agar EMB.....	52
Tabla 11-3: Resultado Identificación de bacterias en agar Manitol.....	53
Tabla 12-3: Resultado del antibiograma en agar Mueller Hinton.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Casos de ETAs reportados en Ecuador 2016-2019.....	5
Figura 2-1: Clasificación de las ETA´s.....	11
Figura 3-1: Especies de <i>Shigella</i>	14
Figura 4-1: <i>E. coli</i> en agar EMB.....	23
Figura 5-1: Especificaciones para el grano desamargado del chocho.	26
Figura 6-1: Especificaciones microbiológicas para comidas preparadas.....	26
Figura 1-2: Metodología para el análisis microbiológico del ceviche de chochos.	28
Figura 2-2: Metodología para el pre-análisis de diluciones óptimas microbiano.	32
Figura 3-2: Metodología de Aerobios mesófilos y <i>Staphylococcus aureus</i> respectivamente. ...	32
Figura 4-2: Metodología de la preparación del medio de cultivo PCA.	33
Figura 5-2: Metodología de la preparación del medio de cultivo Manitol Salado.	33
Figura 6-2: Metodología para la confirmación de <i>Staphylococcus aureus</i>	34
Figura 7-2: Metodología de microorganismos coliformes por la técnica probable (NMP).	35
Figura 8-2: Caldo verde bilis brillante con presencia de gas.	35
Figura 9-2: Proceso para la determinación de coliformes mediante la técnica del NMP.	36
Figura 10-2: Metodología para la preparación del medio EMB.	36
Figura 11-2: Metodología el enriquecimiento de <i>Salmonella</i> y <i>Shigela</i> en caldo tetracionato. .	37
Figura 12-2: Metodología para la preparación del medio S.S.	37
Figura 13-2: Metodología para la purificación de cepas microbiológicas.....	38
Figura 14-2: Metodología para la tinción Gram.	39
Figura 15-2: Metodología para la realización del antibiograma en agar Mueller Hinton.....	39
Figura 16-2: Metodología para la cualificación de mohos y levaduras.	40
Figura 17-2: Metodología para la identificación de parásitos mediante la técnica de flotación.40	
Figura 18-2: Metodología para el análisis PCR.....	41
Figura 1-3: Características fenotípicas de colonias en agar EMB	54

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3: Resultado del Check-list realizado en cada puesto de expendio.	42
---	----

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** CHECK LIST- GUÍA DE EVALUACIÓN SANITARIA PARA PUESTOS DE EXPENDIO AMBULATORIOS DE ALIMENTOS PREPARADOS.
- ANEXO B:** IMÁGENES DEL MUESTREO.
- ANEXO C:** IMÁGENES DEL PROCEDIMIENTO.
- ANEXO D:** RESULTADOS EN MEDIOS DE CULTIVO.
- ANEXO E:** RECUENTO PARASITARIO.
- ANEXO F:** IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS.
- ANEXO G:** TINCIÓN GRAM
- ANEXO H:** PRUEBAS BIOQUÍMICAS.
- ANEXO I:** ANTIBIOGRAMA.
- ANEXO J:** RESULTADOS DE LA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE PC

RESUMEN

El presente trabajo de titulación tuvo como objetivo el análisis microbiológico de los ceviches de chochos expendidos en los lugares de mayor concurrencia en la ciudad de Riobamba-Ecuador con la finalidad de evaluar la calidad microbiológica y la resistencia bacteriana en este alimento de consumo masivo para determinar si es apto o no para su ingesta. Además, busca evidenciar las condiciones higiénico-sanitarias en las cuales es procesado y comercializado; enmarcándose en las normativas de referencia: NTE INEN 2390: Grano desamargado de chocho y la Norma sanitaria para los alimentos y bebidas de consumo humano – Perú. Artículo 15, sección XV. El estudio se realizó en 7 puestos de expendio registrados en el GAD-Riobamba: Coliseo Teodoro Gallegos Borja y explanada del barrio Villa María en el periodo octubre- diciembre del año 2019. Se verificó el cumplimiento de la guía de evaluación sanitaria para puestos de expendio ambulatorios de alimentos preparados, para el análisis se tomaron muestras, en la mañana y en la tarde con el fin de observar la variabilidad en la calidad microbiológica, las diluciones ensayas fueron 10^{-4} y 10^{-5} . Se cuantificó y cualificó Aerobios mesófilos, Coliformes totales, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, parásitos, mohos y levaduras por métodos convencionales de cultivo, incluyendo el aislamiento e identificación de bacterias patógenas por técnicas moleculares. Como resultado se evidenció un déficit en la calidad higiénico-sanitaria hallándose valores superiores a los límites microbiológicos permisibles, estableciendo que este alimento puede representar una fuente de infección de ETA's. La mayoría de las bacterias identificadas presentaron una resistencia a fármacos como Ampicilina y Amoxicilina+ ácido clavulánico. Las entidades de control sanitario deberían verificar, periódicamente, la aplicación de las buenas prácticas de higiene en la manipulación de alimentos y capacitar a los expendedores.

Palabras clave: <CEVICHE>, <MICROBIOLOGÍA>, <CALIDAD MICROBIOLÓGICA>, <INOCUIDAD ALIMENTARIA>, <ENTEROBACTERIAS>, <NORMATIVAS>, <NEUTROFÍLICAS>, <RESISTENCIA FARMACOLÓGICA>

SUMMARY

This degree work main aim was to develop a microbiological analysis of the chochos ceviche using traditional cereal grains as a feedstock expended in the places of greatest concurrence, Riobamba City-Ecuador to evaluate the microbiological quality and bacterial resistance in this food for mass consumption to determine whether or not it is suitable of your food intake. Also, it seeks to demonstrate the hygienic-sanitary conditions in which it is processed and marketed; frame in the reference regulations: NTE INEN 2390: Bittering process of the cereal and the Sanitary Standard for food and beverages for human consumption - Peru. Article 15, section XV. The study was carried out in 7 retail outlets registered in the GAD-Riobamba: Teodoro Gallegos Borja coliseum and plaza of the neighborhood of Villa María in the period running from October to December 2019. Compliance with the health assessment guide for retail outlets was verified Prepared food outpatients, samples were taken for analysis in the morning and the afternoon to observe the variability in microbiological quality, the dilutions tested were 10^{-4} y 10^{-5} . Mesophilic aerobes, total coliforms, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Salmonella, parasites, molds, and yeasts were quantified and qualified by conventional culture methods, including the isolation and identification of pathogenic bacteria by molecular techniques. As a result, a deficit in the hygienic-sanitary quality was evidenced, finding values higher than the permissible microbiological limits, establishing that this food can represent a source of ETA's infection. Most of the identified bacteria showed resistance to drugs such as Ampicillin and Amoxicillin + clavulanic acid. Sanitary control entities should periodically verify the application on good hygiene practices in food handling and training vendors.

Keywords: <CEVICHE>, <MICROBIOLOGÍA>, <MICROBIOLOGICAL QUALITY>, <FOOD SAFETY>, <ENTEROBACTERIAS>, <SANITARY REGULATIONS>, <NEUTROFÍLICAS>, <FARMACOLOGICAL RESISTANCE>

INTRODUCCIÓN

Problemática.

Las enfermedades de transmisión alimentaria más conocidas como ETA's engloban un amplio espectro de dolencias y constituyen un problema de salud pública creciente en todo el mundo. (OMS, 2016) Cada año se reportan más de 600 millones de casos y aproximadamente medio millón de muertes se atribuyen a la contaminación de alimentos.

Las ETA son producidas por el consumo de alimentos o agua, contaminados por bacterias, virus, parásitos, productos químicos y toxinas. (OMS, 2019) Suele producir trastornos gastrointestinales, como dolor abdominal, diarreas, náuseas y vómitos, a veces acompañados de fiebre y en determinados casos pueden desencadenar graves enfermedades. Se estima que, a esta causa, cada año en la Región de las Américas, 77 millones de personas se enferman y más de 9000 mueren, de ellas 31 millones son menores de 5 años. (MSP (Ministerio de Salud Pública Ecuador), 2019)

En Ecuador las cifras publicadas en la página web del Ministerio de Salud Pública (MSP), durante el 2018, las enfermedades transmitidas por agua y alimentos alcanzaron alrededor de 24 000 casos. Hasta junio del año 2019, detallan 11.411 casos reportados de ETA's a nivel nacional, esta estadística pone en manifiesto el problema de salud al cual el consumidor se enfrenta a diario. Cabe recalcar que la provincia de Chimborazo se sitúa en un tercer lugar de intoxicaciones alimentarias con 720 casos hasta junio del 2019. Para el sistema de salud público estas ETA's representan un gasto económico representativo, ya que constituyen el segundo o tercer motivo de consulta en servicios sanitarios de todo tipo, debido al consumo de alimentos contaminados por microorganismos potencialmente patógenos. (Domínguez *et al.*, 2009)

La inocuidad alimentaria debe ser regulada por entes gubernamentalmente competentes, tales como la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (ARCSA), y en este caso la Dirección de higiene del GAD cantón Riobamba, a los cuales corresponde precautelar el cumplimiento de las normativas nacionales e internacionales, además capacitar a los expendedores acerca de las Buenas Prácticas de Manufactura, Higiene y distribución de los productos que se oferta en el área alimenticia.

La preparación y expendio de alimentos en la vía pública es una actividad que se ha venido desarrollando desde la antigüedad (Arámbulo III *et al.*, 2005); esta provee al consumidor ventajas como el acceso, rapidez en su venta, la opción de escoger; también es importante resaltar que este tipo de expendio ofrece trabajo a una población importante como son los vendedores formales e informales, que pueden o no estar al tanto de la higiene general que requiere esta práctica o a su vez conocen muy poco acerca de las normas sanitarias para la preparación de alimentos. (Domínguez *et al.*, 2009)

La falta de higiene y salubridad en el proceso de elaboración y expendio genera contaminación alimentaria desencadenando las conocidas (ETA's), las mismas que ocasionan malestar en la salud del consumidor impidiendo su normal desarrollo cotidiano.

Según el Instituto Nacional de Patrimonio Cultural (INPC) en la ciudad de Riobamba, los ceviches de chochos constituyen un alimento artesanal y de consumo masivo, preparado a base de jugo de tomate, cueros de chanco, especias y chochos desamargados. Los lugares de expendio más representativos son en la explanada del Coliseo Deportivo Teodoro Gallegos Borja, en el barrio Villa María, alrededores de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH) y Universidad Nacional de Chimborazo (UNACH). (INPC, 2013)

En este estudio de investigación se analizó la calidad microbiológica del ceviche de chochos, mismo que es considerado un plato típico y cultural de la provincia de Chimborazo y su capital Riobamba; al ser un producto de preparación y expendio ambulatorio, es importante conocer el grado de inocuidad que posee y si no representa un posible riesgo para la salud de los consumidores.

El chocho (*Lupinus mutabilis sweet*) es una leguminosa con elevado valor proteico, además que contiene cierto porcentaje de alcaloides de tipo quinolizidínicos (2.6 a 4.2%) (Villacreces, 2011a); lo cual hace imposible que su consumo sea directo por la toxicidad y sabor amargo que estos granos presentan, por ello es necesario que pase por un proceso de desamargado, generalmente artesanal, que comprende la selección, limpieza manual del grano, hidratación, cocción y lavado (M.Casa, 2007). He aquí donde posiblemente empieza la contaminación microbiológica del producto base del ceviche de chocho, ya que según fuentes prácticas y teóricas se demuestra que el desamargado se lo realiza con agua proveniente de ríos, acequias o en agua que llega a las viviendas rurales a través de tuberías, pero sin tratamiento alguno de potabilización. (Villacreces, 2011a).

Justificación

Actualmente la salud tiene un enfoque preventivo, por ello es de vital importancia realizar estudios que determinen los riesgos que pueden ser causales de enfermedades de transmisión alimentaria e incluso pueden desencadenar patologías más complicadas de tratar y desembocar en la muerte. (Pietro *et al.*, 2004)

Este proyecto de investigación promueve el estudio de riesgos microbiológicos que son causales de enfermedades infecciosas, haciendo hincapié en la prevención de la salud. Las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA's) son un foco de estudio ya que pueden desencadenar otras patologías con alto índice de morbilidad y mortalidad en el país, es por ello que la determinación microbiológica y resistencia bacteriana de ciertos alimentos que se expenden en masa y de manera típica, como es el caso de los ceviches de chochos en la ciudad de Riobamba y provincia de Chimborazo (INPC, 2013), proporciona información relevante tanto para los consumidores como

para los entes regulatorios de salud pública y privada como es la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (ARCSA), Dirección de Higiene del GAD cantón Riobamba para que estos tomen las medidas correctivas del caso y busquen soluciones a esta situación de falta de higiene y salubridad al momento de la preparación y expendio de este alimento artesanal que se ofrece en la vía pública.

El estudio microbiológico del ceviche de chocho no tiene muchos precedentes como tal; es por esto que el análisis a realizar es pertinente para crear información verídica y eficaz que anteceda futuras investigaciones; además que, se espera concientizar a los comerciantes de ceviche de chocho para que realicen su actividad con buenas prácticas de higiene, sabiendo que la salud del consumidor se interpone de manera perentoria.

El Instituto Nacional de Patrimonio Cultural del Ecuador sitúa, al chocho y sus derivados, como alimentos tradicionales por su valor cultural y alto consumo a través del tiempo, pese a esto a nivel local no existen estudios que avalen la calidad microbiológica de los mismos, por ello esta investigación es pionera, además de oportuna, centrándose en revelar la calidad en la cual se expende el ceviche de chocho, conjuntamente se busca analizar la relación existente con las ETAs y el impacto en la salud de los consumidores.

El estudio es viable puesto que se llevará a cabo en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, que cuenta con los laboratorios de Análisis Microbiológico, medios de cultivo, reactivos y materiales que permiten el desarrollo de la investigación propuesta, además que se tiene acceso a los lugares de venta más concurridos del ceviche de chocho.

OBJETIVOS.

Objetivo General

Analizar la calidad microbiológica y resistencia bacteriana en el ceviche de chochos, expendidos en el barrio Villa María y coliseo Teodoro Gallegos Borja; y su posible impacto en la salud pública de Riobamba.

Objetivos Específicos

- Detectar las condiciones higiénicas sanitarias de expendio del ceviche de chochos a través de un check list de buenas prácticas de higiene, determinando los puntos críticos de contaminación para que se tome las acciones correctivas del caso.
- Determinar la calidad microbiológica del ceviche de chocho mediante pruebas que permitan detectar cualitativa y cuantitativamente la presencia de microorganismos, que se encuentran estipulados en normativas de regulación.
- Identificar bacterias patógenas y su resistencia, a fin de evaluar el posible impacto que estas puedan generar en la salud del consumidor.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

Los alimentos juegan un papel importante en la transmisión de enfermedades de origen alimentario, y son éstas, las cuales constituyen un serio problema de salud pública y pérdidas económicas. Estas enfermedades se encuentran entre las primeras causas de morbilidad tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. (Arámbulo III *et al.*, 2005)

Según la OMS las enfermedades diarreicas son una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en el mundo, y por lo general son consecuencia de la exposición a alimentos o agua contaminados. La manifestación clínica más común de una enfermedad transmitida por los alimentos consiste en la aparición de síntomas gastrointestinales, pero estas enfermedades también pueden dar lugar a síntomas neurológicos, inmunológicos y de otro tipo. La ingestión de alimentos contaminados puede provocar una insuficiencia multiorgánica, incluso cáncer, por lo que representa una carga considerable de discapacidad, así como de mortalidad. (OMS, 2015)

En Ecuador el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC), data que las enfermedades de transmisión alimentaria como diarrea y gastroenteritis de presunto origen infeccioso se posicionan en el tercer lugar de las principales causas de morbilidad con un 18,89%. (INEC, 2014).



Figura 1-1: Casos de ETA's reportados en Ecuador 2016-2019

Fuente: Dirección Nacional Vigilancia Epidemiológica.

El chocho es una leguminosa que al poseer aproximadamente 2.6 a 4.2% de alcaloides quinolizidínicos, debe pasar por un proceso previo de desamargado para que su consumo sea apto.

La norma INEN 2390:2004 estipula que después de dicho proceso, el contenido de alcaloides debe disminuir a 0.2% (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 2005)

En Ecuador el desamargado se realiza de forma artesanal, una investigación realizada por Villacreces de la Universidad San Francisco de Quito (2011), recauda y arroja información de los procesadores del chocho, estos lavan, remojan, hidratan y desamargan el grano en agua proveniente de acequias o en agua que llega a las viviendas a través de tuberías, pero sin tratamiento alguno de potabilización, esta actividad se la lleva a cabo en tinas de plástico o tanques de cemento que son empleados para el lavado de ropa, los cuales generalmente están en los patios de sus viviendas; he aquí un claro ejemplo de la falta de cumplimiento de las condiciones higiénico sanitarias, por lo que puede ser inicio de la contaminación microbiológica del componente principal del ceviche de chocho (Villacreces, 2011).

En otra investigación realizada en la Universidad Técnica de Ambato, Ángel Iza Sarabia (2018) realizó un estudio que determinó la calidad microbiológica de los ceviches de chochos que se preparan y expenden en las afueras de dicha institución, en el cual reflejó un elevado índice microbiológico, manifestando el desarrollo de *Escherichia coli*, coliformes totales, coliformes fecales, la presencia de *Staphylococcus aureus*, mohos y levaduras (Toro Villa and Iza Sarabia, 2018), todos por encima de los niveles permisibles. (NTS N° 071 DIGESA, 2008). Estableciendo que estos alimentos no están cumpliendo con los requerimientos microbiológicos y no son aptos para el consumo humano.

Casa, investigador de la Universidad Técnica de Ambato en 2007 expone que la contaminación microbiológica de los alimentos, como el chocho, es la causante de la pérdida de calidad nutricional, haciéndolos no aptos para el consumo humano. El grano del chocho desamargado (*Lupinus mutabilis sweet*) es un alimento ideal para la proliferación microbiológica por su elevado contenido proteico, grasa y fibra.

En artículos de revisión consideran que la resistencia antimicrobiana se encuentra en un punto crítico ya que se la ubica dentro de los diez problemas de especial atención para la Organización Mundial de la Salud, dado que algunos microorganismos potencialmente patógenos crean resistencia a fármacos tratantes de las afecciones que estos provocan, perdiendo así la eficacia y, en muchos de los casos la falta del tratamiento, aumentando el riesgo de morbilidad y mortalidad a nivel mundial (Chamba *et al.*, 2019).

1.2. Bases teóricas

1.2.1. Alimentos

Es responsabilidad de todos garantizar alimentos inocuos para el consumo humano, pero en especial los entes gubernamentales son los encargados de hacer cumplir las normativas sanitarias

para que estos no representen un problema en la salud del consumidor. Cabe recalcar que para que un alimento sea comercializado debe cumplir ciertas características que se estipulan en la legislación alimentaria.

1.2.2. Higiene.

La higiene de los alimentos es uno de los aspectos trascendentales para poseer un buen estado de salud. Cuando los alimentos no son manipulados apropiadamente, pueden contaminarse y transmitir microorganismos, como bacterias, hongos y parásitos que posiblemente desencadenen enfermedades.

1.2.3. Inocuidad

La inocuidad de los alimentos es la ausencia o niveles seguros de ciertas sustancias y microorganismos aceptables, que son estipulados en normativas que prevén la seguridad en la salud del consumidor. (FAO, 2018)

La inocuidad de los alimentos engloba acciones encaminadas a garantizar la máxima seguridad posible de los alimentos. Las políticas y actividades que persiguen dicho fin deberán de abarcar toda la cadena alimenticia, desde la producción al consumo. (OMS, 2019)

1.2.4. Manipulación y alimento contaminados.

El manipulador de alimentos cumple un rol fundamental para reducir la probabilidad de contaminación en los productos que elabora. Es responsabilidad de todos mantener un buen nivel de higiene en toda la cadena alimenticia, sólo esto garantizará la prevención y disminución de las tasas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial y local.

La contaminación de los alimentos durante la manipulación puede ser directa entre los alimentos crudos, o indirecta a través de las manos, superficies y utensilios contaminados. Un alimento puede ser contaminado por microorganismos patógenos y no patógenos, como bacterias, parásitos, virus y hongos que al ser ingeridos pueden desencadenar una amplia gama de enfermedades e incluso la muerte.

Los alimentos insalubres plantean amenazas para la salud a escala mundial y ponen en peligro la vida de todos: los lactantes, los niños pequeños, las embarazadas, las personas mayores y las personas con enfermedades subyacentes son particularmente vulnerables. (OMS, 2019)

1.2.5. Puntos críticos de contaminación de alimentos

Son etapas del procedimiento, lugares u operaciones en las cuales los alimentos están más predispuestos a contaminarse o alterarse. Si se logra identificar y control estos puntos críticos se podría evidenciar una mejora en la calidad del producto y disminuir las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA).

Puntos críticos:

1. Correcto lavado de manos y utensilios como preparación previa a la manipulación de alimentos (nunca trabajar con utensilios oxidados).
2. Lavar y desinfectar los alimentos que va a utilizar.
3. Lavarse las manos antes de pelar o cortar los alimentos.
4. Trabajar con superficies limpias.
5. Al mezclar los alimentos no hacerlos con las manos (utilizar espátulas).
6. En la preparación final del alimento preocuparse de la temperatura y el tiempo de cocción adecuado.
1. Conservar alimentos en refrigeración.
2. Calentar el alimento mínimo a 60°C para eliminar los microbios.
3. Utilizar un transporte adecuado para evitar la contaminación en los alimentos.
4. Considerar el tiempo que un alimento va a estar a temperatura de riesgo de multiplicación.
5. Servir los alimentos con utensilios limpios, hábitos higiénicos visibles para los consumidores y una correcta presentación.
6. Utilizar concentraciones adecuadas de desinfectantes para la higienización y sanitación de utensilios alimentarios. (OPS, 2016a)

1.2.6. Clasificación de los alimentos por el riesgo

A diferencia de la mayoría de los compuestos químicos peligrosos, la concentración de patógenos alimentarios fluctúa durante el procesamiento, el almacenamiento y la preparación de las comidas, lo que obstaculiza la estimación del número de microorganismos o la concentración de sus toxinas al momento de la ingestión por parte del consumidor. (De Sousa, 2008)

Según el reglamento técnico Centroamericano de “Alimentos, criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos” RTCA67.04.50:08 para registro y vigilancia sanitaria; clasifica a los alimentos en función de la probabilidad de causar daño a la salud clasificándolas en tres categorías:

1. **Alimento Riesgo tipo A:** que comprenden a los alimentos que por su naturaleza, composición, proceso, manipulación y población a la que va dirigida, poseen una ALTA probabilidad de ocasionar daño a la salud.
2. **Alimento Riesgo tipo B:** que comprenden a los alimentos que por su naturaleza, composición, proceso, manipulación y población a la que va dirigida, poseen una MEDIA probabilidad de ocasionar daño a la salud.
3. **Alimento Riesgo tipo C:** que comprenden a los alimentos que por su naturaleza, composición, proceso, manipulación y población a la que va dirigida, poseen una BAJA probabilidad de ocasionar daño a la salud. (REGLAMENTO TÉCNICO CENTROAMERICANO RTCA 67.04.50:08, 2018)

1.2.7. Clasificación de los peligros en la inocuidad de alimentos.

Según la OPS en la clasificación de los peligros en la inocuidad de alimentos - *Control Sanitario – HACCP:*

EVALUACIÓN DE LA GRAVEDAD

“No todos los microorganismos se clasifican de la misma manera al evaluar la gravedad de los síntomas que se desencadenan en el afectado. Ese potencial o el tipo de peligro que un microbio presenta, puede ser de moderado a grave, con todas las variaciones entre esos extremos. De esta manera, los peligros pueden clasificarse en cuatro grupos, según su gravedad para la salud del ser humano:” (OPS, 2016b)

1.2.7.1. Alta

Efectos graves para la salud, con posibilidad de muerte. Generalmente, el afectado necesita de atención hospitalaria.

1. Biológico: toxina del *Clostridium botulinum*, *Salmonella typhi*, *S. Paratyphi A* y *B*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae* O1 clásico, *Vibrio vulnificus*, *Brucella melitensis*, virus de la hepatitis A y E, *Escherichia coli* O157:H7, *Trichinella spiralis*, *Taenia solium*.

2. Químico: contaminación directa de alimentos por sustancias químicas prohibidas o en concentraciones altas, determinados metales. Residuos de antibióticos.
3. Físico: objetos extraños y fragmentos no deseados que pueden causar lesión o daño al consumidor.

1.2.7.2. Moderada, Diseminación Potencialmente Extensa

La patogenicidad es menor y el grado de contaminación es menor. Los efectos pueden revertirse por atención médica y pueden incluir hospitalización. Generalmente, el afectado necesita de atención médica sólo en el orden ambulatorio.

1. Biológico: *Escherichia coli* enteropatógenas (con excepción de la *Escherichia coli*O157:H7), *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Streptococcus* B-hemolítico, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, rotavirus, virus Norwalk, *Entamoeba histolytica*, *Diphyllobothrium latum*, *Cryptosporidium parvum*.

1.2.7.3. Baja, Diseminación Limitada

Causa común de epidemias, diseminación posterior rara o limitada, provoca enfermedad cuando los alimentos ingeridos contienen gran cantidad de patógenos.

1. Biológico: *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* tipo A, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolítica*, y toxina del *Staphylococcus aureus*, la mayoría de los parásitos.(OPS, 2016b)

1.2.8. Enfermedades de origen Alimentario

La contaminación de alimentos con microorganismos patógenos y su persistencia es causante de un problema de salud pública a nivel mundial. Es importante recalcar que la solución, o al menos control, a esta problemática sería el esfuerzo de los manipuladores en el proceso, almacenamiento y expendio, según sea el caso.

1.2.8.1. Enfermedades de Transmisión Alimentaria (ETA's)

Las enfermedades transmitidas por alimentos constituyen un problema sanitario y económico de relevancia mundial. Millones de personas enferman y muchas mueren por consumir alimentos insalubres. Los estados miembros de la Organización Mundial de la Salud (OMS) adoptaron en el año 2000 una recomendación en la cual se reconoce el papel fundamental de la inocuidad

alimentaria para la salud pública, ello implica la adopción de acciones encaminadas a garantizar la máxima seguridad posible de los alimentos. Las políticas y actividades que persiguen dicho fin deberán abarcar toda la cadena alimentaria, desde la producción hasta el consumo (Ruiz *et al.*, 2017). Se consideran ETA's todas aquellas enfermedades causadas por la ingestión de agua o alimentos contaminados que provocan un efecto nocivo en la salud del consumidor, o de un grupo de consumidores, en forma aguda o crónica. Pueden ser causadas por patógenos, sustancias químicas o parásitos que contaminan los alimentos en distintos puntos de la cadena de producción (Estomatológica, Docente and Spíritus, 2009).

Las bacterias generalmente implicadas en ETA's corresponden a las especies *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, y *Listeria monocytogenes* o a los géneros *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella*. y *Escherichia coli*. La franja etaria más vulnerable a enfermar por este potencial patógeno incluye a niños entre uno y 8 años. (Ruiz *et al.*, 2017).

Salmonella spp. es un agente productor de zoonosis cuyo hábitat natural normalmente es el tracto gastrointestinal de los mamíferos y las aves. Se transmite por contacto directo o contaminación cruzada durante la manipulación y el procesado de los alimentos, en el hogar o a través del agua. *S. aureus* es, dentro de su familia, la especie que causa mayor cantidad de infecciones en el ser humano. Suele estar presente en la piel y en las membranas mucosas, sin causar infección. La intoxicación en el hombre se produce por la multiplicación y producción de enterotoxinas termoresistentes en los alimentos consumidos. En la cadena de producción de alimentos existen riesgos de infección por patógenos, por lo que se necesita un control microbiológico estricto para impedir que estos lleguen al consumidor (Sara and Gonzales, 2015).

1.2.9. Clasificación de las ETA's

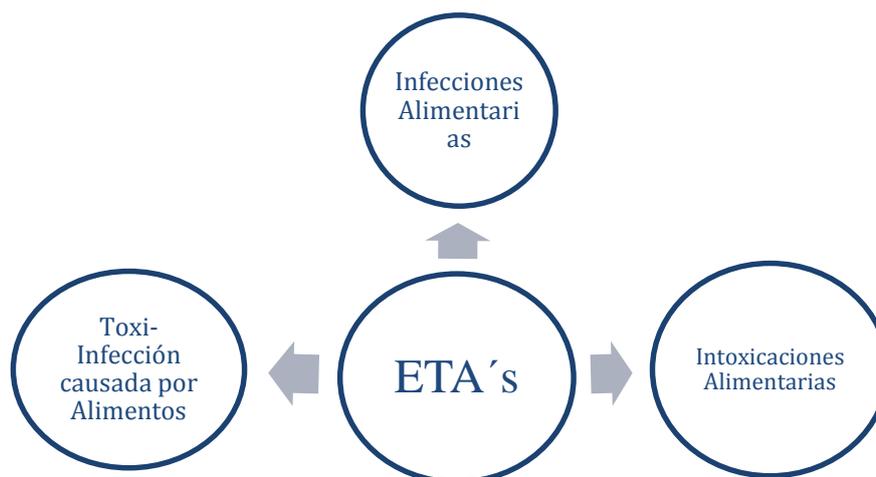


Figura 2-1: Clasificación de las ETA's

Fuente: (OMS/OPS, 2002)

Realizado por: (Calvache, 2019)

1.2.10. Infecciones transmitidas por alimentos.

Las Infecciones transmitidas por alimentos se producen cuando se ha ingerido comida que contiene grandes cantidades de microorganismos. Estos llegan al tracto intestinal de los seres humanos y afectan las funciones de los intestinos, lo que causa diarrea y otros problemas. La gravedad del problema depende de la cantidad de microorganismos ingeridos y el tipo específico de microorganismo. Los primeros síntomas de infección se presentan ya en las primeras seis horas y hasta 48 horas después de haber ingerido el alimento (Ecuador. Agencia Nacional de Regulación Control y Vigilancia Sanitaria, 2015).

Lo importante de las infecciones, es que pueden ser prevenidas adoptando medidas higiénicas adecuadas para evitar que los alimentos se contaminen. Por ejemplo, asegurando una cocción completa de los alimentos en el momento de prepararlos, o realizando un buen lavado de aquellos que habitualmente se consumen en estado crudo como son las verduras y las frutas (Ecuador. Agencia Nacional de Regulación Control y Vigilancia Sanitaria, 2015).

Los agentes etiológicos son varios y los más comunes se describen a continuación:

1.2.10.1. Escherichia coli

La *Escherichia coli* (que se abrevia *E. coli*) es una bacteria que se encuentra en los intestinos de las personas y animales, en el medioambiente y, a veces, también en los alimentos cuando estos han sido contaminados.

La mayoría de los tipos de *E. coli* son inofensivos y forman parte de la microbiota de un tracto intestinal sano. Sin embargo, algunas especies de *E. coli* causan diarrea, infecciones urinarias, enfermedad respiratoria, infecciones sanguíneas y otras enfermedades.

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, usualmente móvil por flagelos peritricos. Esta bacteria es utilizada como indicador de posible contaminación fecal y presencia de patógenos en agua y alimentos debido a que se encuentra abundantemente en heces de humanos y animales. Diversos estudios han argumentado que ciertas cepas de *E. coli* ocasionan diarrea y otras enfermedades extra intestinales en humanos. (Estrada-Garcia *et al.*, 2009) Estas cepas de *E. coli* patogénicas constituyen un grupo heterogéneo de organismos con diferentes propiedades de virulencia, serotipos O:H, epidemiología y enfermedades asociadas. Con base en sus factores de virulencia específicos y rasgos fenotípicos se han subdividido en seis grupos patógenos:

1. *E. coli* enteropatógena (EPEC)
2. *E. coli* enteroagregante (EAEC)
3. *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)
4. *E. coli* de adhesión difusa (DAEC)

5. *E. coli* enteroinvasora (EIEC)
6. *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (Canizalez-Roman *et al.*, 2013)

La *E. coli* O157:H7 es reconocida como uno de los serotipos más representativos de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Es capaz de producir dos tipos de toxina shiga, Stx1 y Stx2, que originan diarrea, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico, las manifestaciones clínicas se caracterizan por disentería sanguinolenta y aguda con espasmos abdominales, acompañado de fiebre moderada. Se estima que del 3 al 5% de casos pueden evolucionar a un síndrome urémico hemolítico siendo las causas más frecuentes de falla renal en infantes; mismos que pertenecen a un grupo vulnerable. (Soto Varela, Lavalle and Alvarado, 2016)

1.2.10.2. *Salmonellosis*

Salmonella es un género de bacilos gramnegativos que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Dentro de 2 especies, *Salmonella bongori* y *Samonella enterica*, se han identificado más de 2500 serotipos o serovariedades diferentes.

Algunos serotipos causan gastroenteritis, que generalmente no es complicada y no necesita tratamiento, pero la enfermedad puede ser grave en los jóvenes, los ancianos y los pacientes con inmunidad debilitada. Este grupo presenta el serotipo de *Salmonella* entérica *enteritidis* y el serotipo de *Salmonella* entérica *typhimurium*, los dos serotipos más importantes de *Salmonella* transmitidos de animales a humanos en la mayor parte del mundo. (OMS, 2018)

La mayoría de las cepas que causan enfermedades en seres humanos y otros mamíferos pertenecen a *Salmonella* entérica subsp. entérica. Algunas serovariedades – *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* y *Salmonella hirschfeldii* son patógenos humanos. Se transmiten principalmente de persona a persona y no tienen reservorios animales importantes. Las demás serovariedades de *Salmonella* son a veces designadas como *Salmonella* no tifoidea, son zoonóticas o potencialmente zoonóticas. La *S. bongori*, *S. enterica subsp. salamae*, *S. enterica subsp. arizonae*, *S. enterica subsp. diarizonae*, *S. enterica subsp. houtenae* y *S. enterica subsp. indica*, se encuentran, generalmente, en poiquiloterms (entre ellos, reptiles, anfibios y peces) y en el medioambiente. En ocasiones, algunos de estos organismos están asociados a enfermedades humanas.

1.2.10.3. *Shigelosis*

La shigelosis, también llamada disentería bacilar, es una infección causada por bacterias del género *Shigella* bacilos Gram-negativos inmóviles, anaerobios facultativos no esporulados, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* que contiene cuatro subgrupos con diferente

capacidad patogénica. Es transmitida por la ruta fecal-oral con una baja dosis infectiva, a través de alimentos contaminados o bien por contacto directo con personas infectadas. (anmat, 2012)
El género *Shigella* se puede dividir en cuatro subgrupos y 43 serotipos que se diferencian entre sí por sus características bioquímicas.

Subgrupo	Especie	Número de serotipos	Fermentación del D-manitol
A	<i>dysenteriae</i>	15	-
B	<i>flexneri</i>	8	+
C	<i>boydii</i>	19	+
D	<i>sonnei</i>	1	+

Figura 3-1: Especies de *Shigella*

Fuente: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica de Argentina.

1.2.11. Intoxicaciones transmitidas por alimentos

Se presenta cuando se consume alimentos contaminados con productos químicos, o con toxinas producidas por algunos microorganismos, o con toxinas que pueden estar presentes en el alimento desde la captura, recolección o desde la producción primaria o la cría, como es el caso de las toxinas contenidas en algunos mariscos.

1.2.11.1. Intoxicaciones estafilocócicas.

Algunas de las toxinas que causan con más frecuencia enfermedades en la población, son por ejemplo las producidas por bacterias como el *Estafilococo aureus*, que puede estar presente en heridas de las manos o la piel, en granitos, en ojos u oídos con pus, así como en la nariz o garganta de las personas manipuladoras de alimentos. (Organización mundial de la salud, 2019)

La intoxicación alimentaria por *Estafilococos* se produce por la ingestión de alimentos contaminados con toxinas que, comúnmente generan diarrea y vómito.

Las bacterias se multiplican rápidamente en los alimentos y puede haber una gran colonia de bacterias sin que haya evidencia de descomposición del alimento. Los factores de riesgo son:

1. Ingestión de alimentos preparados por una persona con una infección en la piel, dado que estas infecciones comúnmente contienen el estafilococo dorado.
2. Ingestión de alimentos almacenados a temperatura ambiente.
3. Ingestión de alimentos preparados en forma inadecuada.
4. Los síntomas generalmente aparecen en un período de 4 a 6 horas. (OMS, 2019)

1.2.11.2. *Micotoxicosis*

El término micotoxicosis hace referencia a un amplio grupo de intoxicaciones causadas por la inhalación, el contacto directo o la ingestión de alimentos que han sido contaminados con micotoxinas, las cuales son metabolitos tóxicos producidos por una gran variedad de hongos filamentosos, entre los que se destacan los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Penicillium* y *Stachybotrys*. (Serrano-Coll HA, 2015)

1.2.12. *Toxico-Infecciones de origen alimentario*

Es una enfermedad que resulta de la ingestión de alimentos con una cierta cantidad de microorganismos causantes de infecciones, capaces de producir o liberar toxinas una vez que ya han sido ingeridos e infectan. (ASSAI, 2018)

1.2.12.1. *Chocho (Lupinus mutabilis sweet)*

El chocho es originario de la zona andina de Sudamérica, siendo la única especie americana del género *Lupinus* domesticada y cultivada como una leguminosa. Sus nombres son muchos, pero entre los más comunes se encuentran: en Quechua: tarwi, en España: altramuz, Ecuador y norte de Perú: chocho, en el sur de Perú y Bolivia: Tarhui, Chuchus Muti. En inglés: tarwi, pearl lupin, Andean lupin.

El lupino, es consumido en la región de los Andes desde la época pre Inca, su distribución comprende desde Colombia hasta el norte de Argentina, aunque actualmente es de importancia solo en Ecuador, Perú y Bolivia (Briones and Murillo, 2017).

1.2.12.2. *Proceso de desamargado del chocho*

El grano de chocho crudo por su alto contenido de lupanina, esparteína y otros alcaloides limita su consumo directo, por lo que es necesario que el grano sea sometido al proceso de desamargado o deslupinación. El proceso es muy simple y no necesita de maquinaria ni de tecnología costosa. El desamargado del chocho presenta las siguientes ventajas:

1. Destrucción de la viabilidad de las semillas, de enzimas indeseables como las lipasas, responsables de la autooxidación de las grasas, a través de la cocción.
2. Destrucción de sustancias organolépticas indeseables, principios anti nutritivos, como los inhibidores de proteasas y las hemaglutininas.
3. Eliminación de los oligosacáridos que se encuentran en diversas leguminosas porque producen flatulencias, todo esto desaparece en el proceso de lavado.

También el desamargado presenta las siguientes desventajas:

1. El proceso para eliminar los alcaloides (lupanina, esparteína) es muy extenso.
2. Produce pérdida de nutrientes entre ellos carbohidratos y algunos minerales.
3. La calidad del agua empleada en este proceso puede afectar el control de calidad en todo el proceso y cuestionar la sanidad del grano.

El desamargado tradicional es un proceso realizado por los campesinos andinos hace siglos para eliminar el sabor amargo del grano. Lo primero que ellos hacen es seleccionar y limpiar manualmente el grano, luego realizan la hidratación por 24 horas que generalmente se hace con agua de vertientes, pero en muy pocos casos se utiliza el agua potable, después de este tiempo se procede a cocinar en leña o gas por un periodo de una hora, al finalizar la cocción se realiza un lavado del chocho durante cuatro o cinco días. El tiempo total de este procedimiento es aproximadamente de siete días. (Villacreces, 2011)

Las fases que se deben considerar para obtener un alimento con condiciones óptimas para el consumo humano son:

1. La hidratación es donde el chocho absorbe agua y duplica su peso, esta etapa es prioridad antes de la cocción. Se realiza en tanques de hidratación una vez que el agua potable alcanza los 40°C, se empaca en fundas con un peso de 4,5 kg por un tiempo de 14 horas.
2. El chocho ya hidratado se ubica en ollas con capacidad de 300 kg. se procede a cocinar por un lapso de 45 minutos, al cabo de este tiempo el grano debe estar blando y listo para la siguiente etapa.
3. Al momento de lavarlo se debe mantener el agua en contacto con el grano, en esta etapa se controla el calentamiento, cloración y agitación del agua, son necesarios tres lavados hasta obtener el grano de chocho listo para el consumo. La dosificación recomendada es de 7,5 g de hipoclorito de calcio por 2500 litros de agua.
4. El proceso de agitación es un sistema que ayuda a la eliminación de alcaloides y se efectúa durante 72 horas mientras es lavado, las características finales del grano desamargado deben ser firmes, duros y sin daños en la cáscara.
5. Para finalizar el desamargado del chocho se procede a escurrirlo en una mesa, eliminando el agua en exceso, para que el chocho pueda ser envasado en bidones (Jair *et al.*, 2018)

1.2.12.3. *Composición química y valor nutricional del chocho (Lupinus mutabilis sweet)*

El grano del chocho es rico en proteína y grasas, razón por la cual debería ser utilizado en la alimentación humana con mayor frecuencia; las proteínas y aceites constituyen más de la mitad de su peso; estudios realizados en más de 300 diferentes genotipos muestran que la proteína varía del 41- 51% y la grasa de 14-24%. Existe una correlación positiva entre proteínas y alcaloides, mientras que es negativa entre proteína y grasa, significa que entre más proteína tenga, mayor será la cantidad de alcaloide, esto no ocurre con la grasa (Villacreces, 2011b).

Tabla 1-1: Porcentaje de nutrientes en semilla cruda.

Componentes	Porcentaje (%P/P)
Proteína	35-48
Grasa	15-24
Carbohidratos	28
Fibra	6-20
Ceniza	3-6
Humedad	7-12

Fuente: (Mariño, 2011)

1.2.12.4. Problemas que se producen por mala manipulación y almacenamiento incorrecto del Chocho

En la selección y pesado del grano las inadecuadas medidas de higiene como el mal lavado de manos o superficies mal desinfectadas favorecen el crecimiento de los microorganismos. En el almacenamiento la temperatura ambiente ayuda a la rápida descomposición del grano, aumentando el crecimiento de bacterias que a su vez hace que el grano adquiere una textura, olor y sabor diferente por la descomposición de proteínas y grasas produciendo intoxicaciones alimentarias (Bayona, 2009).

1.2.13. Ceviche

La palabra ceviche tiene distintas formas de escritura conocidas como, por ejemplo: cebiche, seviche o sebiche; este plato exquisito resulta polémico desde su propio nombre, por no contar con una historia clara de su origen. Los historiadores han podido identificar que, desde hace más de 2,000 años, en la época de la cultura Mochica, en el norte del Perú ya se preparaba un plato que bien podría haber sido el origen del actual cebiche peruano; se trataba de un potaje (plato a base de verduras y legumbres cocidas en abundante agua, presenta muchas variables), consistente

con pescado fresco cocinado en frío, ‘macerado’ en los agrios jugos de frutos lugareños como el tumbo (*Passiflora tripartita*) y maracuyá (*Passiflora edulis*) (Briones, y Murillo, 2017).

1.2.14. Ceviche de chocho de la ciudad de Riobamba

El Instituto Nacional de Patrimonio Cultural del Ecuador declaró al ceviche de chocho como un plato tradicional de la provincia de Chimborazo, que contiene jugo de tomate espeso, chocho sin cáscara, cebolla encurtida, cuero u oreja de cerdo; se acompaña con canguil, maíz tostado, chifles, sin olvidar el ají rojo y ají blanco que según los riobambeños si no se acompaña con este ají no es el tradicional ceviche de chochos (Salazar, 2015). En todo caso en esta investigación se analizará el ceviche de chocho tradicional, tal cual es servido por las vendedoras, sin ningún aditivo por el consumidor.

La calidad sanitaria del ceviche de chochos puede ser afectada también por la microbiota y adquirida de la materia prima a utilizar, además de los ingredientes que se agregue durante su elaboración. Al ser un plato que no sufre un proceso de cocción de todos sus componentes, puede representar un riesgo para la salud de los consumidores (Sara and Gonzales, 2015)

1.2.14.1. Cualidades que contiene los ingredientes principales del ceviche de chocho:

1. El limón aporta una gran cantidad de vitamina C y minerales como el potasio. También interviene en muchas reacciones enzimáticas como la producción del colágeno, excelente antioxidante que ayuda a reducir el riesgo de algunas enfermedades (Susana del Pozo de la Calle, 2016).
2. El tomate fresco y maduro, es un eficaz remedio para eliminar el ácido úrico. También alivian las enfermedades del estómago, hígado, intestinos. Contiene vitamina B y C, minerales como el potasio, fósforo. Además, presenta un alto contenido en carotenos como el licopeno, una importante fuente de antioxidantes (Carlos Kozel, 2012).
3. El maíz tostado es una buena fuente de hidratos de carbono, también contiene mucha fibra que es esencial para la digestión por que ayuda a acelerar el paso de los alimentos por el tracto intestinal, además ayuda a mantenernos satisfechos entre comidas, la proteína que posee es de 4 g por cada 48 g, lo que equivale a un 1/4 de taza (Jinan Banna, 2011).
4. La cebolla es rica en vitaminas A, B1 C, E; minerales como calcio, magnesio, yodo, cobalto, cobre, hierro, bromo, fósforo, cloro, potasio, níquel, silicio, zinc; el azufre, es uno de los antioxidantes más poderosos, también es importante para mantener al cuerpo bien nutrido, en especial el sistema nervioso y los huesos (K. Laura Garcés G, 2012).

5. El cuero de cerdo se compone principalmente de proteína, entre ellas están: El colágeno que es un tejido conectivo que se convierte en gelatina cuando llega al punto de ebullición, la albúmina es una proteína soluble, la elastina es sumamente inerte al ataque químico. Como todas las materias biológicas, contiene también lípidos, carbohidratos, sales inorgánicas y agua (Edgar Garrido Castelán, 2006).

1.3. Microbiología.

1.3.1. Indicadores de la calidad microbiológica afines a este estudio.

1.3.1.1. Microorganismos aerobios mesófilos

En este grupo se incluyen todos los microorganismos, capaces de desarrollar en presencia de oxígeno a una temperatura comprendida entre 20°C y 45°C con una óptima entre 30°C y 40°C.

El recuento de microorganismos aerobios mesófilos, en condiciones establecidas, estima la microbiota total sin especificar tipos de microorganismos.

Refleja la calidad sanitaria de los productos analizados, indicando además de las condiciones higiénicas de la materia prima, la forma como fueron manipulados durante su elaboración.

Un recuento bajo de aerobios mesófilos no implica o no asegura la ausencia de patógenos o sus toxinas, de la misma manera un recuento elevado no significa presencia de flora patógena. (Agencia Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología, 2014)

Un recuento elevado puede significar:

1. Excesiva contaminación de la materia prima.
2. Deficiente manipulación durante el proceso de elaboración.
3. La posibilidad de que existan patógenos, pues estos son mesófilos.
4. La inmediata alteración del producto.

En el uso o la interpretación del recuento de microorganismo aerobios mesófilos hay ciertos factores que deben ser tenidos en cuenta:

Este recuento es sólo de microorganismos vivos.

1. La utilidad del indicador depende de la historia del producto y el momento de la toma de muestra. En alimentos perecederos manipulados correctamente pueden desarrollar recuentos elevados y perder calidad si son almacenados por un período de tiempo

prolongado. En este caso, el recuento no se encontraría elevado por la condición de higiene del producto, sino por la vida útil del mismo.

2. Los procedimientos que sufre el alimento en su elaboración, por ejemplo, un proceso térmico, pueden enmascarar productos con altos recuentos o condiciones deficientes de higiene. Además, el almacenamiento prolongado en congelación o con pH bajo puede producir una disminución del recuento.
3. El recuento de mesófilos nos indica las condiciones higiénico sanitarias de algunos alimentos, pero no tiene significado sanitario

1.3.1.2. *Coliformes totales y coliformes fecales*

Debido a que un gran número de enfermedades son transmitidas por vía fecal-oral utilizando como vehículo los alimentos y el agua, es necesario contar con microorganismos que funcione como indicador de contaminación fecal.

El grupo coliforme es constante, abundante y casi exclusivo de la materia fecal, poseen la característica de sobrevivencia y capacidad de multiplicación en ambientes externos al intestino. En productos alimenticios que han recibido un tratamiento térmico, se utilizan como indicadores de malas prácticas sanitarias.

El grupo de bacterias coliformes totales comprende todos los bacilos Gramnegativos aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa con producción de gas en un lapso máximo de 48 h. a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. (Camacho *et al.*, 2009)

Este grupo está conformado por 4 géneros principalmente:

1. *Enterobacter.*
2. *Escherichia.*
3. *Citrobacter.*
4. *Klebsiella.*

La determinación de microorganismos coliformes totales por el método del Número más Probable (NMP), se fundamenta en la capacidad de este grupo microbiano de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas al incubarlos a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 h., utilizando un medio de cultivo que contenga sales biliares. Se basa en la determinación del número más probable (NMP) por la técnica de dilución en tubos, utilizando el medio líquido selectivo caldo verde brillante bilis-lactosa o similar para el ensayo presuntivo y los tubos que presentan gas son confirmados en agar Eosina azul de metileno (EMB). (Instituto Ecuatoriano de Normalización NTE INEN 1529-6, 1990)

1.3.1.3. Mohos y levaduras

Comúnmente se da el nombre de moho a ciertos hongos multicelulares filamentosos, dotados de un micelio verdadero, microscópicos, y cuyo crecimiento en los alimentos se conoce fácilmente por su aspecto aterciopelado o algodonoso.

Los hongos son microorganismos aerobios estrictos, eucarióticos, característicamente miceliares. Se desarrollan en un rango de pH de 2 a 9, temperaturas entre 10 a 35°C y pueden crecer en condiciones de actividad de agua (a_w) relativamente bajas (<0.85), aunque las levaduras generalmente requieren una mayor actividad de agua. (Toro Villa and Iza Sarabia, 2018)

Asimismo, las levaduras son hongos que crecen generalmente en forma de agregados sueltos de células independientes, que pueden ser globosas, ovoides, piriformes, alargadas o casi cilíndricas. Cuando crecen sobre medios sólidos, forman colonias de aspecto característico que recuerdan a las colonias bacterianas.

La relevancia de la presencia de mohos y levaduras en los alimentos está definida por la capacidad de producir diferentes grados de deterioro y descomposición de los mismos. Además, que ciertos hongos poseen la capacidad de producir micotoxinas, compuestos estables que no se destruyen durante el procesamiento de alimentos, pudiendo desencadenar enfermedades graves e incluso la muerte en poblaciones inmunocomprometidas, ancianos y niños. (Agencia Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología, 2014)

1.3.1.4. Parásitos

La mayoría de los parásitos intestinales se transmiten por contaminación del ambiente y en este aspecto, el agua y los alimentos juegan un papel importante. Si las heces no se eliminan de manera apropiada, los quistes, ooquistes y huevos de los parásitos intestinales pueden contaminar las fuentes de agua, alimentos etc. (Hernández-Vásquez and Burstein, 2019)

1.3.2. Medios de cultivo

El análisis y determinación de microorganismos presentes en las unidades de análisis se hacen posibles con la utilización de medios de cultivo que posean los nutrientes necesarios para el desarrollo, multiplicación y crecimiento para evidenciar su morfología, reacciones metabólicas y fisiológicas que dependerán de cada una de las especies y géneros en cuanto a las necesidades de composición, pH, presión osmótica, potencial redox, hidratación temperatura y la atmósfera. Además, el aislamiento es fundamental para obtener cepas puras y proceder a su posterior análisis genético mediante PCR u otras técnicas de vanguardia. (Álvarez Benito, Boquet Jiménez and De Fez, 1995)

1.3.2.1. Tipos de medios de cultivo

Ya que no existe un medio universal que abarque todas a las necesidades de una amplia gama de bacterias, al paso del tiempo se han venido investigando y desarrollando medios de cultivo que cubran las necesidades de los estudios microbiológicos acorde sus necesidades nutritivas y hábitat.

Según el fin que estén destinados a emplearse se clasifican en:

1. **Medios selectivos:** son aquellos que se emplean para inhibir en su totalidad el crecimiento de bacterias diferentes al que se quiere aislar y están presentes en la muestra.
2. **Medios de enriquecimiento:** son aquellos que favorecen las condiciones para el crecimiento de una bacteria en particular que se encuentra en una cantidad mínima, un ejemplo de ello es el caldo selenito y tetrionato que se emplea para incrementar el número de *Salmonella*.
3. **Medios de diferenciación:** son aquellos que se emplean para poner en manifiesto a las bacterias que dan positiva en alguna prueba bioquímica. Como los medios empleados para enterobacterias que en su composición incluyen lactosa.
4. **Medios de identificación:** se emplean para la identificación de un solo tipo de bacteria.
5. **Medios de multiplicación:** aquellos que poseen una composición categórica y óptima para un grupo de microorganismo al cual va encaminado.
6. **Medios de conservación:** en su composición favorece para el mantenimiento de los microorganismos y se incuban criogénicamente a $+2 \pm 4$ °C. (Cuesta, 2000)

1.3.2.2. Agar Eosina Azul de metileno EMB

Es un medio diferencial para el cultivo de *Enterobacteriaceae*, en su composición contiene eosina y azul de metileno y la inserción de lactosa permite distinguir los microorganismos que fermentan el azúcar y los que no. Generalmente se usa para la identificación característica de *E coli*. Ya que se producen colonias verde metálicas brillantes.

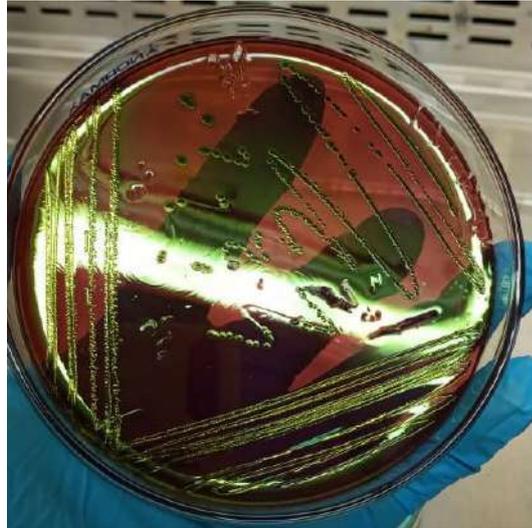


Figura 4-1: E. coli en agar EMB

Fuente: (Calvache, 2019)

1.3.2.3. Agar Standard Methods o PCA

Standard Methods o Placa de agar recuento PCA; es un medio no selectivo recomendado para el conteo de bacterias de interés sanitario, que son indicadores de la contaminación o la carga microbiana en los alimentos. (Agencia Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología, 2014)

Plate Count Agar (PCA) Es un medio que no contiene inhibidores o indicadores y es relativamente rico en nutrientes. La digestión enzimática de caseína (triptona) es una fuente de nitrógeno que contiene un alto nivel de aminoácidos libres y el extracto de levadura suministra principalmente las vitaminas del complejo B.

La glucosa proporciona una fuente de energía para el crecimiento de bacterias, mientras que el agar es el agente solidificante. (MERCK, 2019)

1.3.2.4. Agar Manitol

El agar manitol salado, es un medio para aislamiento y recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva donde la concentración de cloruro de sodio (NaCl), inhibe el crecimiento de bacterias que no pertenecen al género *Staphylococcus*. (BD Diagnostic Systems, 2013b)

1.3.3. Diluyente.

Posterior a la toma de la muestra, se efectúan diluciones con el objetivo de lograr conseguir una muestra representativa del alimento, en cuanto al aspecto cuantitativo y cualitativo con el fin de

lograr una distribución de microorganismos lo más uniforme posible y se realiza gracias al empleo del diluyente.

El diluyente favorece a la recuperación de microorganismo que se encuentran en la muestra para ponerlos en manifiesto cuanto se cultivan, un diluyente debe poseer osmolaridad y pH favorables para la activación y recuperación de las colonias microbianas. Y se utiliza en la preparación de la solución madre y para las respectivas diluciones decimales. (Camacho *et al.*, 2009)

En análisis microbiológico de alimentos un buen diluyente es aquel que no produzca modificaciones en la flora del alimento de análisis es decir contenga lo más fielmente la microbiota de la muestra, sin favorecer ni suprimir el desarrollo.

1.3.4. Agua de peptona.

El Agua de Peptona Tamponada es un diluyente destinado a la preparación de suspensiones. El medio también se puede usar para el pre enriquecimiento de Salmonella, antes del enriquecimiento selectivo y de las fases de aislamiento, también se usa para diluciones decimales para los análisis microbiológicos. (Bioser, 2018)

Compuesta por una mezcla de fosfatos es una solución tampón para mantener las variaciones de pH al momento de agregar la muestra como en el crecimiento microbiano en sí, el cloruro de sodio mantiene el nivel salino adecuado para el desarrollo y mantenimiento de los microorganismos; por su parte la peptona provee los nutrientes necesarios para los organismos que no presentes exigencias particulares.

1.3.5. Tinción Gram

Después de haber realizado la siembra en agares selectivos e identificado fenotípicamente las bacterias de interés, se procede a la realización de la Tinción Gram la cual cede la coloración de las mismas y poder verificar su morfología microscópica. Asimismo, permite la revisión de la pureza de las cepas.

1.3.6. Resistencia antimicrobiana

La resistencia a los antimicrobianos es en la actualidad una de las principales emergencias que afecta a todas las especies microbianas. La creciente prevalencia de los microorganismos resistentes tiene una notable repercusión en la salud pública porque condiciona el incremento de los índices de morbilidad y mortalidad por infecciones, prolonga la enfermedad y el incremento sustancial de los costos sanitarios (Cuba *et al.*, 2011)

El fenómeno de la resistencia afecta principalmente a las bacterias, y de forma general, a la gran mayoría de los géneros y especies microbianas y parasitarias que pueden ser transferidos al hombre desde el ambiente por diferentes vías, entre ellas, la cadena alimentaria (FAO, 2010).

La resistencia a los antimicrobianos se define, desde el punto de vista médico, como la ausencia de respuesta clínica a la administración de los antibióticos. El efecto adverso se registra de manera característica como un fracaso en el tratamiento. Las enfermedades causadas por una cepa resistente pueden empeorar o causar la muerte ya que el antimicrobiano no ejerce ningún efecto. La resistencia antimicrobiana conlleva en ocasiones a la necesidad de utilizar antibióticos de amplio espectro o combinaciones de antibióticos para lograr combatir determinadas enfermedades infecciosas, lo que trae como consecuencia efectos negativos sobre el sistema gastrointestinal tales como alteraciones en las funciones de la microbiota intestinal normal (Morales González and Navazo Bermejo, 2006).

El control de la resistencia a los antimicrobianos en alimentos se debe realizar en bacterias indicadoras de la calidad sanitaria tales como: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, que se emplean a menudo como parámetros de higiene. También, en las bacterias zoonóticas y agentes patógenos humanos como *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* (Maynard *et al.*, 2004).

Salmonella y *Escherichia coli*, que con frecuencia afectan al hombre y también a los animales, se consideran los dos géneros con mayores riesgos de transferencia zoonótica de resistencias. La resistencia de estas bacterias ha desencadenado problemas de salud por ejemplo *Salmonella Typhimurium* DT104 multiresistente que ha aumentado en los últimos años, ocasionando brotes de fiebre tifoidea, causando incluso la muerte (Cuba *et al.*, 2011).

1.4. Base legal

Normativa:

Las bases legales de este anteproyecto de investigación se encuentran en las siguientes normativas:

La Constitución Ecuatoriana reformada en el año 2008 en su artículo 13 establece que “Las personas y colectividades tienen derecho al acceso seguro y permanente a alimentos sanos, suficientes y nutritivos; preferentemente producidos a nivel local y en correspondencia con sus diversas identidades y tradiciones culturales” (Constitución de la República del Ecuador, 2008).

1. NTE INEN 2390: Leguminosas. Grano desamargado de chocho. Requisitos

TABLA 2: Análisis microbiológico del chocho desamargado

REQUISITOS	UNIDAD	VALOR	METODO DE ENSAYO
Recuento aerobios totales	UFC/g	$18 \times 10^2 - 1 \times 10^3$	NTE INEN 1 529-5
Recuento coliformes totales	NMP/g	$10 - 10^2$	NTE INEN 1 529-7
Recuento de hongos y levaduras	UFC/cm ³	$0 - 5 \times 10^2$	NTE INEN 1 529-10
<i>Escherichia coli</i>		Ausencia	NTE INEN 1 529-8
Tipificación <i>E. Coli</i> 0157 HT		Ausencia	NTE INEN 1 529-8

UFC = Unidades Formadoras de Colonias.
NMP = Número Más Probable.

TABLA 4: Especificaciones de calidad del producto desamargado mediante el proceso térmico-hídrico

Descripción	Producto comestible limpio húmedo
Presentación	Natural, uniforme, color blanco-crema preferentemente
Olor	Característico, libre de olores extraños
Sabor	Característico del chocho, libre del sabor amargo

Figura 5-1: Especificaciones para el grano desamargado del chocho.

Fuente: (NTE INEN 2390)

1. Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano – Perú. Artículo 15, sección XV

15. COMIDAS PREPARADAS						
15.1 Comidas Preparadas sin tratamiento térmico (ensaladas crudas, mayonesas, salsa de papa huancaína, ocopa, postres, jugos, otros). Comidas preparadas que llevan ingredientes con y sin tratamiento térmico (ensaladas mixtas, palta rellena, sándwiches, cebiche, postres, refrescos, otros).						
Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Límite por g. ó mL	
					m	M
Aerobios Mesófilos	2	3	5	2	10^5	10^6
Coliformes	5	3	5	2	10^2	10^3
<i>Staphylococcus aureus.</i>	5	3	5	2	10	10^2
<i>Escherichia coli</i>	5	3	5	2	10	10^2
<i>Salmonella sp.</i>	10	2	5	0	Ausencia/25 g	-----

Figura 6-1: Especificaciones microbiológicas para comidas preparadas.

Fuente: (NTS N° 071 DIGESA, 2008)

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

El plan de análisis microbiológico del ceviche de chochos expendidos en el Coliseo Teodoro Gallegos Borja y explanada del barrio Villa María, se detalla en la Figura 7; que comprende el muestreo, siembra, incubación, cualificación y cuantificación de unidades formadoras de colonias, pruebas confirmatorias y antibiograma.

2.1. Lugar de Investigación

El análisis microbiológico del ceviche de chocho se realizará en los lugares de venta más concurridos en la ciudad de Riobamba, tales como: el Coliseo Teodoro Gallegos Borja, la explanada del barrio Villa María en el periodo octubre-diciembre del año 2019.

Para el análisis y procesamiento microbiológico de las muestras se realizó:

Lugar: Laboratorio de Análisis microbiológico de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Cantón: Riobamba

Provincia: Chimborazo

2.2. Factores de Estudio

2.2.1. Población de estudio

La población de estudio son todos los puestos de expendio ambulatorio de ceviche de chochos. (registrados en el GAD Riobamba)

2.2.2. Localización del muestreo

Lugares de mayor concurrencia en la ciudad de Riobamba; el Coliseo Teodoro Gallegos Borja y la explanada del barrio Villa María en el periodo octubre-diciembre del año 2019.

2.2.3. Tamaño de la muestra.

Este estudio se enfoca en los lugares de mayor concurrencia ya estipulados anteriormente, los mismos que constan de 7 puestos de expendio, de estos se tomaron 2 muestras, en la mañana y en

la tarde con el fin de observar la variabilidad en la calidad microbiológica acorde a condiciones ambientales como: Vectores, temperatura, polvo, etc. Además de cada muestra madre se realizó 7 diluciones, de las cuales se analizaron las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} .

2.2.4. Método de muestreo

El método de muestreo a utilizar es mixto ya que el universo se escogerá de manera no probabilística a conveniencia en los lugares de venta más concurridos, por otra parte, el método de muestreo de las unidades de análisis se realizará probabilísticamente de modo aleatorio simple. (Hernández Sampieri, Fernández Collado and Baptista Lucio, 2014)

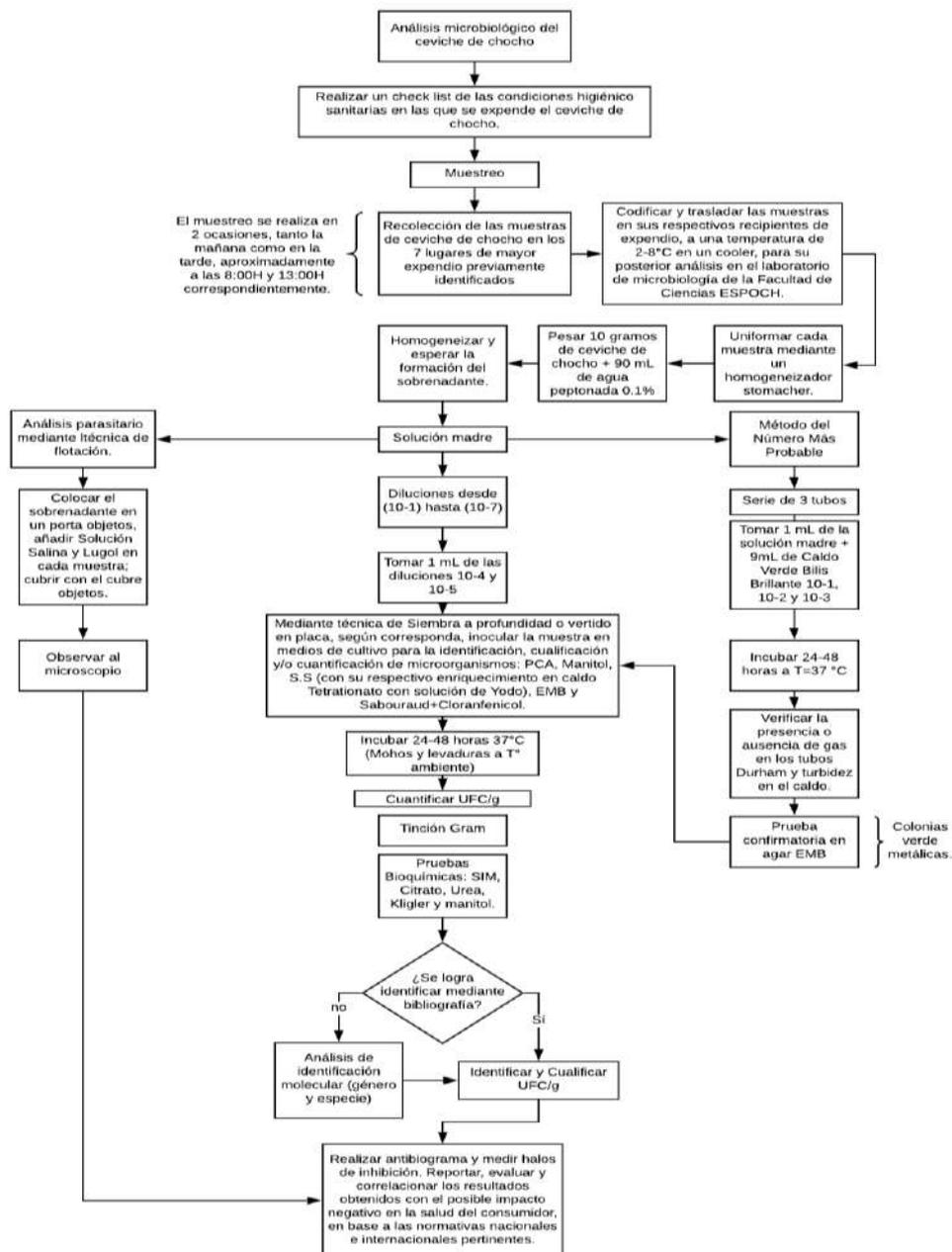


Figura 1-2: Metodología para el análisis microbiológico del ceviche de chochos.

Elaborado por: (Calvache, 2019)

2.3. Materiales, equipos y reactivos

Tabla 1-2: Materiales utilizados.

Materiales
Guantes
Mascarilla
Gorro
Mandil
Cooler
Marcador
Envases de vidrio estériles 250 mL
Algodón
Gasa
Cinta indicadora
Papel parafilm
Puntas azules estériles
Puntas amarillas estériles
Pipeta automática de 1000 µL
Probeta de 100mL
Jeringuillas de 10mL
Tubos de ensayo
Gradilla
Lámpara de alcohol
Asa de platino
Tubos Durham
Hisopos
Erlenmeyer de 50mL
Cajas Petri
Placas porta y cubre objetos

Realizado por: (Calvache, 2019)

Tabla 2-2: Equipos, Medios de cultivo y Reactivos usados en el análisis microbiológico.

Equipos	Balanza analítica
	Cámara de flujo laminar
	Estufa bacteriológica
	Autoclave
	Microscopio
Medios de cultivo	Agar Eosina azul de metileno
	Agar Standard Methods
	Agar manitol
	Agar Sabouraud más cloranfenicol
	Agar S.S.
	Caldo verde bilis brillante
	Agua de peptona
	Enriquecimiento Base para Salmonella
Suplemento de enriquecimiento de Salmonella	
Reactivos	Tinción Gram
	Cristal violeta
	Lugol
	Alcohol acetona
	Safranina
	Aceite de Inmersión

Realizado por: (Calvache, 2019)

2.4. Metodología

2.4.1. Métodos y técnicas

Técnicas: protocolo de muestreo de la guía para muestreos de alimentos FAO (Organización de las naciones Unidas para la agricultura y la alimentación). (FAO, 2010, pp. 35-36)

Protocolo de análisis microbiológico de ceviches de chochos expendidos en el Coliseo Teodoro Gallegos Borja y Explanada del barrio Villa María de la ciudad de Riobamba

- 1. Objeto del muestreo:** ceviche de chochos
- 2. Objetivo del muestreo:** analizar microbiológicamente los ceviches de chochos en los lugares de mayor expendio y más concurridos de la ciudad de Riobamba.
- 3. Características a evaluar:** cuantificar las unidades formadoras de colonias y cualificar la presencia o ausencia de bacterias, parásitos, mohos y levaduras de interés para el estudio, con un posible impacto en la salud pública de la Ciudad.
- 4. Punto de muestreo:** Coliseo Teodoro Gallegos Borja y Explanada del barrio Villa María
- 5. Plan de muestreo:** recolección de 2 unidades de muestra por cada local ubicado en dichos lugares, tanto por la mañana como en la tarde.
- 6. Envases de recolección:** recipientes plásticos en los cuales son entregados al consumidor.
- 7. Toma de muestra:** 2 unidades de ceviches de chochos de cada local con su respectiva codificación.
- 8. Transporte de la muestra:** cooler's para mantener la muestra a una temperatura de 2 a 8 °C, hasta llegar al laboratorio para su posterior análisis.
- 9. Informe de muestreo:** Listado de locales y vendedores registrados en el GAD Riobamba con sus respectivas direcciones.
- 10. Análisis de laboratorio:** protocolo de análisis microbiológico en medios de cultivo: Agar PCA, agar S.S, agar EMB, agar Manitol Salado, agar Saboraud, caldo verde brillante bilis, caldo tetracionato.
- 11. Análisis y Discusión de resultados:** interpretación con las normas:
 - NTE INEN 2390: Leguminosas. Grano desamargado de chocho. Requisitos
 - Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano – Perú. Artículo 15, sección XV

2.4.2. Pre análisis de diluciones óptimas para el conteo microbiano.

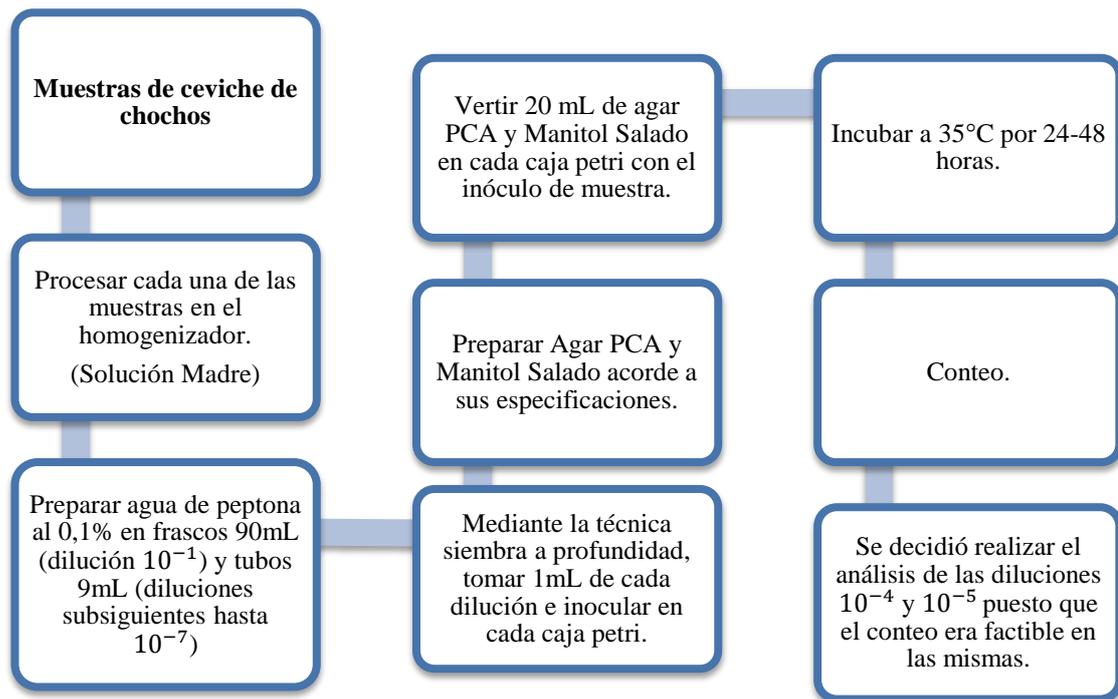


Figura 2-2: Metodología para el pre-análisis de diluciones óptimas para el conteo microbiano.

Realizado por: (Calvache, 2019)

2.4.3. Recuento de aerobios mesófilos y *Staphylococcus aureus*.

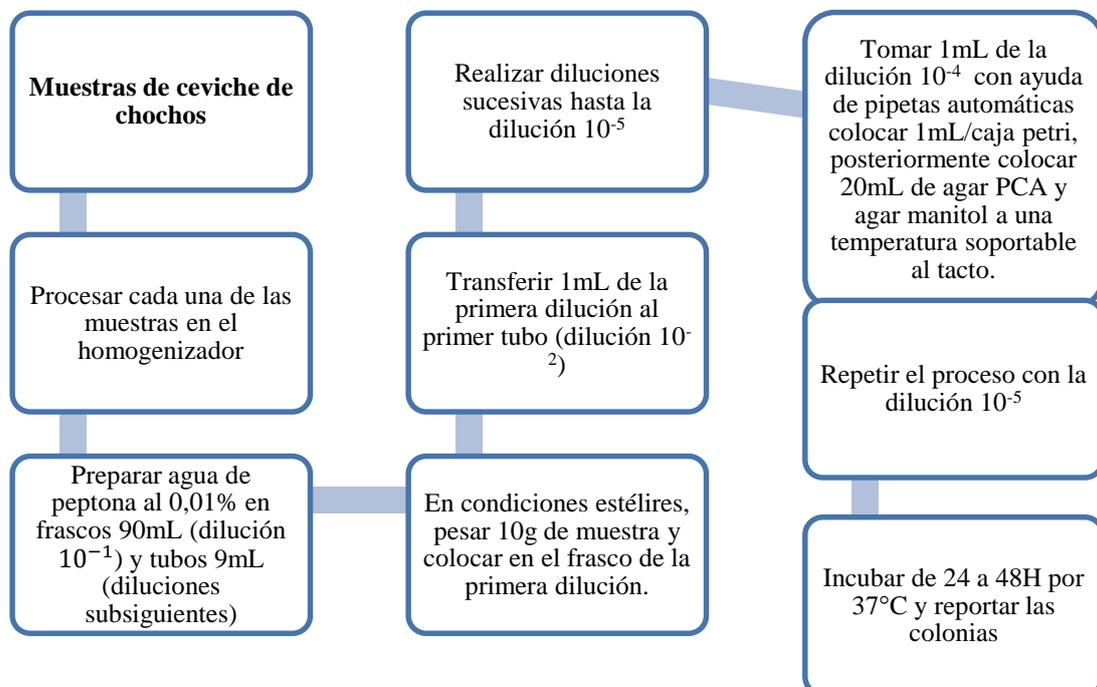


Figura 3-2: Metodología para el recuento de Aerobios mesófilos y *Staphylococcus aureus* respectivamente.

Realizado por: (Calvache, 2019)

2.4.4. Preparación del medio de cultivo PCA (PLATE COUNT AGAR)

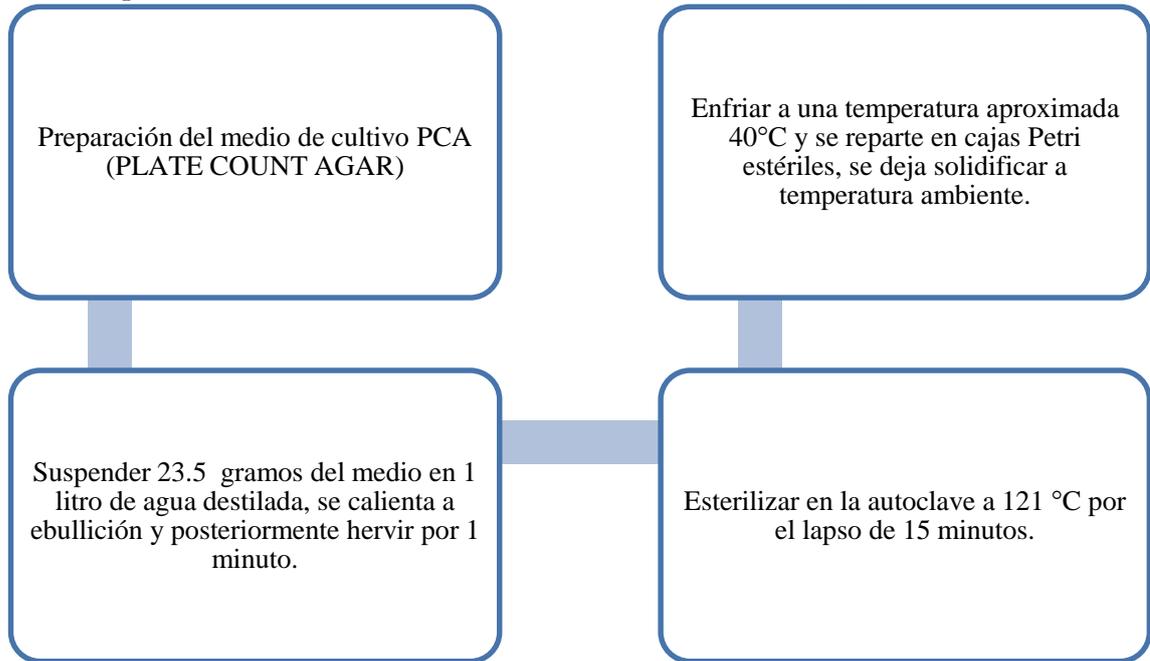


Figura 4-2: Metodología de la preparación del medio de cultivo PCA.

Realizado por: (Calvache, 2019)

Fuente: (MERCK, 2019).

2.4.5. Preparación del medio de cultivo Manitol salado.

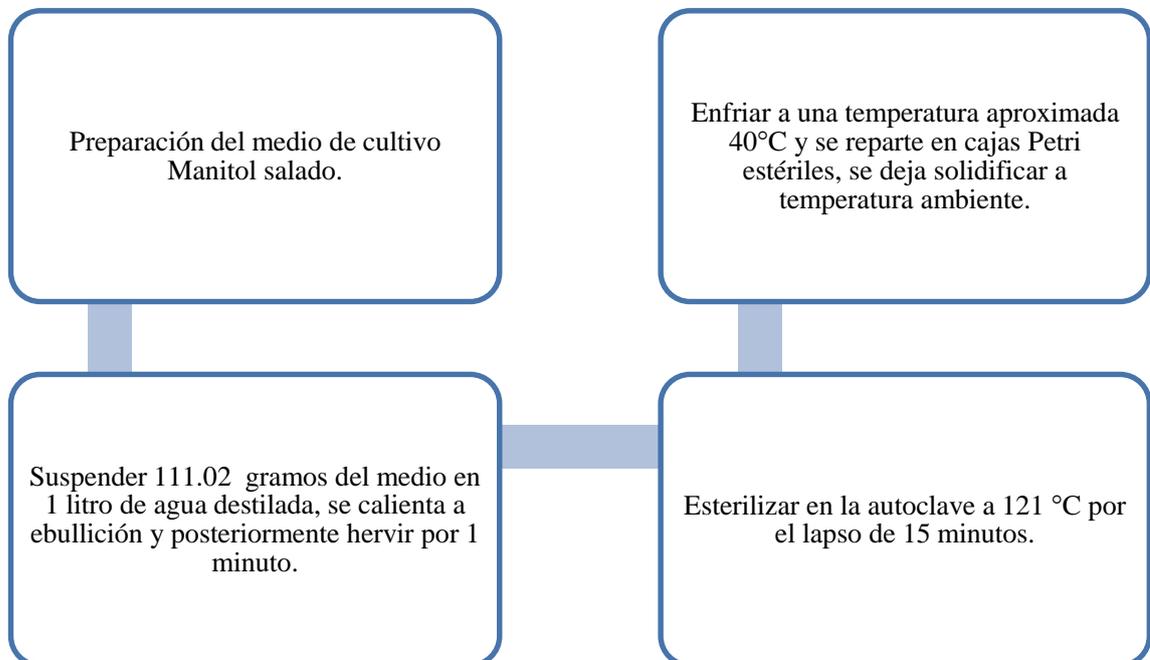


Figura 5-2: Metodología de la preparación del medio de cultivo Manitol Salado.

Realizado por: (Calvache, 2019)

Fuente: (BD Diagnostic Systems, 2013b)

2.4.6. Prueba confirmatoria para *Staphylococcus aureus*

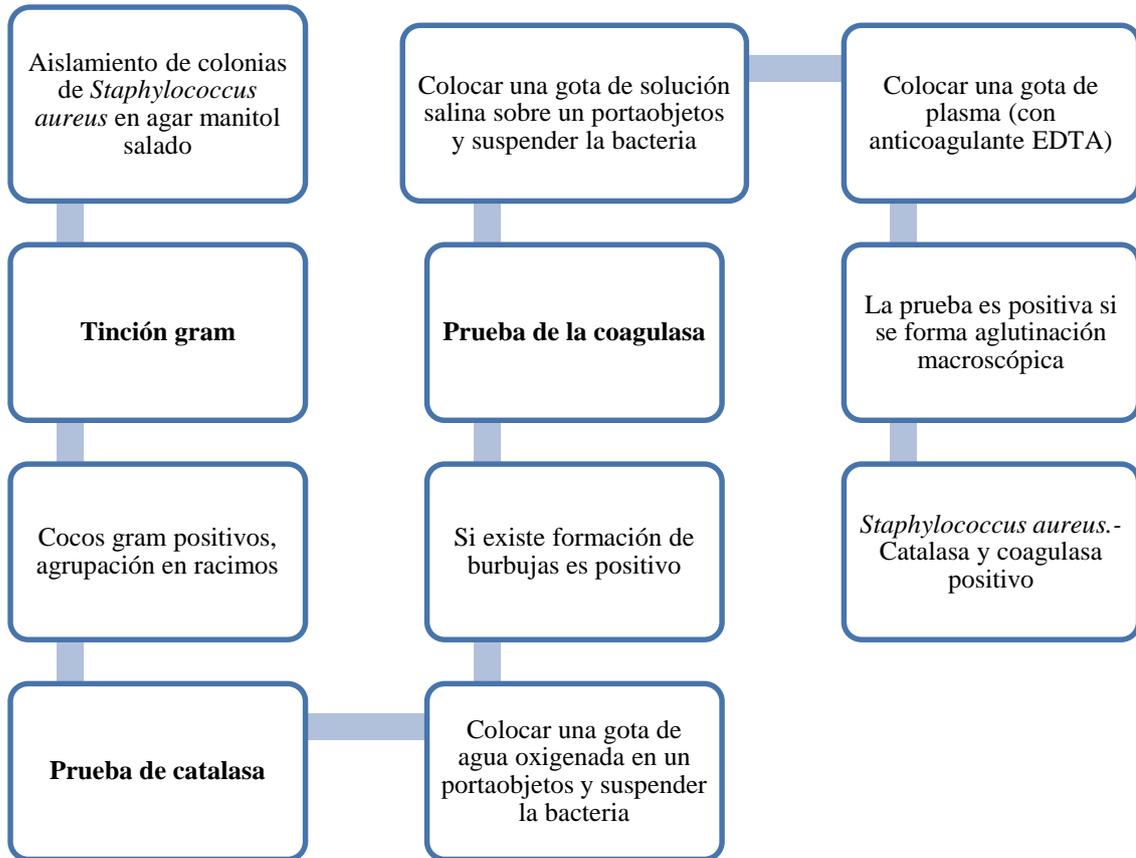


Figura 6-2: Metodología para la confirmación de *Staphylococcus aureus*.

Realizado por: (Calvache, 2019)

Fuente: (Instituto Nacional de Salud de Colombia, 2011)

2.4.7. Determinación de microorganismos coliformes por la técnica del número más probable (NMP)

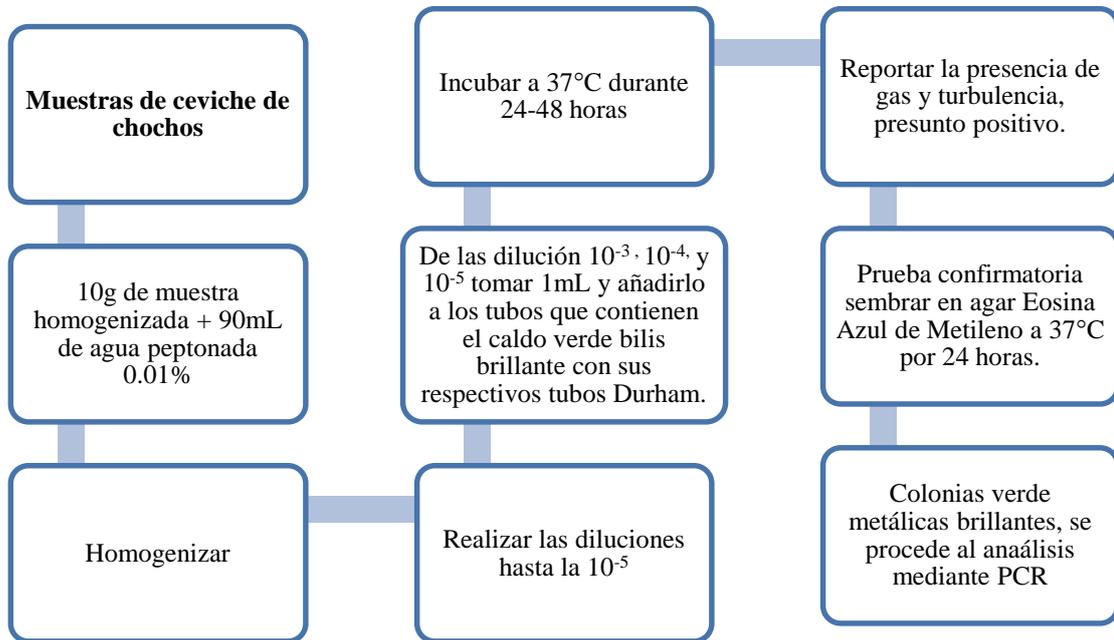


Figura 7-2: Metodología para la determinación de microorganismos coliformes por la técnica del número más probable (NMP).

Realizado por: (Calvache, 2019)

Fuente: (Camacho *et al.*, 2009)

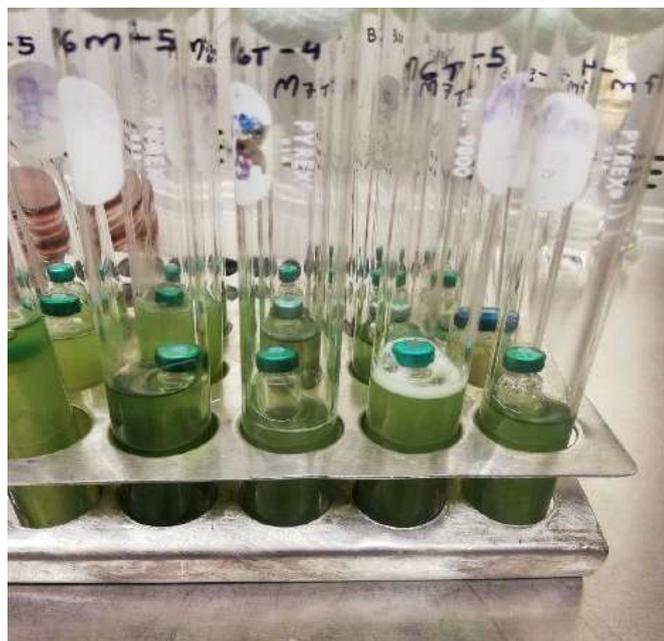


Figura 8-2: Caldo verde bilis brillante con presencia de gas.

Realizado por: (Calvache, 2019)

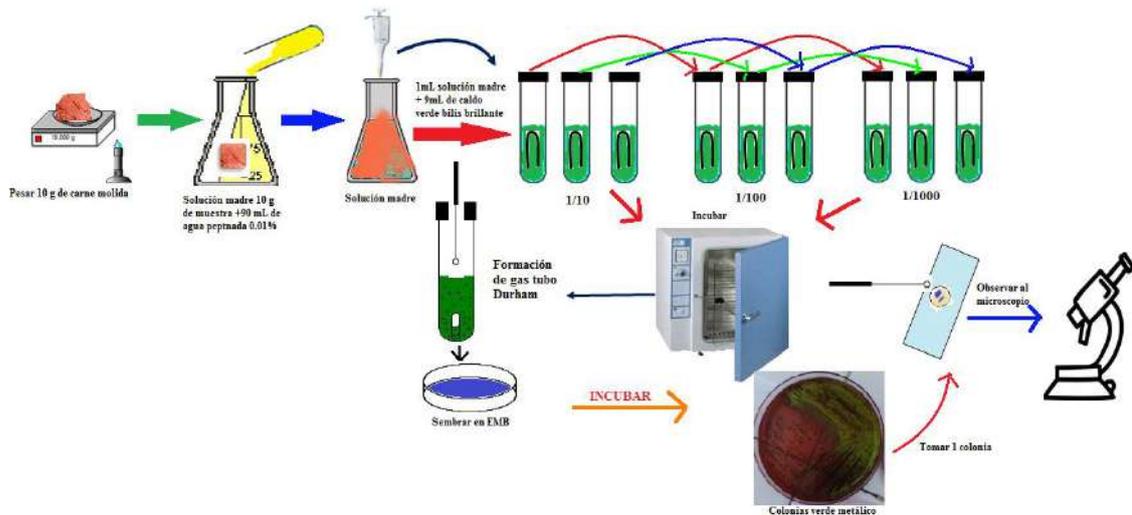


Figura 9-2: Proceso para la determinación de coliformes mediante la técnica del NMP.

Fuente: (Jara, 2016)

2.4.8. Preparación del medio de cultivo EMB (eosina azul de metileno)

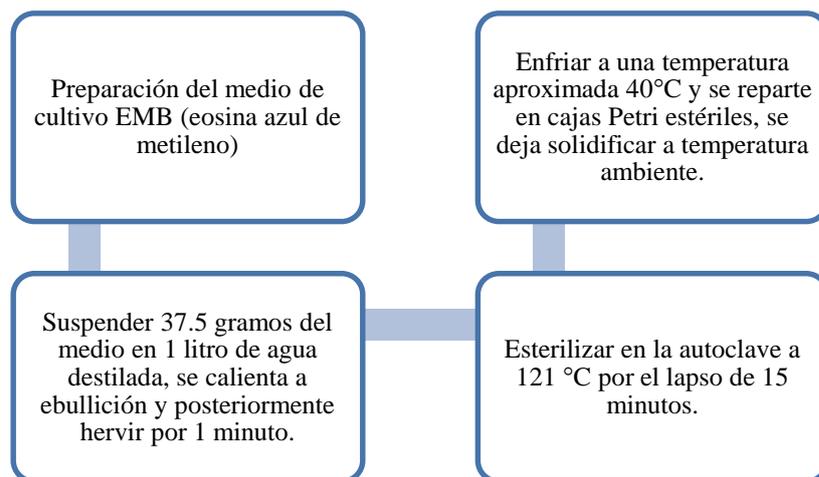


Figura 10-2: Metodología para la preparación del medio EMB.

Realizado por: (Calvache, 2019)

Fuente: (BD Diagnostic Systems, 2013a).

2.4.9. Identificación de *Salmonella*.

2.4.9.1. Preparación del caldo tetrionato (caldo para enriquecimiento)

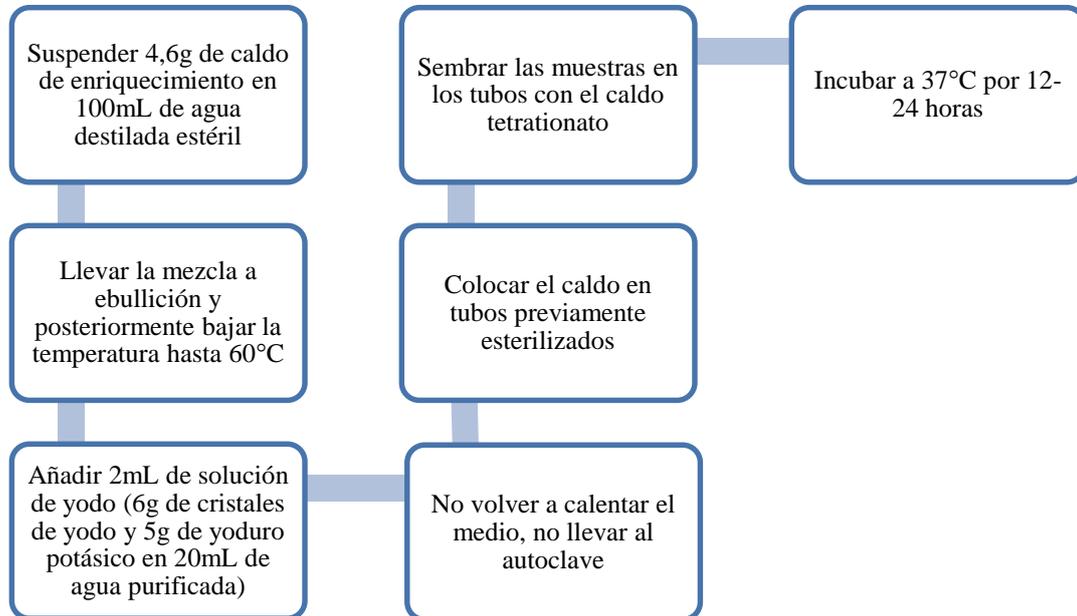


Figura 11-2: Metodología para el enriquecimiento de *Salmonella* y *Shigella* en caldo tetrionato.

Realizado por: (Calvache, 2019)

Fuente: (MERCK, 2018)

2.4.9.2. Preparación del agar SS.

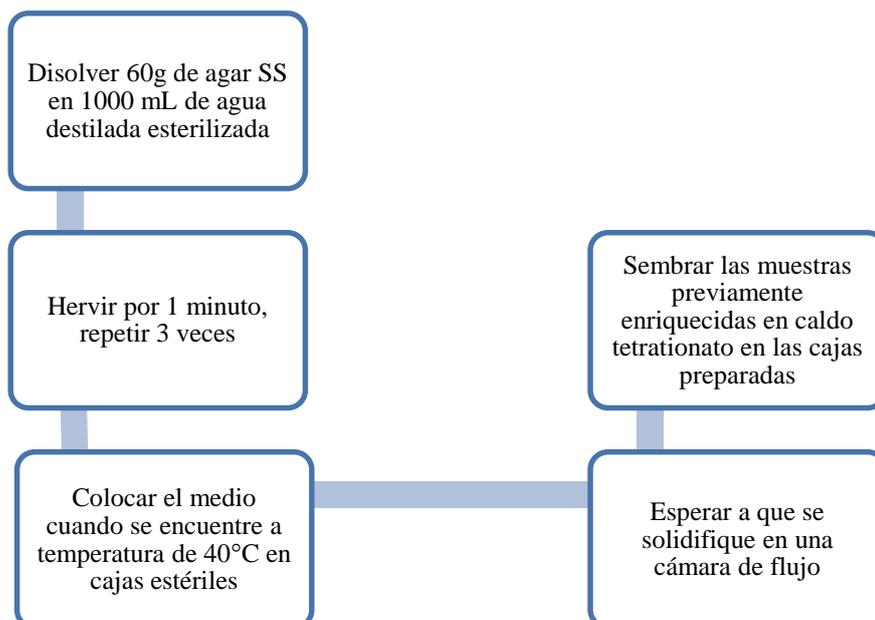


Figura 12-2: Metodología para la preparación del medio S.S.

Realizado por: (Calvache, 2019)

Fuente: (MERCK, 2018)

2.4.10. Purificación de cepas.

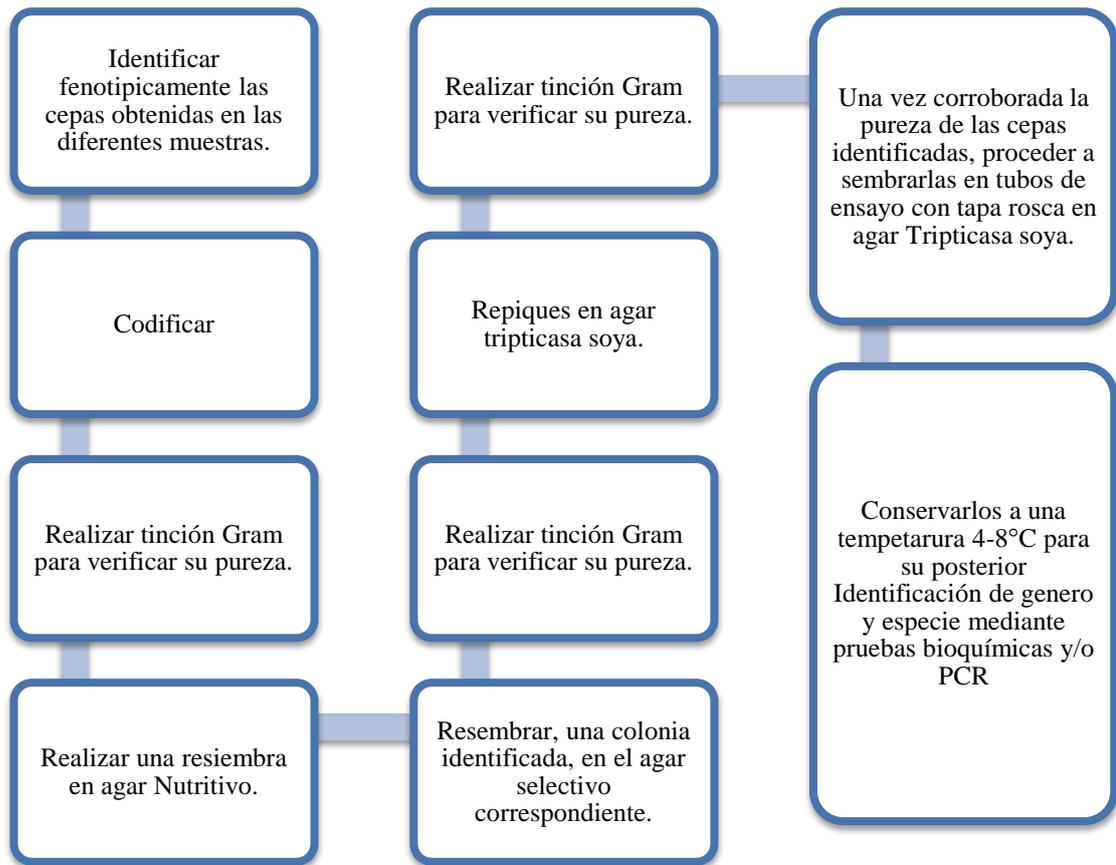


Figura 13-2: Metodología para la purificación de cepas microbiológicas.

Realizado por: (Calvache, 2019)

Fuente: (Álvarez Benito, Boquet Jiménez and De Fez, 1995)

2.4.11. Tinción Gram

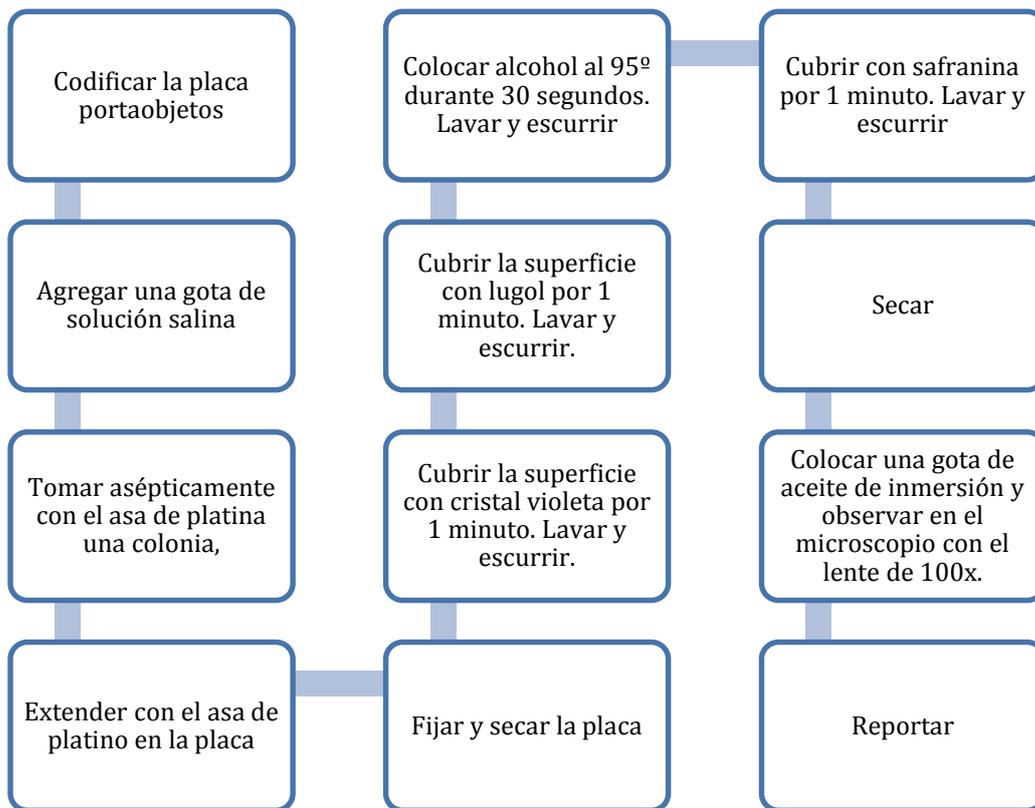


Figura 14-2: Metodología para la tinción Gram.

Realizado por: (Calvache, 2019)

Fuente: (U. Salamanca, 2017)

2.4.12. Antibiograma en agar Mueller Hinton

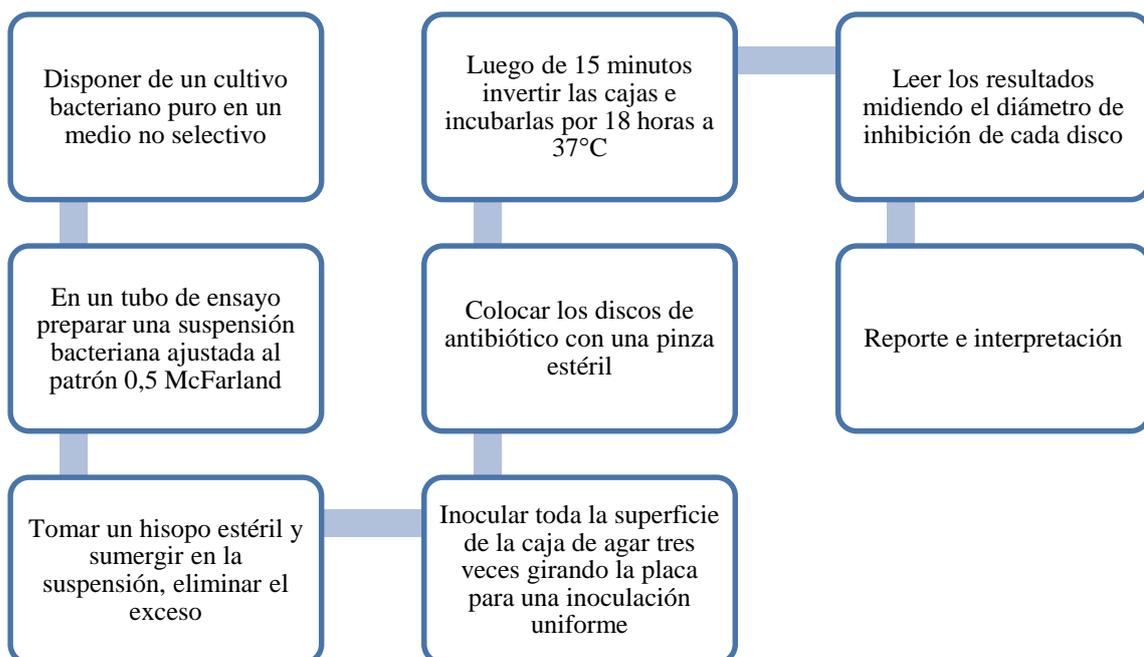


Figura 15-2: Metodología para la realización del antibiograma en agar Mueller Hinton.

Realizado por: (Calvache, 2019)

Fuente: (INSTITUTO NACIONAL DE SALUD- PERÚ, 2002)

2.4.13. Cualificación de mohos y levaduras

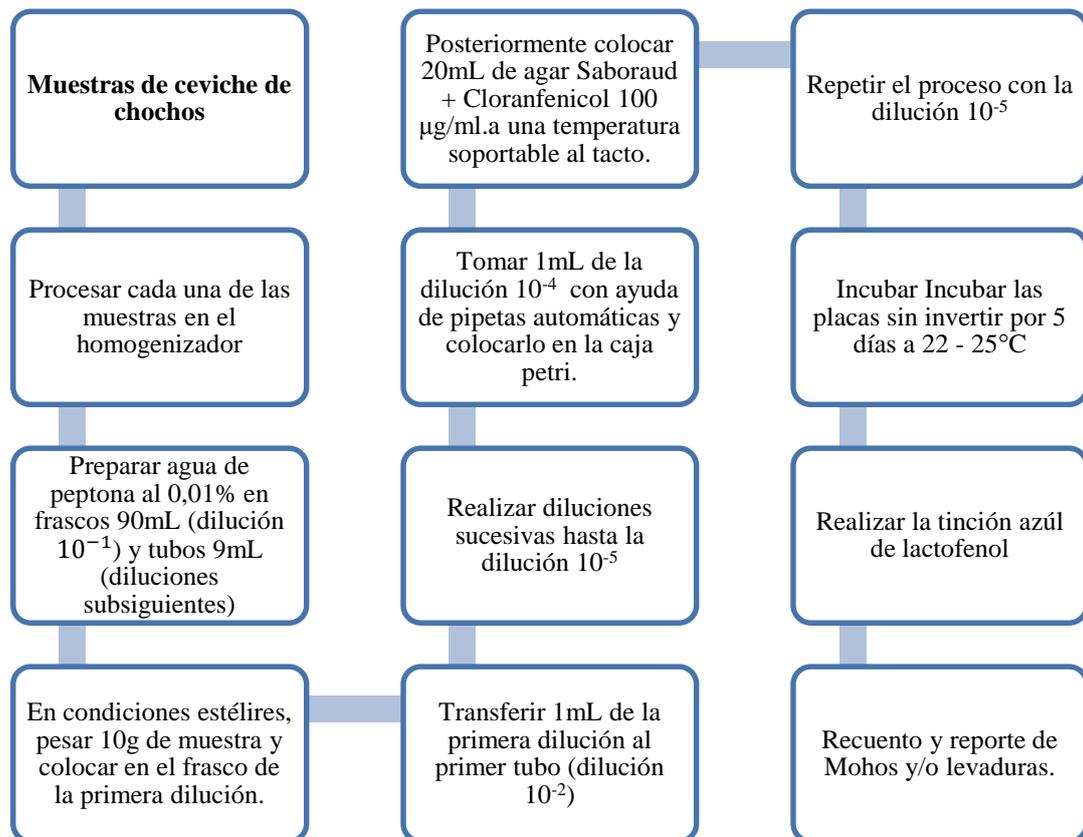


Figura 16-2: Metodología para la cualificación de mohos y levaduras.

Realizado por: (Calvache, 2019)

Fuente: (Toro Villa and Iza Sarabia, 2018)(NTE INEN 1529-10, 2013)

2.4.14. Identificación de parásitos por la técnica de flotación:

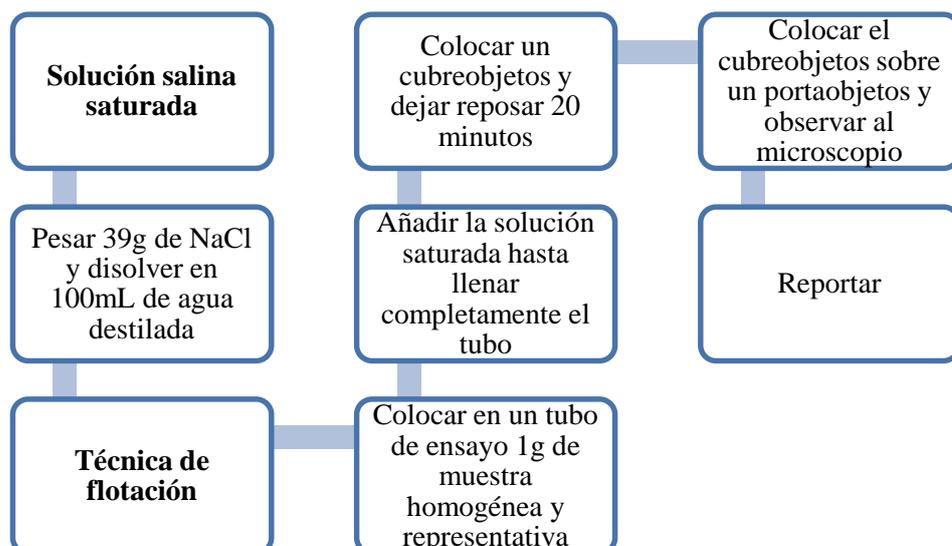


Figura 17-2: Metodología para la identificación de parásitos mediante la técnica de flotación.

Realizado por: (Calvache, 2019)

Fuente: (Girard, 2003)

2.4.15. Análisis PCR

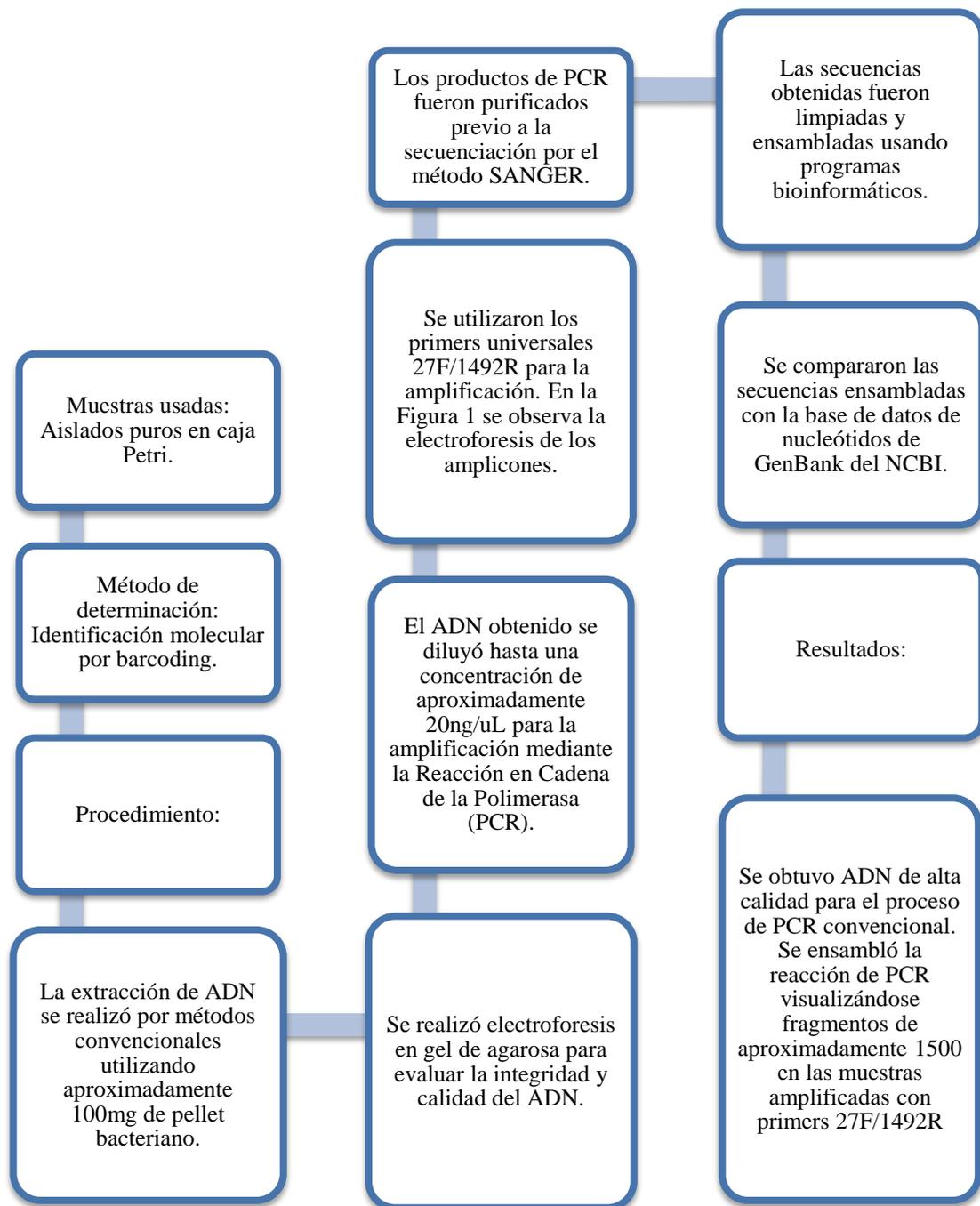


Figura 18-2: Metodología para el análisis PCR.

Realizado por: (Calvache, 2019)

Fuente: (Flores, 2020)

CAPÍTULO III

1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados encontrados presentan las cepas bacterianas identificadas en las muestras de ceviche de chochos, cuantificación y cualificación de microorganismos según corresponda basándose principalmente en la Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano – Perú. Artículo 15, sección XV.

Los datos del muestreo por duplicado de cada local y las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} .

Cabe recalcar que los nombres de los locales han sido salvaguardados para proteger su identidad por lo que se enumeraron de forma aleatoria con L1 hasta L7.

3.1. Resultados del Check list de buenas prácticas de higiene (Anexo 1-1) aplicado a cada puesto de expendio.

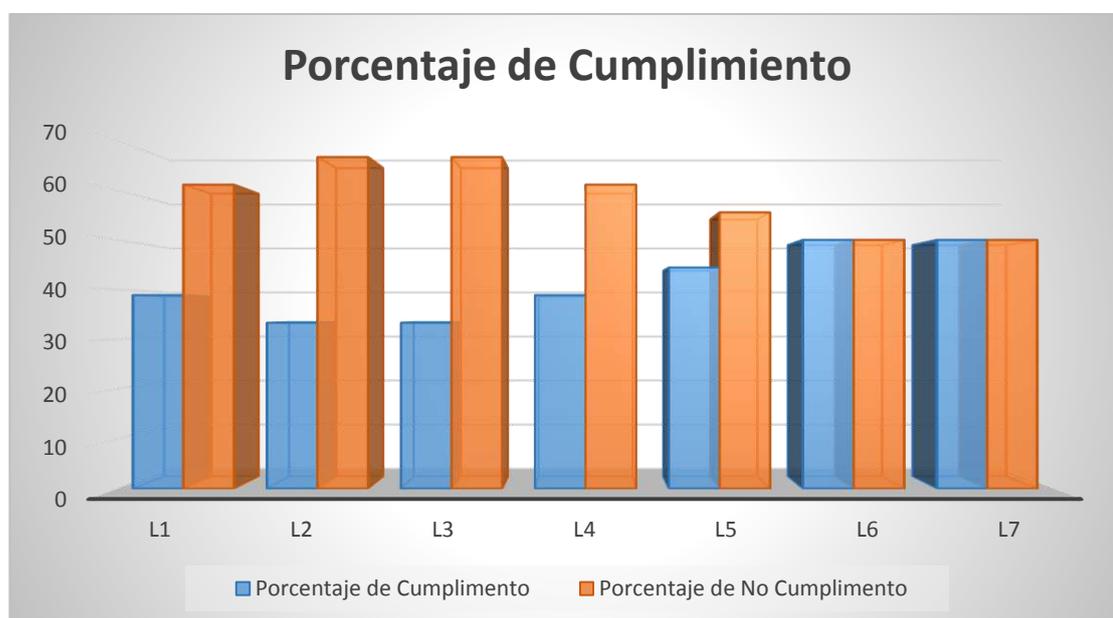


Gráfico 1-3: Resultado del Check-list realizado en cada puesto de expendio.

Realizado por: (Calvache, 2019)

El check list realizado consta de 18 parámetros para la verificación del cumplimiento de las medidas de higiene en el expendio del ceviche de chochos, fue realizado en base al Reglamento para el Control Sanitario de Alimentos que se Expenden en la Vía Pública acuerdo 14381. Como se puede observar en el gráfico de columnas agrupadas de cada local de expendio, en los locales

L1, L2, L3, L4 y L5 predomina el porcentaje de No cumplimiento, aproximadamente del 65% mientras que los locales L6 y L7 el porcentaje de cumplimiento es del 50% de los parámetros evaluados (anexo A) dejando en manifiesto la falta de salubridad en puntos críticos como: transporte, manipulación, almacenamiento y expendio del ceviche de chochos.

En el Art. 30 del reglamento mencionado se estipula que la venta de ceviches se comercializará solamente en lugares que cuenten con una infraestructura sanitaria básica y una adecuada cadena de frío, que garantice su conservación, por considerarse productos de alto riesgo epidemiológico (Acuerdo 14381 Registro Oficial 966, 1992), esto no se cumple pues ningún punto de venta contaba con una infraestructura básica, agua potable circulante ni con cadena de frío.

3.2. Medición de pH.

Tabla 1-3: Medición de pH.

Local	pH
L1	4.86
L2	4.95
L3	5.24
L4	4.76
L5	5.43
L6	4.49
L7	5.36

Realizado por: (Calvache, 2019)

La medición de pH de todas las muestras oscila entre 4 y 6. La mayoría de las bacterias se desarrolla mejor en pH neutro o cercano a él, y la mayoría de los alimentos considerados favorables a estos agentes tienen el pH entre 4,6 y 7,0. Las bacterias neutrofílicas con un rango de crecimiento de 5-5.8. Es así que, al contrastar con los otros ensayos de análisis realizados, es razonable que a este pH se desarrollen enterobacterias que se identificaron. (OPS, 2017)

3.3. Recuento de aerobios mesófilos

Tabla 2-3: Recuento de aerobios mesófilos

Aerobios mesófilos			
Agar PCA			
Local	Límites permitidos m (log UFC/g)	Muestreo en la mañana 8:00H. (log UFC/g)	Muestreo en la tarde. 13:00H. (log UFC/g)
L1	5	6,38±0,21	6,42±0,28
L2	5	5,91±0,45	6,32±0,30
L3	5	6,27±0,14	6,00±0,28
L4	5	6,36±0,29	5,70±0,40
L5	5	6,18±0,23	6,03±0,23
L6	5	6,46±0,09	6,43±0,04
L7	5	6,66±0,04	6,43±0,04
(ISO 4833-1: 2013, 2019)			
Reglamento Sanitario de los Alimentos-Chile Dto. N° 977/96 (D.OF.13.05.97)			

Realizado por: (Calvache, 2019)

El recuento de Aerobios mesófilos refleja la calidad sanitaria de los productos analizados, pudiendo indicar las condiciones higiénicas de la materia prima, la forma como fueron manipulados durante su elaboración y su expendio. Hay que tomar en cuenta que un recuento bajo de aerobios mesófilos no implica o no asegura la ausencia de patógenos o sus toxinas, de la misma manera un recuento elevado no significa presencia de flora patógena. (Passalacqua and Cabrera, 2014) Todas las muestras analizadas presentan un conteo elevado de Aerobios mesófilos, por encima de los límites permisibles en la norma ISO 4833-1: 2013, la Normativa de Perú y Chile para alimentos preparados mixtos, exteriorizando la deficiente calidad sanitaria que poseen las muestras de análisis. Dejando en duda las condiciones higienicas de la materia prima, preparación y expendio.

3.4. Recuento de *Staphylococcus aureus*.

Tabla 3-3: Recuento de *Staphylococcus aureus*.

Agar Manitol Salado			
Local	Límites permitidos (log UFC/g)	Muestreo en la mañana 8:00H. (log UFC/g)	Muestreo en la tarde. 13:00H. (log UFC/g)
1	1	4,30±0,43	4,35±0,49
2	1	4,72±1,01	5,11±0,71
3	1	4,24±0,34	4,63±0,21
4	1	Nr	Nr
5	1	4,24±0,34	4,54±0,09
6	1	Nr	Nr
7	1	5,06±0,40	5,07±0,16
Nr: No reporta RM N° 615-2003 SA/DM REGLAMENTO SANITARIO DE LOS ALIMENTOS-CHILE DTO. N° 977/96 (D.OF. 13.05.97)			

Realizado por: (Calvache, 2019)

El *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico es un microorganismo que se encuentra frecuentemente en alimentos crudos o cocidos de origen animal, especialmente en aquellos que requieren manipulación directa para su preparación, como es el caso de los alimentos preparados no industriales. Internacionalmente las intoxicaciones alimentarias causadas por *S. aureus* enterotoxigénico no son notificadas a los sistemas de vigilancia epidemiológica y usualmente los casos reportados son aquellos que corresponden a brotes. (Instituto Nacional de Salud de Colombia, 2011) Este microorganismo es uno de los principales agentes etiológicos de ETA's, por todo esto su presencia en los alimentos se considera un riesgo para la salud del consumidor.

Cinco de los siete locales de expendio de los ceviches de chochos analizados presentaron resultados desfavorables puesto que sobrepasan el límite permisible en las normativas especificadas en la tabla 3-3, demostrando que este alimento no es apto para el consumo humano, por su falta de inocuidad.

En otra investigación realizada en los puntos de venta de ceviche de chochos en las afueras de la Universidad Técnica de Ambato se registraron resultados similares, con una presencia de *Staphylococcus aureus* del 66.7 %. (Toro Villa and Iza Sarabia, 2018)

3.5. Recuento de Coliformes totales por el método del Número Más Probable.

Tabla 4-3: Recuento de Coliformes totales por el método del Número Más Probable.

Local	Número de tubos positivos por dilución			NMP/g	Límites de confianza del 95%		Categoría	M NMP/g
	Dilución 10 ⁻³	Dilución 10 ⁻⁴	Dilución 10 ⁻⁵		Inferior	Superior		
L1	3	3	1	460	71	2400	1	100
L2	3	2	1	150	30	440	2	100
L3	3	2	2	210	35	470	3	100
L4	2	2	1	28	10	150	4	100
L5	3	1	1	75	14	230	2	100
L6	2	1	1	20	7	89	4	100
L7	1	1	1	11	3	36	4	100
(Instituto Ecuatoriano de Normalización NTE INEN 1529-6, 1990)								

Realizado por: (Calvache, 2019)

3.6. Prueba confirmatoria de *Escherichia coli* en agar EMB.

Tabla 5-3: Resultados de confirmación de *E. coli* en agar EMB

Locales	Repetición de tubos por diluciones.	Resultado en agar EMB (Colonias verde metálicas brillantes + tinción Gram)
L1	Dilución 10 ⁻³	+
	Dilución 10 ⁻⁴	+
	Dilución 10 ⁻⁵	+
L2	Dilución 10 ⁻³	+
	Dilución 10 ⁻⁴	+
	Dilución 10 ⁻⁵	+
L3	Dilución 10 ⁻³	+
	Dilución 10 ⁻⁴	+
	Dilución 10 ⁻⁵	+
L4	Dilución 10 ⁻³	+
	Dilución 10 ⁻⁴	+
	Dilución 10 ⁻⁵	+
L5	Dilución 10 ⁻³	+
	Dilución 10 ⁻⁴	+
	Dilución 10 ⁻⁵	+

L6	Dilución 10 ⁻³	+
	Dilución 10 ⁻⁴	+
	Dilución 10 ⁻⁵	+
L7	Dilución 10 ⁻³	+
	Dilución 10 ⁻⁴	+
	Dilución 10 ⁻⁵	+

Realizado por: (Calvache, 2019)

La transmisión de enfermedades por vía fecal-oral son muy recurrentes debido a la falta de higiene en la manipulación de los alimentos o contaminación de la materia prima. Los coliformes totales son microorganismos indicadores de contaminación fecal, y en el caso de alimentos que han pasado por un proceso de cocción son indicadores de una mala práctica sanitaria. Según la Normativa Sanitaria para alimentos preparados de Perú el límite permisible de coliformes totales es de 100NMP/g en alimentos preparados como es el caso del ceviche de chocho. L4, L5, L6 y L7 son los locales que presentan un recuento aceptable de dichos microorganismos con cantidades inferiores a la estipulada, al contrastar información con el check list realizado de buenas prácticas de higiene (Anexo A), estos resultados son comprensibles puesto que la manipulación en el expendio es más adecuada, caso contrario L1, L2 y L3 presenta un elevado recuento de coliformes, evidenciando la falta de higiene del manipulador.

Según una publicación en EL COMERCIO la prevalencia de coliformes fecales y *Escherichia coli* alcanzó el 80% de las casi 130 muestras de algunos de los alimentos más populares que se expenden en las calles de Guayaquil, Quito y Cuenca. Así mismo, en la Universidad de Cuenca se analizó la calidad microbiológica de ceviches y encebollados de pescado expendidos de forma ambulante en la ciudad de Cuenca-Ecuador reportando que el 90,6% de ceviches incumplieron con los criterios microbiológicos establecidos en la misma normativa base. Es bastante cuestionable el control que se ejerce a nivel nacional en las comidas que se expenden ambulatoriamente, su consumo es masivo y representan un foco infeccioso y puede dar paso a brotes epidémicos de ETA's. (El Comercio, 2019) (Merchán Pesántez and Mocha Morocho, 2018)

Este grupo está conformado por 4 géneros, primordialmente (*Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*.). Los coliformes fecales, está constituido por bacterias Gram-negativas capaces de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas a las 48 h. de incubación a 35±2°C. (Camacho *et al.*, 2009)

3.7. Cualificación de *Salmonella spp.*

Tabla 6-3: Resultado de la cualificación de *Salmonella spp.*

Cualificación de <i>Salmonella spp.</i>		
Agar S.S.		
Local	Resultado: Presencia/Ausencia	Código de muestra
L1	Presencia	A: m1m-4, m1t-4, m1t-5
L2	Presencia	A: m2m-5
L3	Ausencia	
L4	Ausencia	
L5	Ausencia	
L6	Presencia	A: m6t-4 I: m6m-5, m6t-5
L7	Presencia	A: m7m-4
Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano – Perú. Artículo 15, sección XV. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-114-SSA1-1994		

Realizado por: (Calvache, 2019)

Las Normativas base estipulan que los alimentos deben estar libres del género *Salmonella*. Generalmente la contaminación de alimentos se puede dar por las especies no tifoideas, causantes de la gastroenteritis no tifoidea con una diarrea de 3 a 5 días, fiebre y dolor abdominal. La fiebre tifoidea causada por los serotipos *S. typhi* y *S. paratyphi*, es una enfermedad más grave y puede ser mortal. (OMS, 2018)

En la tabla 6-3. Se puede observar que en las muestras de cuatro puestos de expendio hay contaminación por este género que ha sido identificado mediante agar selectivo S.S. y pruebas bioquímicas.

En un estudio desarrollado por la ESPOL, la Escuela Politécnica Nacional y la Universidad de Cuenca en el 2019, con el respaldo de la Corporación Ecuatoriana para el Desarrollo de la Investigación y la Academia (Cedia) y Vlr Network, una red universitaria para investigación y postgrados se evidenció que en Quito y Cuenca hubo una elevada detección de *Salmonella* en alimentos ambulorios, entre ellos el ceviche de chochos. Los investigadores aseguran que varias de las fuentes de contaminación se relacionan con problemas en la cocción de los alimentos, a temperaturas y tiempos inadecuados; la contaminación cruzada en el almacenamiento, al mezclar alimentos crudos con otros listos para el consumo; y por el uso de utensilios. (El Comercio, 2019)

3.8. Cualificación de Mohos y Levaduras.

Tabla 7-3: Resultados de Mohos y levaduras.

Agar Saboraud+Cloranfenicol		
Local	Presencia de Mohos y Levaduras	
	Mohos	Levaduras
L1	Ausencia	Presencia
L2	Presencia	Presencia
L3	Ausencia	Presencia
L4	Ausencia	Presencia
L5	Ausencia	Presencia
L6	Ausencia	Presencia
L7	Presencia	Presencia
(NTE INEN 1529-10, 2013)		

Realizado por: (Calvache, 2019)

En las distintas normativas que sirven de base para la realización de este estudio no se estipula un recuento permisible de Mohos y levaduras en alimentos preparados como tal, en la normativa INEN NTE 2390- 2004 Requisitos para el Grano Desamargado del Chocho se estipula un nivel permisible del grano de $0-5 \times 10^2$ UFC/g. (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 2005) Las levaduras y los hongos tienen una actividad contaminante sobre los alimentos, en dependencia de su especie; el ceviche de chochos posee ingredientes que han pasado por un proceso de cocción y otros que no, la contaminación por estos agentes etiológicos genera deterioro en el mismo y una baja en la calidad organoléptica y de textura, además que estos resultados representan déficit en la inocuidad del alimento.

Por otra parte, se pueden desarrollar mico-intoxicaciones producidas por los metabolitos tóxicos que producen ciertos hongos, compuestos estables que no se destruyen durante el procesamiento de alimentos, las consecuencias pueden ser graves en los órganos afectados. También están asociados a reacciones alérgicas e infecciones sobretodo en la población inmunocomprometida, en ancianos y niños. (Serrano-Coll HA, 2015)

En el estudio desarrollado por Iza y Toro antes mencionado se reportó que del total de las muestras el 33,2 % presentó cargas superiores permisibles para la determinación de mohos y levaduras.

3.9. Recuento parasitario.

Tabla 8-3: Resultado del recuento parasitario

Técnica de flotación	
LOCAL	ARRIENDO
L1	-
L2	<i>Entamoeba coli</i> (+)
L3	<i>Entamoeba coli</i> (+)
L4	-
L5	<i>Entamoeba coli</i> (++)
L6	<i>Entamoeba histolytica</i> (+)
L7	<i>Entamoeba coli</i> (+)

Realizado por: (Calvache, 2019)

La presencia de parásitos en alimentos listos para el consumo humano representa contaminación por el personal de manipulación con mala higiene o que trabaja en instalaciones antihigiénicas. En cinco de los puestos de expendio se pudieron identificar *Entamoeba coli* y *Entamoeba histolytica*, especies de amebas intestinales, esta última es la única de reconocido poder patógeno, además es la más frecuentes en todo el mundo causando amebiasis. La infección se contrae por la ingesta de quistes ya que son relativamente resistentes a la desinfección e incluso a procesos térmicos. En el Ecuador no hay cifras oficiales de la amebiasis ni de su distribución geográfica. La Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica no considera a *E. histolytica* entre los microorganismos involucrados en el Síndrome Diarreico Agudo ni tampoco como parte de los microorganismos causantes de enfermedades transmitidas por agua y alimentos. Sin embargo, la Región Andina de América del Sur está considerada como región endémica de amebiasis lo que ha llevado a algunos organismos de salud al uso continuo de anti amebianos, práctica que está contraindicada por la OMS. (Mayorga and Zapata, 2015)

3.10. Identificación de cepas.

Tabla 9-3: Resultado de Identificación bacteriana en agar S.S.

Identificación de cepas.													
S.S agar													
				Pruebas Bioquímicas									
Codificación de la Colonia	Morfología	Coloración	Gram	SIM		Citrato	Kligler				Urea	Manitol	Identificación
				Indol	Movilidad		Glucosa	Gas/Glucosa	Lactosa	H2S			
A	Colonias redondas con centro negro	Translucidas, fermentadoras	Bacilos Gram -	-	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Citrobacter freundii</i>
D	Colonias redondas, no presenta halo ni centro	Rosa intenso No fermentadoras	Bacilos Gram -	-	-	+	+	+	+	-	V+	V+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
I	Colonias redondas con centro café	Translucidas, fermentadoras.	Bacilos Gram -	-	+	+	+	-	-	+	-	+	<i>Salmonella spp.</i>
K	Colonias redondas cremosas	Salmón, fermentadoras	Bacilos Gram -	-	V+	+	+	+	+	-	+	V+	<i>Enterobacter ludwigii</i>

Realizado por: (Calvache, 2019)

Tabla 10-3: Resultado de Identificación bacteriana en agar EMB.

Agar EMB (Eosina azul de metileno)													
				Pruebas Bioquímicas									
Codificación de la Colonia	Morfología	Coloración	Gram	SIM		Citrat	Kligler				Urea	Manitol	Identificación
				Indol	Movilidad		Glucosa	Gas/Glucosa	Lactosa	H2S			
M	Colonias mucosas	violetas	Bacilos Gram -	-	+	+	+	+	+	-	V+	V+	<i>Enterobacter ludwigii</i>
N	Colonias redondas	Verde metálico brillante.	Bacilos Gram -	+	+	V-	+	+	V+	-	-	+	<i>Escherichia coli.</i>
O	Colonias redondas	Moradas, sin brillo	Bacilos Gram -	+	V-	-	+	-	-	-	-	V+	<i>Escherichia coli inactivo</i>
P	Colonias redondas lisas.	Lilas pálidas sin brillo.	Bacilos Gram -	-	V-	-	+	-	-	-	-	+	<i>Shigella flexneri</i>
Q	Colonias mucosas	Atomatadas.	Bacilos Gram -	+	-	+	+	+	+	-	+	V+	<i>Klebsiella oxytoca.</i>

Realizado por: (Calvache, 2019)

Tabla 11-3: Resultado Identificación de bacterias en agar Manitol.

Identificación de cepas:						
Agar Manitol Salado						
Codificación de la Colonia	Morfología	Coloración	Gram	Catalasa	Coagulasa	Identificación
AU1	Colonias pequeñas	Amarillas doradas fermentadoras del medio	Cocos Gram +	+	+	<i>Staphylococcus aureus</i>
AU4	Colonias grandes		Cocos Gram +	+	-	<i>Micrococcus caseolyticus</i>

Realizado por: (Calvache, 2019)

La identificación bacteriana se realizó fenotípica y genotípicamente mediante agares selectivos, de enriquecimiento y pruebas moleculares.

Resultados

En la tabla siguiente se indica la morfología característica de las colonias:

Microorganismos	BD EMB Agar, Modified
<i>E. coli</i>	Colonias grandes, color negro azulado, brillo verde metálico
<i>Enterobacter/Klebsiella</i>	Colonias grandes, mucoides, color negro azulado
<i>Proteus</i>	Colonias grandes, incoloras
<i>Salmonella</i>	Colonias grandes, desde incoloras hasta color ámbar
<i>Shigella</i>	Colonias grandes, desde incoloras hasta color ámbar
<i>Pseudomonas</i>	Colonias irregulares, incoloras
Bacterias gram-positivas	Crecimiento escaso o nulo

Características de rendimiento y limitaciones del procedimiento

En **BD EMB Agar, Modified**, crecerán microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae* y una diversidad de bacilos gram-negativos, p. ej. *Pseudomonas* y *Aeromonas*³⁻⁵.

Frecuentemente este medio no inhibe completamente los microorganismos gram-positivos.

Figura 1-3: Características fenotípicas de colonias en agar EMB

Realizado por: (Calvache, 2019)

Fuente: (BD Diagnostic Systems, 2013a)

La identificación se realizó mediante pruebas bioquímicas, es importante recalcar que si no se lograba identificarlas o si había inconsistencias con bibliografía se enviaron las muestras aisladas con un 97- 99% de pureza al laboratorio de identificación molecular IDgen. Es así que se identificaron bacterias patógenas de interés clínico tales como:

Los microorganismos del grupo KESC (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Citrobacter*), morfológicamente los microorganismos pertenecientes a estos géneros son cocobacilos o bacilos de bordes redondeados cuyas dimensiones varían desde 0,3 a 1 µm de ancho y 3 a 6 µm de largo, son aerobios o anaerobios facultativos y en la coloración de Gram se comportan como Gram negativos. (Lopardo, Garrahan and Predari, 2014)

Enterobacter ludwigii.

Los datos de vigilancia y los informes de casos de brotes América del Norte, Europa y Asia indican que *Enterobacter spp.* representa un importante patógeno oportunista entre los recién nacidos y personas con un sistema inmune deprimido. Esta especie se ha convertido en los últimos años en una de las principales responsables de enfermedades adquiridas en centros de salud.

Citrobacter freundii.

Citrobacter spp. es el agente etiológico de varias infecciones extraintestinales, también es causa de bacteriemia y de septicemia. *C. freundii* se aísla frecuentemente de orina y de heridas quirúrgicas.

Características de las colonias Las colonias de *C. freundii*, que en un 78% fermentan la lactosa, generalmente en agar MC son de color rojo y en agar EMB son oscuras. Bacilos 0,6-6 µm de largo. Las cepas de *C. freundii*, producen las siguientes reacciones, dar un TSI alcalino/ácido con gas (no fermentan la lactosa y sí la glucosa, con producción de gas) y con producción de H₂S. Un problema del diagnóstico diferencial, es que cepas típicas de *C. freundii* sean identificadas por error como *S. enterica* en razón de compartir caracteres bioquímicos tales como SH₂ y un perfil de hidratos de carbono muy parecido. (Lopardo, Garrahan and Predari, 2014)

Klebsiella spp.

El género *Klebsiella* está ampliamente distribuido en la naturaleza, es huésped habitual saprófito del hombre y de los animales y la especie *K. pneumoniae* forma parte de la microbiota normal del intestino humano y de la cavidad oral. Es así que las heces son la fuente más significativa de las infecciones.

K. oxytoca y *K. pneumoniae* se detectaron como patógenos intestinales, especialmente en pacientes menores de 6 años de edad

Klebsiella oxytoca.

Son microorganismos facultativos anaerobios, se reproducen mejor entre 30°C y 37°C. Tienen la enzima de catalasa, ureasa, fermenta muchos carbohidratos, como la lactosa, por lo tanto, son capaces de formar ácidos fuertes en sus procesos metabólicos. Bacterias con y sin cápsula; un tamaño entre 0.5 µm y 2.0 µm. Es inmóvil. (Garzón J, Lemos E and Rivas R, 2003)

Shigella flexneri.

El género *Shigella* comprende las especies *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. boydii* y *S. dysenteriae*, bacterias responsables de la shigelosis que pueden causar desde diarrea acuosa hasta diarrea exudativa fulminante. Al microscopio óptico todas las cepas se correspondieron con bacilos gramnegativos, rectos y pequeños, corroborándose también la ausencia de movilidad. (Prats and Mirelis, 2011)

Salmonella spp.

Los miembros del género *Salmonella* son bacilos gram negativos, de 2- 3 µm de largo x 0,4-0,6 µm de ancho. En agar S.S las colonias características convexas de 2 a 4 mm de diámetro. En pruebas bioquímicas la mayoría de las cepas dan las siguientes reacciones: TSI alcalino/ácido con

o sin gas, con producción de sulfuro de hidrógeno (H₂S), la mayoría no fermenta la lactosa y sí fermenta la glucosa con producción de gas. (Pietro *et al.*, 2004)

Escherichia coli.

E. coli se caracteriza por poseer bacilos Gram negativos, no esporulante, producción de indol a partir de triptófano, no utilización de citrato como fuente de carbono y no producción de acetoina. Además, fermenta la glucosa y la lactosa con producción de gas. *E. coli* O157: H7 es el serotipo productor de toxina Shiga más importante por su impacto en la salud pública. Las cepas de *Escherichia coli* patógenas extraintestinales (ExPEC) del serotipo O1: K1: H7 / NM están frecuentemente implicadas en meningitis neonatal, infecciones del tracto urinario y septicemia en humanos. (Mora *et al.*, 2009)

A nivel de Latinoamérica y el Ecuador las enfermedades diarreicas agudas (EDA) son la segunda causa de morbilidad en la población en general y de mortalidad en niños menores de 5 años y adultos mayores (INEC, 2009). Por ello es importante que se destinen recursos y personal capacitado para el control microbiológico de comidas ambulantes, para así proteger a la población de enfermedades infecciosas que incluso pueden ser letales, además que causan un costo elevado en la salud pública.

3.11. Reporte del Antibiograma

Tabla 12-3: Resultado del antibiograma en agar Mueller Hinton.

Antibiograma para Enterobacterias identificadas y aisladas.								
Antibióticos y Diámetros Críticos para Enterobacterias								
Codificación de la Colonia	Ciprofloxacina 5 µg		Cefuroxima 30 µg		Amoxicilina + Ác. Clavulánico 20/10µg		Ampicilina 10µg	
	Diámetro del halo (mm)		Diámetro del halo (mm)		Diámetro del halo (mm)		Diámetro del halo (mm)	
	R=<15mm I=16-20mm S=>21mm		R=<14mm I=15-22mm S=>23mm		R=<13mm I=14-17mm S=>18mm		R=<13mm I=14-16mm S=>17mm	
		Ciprofloxacina 5 µg		Cefuroxima 30µg		Amoxicilina + Ác. Clavulánico 20/10µg		Ampicilina 10µg
A	36	Sensible	23	Sensible	11	Resistente	14	Medianamente Sensible
D	36	Sensible	24	Sensible	0	Resistente	0	Resistente
I	30	Sensible	23	Sensible	0	Resistente	13	Resistente
K-M	35	Sensible	24	Sensible	0	Resistente	0	Resistente
N	35	Sensible	24	Sensible	23	Sensible	9	Resistente
O	38	Sensible	25	Sensible	26	Sensible	12	Resistente
P	42	Sensible	22	Medianamente Sensible	0	Resistente	0	Resistente
Q	40	Sensible	33	Sensible	25	Sensible	13	Resistente
Diámetros críticos adaptados del CFA-SFM, 2000-2001								

Realizado por: (Calvache, 2019)

Antibiograma para Cocos Gram Positivos identificados y aislados.								
Antibióticos y Diámetros Críticos.								
	Claritromicina 15µg R=<10mm I=11-12mm S=>13mm		Azitromicina 15µg S=>12mm		Tetraciclina 30µg R=<14mm I=15-18mm S=>19mm		Gentamicina 10µg R=<12mm I=13-14mm S=>15mm	
Codificación de la Colonia	Diámetro del halo (mm)	Claritromicina 15µg	Diámetro del halo (mm)	Azitromicina 15µg	Diámetro del halo (mm)	Tetraciclina 30µg	Diámetro del halo (mm)	Gentamicina 10µg
Au1	30	Sensible	22	Resistente	10	Resistente	27	Sensible
Diámetros críticos adaptados del CFA-SFM, 2000-2001								

Realizado por: (Calvache, 2019)

La OMS y otros organismos internacionales como la ONU, reconocen que la resistencia a los antimicrobianos es un problema creciente a nivel mundial, pues la ineficacia de los fármacos ante los agentes patológicos se vuelve cada vez más incontrolable, es así que la enfermedad persiste y puede transmitirse a otras personas.

Los microorganismos han desarrollado distintos mecanismos de resistencia, entre estos los más comunes son: la síntesis de enzimas que son capaces de destruir la acción del antimicrobiano, la mutación y la alteración de la diana biológica del microorganismo para evadir al fármaco. El análisis de la resistencia antimicrobiana que presentan las cepas identificadas en este estudio se evidencia en la tabla 12-3. en la cual se observa claramente la resistencia de la mayoría de las cepas hacia los discos de Ampicilina 10µg y Amoxicilina + Ácido Clavulánico 20/10µg. esto se debe a la resistencia natural a antibióticos β-lactámicos que depende de la especie, algunos ejemplos son: *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca* que poseen una β-lactamasa cromosómica. Caso contrario los discos de Ciprofloxacina 5 µg y Cefuroxima 30µg presentan una elevada sensibilidad hacia dichos microorganismos.

Se considera que las cepas de *S. flexneri* son menos virulentas. Éste género se caracteriza por la presencia de multiresistencia a antibióticos y una variedad de factores de virulencia que permiten la infección al hospedero

CONCLUSIONES

El check-list realizado evaluó las condiciones higiénico-sanitarias básicas, en las cuales debería ser expendido el ceviche de chochos, revelando un elevado porcentaje de no cumplimiento de los parámetros de verificación establecidos en la legislación, además permitió identificar los posibles puntos críticos de contaminación que deben ser controlados, asegurando la inocuidad de este alimento para su consumo humano.

El análisis microbiológico de los ceviches de chochos analizados proyectó resultados que evidencian una mala práctica higiénica, en distintos puntos de su procesamiento, mediante los elevados recuentos de aerobios mesófilos, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, coliformes totales, parásitos y cualificación de *Escherichia coli*, mohos y levaduras. Constituyendo una fuente de infección para el consumidor y un problema para la salud pública generando costos en la atención y tratamiento del mismo.

Se ha identificado, en los ceviches de chochos, la presencia de bacterias patógenas (*Enterobacter ludwigii*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella spp*, *Escherichia coli O1: K1: H7* y *Staphylococcus aureus*) mismas que representan un elevado riesgo de adquirir Enfermedades de Transmisión Alimentaria (ETA's), la salud del consumidor se ve afectada y este cuadro puede ser más severo si dichas bacterias poseen la capacidad de resistencia a los antibióticos de su tratamiento.

RECOMENDACIONES

Las entidades de control sanitario deberían verificar, periódicamente, la aplicación de las buenas prácticas de higiene en la manipulación de alimentos.

Realizar capacitaciones a los manipuladores de los alimentos que son expendidos de manera ambulatoria, ayudaría a elevar la calidad microbiológica de los productos.

Sería de gran ayuda la adecuación de los sitios de venta, proporcionando agua potable circulante a cada puesto de expendio.

GLOSARIO

Microbiología. - La Microbiología es la ciencia que estudia los microorganismos, bacterias, hongos, protistas y parásitos y otros agentes como virus, viroides y priones.

Calidad microbiológica - El criterio microbiológico para un alimento define la aceptabilidad de un producto o un lote de un alimento basada en la ausencia o presencia, o en la cantidad de microorganismos, incluidos parásitos, y/o en la cantidad de sus toxinas/metabolitos, por unidad o unidades de masa, volumen, superficie o lote.

Inocuidad. - La inocuidad de los alimentos es la ausencia, o niveles seguros y aceptables, de peligro en los alimentos que pueden dañar la salud de los consumidores.

Bacterias neutrofílicas. – pH de crecimiento óptimo en un rango de 5-7.

Patogénico. - Que causa o produce enfermedad.

SIGLAS

°C	Grado Celsius
ETA's	Enfermedades transmitidas por alimentos
EMB	Eosin methylene blue
NMP	Número más probable
pH	Potencial de hidrógeno
UFC/g	Unidades Formadoras de colonias por gramo

BIBLIOGRAFÍA

ACUERDO 14381 (Registro Oficial 966, 26-VI) *Reglamento Para El Control Sanitario De Alimentos Que Se Expenden En La Vía Pública*. Quito-Ecuador. Available at: https://www.controlsanitario.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2019/04/A-14381_REGLAMENTO-PARA-EL-CONTROL-SANITARIO-DE-ALIMENTOS-QUE-SE-EXPENDEN-EN-LA-VÍA-PÚBLICA.pdf (Accessed: 29 February 2020).

AGENCIA NACIONAL DE MEDICAMENTOS ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA '*Análisis Microbiológico De Los Alimentos*', In *Análisis Microbiológico De Los Alimentos*. 3° edición. Buenos Aires.

ÁLVAREZ BENITO, M. V., et. al. *Manual de Técnicas en Microbiología Clínica*. 2° edición. Edited by H. Niño. 1995.

ASSAI ETA - Enfermedades Transmitidas por los Alimentos, ETA Enfermedades Transmitidas por los Alimentos. Available at: <https://www.assal.gov.ar/eta/> (Accessed: 17 February 2020).

BD Diagnostic Systems (2013a) *BD EMB Agar (Eosin Methylene Blue Agar), Modified USO PREVISTO*. Available at: <http://www.bd.com> (Accessed: 20 February 2020).

BD Diagnostic Systems (2013b) *BD Mannitol Salt Agar, BD Mannitol Salt Agar*. Available at: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8771> (Accessed: 20 February 2020).

BIOSER *Agua de Peptona Tamponada*, *Control Microbiológico*. Available at: <https://www.bioser.com/productos/agua-de-peptona-tamponada-20-g-l-121p/> (Accessed: 24 February 2020).

CAMACHO, A. et al. '*Método para la determinación de bacterias coliformes, coliformes fecales y Escherichia coli por la técnica de diluciones en tubo múltiple (Número más Probable o NMP)*', in *Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos*. 2ª ed. México. Available at: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Colif-tot-fecales-Ecoli-NMP_6529.pdf (Accessed: 10 February 2020). pp 157. 2009.

CANIZALEZ-ROMAN, A. et al. '*Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic Escherichia coli strains isolated from food items in northwestern Mexico*', *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V., 164(1), pp. 36–45. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.020.

EL COMERCIO. *Estudio detecta coliformes fecales en comidas que se expenden en las calles de Quito, Guayaquil y Cuenca*. Available at:

<https://www.elcomercio.com/actualidad/universidades-alimentos-contaminados-quito-guayaquil.html> (Accessed: 1 March 2020).2019.

CUESTA, A. *Aseguramiento de calidad MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS*. Available at: (2000)http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP_FaoRlc/old/prior/comagric/codex/rla3013/pdf/aseg3.pdf (Accessed: 27 February 2020).

ESTRADA-GARCIA, T. et al. ‘Association of diarrheagenic escherichia coli pathotypes with infection and diarrhea among mexican children and association of atypical enteropathogenic E. coli with acute diarrhea’, *Journal of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology (ASM), 47(1), pp. 93–98. doi: 10.1128/JCM.01166-08.

FAO. *Inocuidad alimenticia., Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. Available at: <http://www.fao.org/food-safety/es/> (Accessed: 24 February 2020).

FLORES, F. *Análisis PCR*. Quito. Available at: uito.

GARZÓN J, LEMOS E, et. al., *Prevalencia de betalactamasas de espectro extendido en Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae y Klebsiella oxytoca del Hospital Occidente de Kennedy. Nivel III, Bogotá. Nivel III, Bogotá* Available at: <http://www.scielo.org.co/pdf/recis/v2n2/v2n2a4.pdf> (Accessed: 20 February 2020).

GIRARD, R. *Manual de Parasitología*. Honduras. Available at: [http://www.bvs.hn/Honduras/pdf/Manual Parasitologia 2007.pdf](http://www.bvs.hn/Honduras/pdf/Manual%20Parasitologia%202007.pdf) (Accessed: 29 February 2020).

HERNÁNDEZ-VÁSQUEZ, A. et.al. ‘Promoción de la salud oral y perspectivas para el 2020 de la Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública’, *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. Instituto Nacional de Salud (Peru), 36(4), pp. 551–2. doi: 10.17843/rpmesp.2019.364.4982.

HERNÁNDEZ SAMPIERI, R., FERNÁNDEZ COLLADO, et. al. *Metodología de la investigación*. McGraw-Hill Education.2014.

INPC *Instituto Nacional de Patrimonio Cultural, Ecuador culinario- saberes y sabores*. Available at: <http://patrimoniocultural.gob.ec/patrimonios-inmateriales-del-ecuador/>.

INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN NTE INEN 2390: *Leguminosas. Grano desamargado de chocho. Requisitos*. Quito. Available at: <https://archive.org/details/ec.nte.2390.2005/page/n3/mode/2up>.

INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN NTE INEN 1529-6 *Control microbiológico de los alimentos. Determinación de microorganismos coliformes por la técnica del número más probable, NTE INEN 1529-6*. Available at:

<https://archive.org/details/ec.nte.1529.6.1990/page/n3/mode/2up> (Accessed: 27 February 2020).

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DE COLOMBIA *Evaluación De Riesgos De Staphylococcus Aureus Enterotoxigénico En Alimentos Preparados No Industriales En Colombia República de Colombia.* Bogotá. Available at: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Er-staphylococcus.pdf> (Accessed: 26 February 2020).

ISO 4833-1: 2013 (2019) ISO - ISO 4833-1:2013 - Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique, Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la enumeración de microorganismos. Parte 1: Conteo de colonias a 30 grados C mediante la técnica de vertido en placa. Available at: <https://www.iso.org/standard/53728.html> (Accessed: 20 February 2020).

JAIR, B. et al. 'Evaluación De Parámetros Durante La Extrusión De Una Mezcla De Harinas De Tarwi (*Lupinus Mutabilis*) y ARROZ (*Oryza Sativa*) Para La Producción De Un Snack' Presentado Por. Universidad Nacional Del Santa. Available at: <http://repositorio.uns.edu.pe/bitstream/handle/UNS/3052/47037.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (Accessed: 26 February 2020).

JARA, H. *Escuela Superior Politécnica De Chimborazo Facultad De Ciencias 'Análisis Microbiológico De Las Carnes Molidas Ciudad De Riobamba'.* ESPOCH. Available at: http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4977/1/56T00627_UDCTFC.pdf (Accessed: 10 February 2020).

LOPARDO, H. A., GARRAHAN, J. P. et. al. 'Bacterias de importancia Clínica', in MANUAL DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA DE LA ASOCIACIÓN ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA. Argentina.2014.

MAYORGA, T. A. & ZAPATA, S. *Investigación de Entamoeba histolytica en dos Comunidades Ecuatoriana.* Universidad San Francisco de Quito. Available at: <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/5058/1/122504.pdf> (Accessed: 1 March 2020).

MERCHÁN PESÁNTEZ, E. E. & MOCHA MOROCHO, C. P. 'Evaluación de la calidad microbiológica de ceviches y encebollados de pescado vendidos de forma ambulante en la ciudad de Cuenca-Ecuador'.2018.

MERCK *Recuento en placa de agar | 105463, Plate Count agar PCA.* Available at: https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Plate-Count-agar,MDA_CHEM-105463?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F#anchor_BRO (Accessed: 20

February 2020).

MORA, A. et al. ‘Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O1:K1:H7/NM from human and avian origin: Detection of clonal groups B2 ST95 and D ST59 with different host distribution’, *BMC Microbiology*. BioMed Central Ltd., 9, p. 132. doi: 10.1186/1471-2180-9-132.

MSP (Ministerio de Salud Pública Ecuador) (2019) *Subsistema De Vigilancia Sive-Alerta Enfermedades Transmitidas Por Agua Enfermedades Transmitidas por Alimentos Tabla de contenido*. Quito. Available at: https://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/es/ (Accessed: 4 February 2020).

NTE INEN 1529-10 *Control Microbiológico De Los Alimentos. Mohos Y Levaduras Viables. Recuentos En Placa Por Siembra En Profundidad*. Quito-Ecuador. Available at: https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_1529-10-1.pdf (Accessed: 29 February 2020).2013.

NTS N° 071 DIGESA ‘Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano’, *Digesa*, pp. 1–24. Available at: http://www.digesa.minsa.gob.pe/norma_consulta/Proy_RM615-2003.pdf.

OMS *Salmonella (no tifoidea)*. Available at: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\).2018](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal).2018).

OMS *Inocuidad de los alimentos, Inocuidad de los alimentos*. Available at: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety> (Accessed: 5 February 2020).2019.

OPS (2016a) *Manual Para Manipuladores De Alimentos*. Whashington DC. Available at: <http://www.fao.org/3/a-i7321s.pdf>.2016.

OPS (2016b) *OPS/OMS Clasificación de los peligros, Clasificación de los peligros*. Available at: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10837:2015-clasificacion-peligros&Itemid=41432&lang=es (Accessed: 10 February 2020).

OPS *Peligros biológicos*. Available at: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10838:2015-peligros-biologicos&Itemid=41432&lang=es (Accessed: 1 March 2020).

Organización mundial de la salud (2019) *Inocuidad de los alimentos*. Available at: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety> (Accessed: 5 July 2019).

PASSALACQUA, N. & CABRERA, J. ‘Microorganismos indicadores’.2014.

PIETRO, S. D. I. et al. 'Artículo Original Vigilancia Epidemiológica De Enfermedades Transmitidas Por Alimentos En La Provincia De Rio Negro , Argentina , 1993-2001 Materiales y métodos Resultados En el período 1993-2001 la Dirección de Salud Ambien-', *Medicina*, pp. 120–124.

PRATS, G. & MIRELIS, B *GÉNERO Shigella: Aspectos Prácticos Para El Laboratorio De Microbiología*. Barcelona. Available at: <https://seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/Rshigella.pdf> (Accessed: 20 February 2020).

REGLAMENTO TÉCNICO CENTROAMERICANO RTCA 67.04.50:08 'Alimentos. criterios microbiológicos para la inocuidad de los alimentos', 2018(402), pp. 2–4. Available at: <https://mspas.gob.gt/images/files/drca/normativasvigentes/RTCACriteriosMicrobiologicos.PDF> (Accessed: 10 February 2020).2018.

SERRANO-COLL HA, C.-C. N 'Micotoxicosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos', *Micotoxicosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos*, 29(1). Available at: <http://www.scielo.org.co/pdf/cesm/v29n1/v29n1a12.pdf> (Accessed: 17 February 2020).

SOTO VARELA, Z., LAVALLE, L. P. et. al. 'Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia', *Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia*, 32(1), pp. 105–122. Available at: <http://www.scielo.org.co/pdf/sun/v32n1/v32n1a10.pdf> (Accessed: 10 February 2020).2016.

DE SOUSA, C. P. 'The impact of food manufacturing practices on food borne diseases', *Brazilian Archives of Biology and Technology*. Tecpar, pp. 815–823. doi: 10.1590/S1516-89132008000400020. 2013.

TORO VILLA, L. DEL P. & IZA SARABIA, Á. D. *Determinación de la calidad microbiológica de los ceviches de chochos que se preparan y expenden en las afueras de una institución de educación superior de la ciudad de Ambato*. Available at: <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/28234>.2014.

U. SALAMANCA *Laboratorio Microbiologia, Microbiología General y Bucal*. Available at: http://campus.usal.es/~micromed/Practicas_odontologia/unidades/labv/LabMicro/Diag_directo.html (Accessed: 20 February 2020). 2017.

VILLACRECES, N. R. *Evaluación del procesamiento artesanal del chocho (Lupinus mutabilis Sweet) sobre el consumo de agua, tiempo empleado y la calidad nutricional y microbiológica*, *Colegio de Agricultura, Alimentos y Nutrición*. 2010.

ANEXOS

ANEXO A: Check list- Guía de evaluación Sanitaria para puestos de expendio ambulatorios de alimentos preparados.

Guía de evaluación Sanitaria para puestos de expendio ambulatorios de alimentos preparados. (Ceviche de chochos)		
	SI CUMPLE	NO CUMPLE
¿Posee registro-permiso sanitario de venta, otorgado por la Municipalidad?		
DEL VENDEDOR:		
Vestimenta apropiada: delantal o mandil que cubra la ropa usual, preferiblemente blanco o de colores claros limpios y en buen estado de presentación.		
Cabello corto o recogido, cubierto por un gorro o redecilla.		
Uso de guantes limpios		
No portar anillos, pulseras ni reloj.		
No debe manipular alimentos y dinero en forma conjunta		
LA PREPARACIÓN:		
Las materias primas deberán guardarse en envases adecuados y en buen estado de conservación y limpieza.		
Para el lavado de utensilios se utilizará agua potable circulante y jabón, desechando el uso de baldes y recipientes con agua sin renovar.		
TRANSPORTE:		
El transporte de alimentos se realizará en condiciones higiénicas y de temperatura que garanticen la conservación e inocuidad de los mismos.		
El vehículo o medio de transporte es adecuado para proteger los alimentos de la contaminación.		
COMERCIALIZACIÓN:		

Los alimentos que se exponen a la vista del público, se colocan en vitrinas cerradas		
Los alimentos se despachan, utilizando material desechable, caso contrario debe ser en material inalterable y lavado con agua potable circulante y jabón después de cada utilización.		
En caso de utilizarse papel o plástico para el expendio, deberá ser de primer uso.		
Sillas y mesas limpias y en buen estado.		
SANEAMIENTO		
El expendedor dispone de un depósito para los desperdicios y será de material de fácil limpieza, con tapa y con una funda plástica para facilitar su eliminación.		
El expendedor no puede arrojar a la vía pública desperdicios o agua de lavado.		
Desagües con tapa y rejilla con buen funcionamiento y libres de basura.		
No se permite la presencia de animales domésticos en el puesto, cerca de él o en sus alrededores.		
Es responsabilidad del vendedor, en coordinación con las autoridades de salud correspondiente, realizar un control permanente de vectores (moscas, cucarachas, roedores, etc.)		
Evaluador: Luciana Calvache Andramuño.	Firma:	

Elaborado por: (Calvache, L. 2019)

Fuente: (Acuerdo 14381 Registro Oficial 966, 1992)

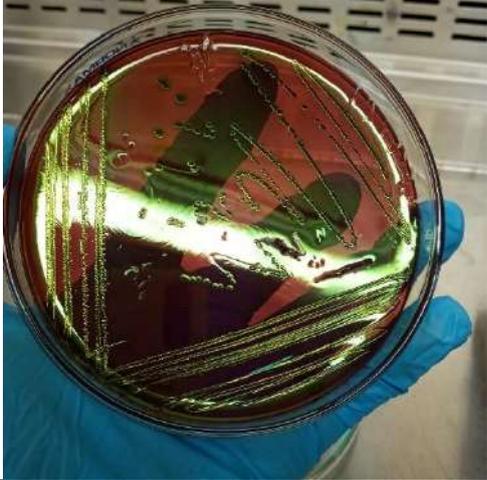
ANEXO B: Imágenes del muestreo.

	
<p>Instalaciones de expendio.</p>	<p>Instalaciones de expendio.</p>
	
<p>Muestra de ceviche de chochos tradicional.</p>	<p>Homogenización de las muestras.</p>

ANEXO C: Imágenes del procedimiento.

	
<p>Dilución de la muestra madre.</p>	<p>Medición de pH.</p>

ANEXO D: Resultados en medios de cultivo.

	
<p>Recuento de Aerobios mesófilos.</p>	<p>Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> en agar manitol</p>
	
<p>Confirmación de <i>Escherichia coli</i> en agar EMB</p>	<p>Técnica NMP para Coliformes</p>

ANEXO E: Recuento parasitario.

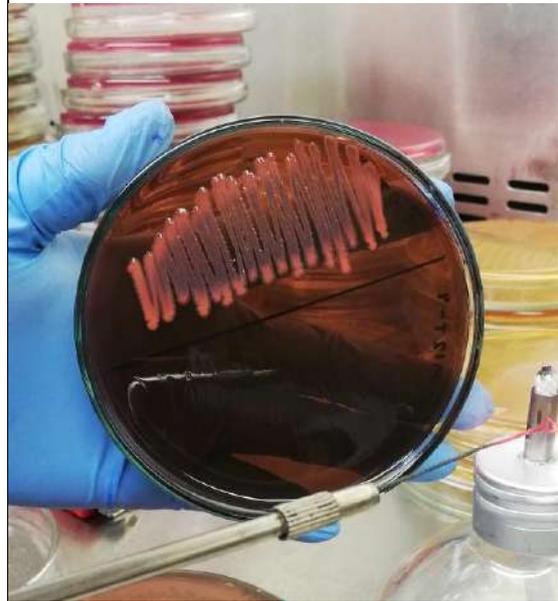
	
<p>Técnica de flotación para el recuento parasitario.</p>	

ANEXO F: Identificación de Bacterias.

Identificación de Bacterias.



Citrobacter freundii



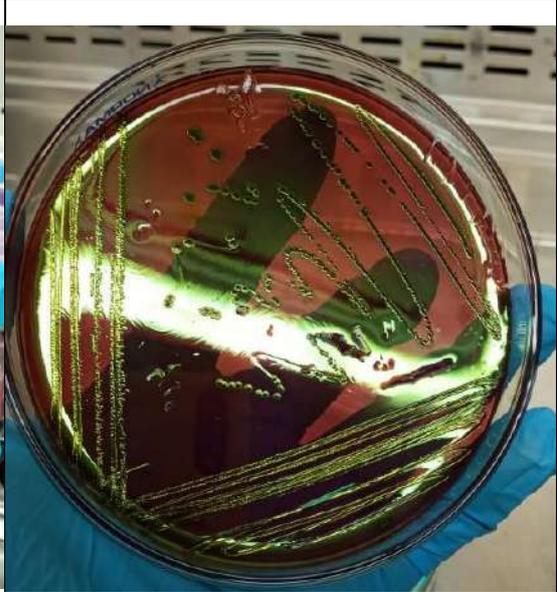
Klebsiella pneumoniae



Slmonella spp.



Enterobacter ludwigii.



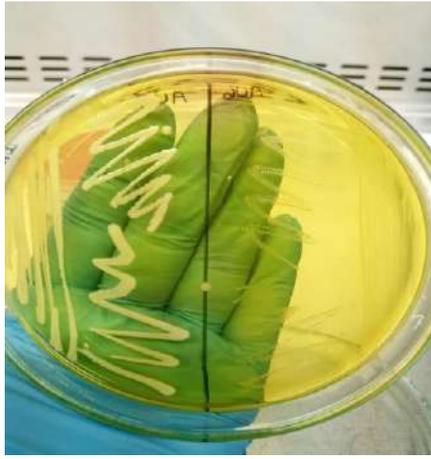
Escherichia coli.



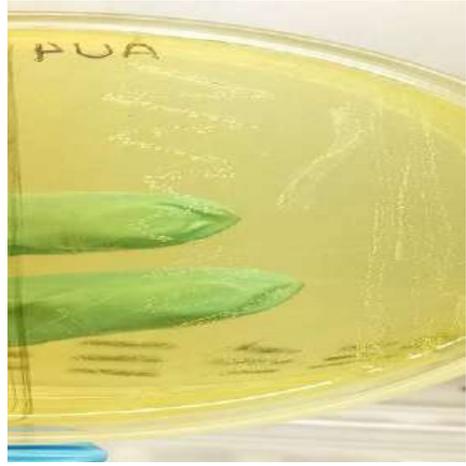
Shigella flexneri



Klebsiella oxytoca.

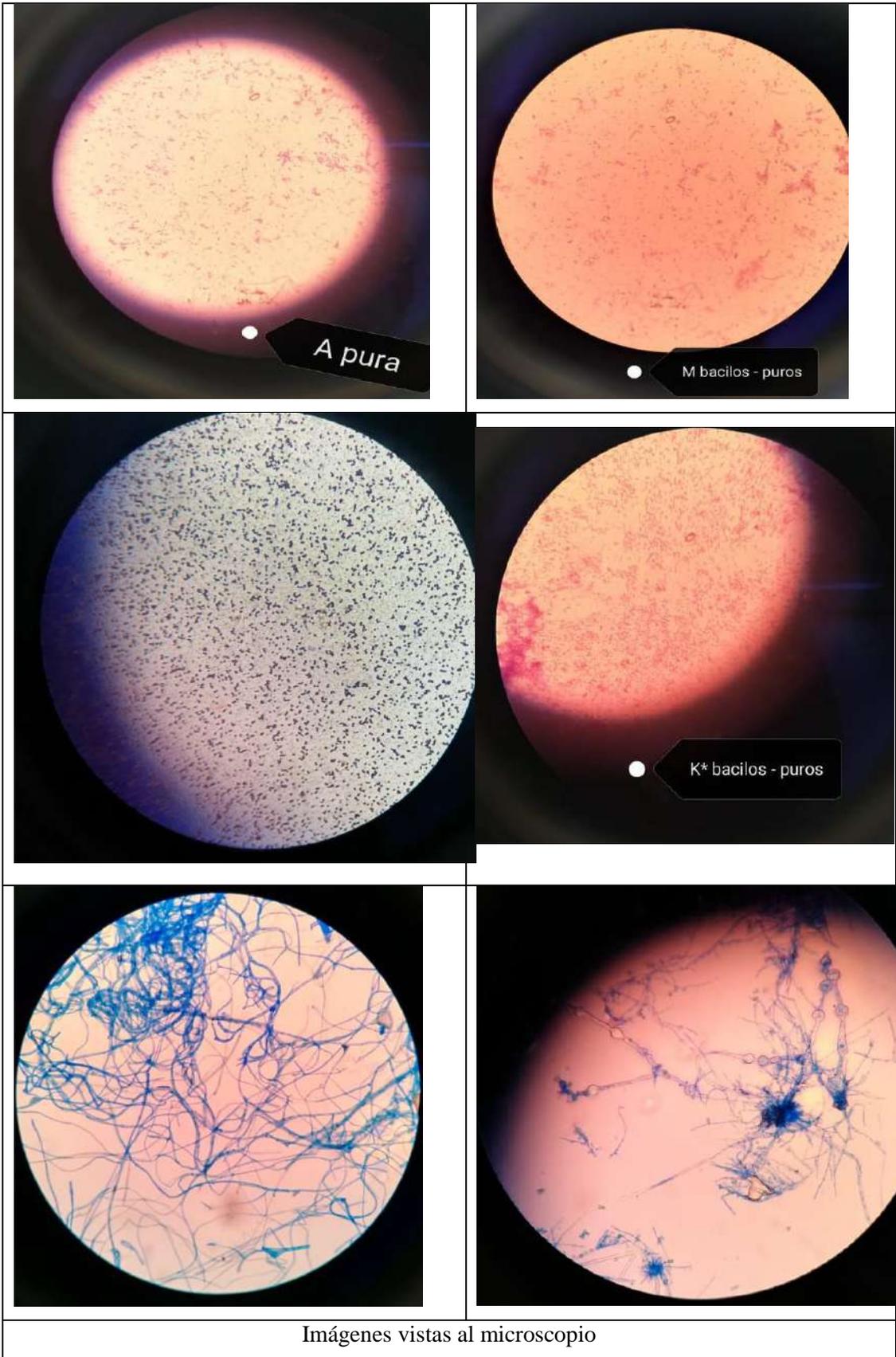


Staphylococcus aureus

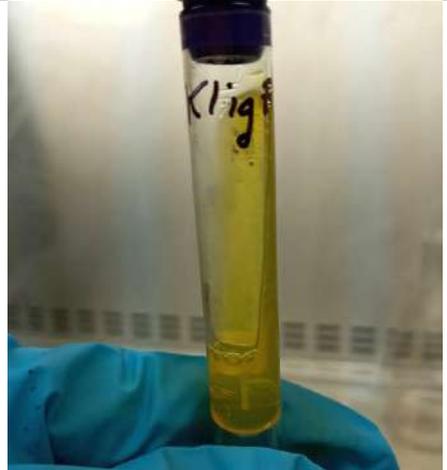
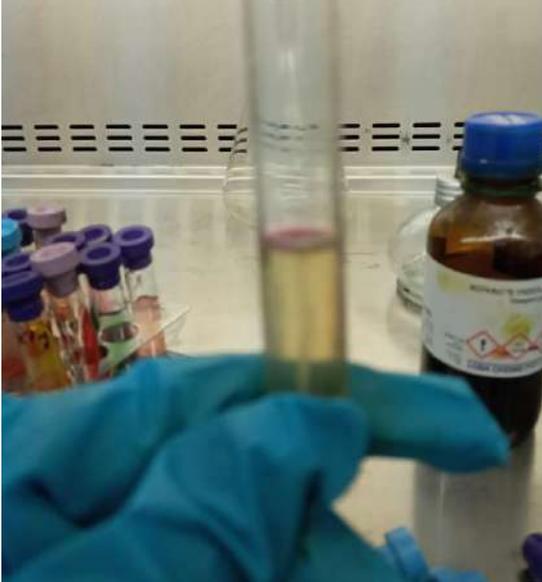


Macrocooccus caseolytico

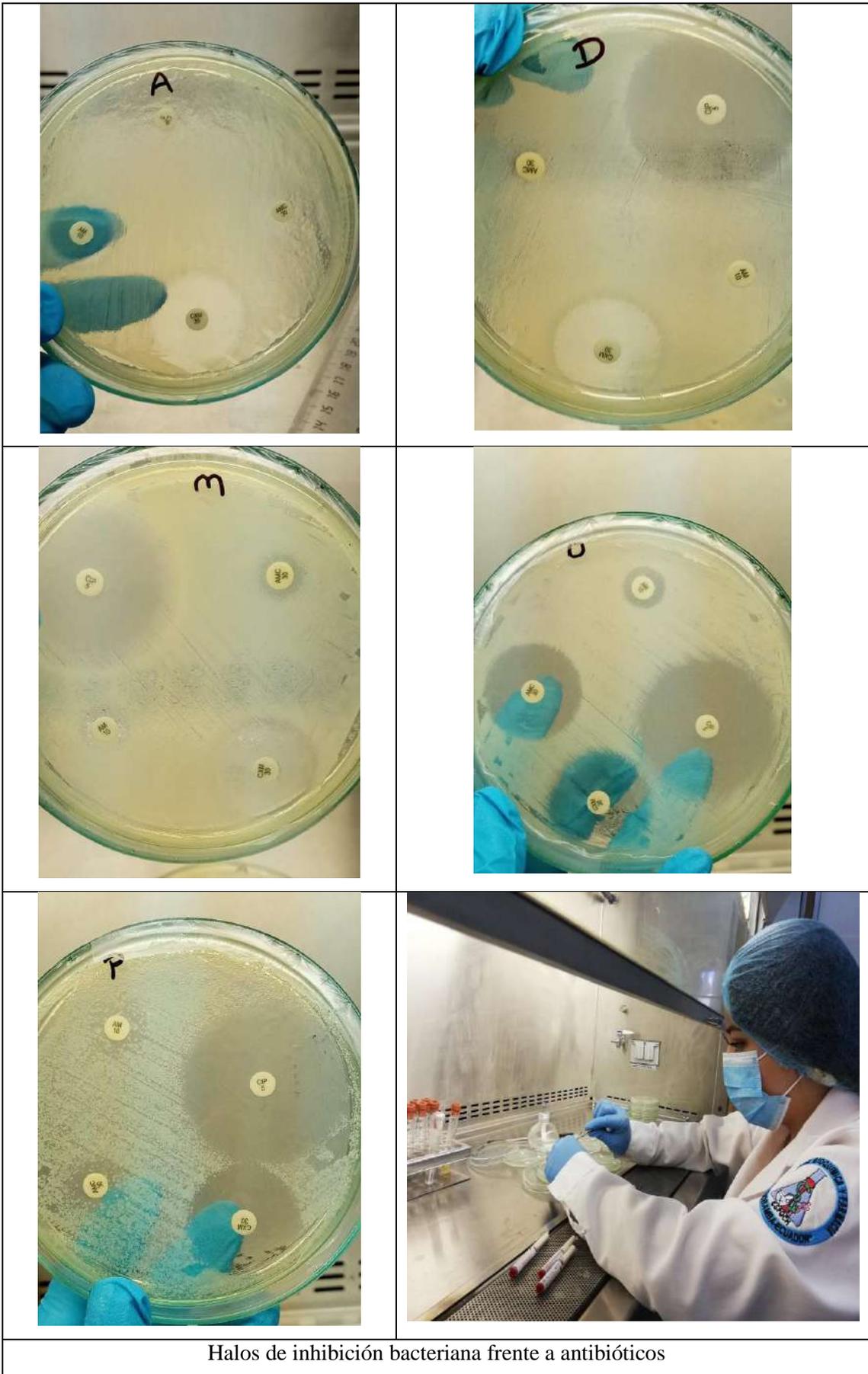
ANEXO G: Tinción Gram



ANEXO H: Pruebas bioquímicas.

	
<p>Pruebas bioquímicas</p>	<p>Kligler</p>
	
<p>Indol Positivo</p>	<p>Pruebas bioquímicas</p>

ANEXO I: Antibiograma.



Halos de inhibición bacteriana frente a antibióticos

ANEXO J: Resultados de la identificación de Bacterias mediante la técnica de PC



Av. De los Granados E14-285 y Eloy Alfaro
Teléfono: 0998982450
e-mail: jdgen.ecuador@gmail.com
R.U.C. 1713443479001

Informe de Resultados

Nombre del Proyecto: Identificación molecular de 6 bacterias – ESPOCH
Informe No.: A-164

Técnico Responsable: Ing. Jorge García

Fecha: 05/02/2020

Resultados

Muestra	Código IDgen	Longitud	% de Calidad	Organismo	Fragmento	% de identidad	NºAccesión
A	B71	1412	94.8	<i>Citrobacter freundii</i>	16S	99.79	FN997639.1
Au4	B72	1193	85.2	<i>Macrococcus caseolyticus</i>	16S	99.32	MG744632.1
E	B73	815	94.6	<i>Enterobacter ludwigii</i>	16S	99.26	MN181146.1
J	B74	1388	85.7	<i>Citrobacter freundii</i>	16S	99.71	MN208128.1
M	B75	1407	96.5	<i>Enterobacter ludwigii</i>	16S	99.72	JQ308612.1
R	B76	756	71.6	<i>Escherichia coli</i>	16S	96.42*	MN557358.1

*Los resultados con un porcentaje de identidad menor al 99% para bacterias y menor al 97% para hongos no permiten asegurar que el aislado corresponde a esa especie. Es posible que se trate de una nueva especie no descrita o para la cual no hay referencias en la base de datos.

Firma autorizada

Francisco Javier Flores Flor, PhD.

Propietario IDgen

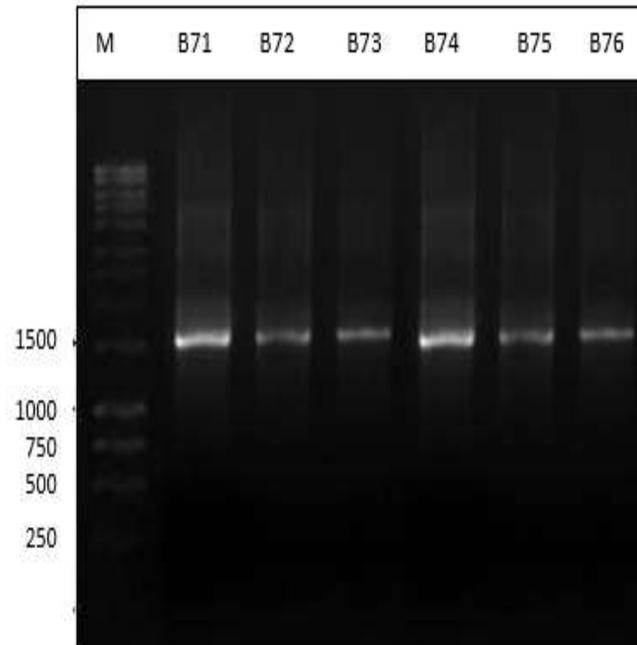


Figura 1. Visualización en gel de agarosa 2% de los seis amplicones de aproximadamente 1500 pb amplificados con primers 27F/1492R. M: Marcador de peso molecular.

Conclusiones:

1. Se obtuvo ADN de buena calidad de las muestras.
2. La búsqueda en la base de datos Genbank permitió identificar las muestras con diferentes porcentajes de identidad.



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y RECURSOS
PARA EL APRENDIZAJE Y LA INVESTIGACIÓN
UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS



REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 11/06/2020

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)	
Nombres - Apellidos: Luciana Vanesa Calvache Andramuño	
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL	
Facultad: CIENCIAS	
Carrera: BIOQUÍMICA Y FARMACIA	
Título a optar: BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA	
f. Analista de Biblioteca responsable: 0050-DBRAI-UPT-2020	 