



# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

## **FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA**

### **"CARACTERIZACIÓN DE LOS PRINCIPALES MICROORGANISMOS ASOCIADOS A ALIMENTOS DE CONSUMO MASIVO EN EL ECUADOR."**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del Título de Doctor en Biociencias  
Aplicadas, Mención en Bioseguridad Alimentaria**

Presentado por:

ENRIQUE JOSE SALAZAR LLORENTE

Guayaquil - Ecuador

**(2024)**

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres Gilberto y Mercedes que siempre han creído en mí y a través del ejemplo haberme forjado el hombre que soy en la actualidad.

A mi amada esposa Mónica Solís que, con su paciencia, amor, cariño, comprensión, aprecio y apoyo incondicional han logrado en mí una mejora integral convirtiéndome en una mejor persona.

A mi hermana María Fernanda por su respaldo en los días más complejos, siempre a mi lado sin soltarme la mano.

A lo más bello que tengo en esta vida, mi hija Ariana por ser una fuente de motivación e inspiración para poder superarme cada día más y cumplir con metas y objetivos propuestos.

A la Escuela Superior Politécnica del Litoral por haberme formado profesionalmente al más alto nivel y permitirme ser un mejor profesional con pertinencia y capacidad en el ámbito laboral.

A cada uno de mis docentes que con su conocimiento, experticia y capacidad han logrado transmitirme un copioso conocimiento en mi formación de tesis.

A mi director de tesis PhD Juan Manuel Cevallos Cevallos que, con su ejemplo, mística, humildad, pero sobre todo calidad humana ha permitido que logre habilidades y competencias que me han permitido ser un mejor profesional.

A mi Co- director de Tesis PhD Washington Cárdenas Medranda por su experiencia, alto nivel de conocimiento, apertura y facilidades que fueron fundamentales en el proceso de aprendizaje y desarrollo de mi tesis Doctoral.

Al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) y Laboratorio de Biomedicina por las facilidades brindadas en el desarrollo de los estudios realizados para mi tesis Doctoral.

## DEDICATORIA

A DIOS, primeramente, mi esposa  
Mónica, mi hija Ariana, a mis padres y  
hermana por ser esa fuente de amor,  
paciencia e inspiración.

## TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

-----  
Ing. María Isabel Jiménez Feijoo PhD.  
IIDECANO O DELEGADO

-----  
Jonathan Coronel León PhD.  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL ESPOL

-----  
Andrea Orellana Manzano PhD.  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL ESPOL

-----  
Marynes Montiel Romero PhD.  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL ESPOL

-----  
Walter Reyes Borja PhD.  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL EXTERNO

-----  
Johana Ortiz Ulloa PhD.  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL EXTERNO

-----  
Juan Manuel Cevallos PhD.  
DIRECTOR DE PROYECTO DE TITULACIÓN

-----  
Washington Cárdenas Medranda PhD.  
CO-DIRECTOR DE PROYECTO DE TITULACIÓN

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral.



Elmundo digitalizado por:  
**ENRIQUE JOSE  
SALAZAR LLORENTE**

**Enrique José Salazar Llorente**

## GLOSARIO

**Agar (con eosina y azul de metileno).** — es un medio de cultivo diferencial que inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas y algunas Gram negativas.

**Azul de metileno.** — es un colorante que se utiliza para la determinación de la morfología bacteriana.

***Bacillus amyloliquefaciens.*** — es una especie de bacteria del género *Bacillus*, fuente del BamHI enzima de restricción, y sintetizadora de una proteína antibiótica natural.

**Bacterias.** — son microorganismos procariotas que presentan un tamaño de unos pocos micrómetros y diversas formas.

**Betalactamasas de espectro extendido.** — es una enzima capaz de hidrolizar las penicilinas, todas las cefalosporinas (menos las cefamicinas) y las monobactamas, pero no las carbapenemas.

**Biocontrol.** — organismos que son enemigos naturales de los patógenos o plagas con el fin de reducir o eliminar sus efectos dañinos.

**Biolog OmniLog.** — equipo para identificación bioquímica de bacterias aeróbicas y anaeróbicas.

**Caldo verde brillante bilis.** — es un medio de cultivo que se utiliza para la detección de organismos coliformes en alimentos.

**Caldo Rappaport Vassiliadis.** — es un medio líquido para el enriquecimiento selectivo de *Salmonella* a partir de carne vacuna y productos lácteos.

**Codex Alimentarius.** — colección de normas alimentarias y textos afines aceptados internacionalmente y presentados de modo uniforme.

***Escherichia coli.*** — es una bacteria miembro de la familia de las enterobacterias.

***Enterococcus.*** — es un género de bacterias del ácido láctico de la división Firmicutes.

**Genotipos.** — se refiere a la información genética que posee un organismo en particular, en forma de ADN.

**Hepatitis A.** — es un virus que causa la inflamación del hígado debida a la infección.

***Listeria monocytogenes.*** — es una bacteria patógena causante de la listeriosis.

**Norovirus.** — es un género de virus ARN de la familia Caliciviridae.

**Oxalato.** — son sales del ácido oxálico.

**Oxford modificado agar base.** — medio de cultivo base que contiene los nutrientes necesarios

para el adecuado desarrollo bacteriano.

**PCR con transcriptasa inversa heminestada.** —técnica molecular utilizada para detectar y amplificar ácidos nucleicos específicos

**Prevalencia.** — proporción de individuos de un grupo o una población, que presentan una característica o evento determinado.

**Propagación.** — expansión de una enfermedad.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>CAPÍTULO I FUNDAMENTO TEÓRICO</b> .....	<b>5</b>
1.2.1. <i>Listeria monocitogenes</i> .....	7
1.2.2. <i>Salmonella</i> spp.....	8
1.2.3. <i>Escherichia coli</i> .....	10
1.2.4. Norovirus.....	13
1.2.5. Hepatitis A.....	18
1.3.1. Conteo en placa y número más probable (NMP).....	24
1.3.2. Identificación bioquímica y fenotipado .....	25
1.3.3. Tinción de Gram .....	26
1.3.4. Pruebas bioquímicas para patógenos de alimentos .....	27
1.3.5. Tinción con azul de metileno .....	28
1.3.6. Sistemas de identificación bioquímicas .....	28
1.3.7. Sistema de identificación biológico OmniLog .....	29
1.4.1. ARNr 16S (RRS) .....	31
1.4.2. 16S-23S ARNr.....	31
1.4.3. ARNr 23S .....	31
1.4.4. RpoB (Subunidad $\beta$ de la ARN Polimerasa).....	32
1.4.5. GyrB (Subunidad $\beta$ del ADN Girasa) .....	32
1.4.6. Transcripción inversa-PCR (RT-PCR) .....	32
1.4.7. RT PCR y Heminested .....	33
1.4.8. Calidad microbiológica global de los alimentos ecuatorianos .....	35
<b>CAPÍTULO 2 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
2.3.1. Objetivo específico 1 .....	37
2.3.2. Objetivo específico 2 .....	38
<b>CAPÍTULO 3 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
3.1.1. Selección y recolección de muestras en las ciudades de Quito, Guayaquil y Cuenca y su mantenimiento.....	39
3.1.2. Análisis de TAM (total aerobios mesófilos bacteria); TC (total coliformes); FC (fecal coliformes); EC ( <i>E. coli</i> ); SE ( <i>Salmonella enterica</i> ); LM, ( <i>Listeria monocytogenes</i> ) para la detección de la calidad microbiológica en las matrices alimentarias.....	41
3.1.2.1. Recuento de las poblaciones indicadoras de bacterias para la detección de <i>E. coli</i> .....	41
3.1.4. Detección de <i>Salmonella enterica</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> en muestras de alimentos de las ciudades de Quito, Guayaquil y Cuenca en medios de cultivos.....	43
3.1.4.1. Protocolo de detección para <i>Salmonella</i> entérica y <i>Listeria monocytogenes</i> .....	43

3.1.4.2. Análisis de datos .....	44
3.1.6. Identificación bioquímica para la detección de <i>E. coli</i> , <i>Salmonella enterica</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> en muestras de alimentos de las ciudades de Quito, Guayaquil y Cuenca. ....	44
3.1.7. Identificación molecular para la detección de <i>E. coli</i> , <i>Salmonella enterica</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> en muestras de alimentos de las ciudades de Quito, Guayaquil y Cuenca. ....	45
3.2.1. Recolección de muestras para la determinación de virus en alimentos .....	46
3.2.1. Identificación de las secuencias genómicas de NV GI, NV GII y HAV .....	46
3.2.3. Diseño de cebadores específicos para NV GI, NV GII y HAV .....	51
3.2.2. Verificación de los controles positivos mediante digestión de los plásmidos .....	52
3.2.4. Validación de la HNRT-PCR de NVGI, NVGII y el gen HAV .....	52
3.2.5. Extracción de ARN Viral: Protocolo experimental .....	53
3.2.8. RT-PCR y PCR Heminested.....	54
3.2.9. Protocolo de termociclado .....	55
a. Los medios de la secuencia alfabética son los siguientes: Y= C, T.....	56
b. La localización se basa en el número de acceso M14707 (Hepatitis A virus).....	56
3.2.10. Análisis de los productos de PCR.....	56
<b>CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>57</b>
4.1.1. Identificación de bacterias patógenas presentes en alimentos de consumo masivo disponibles en mercados de las ciudades de Guayaquil, Quito y Cuenca .....	57
4.1.1.1 Detección de TAM (total aerobios mesófilos bacteria); TC (total coliformes); FC (fecal coliformes); EC ( <i>E. coli</i> ) para la determinación de la calidad microbiológica en las matrices alimentarias .....	57
4.1.1.1.1 Recuentos del número más probable en matrices alimentarias de Quito, Guayaquil y Cuenca	57
4.1.1.1.2 Tipos de alimentos y niveles de contaminación .....	58
4.1.1.1.3 Interacción entre la ciudad y el tipo de alimento .....	59
4.1.1.2. Detección de <i>E. coli</i> , <i>Salmonella enterica</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> en muestras de alimentos de las ciudades de Quito, Guayaquil y Cuenca .....	61
4.1.1.2.1. Prevalencia de genes de <i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i> , <i>L. monocytogenes</i> y patógenos oportunistas.....	61
4.1.2 Determinación de la presencia de Norovirus y Hepatitis A en alimentos de consumo masivo en la ciudad de Guayaquil.....	65
4.1.2.1. Evaluación de eficacia y método de extracción del ARN .....	65
4.1.2.2. Evaluación de los cebadores.....	69
4.1.2.3. Análisis de correspondencias múltiples .....	70
4.2.1. Identificación de bacterias patógenas presentes en alimentos de consumo masivo	

disponibles en mercados de las ciudades de Guayaquil, Quito y Cuenca.....	71
4.2.1.1 Calidad microbiológica general de los alimentos ecuatorianos.....	71
4.2.1.2. Prevalencia de patógenos oportunistas en alimentos.....	74
4.2.1.3. Organismos de deterioro detectados.....	75
4.2.2. Determinación de la presencia de Norovirus y Hepatitis A en alimentos de consumo masivo en la ciudad de Guayaquil.....	76
4.2.2.1. Uso generalizado de RT-PCR y heminested PCR y borrele estimación de muertes por infección.....	76
4.2.2.2. Detección de norovirus y Hepatitis A.....	77
4.2.2.3. Desarrollo y evaluación de cebadores.....	78
4.2.2.4. Relevancia de estudio.....	78
<b>CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>80</b>
<b>5.1. CONCLUSIONES.....</b>	<b>80</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>85</b>
<b>PUBLICACIONES.....</b>	<b>115</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>116</b>
3.1.1. Procedimiento.....	117
3.1.2. Inoculación.....	117
3.1.3. Incubación.....	117
3.2.1. Procedimiento.....	118
3.2.2. Inoculación.....	118
3.2.3. Incubación.....	118
3.3.1. Procedimiento.....	119
3.3.2. Inoculación.....	119
3.3.3. Incubación.....	119
3.4.1. Procedimiento.....	120
3.4.2. Inoculación.....	120
3.4.3. Incubación.....	121
3.5.1. Procedimiento.....	121
3.5.2. Inoculación.....	121
3.5.3. Incubación.....	121
3.6.1. Procedimiento.....	122
3.6.2. Inoculación.....	122
3.6.3. Incubación.....	122
3.7.1. Procedimiento.....	123
3.7.2. Inoculación.....	123
3.7.3. Incubación.....	123
3.8.1. Procedimiento.....	124
3.8.2. Inoculación.....	124
3.8.3. Incubación.....	124

3.9.1. Procedimiento.....	125
3.9.2. Inoculación .....	125
3.9.3. Incubación .....	125
3.10.1. Procedimiento.....	126
3.10.2. Inoculación .....	126
3.10.3. Incubación .....	126
3.11.1. Procedimiento.....	126
3.11.2. Inoculación .....	127
3.11.3. Incubación .....	127
<b>ANEXO 4 .....</b>	<b>128</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No. 1. Reporte epidemiológico hasta la semana 14 del número de personas con cuadros de enfermedades transmitidas por alimentos en el transcurso del año 2023 en las provincias de Azuay, Guayas y Pichincha (MSP, 2023) .....	6
Tabla No. 2. Agentes biológicos infecciosos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos.....	23
Tabla No 3. Grupos de alimentos muestreados en Guayaquil, Quito y Cuenca con los análisis correspondientes realizados.....	42
Tabla No 4. Descripción de las secuencias de NV GI para el análisis genético.....	47
Tabla No 5. Descripción de las secuencias NV GII para el análisis genético.....	48
Tabla No 6. Descripción de las secuencias del VHA para el análisis genético .....	48
Tabla No 7. Secuencia de genes sintetizados para control positivo y diseño de cebadores Norovirus (GI Y GII); Hepatitis A (HAV).....	50
Tabla No 8. Secuencia de genes sintetizados de NV GI (a) NV GII (b) y HAV (c) obtenida por alineamiento a partir de cepas de la base de datos de secuencias genéticas del Centro Nacional de Información Biotécnica (NCBI) .....	51
Tabla No 9. Información generada de los conjuntos de cebadores NV GI.....	55
Tabla No 10. Información generada de los conjuntos de cebadores NV GII.....	56
Tabla No 11. Información generada de los conjuntos de cebadores del VHA .....	56

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No 1. Análisis filogenético de NoV utilizando la secuencia completa del ORF2, que abarca todos los genogrupos y genotipos (Cuevas Ferrer, 2023) .....	15
Figura No.2. A) Representación esquemática de la estructura del virión. B) Esquema de la organización genómica de NV, en el que se muestran las distintas proteínas codificadas en cada uno de los tres ORF (Pérez et al., 2012).....	16
Figura N° 3. Análisis del árbol filogenético del HAV utilizando secuencias completas.....	21
Figura N° 4. Esquema que representa la estructura del virión de HAV y cómo se organiza su material genético.....	22
Figura No 5. Esquema general de la pared celular de las bacterias Gram positiva (Rohde, 2019). .....	26
Figura No 6. Esquema general de la pared celular de las bacterias Gram negativa (Rohde, 2019). .....	27
Figura No 7. Digestión del plásmido pTop Blunt V2 con la secuencia insertada de NVGI, NVGII y el gen HAV.....	52
Figura No 8. Diagrama de flujo del método para inhibición de polifenoles, carbohidratos, lípidos y vitaminas en alimentos.....	54
Figura No 9. Asociación significativa entre la ciudad y el tipo de alimento con los niveles de bacterias mesófilas aerobias totales (TAM), coliformes totales (TC), coliformes fecales (FC) y E. coli (EC). Las letras distintas sobre las barras representan diferencias significativas entre las ciudades (A) o los grupos de alimentos (B) .....	58
Figura No 10. Bacterias mesófilas aerobias totales (A), coliformes totales (B), coliformes fecales (C) y E. coli (D) de diferentes alimentos muestreados en las ciudades de Quito, Guayaquil y Cuenca. Letras distintas sobre las barras representan diferencias significativas entre ciudades y combinaciones de grupos de alimentos. NA, no analizado .....	60
Figura No 11. Prevalencia (%) de E. coli (A), S. enterica (B) y L. monocytogenes (C) en las cinco muestras compuestas de grupos de alimentos seleccionados de cada uno de las tres ciudades ecuatorianas. Promedios nacionales son los valores medios de prevalencia de todas ciudades. *, no detectado .....	62
Figura No 12. Mapa de calor que muestra la correlación de Pearson y la agrupación de vinculación completa de las 50 especies bacterianas más prevalentes. Las entradas de alimentos están etiquetadas (tipo de alimento)-(ciudad). Los tipos de alimentos fueron ensalada de frutas (FS), queso (CHE), encebollado (E), bolón (B), pollo (CHI), salsas (S), carne molida (GB), jugo (J), fruta (F) y ceviche (CEV). Las muestras procedían de las ciudades de Quito (Q), Guayaquil (G) y Cuenca (C). Las especies detectadas se clasificaron como patógenos transmitidos por los alimentos (PF), patógenos oportunistas (PO), bacterias del deterioro de los alimentos (FS), bacterias de control biológico (BC) u otras bacterias (F). (BC), u otras bacterias (OT) .....	64
Figura No 13. Genogrupo GI NV obtenido de alimentos contaminados naturalmente durante el muestreo de octubre a noviembre de 2020 en Monte Sinaí, Guayaquil- Ecuador. Carriles 1 y 14: DNA ladder 12000 pb; carril 2 control negativo PCR; carril 3 control de extracción; carril 4 NVGI identificado en fresa (213pb); carril 5 muestra de fresa lavada; carril 6 fresa inoculada con NVGI (Control Positivo); carril 7 virus NVGI inoculado sin fresa (Control Positivo); carril 8 muestra de salchicha; carril 9 muestra de salchicha lavada; carril 10 salchicha inoculada con NVGI (Control Positivo); carril 11 virus NVGI inoculado sin salchicha (Control Positivo); carril 12 muestra de agua embotellada; carril 13 Control Positivo de NVGI (ARN sintético). Las muestras se analizaron en geles de agarosa al 2 % y tiñéndose con colorante de cianina.....	66
Figura No 14. Genogrupo GI NV obtenido de alimentos contaminados naturalmente durante el muestreo de octubre a noviembre de 2020 en Monte Sinaí, Guayaquil- Ecuador. Carriles 1 y 12: DNA ladder 12000 pb; carril 2 control negativo PCR; carril 3 control de extracción; carril 4 muestra de agua embotellada; carril 5 muestra de agua embotellada inoculada con NVGI (Control Positivo); carril 6; virus NVGI inoculado sin agua embotellada (Control Positivo); carril 7 NVGI identificado en espinacas (213pb); carril 8 espinacas lavadas; carril 9 espinacas inoculadas con NVGI (Control Positivo); carril 10 virus NVGI inoculado sin espinacas(Control Positivo); carril 11 Control Positivo NVGI (ARN Sintético). Las muestras se analizaron en geles de agarosa al 2 % y tiñéndose con colorante de cianina.....	66

- Figura No 15. Genogrupo GII NV obtenido de alimentos contaminados naturalmente durante el muestreo de octubre a noviembre de 2020 en Monte Sinaí, Guayaquil- Ecuador. Carriles 1 y 14: DNA ladder 12000 pb; carril 2 control negativo PCR; carril 3 control de extracción; carril 4 muestra de salchicha; carril 5 muestra de salchicha lavada; carril 6 salchicha inoculada con NVGII (Control Positivo); carril 7 virus NVGII inoculado sin salchicha (Control Positivo); carril 8 NVGII identificado en espinaca (215pb); carril 9 muestra de espinaca lavada; carril 10 espinaca inoculada con NVGII (Control Positivo); carril 11 virus NVGII inoculado sin espinaca (Control Positivo); carril 12 muestra de fresa; carril 13 Control Positivo de NVGII (ARN Sintético). Las muestras se analizaron en geles de agarosa al 2 % y tiñéndose con colorante de cianina .....67
- Figura No 16. Genogrupo GII NV obtenido de alimentos contaminados naturalmente durante el muestreo de octubre a noviembre de 2020 en Monte Sinaí, Guayaquil- Ecuador. Carriles 1 y 12: DNA ladder 12000 pb; carril 2 control negativo PCR; carril 3 control de extracción; carril 4 muestra de fresa lavada; carril 5 muestra de fresa inoculada con NVGII (Control Positivo); carril 6 virus NVGII inoculado sin fresa (Control Positivo); carril 7 muestra de agua embotellada; carril 8 muestra de agua embotellada (duplicado); carril 9 agua embotellada inoculada con NVGII (Control Positivo); carril 10 virus NVGII inoculado sin agua embotellada (Control Positivo); carril 11 Control Positivo NVGII (ARN Sintético). Las muestras se analizaron en geles de agarosa al 2 % y tiñéndose con colorante de cianina .....67
- Figura No 17. Virus VHA obtenido de alimentos contaminados naturalmente durante el muestreo de octubre a noviembre de 2020 en Monte Sinaí, Guayaquil- Ecuador. Carriles 1 y 14: DNA ladder 12000 pb; carril 2 control negativo PCR; carril 3 control de extracción; carril 4 muestra de salchicha; carril 5 salchicha lavada samp2le; carril 6 salchicha inoculada con HAV (Control Positivo); carril 7 virus HAV inoculado sin salchicha (Control Positivo); carril 8 muestra de espinaca; carril 9 muestra de espinaca lavada; carril 10 espinaca inoculada con VHA (Control Positivo); carril 11 virus VHA inoculado sin espinaca (Control Positivo); carril 12 muestra de fresa; carril 13 Control Positivo NVGII (ARN Sintético). Las muestras se analizaron en geles de agarosa al 2 % y tiñéndose con colorante de cianina .....68
- Figura No 18. Virus VHA obtenido de alimentos contaminados naturalmente durante el muestreo de octubre a noviembre de 2020 en Monte Sinaí, Guayaquil- Ecuador. Carriles 1 y 12: DNA ladder 12000 pb; carril 2 control negativo PCR; carril 3 control de extracción; carril 4 muestra de fresa lavada; carril 5 muestra de fresa inoculada con HAV (Control Positivo); carril 6 virus HAV inoculado sin fresa (Control Positivo); carril 7 HAV identificado en muestra de agua embotellada (160pb); carril 8 HAV identificado en duplicado de muestra de agua embotellada (160pb); carril 9 agua embotellada inoculada con HAV (Control Positivo); carril 10 virus HAV inoculado sin agua embotellada (Control Positivo); carril 11 HAV Control Positivo (ARN Sintético). Las muestras se analizaron en geles de agarosa al 2 % y tiñéndose con colorante de cianina.....68
- Figura No 19. Biplot obtenido mediante la A. Correspondencia Múltiple, que muestra las relaciones entre patógenos y grupos de alimentos. Fuente: Salazar et al. ....70

## ABREVIATURAS

**ACHIPIA:** Agencia Chilena de Inocuidad y Calidad Alimentaria

**BLEE:** betalactamasas de espectro extendido

**BGLB:** brilliant green bile broth

**BPA:** Buenas prácticas agrícolas

**BPM:** Buenas prácticas de manufactura

**CAC:** Comisión del Codex Alimentarius

**CF:** coliformes fecales

**CT:** coliformes totales

**EC:** *Escherichia coli*

**EE. UU:** Estados Unidos de América

**EFSA:** European Food Safety Authority

**EMB:** agar con Eosina y Azul de Metileno

**ETA:** Enfermedades transmitida por alimentos

**FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

**FDA:** Food and Drug Administration

**HACCP:** Análisis de peligros y puntos críticos de control

**IC:** Intervalo de confianza de los datos

**INSST:** Instituto Nacional de seguridad y Salud en el Trabajo

**INEN:** Servicio Ecuatoriano de Normalización

**NMP:** método del número más probable

**PCA:** Agar de recuento en placa

**PCC:** Punto de Control Crítico

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**RPM:** revoluciones por minutos

**RT-PCR:** reacción en cadena de polimerasa-transcripción inversa

**RTE:** Listo para el consumo

**TAM:** mesófilos aerobios totales

**TSI:** agar-hierro-triple azúcar

**TSA:** agar Triptona-Soja

**TW:** agua de triptona

**UFC:** unidades formadoras de colonia

**μL:** microlitro

**UE:** Unión europea

## RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por alimentos causadas por bacterias y virus son un problema de salud pública importante en todo el mundo, y en Ecuador hay una falta de información sobre la calidad microbiológica de los alimentos. Para abordar esta problemática, se realizó un estudio transversal en el que se recolectaron muestras de alimentos populares ecuatorianos, como bolón, encebollado, salsas, ceviche, frutas, jugos de frutas, ensalada de frutas, carne molida, queso y pollo crudo, en los mercados de Quito, Cuenca y Guayaquil. Se examinaron 10 grupos de alimentos de consumo común en el Ecuador y 15 muestras por cada grupo fueron tomados de mercados populares de tres principales ciudades como Quito, Guayaquil y Cuenca para determinar las poblaciones de diferentes microorganismos, incluyendo bacterias mesófilas aerobias totales, coliformes totales, coliformes fecales, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes*, según las regulaciones locales para cada tipo de alimento.

La *Escherichia coli*, aunque generalmente un microorganismo que vive en una relación simbiótica comensalista con su hospedador, abarca patógenos mortales transmitidos por los alimentos, como el serotipo enterohemorrágico y se trata como un patógeno potencial en este estudio. Fue altamente prevalente en la carne molida (40 a 100%) y en queso fresco (60 a 100%) de las tres ciudades, con nacionales promedios de 73 y 80%, respectivamente. También era frecuente detectado entre muestras de salsas (20 a 40%) y encebollado (0 a 80%), con promedios nacionales de 33 y 40%, respectivamente. No se detectó *E. coli* en muestras de bolón, frutas y jugos de frutas, pero se detectó en ensaladas de frutas de Guayaquil (80%) y ceviche de Quito (20%).

*Salmonella entérica* fue más prevalente en muestras de pollo crudo, oscilando entre el 20 y el 60% en las tres ciudades a nivel nacional con un promedio del 40%. El patógeno también fue aislado en salsas (20% de prevalencia) de Quito y Cuenca, así como ceviche (20% de prevalencia) y encebollado de Cuenca (20% de prevalencia).

Se detectó *Listeria monocytogenes* en el queso (20 a 40% prevalencia) de las tres ciudades, con un promedio nacional de 27%, y en bolón (prevalencia 20%) de Cuenca. El patógeno mostró una alta prevalencia en ensaladas de frutas de Guayaquil (80% de prevalencia) y Cuenca (60% de prevalencia) pero no se detectó en ensaladas de frutas de Quito.

Así mismo, se llevaron a cabo estudios para detectar la presencia de norovirus y hepatitis A en alimentos. La dificultad de detectar virus en alimentos debido a la baja carga viral que usualmente se presentan en matrices alimentarias se desarrolló un protocolo de detección tomando como muestras de alimentos frutas, vegetales (fresas y espinacas respectivamente) y productos procesados como agua y embutidos (salchichas) ya que la presencia de Norovirus y Hepatitis A son frecuentes como riesgos biológicos en los alimentos anteriormente mencionados para ello fue necesario inhibir ciertos compuestos presentes en los alimentos para evitar la degradación del material genético viral. El estudio reveló la presencia de norovirus y hepatitis A en las muestras de alimentos, lo que sugiere contaminación cruzada por manipuladores de alimentos. Este trabajo representa uno de los primeros estudios que caracterizan los patógenos transmitidos por alimentos de consumo masivo en el Ecuador.

## ABSTRACT

Foodborne illnesses caused by bacteria and viruses are a major public health problem worldwide, and in Ecuador, there is a lack of information on the microbiological quality of foods. To address this problem, a cross-sectional study was carried out in which samples of popular Ecuadorian foods, such as bolón, encebollado, sauces, ceviche, fruits, fruit juices, fruit salad, ground meat, cheese and raw chicken, were collected in the markets of Quito, Cuenca and Guayaquil. Ten groups of foods commonly consumed in Ecuador were examined and 15 samples for each group were taken from popular markets in three main cities such as Quito, Guayaquil and Cuenca to determine the populations of different microorganisms, including total aerobic mesophilic bacteria, total coliforms, fecal coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes*, according to local regulations for each type of food.

*Escherichia coli*, although generally a microorganism that lives in a commensalistic symbiotic relationship with its host, encompasses deadly foodborne pathogens such as the enterohemorrhagic serotype and is treated as a potential pathogen in this study. It was highly prevalent in ground beef (40 to 100%) and fresh cheese (60 to 100%) in the three cities, with national averages of 73 and 80%, respectively. It was also often detected among samples of sauces (20 to 40%) and onions (0 to 80%), with national averages of 33 and 40%, respectively. *E. coli* was not detected in samples of bolón, fruits and fruit juices, but was detected in fruit salads from Guayaquil (80%) and ceviche from Quito (20%).

*Salmonella enterica* was most prevalent in raw chicken samples, ranging between 20 and 60% in the three cities nationwide with an average of 40%. The pathogen was also isolated in sauces (20% prevalence) from Quito and Cuenca, as well as ceviche (20% prevalence) and encebollado from Cuenca (20% prevalence).

*Listeria monocytogenes* was detected in cheese (20 to 40% prevalence) from the three cities, with a national average of 27%, and in bolón (20% prevalence) from Cuenca. The pathogen showed a high prevalence in fruit salads from Guayaquil (80% prevalence) and Cuenca (60% prevalence) but was not detected in fruit salads from Quito.

Likewise, studies were carried out to detect the presence of norovirus and hepatitis A in foods. Due to the difficulty of detecting viruses in foods due to the low viral load that usually occur in food matrices, a detection protocol was developed taking as food samples fruits, vegetables (strawberries and spinach respectively) and processed products such as water and sausages since the presence of Norovirus and Hepatitis A are frequent as biological risks in the mentioned foods. Therefore, it was necessary to inhibit certain compounds present in the foods to avoid the degradation of the viral genetic material. The study revealed the presence of norovirus and hepatitis A in food samples, suggesting cross-contamination by food handlers. This work is one of the first studies that characterize the pathogens transmitted by foods of mass consumption in Ecuador.

## CAPÍTULO I FUNDAMENTO TEÓRICO

### 1.1. Enfermedades transmitidas por alimentos

Se estima que alrededor de 600 millones de individuos a nivel global sufren de enfermedades transmitidas por alimentos y 420.000 personas mueren por esta causa cada año con unos costes económicos anuales superiores a 14.000 millones de dólares (Pires et al., 2021). Enfermedades transmitidas por alimentos causadas por patógenos bacterianos transmitidos a través de la comida, como *Salmonella entérica*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum.*, *Escherichia coli* (EC), *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella* spp. *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* spp. y *Helicobacter pylori* son responsables de numerosos brotes (Butot & Sánchez, 2007). En gran parte de los casos, los patógenos alimentarios causan náuseas, diarrea sanguinolenta, vómitos y fiebre, entre otros síntomas. *S. enterica* puede invadir el sistema circulatorio y causar septicemia (Leiva et al., 2018) e incluso la muerte (Butot et al., 2007; Kim et al., 2013). Otros patógenos, como el *Clostridium botulinum*, pueden producir toxinas capaces de paralizar el sistema nervioso y provocar la muerte de los individuos afectados (OMS, 2023). En Ecuador, aunque brotes de salmonelosis son comúnmente reportados (Fiore et al., 2006) otros brotes pueden estar subestimados, como se han reportado en otros países en desarrollo.

La mayoría de los países desarrollados están adoptando medidas para controlar las enfermedades transmitidas por los alimentos se han establecido sistemas de inocuidad alimentaria con base científica y normas aplicadas respaldadas por la investigación. Los programas enfocados en la prevalencia de patógenos transmitidos por los alimentos en la cadena alimentaria, la propagación de enfermedades y la exposición de la población a los riesgos como pueden ser las enfermedades gastrointestinales, propagación de enfermedades, costos económicos y complicaciones de salud, son elementos fundamentales en el desarrollo de un sistema nacional de seguridad alimentaria eficiente. Sin embargo, los programas de inocuidad alimentaria basados en la investigación se ejecutan casi exclusivamente en los países industrializados (Lowther et al., 2019) y faltan en muchos países en desarrollo como Ecuador, debido a la escasez de recursos y la falta de datos de referencia sobre la presencia de microorganismos contaminantes en los alimentos (Chiluisa & Gabriela, 2012).

En los Estados Unidos, los estudios de referencia microbianos se llevan a cabo en regiones para las que no se disponen de datos de prevalencia patógenos (Martín Juárez, 2005). Asimismo, se han

realizado estudios que investigan la calidad microbiológica de los alimentos listos para el consumo en distintas regiones, como China, Pakistán y Nigeria (Torrens et al., 2015).

Los recuentos totales de bacterias aeróbicas y los niveles de coliformes se han empleado como indicadores de la inocuidad en los alimentos, y muchas regulaciones establecen estándares microbiológicos basados en los niveles de estas bacterias (Bances Torres, 2023). Los organismos indicadores suelen cuantificarse, sin embargo, rara vez se han identificado los aislados predominantes en las pruebas de aerobios totales y coliformes, lo que impide la detección de bacterias patógenas, ya que varios patógenos alimentarios pueden crecer entre los microorganismos indicadores (Yong, 2009).

Las enfermedades causadas por los alimentos suelen ser a menudo de naturaleza infecciosa o tóxica y son causadas por bacterias, virus o parásitos que entran en el cuerpo a través de agua o alimentos contaminados. Estas enfermedades abarcan diversas dolencias y representan un creciente problema de salud pública. Son causadas por la ingestión de alimentos contaminados con microorganismos en cualquier etapa del procesamiento de los alimentos, desde la producción hasta el consumo. La manifestación clínica más común es la aparición de síntomas gastrointestinales. (Ministerio de Salud Pública, 2021).

A pesar de la importancia de estas enfermedades a nivel mundial, en el Ecuador solo se realiza el monitoreo de fiebre tifoidea y paratifoidea, salmonelosis, Hepatitis A y shigelosis. La Tabla 1 presenta los datos hasta el segundo trimestre del 2023 de estas enfermedades en el Ecuador.

**Tabla No.1. Reporte epidemiológico hasta la semana 14 del número de personas con cuadros de enfermedades transmitidas por alimentos en el transcurso del año 2023 en las provincias de Azuay, Guayas y Pichincha (MSP, 2023).**

Nombre/Provincia Número de casos	Fiebre tifoidea y paratifoidea	Salmonelosis	Hepatitis A	Shigelosis	Otras intoxicaciones alimentarias
Azuay	3	12	6	3	89
Guayas	79	204	6	17	467
Pichincha	29	36	18	22	817

## 1.2. Patógenos en alimentos

La propagación de agentes infecciosos a través de los alimentos constituye un desafío global para

la salud pública. El informe preliminar de FoodNet 's muestra 25,606 infecciones, 5,893 hospitalizaciones y 120 muertes por patógenos transmitidos por los alimentos en 10 lugares de los Estados Unidos durante el periodo de 2015 a 2018 (Tack et al., 2019).

Hay muchos patógenos que potencialmente pueden contaminar los alimentos, y muchos más escenarios por los que podría surgir dicha contaminación. La detección de patógenos en el producto final requiere mucho tiempo, es costosa, a menudo invasiva y, en gran medida, ineficaces para garantizar el nivel requerido de inocuidad alimentaria (IAEA, 2018).

Cabe señalar que la inocuidad alimentaria es un problema importante con implicaciones graves y para la salud pública cuando se consumen alimentos contaminados con microorganismos patógenos (Hoffmann et al., 2017). En la fase de elaboración de los alimentos y al considerar la seguridad alimentaria, se emplea la metodología del Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control (APPCC) para tomar las precauciones necesarias a fin de garantizar que estos sean seguros para el consumo (Ceyhun Sezgin & Artik, 2015).

Las especies bacterianas patógenas que se han asociado con frecuencia a los alimentos son *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Clostridium* spp. *Campylobacter* spp. *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Shigella* spp. y *Vibro parahaemolyticus* (EFSA, 2019).

### **1.2.1. Listeria monocitogenes**

La presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos preparados para el consumo genera una importante inquietud debido a su elevada tasa de letalidad, especialmente para los individuos con mayor susceptibilidad, como mujeres embarazadas y personas con sistemas inmunológicos debilitados (Camargo et al., 2017). La *Listeria monocytogenes* perteneciente a la familia *Listeriaceae* se define como un bacilo Gram positivo con dimensiones específicas de 0,5 a 2 por 0,5 micras, capaz de infectar células dentro del sistema retículo endotelial y puede encontrarse en temperaturas que oscilan entre los 20 y 25°C aunque también han reportado crecimiento a temperaturas de refrigeración, su rango de pH óptimo es cercano al neutral lo cual va desde 6 a 9 aunque también se puede desarrollar en un rango más amplio comprendido entre 4.4 a 9.6. En cuanto a su metabolismo, es un organismo facultativo anaerobio que es positivo para la enzima catalasa y negativo para la enzima oxidasa. Se han identificado 13 serotipos de *Listeria monocytogenes*, sin embargo, los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b son los más comúnmente asociados con enfermedades en seres humanos y animales (INSST, 2022).

La membrana de *Listeria* ha sido descrita según Bierne H, 2007, con aproximadamente 90 Ångströms de grosor y está compuesta por proteínas (55-60%), lípidos (30-35%) y carbohidratos (1,3-2,3%). Los lípidos incluyen principalmente fosfolípidos como fosfatidilglicerol, difosfatidilglicerol y fosfoglicolípidos. La respuesta inmunitaria a *Listeria monocytogenes* involucra la activación de células inmunitarias, como macrófagos y células dendríticas, y la producción de anticuerpos específicos contra la bacteria. La *Listeria monocytogenes* se ingiere a través de alimentos contaminados y puede adherirse y penetrar en las células intestinales y otros órganos. Desde allí, se disemina a través del sistema linfático y sanguíneo y se replica dentro de las células, lo que provoca síntomas que pueden variar en gravedad, como fiebre, dolores musculares y náuseas. En personas inmunocomprometidas, la infección puede ser más grave, afectando el sistema nervioso central. En mujeres embarazadas, puede provocar complicaciones como abortos espontáneos (Chomba Valiente, 2022).

En 2017, la EFSA informó de 2.480 casos humano-invasivos confirmados de listeriosis y una tasa de prevalencia del 0,9% en quesos blandos y semiblandos elaborados con leche cruda o tratada a baja temperatura (EFSA, 2019). La prevalencia de la *Listeria monocytogenes* en la leche cruda y queso ha sido ampliamente reportada, y su naturaleza ubicua y contaminación por distribución se puede presentar en cualquier etapa del proceso de producción (Dalzini et al., 2016).

### **1.2.2. Salmonella spp.**

*Salmonella* spp. sigue representando el primer agente causal de brotes de enfermedades de origen alimentario en la UE con 9600 casos y 2227 hospitalizaciones al año 2020. *Salmonella* puede detectarse en el tracto intestinal de animales sanos, y la contaminación de la leche se produce principalmente durante las operaciones de ordeño (Griffin et al., 2020). *Salmonella* es un tipo de bacteria que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, no esporulado y generalmente móvil gracias a sus flagelos peritricos. Puede utilizar citrato como su única fuente de carbono y tiene un metabolismo que combina la oxidación y la fermentación. Para crecer, no necesita cloruro de sodio, pero puede hacerlo en concentraciones que oscilan entre el 0,4% y el 4%. La mayoría de los serotipos de *Salmonella* se desarrollan a temperaturas que van desde los 5 °C hasta los 47 °C, con una temperatura óptima de 35 °C-37 °C, aunque algunos pueden sobrevivir a temperaturas más bajas, incluso hasta -2 °C o 4 °C, y temperaturas más altas de hasta 54 °C. El pH de crecimiento de la bacteria oscila entre 4 y 9, con un pH óptimo entre 6,5 y 7,5. La actividad de agua

(aw) de 0,99 a 0,94 favorece su crecimiento, aunque también pueden sobrevivir en alimentos secos con una aw menor de 0,2. La bacteria no crece a temperaturas inferiores a 7 °C, pH menor de 3,8 y aw menor de 0,94. *Salmonella* es altamente patógena, con más de 2500 serotipos identificados en el sistema actual de Kauffmann-White. Los serotipos más comunes que se encuentran en alimentos a nivel mundial son *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, Enteritidis y Newport (Gonzalez, Pereira, Soto, Hernandez, & Villareal, 2014).

Según Azimi et al., 2020, *Salmonella* utiliza diferentes estrategias de replicación. Después de ser transferida de SPI-1 (invasivo) a SPI-2 (mantenimiento), *Salmonella* se replica en una estructura llamada SCV (vacuola de *Salmonella* que contiene el patógeno). Durante la replicación, *Salmonella* requiere nutrientes y extiende un apéndice largo en el citoplasma llamado SIF (Filamento Inducido por *Salmonella*). Además, *Salmonella* puede salir de la SCV, replicarse en el citoplasma y dirigirse al sistema de autofagia. Sin embargo, puede detener la autofagia o matar a los macrófagos y luego liberarse. Después de su liberación, *Salmonella* es absorbida por los neutrófilos y degradada con ROS (especies reactivas de oxígeno). Aunque *Salmonella* puede resistir ROS, como otras bacterias.

De acuerdo con (Azimi et al., 2020), *Salmonella* utiliza un sistema de secreción tipo III (T3SS) codificado por los grupos de patogenicidad SPI-1 y SPI-2 para invadir y sobrevivir dentro de las células huésped. El T3SS es un complejo de proteínas que permite a la bacteria inyectar proteínas efectoras en la célula huésped, lo que le permite manipular la maquinaria celular y facilitar su entrada y supervivencia intracelular. La adhesión de *Salmonella* a las células huésped se produce a través de la interacción de proteínas de adhesión en la superficie de la bacteria con receptores en la superficie de la célula huésped. Una vez que la *Salmonella* se ha adherido a la célula huésped, utiliza el T3SS para inyectar proteínas efectoras en la célula huésped, lo que le permite manipular la maquinaria celular y facilitar su entrada y supervivencia intracelular. Sin embargo, puede detener la autofagia o matar a los macrófagos y luego liberarse. Después de su liberación, *Salmonella* es absorbida por los neutrófilos y degradada con ROS (especies reactivas de oxígeno).

De acuerdo a Chowdhury et al., 2019 menciona que los macrófagos hemofagocíticos en la fiebre tifoidea murina tienen un fenotipo antiinflamatorio, lo que sugiere que *Salmonella* puede manipular la

respuesta inmunitaria del huésped para su beneficio. Además, (Soltan Dallal et al., 2020) menciona que *Salmonella* tiene diferentes estrategias para evadir el sistema inmunitario del huésped, incluyendo la producción de proteínas efectoras que inhiben la respuesta inmunitaria y la modulación de la expresión de genes involucrados en la respuesta inmunitaria. En general, la respuesta inmunitaria del huésped a *Salmonella* incluye la activación de células inmunitarias como los macrófagos y los neutrófilos, la producción de citocinas inflamatorias y la generación de una respuesta de anticuerpos. Sin embargo, *Salmonella* puede manipular la respuesta inmunitaria del huésped para su beneficio y evitar la eliminación por el sistema inmunitario.

El genoma de la *Salmonella enterica* es complejo y se compone de una parte estable y conservada, llamada núcleo, y una gran cantidad de genes accesorios y regiones genómicas variables. Estos genes accesorios incluyen elementos transponibles, fagos, plásmidos y las islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPIs). La variación en el contenido genético se encuentra en regiones específicas, como las SPIs, sitios de inserción de fagos y elementos transponibles. Estas regiones son conservadas en varios aislados, aunque no en todos, lo que puede afectar su especificidad de huésped. Se ha descubierto que la estructura del pan-genoma de *Salmonella enterica* es "cerrada", lo que significa que el tamaño del pan-genoma disminuye a medida que se agregan más genomas para comparar (Jacobsen et al., 2011).

La salmonelosis es una afección común transmitida por la bacteria *Salmonella* y afecta a decenas de millones de personas en todo el mundo cada año, causando más de cien mil muertes. En la mayoría de los casos, los síntomas son leves y los pacientes se recuperan sin un tratamiento específico, la *Salmonella* se contagia a través del consumo de alimentos o agua contaminados y por el contacto con personas o animales infectados. No obstante, en ciertos casos, especialmente en niños pequeños y ancianos, la deshidratación generada por la enfermedad llega a ser grave y poner en riesgo la vida (Carvajal et al., 2019).

### **1.2.3. Escherichia coli**

*Escherichia coli* es la principal bacteria productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) identificada en productos alimenticios, humanos y muestras ambientales en todo el mundo (Ojer-Usoz et al., 2017). *E. coli* es una bacteria Gram-negativa que tiene una estructura celular típica de las bacterias, con una pared celular compuesta por una capa delgada de peptidoglicano rodeada por una

membrana externa compuesta por lipopolisacáridos y proteínas. La estructura detallada de *E. coli* puede variar dependiendo de la cepa y la condición de crecimiento. Los rangos de pH óptimos para su crecimiento se encuentran entre 6.5 a 7.5 y su temperatura óptima se encuentra alrededor de los 37°C.

En Ecuador, se han caracterizado cepas de *E. coli* productoras de BLEE en muestras clínicas, vegetales crudos, heces de perros y pollos de engorde (Cartelle Gestal et al., 2016; Chiluisa-Guacho et al., 2018; Hedman et al., 2019; Ortega-Paredes et al., 2019; Soria Segarra et al., 2018; Vinueza-Burgos et al., 2019; Zurita et al., 2019). La gran mayoría de las cepas de *Escherichia coli* son inofensivas y forman parte de la flora intestinal normal y saludable. No obstante, existen ciertas cepas que pueden provocar enfermedades, algunas de las cuales pueden ser graves, como la diarrea, infecciones del tracto urinario, enfermedades respiratorias e infecciones sistémicas. (Intriago et al., 2023). Entre las distintas cepas de *Escherichia coli*, se encuentran la *E. coli* enterotoxigénica (ECET), la *E. coli* enteropatógena (ECEP) en sus variantes típica y atípica, la *E. coli* productora de toxina Shiga (ECTS), la *E. coli* enteroagregativa (ECEA), la *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), la *E. coli* enteroinvasiva (ECEI) y la *E. coli* de adherencia difusa (ECAD) (Gómez-Duarte, 2014).

El genoma de *E. coli* es una molécula de ADN circular de aproximadamente 4.6 millones de pares de bases. El genoma se organiza en un solo cromosoma y, en algunos casos, puede contener plásmidos adicionales. El cromosoma de *E. coli* se divide en dos regiones principales: la región de replicación y la región de terminación. La región de replicación es donde comienza la replicación del ADN, mientras que la región de terminación es donde termina la replicación. El genoma de *E. coli* contiene aproximadamente 4,300 genes codificantes de proteínas, así como regiones no codificantes de ADN que pueden contener elementos reguladores y secuencias repetitivas. La organización de los genes en el genoma de *E. coli* es altamente conservada, con genes relacionados funcionalmente agrupados en operones (Lista Pombo, 2020).

La replicación del ADN en *E. coli* es un proceso semiconservativo, lo que significa que cada hebra de ADN parental se utiliza como molde para sintetizar una nueva hebra complementaria. El proceso de replicación comienza en un sitio específico del cromosoma llamado origen de replicación, donde una proteína llamada DnaA se une y desenrolla la doble hélice de ADN. Luego, una proteína llamada helicasa separa las dos hebras de ADN, creando una horquilla de replicación. A medida que la horquilla de replicación se mueve a lo largo del cromosoma, una enzima llamada ADN polimerasa sintetiza nuevas hebras de ADN complementarias a las hebras parentales. La síntesis de ADN es bidireccional,

lo que significa que se están sintetizando nuevas hebras de ADN en ambas direcciones a partir del origen de replicación. Una vez que se completa la replicación, las dos moléculas de ADN resultantes se separan y se distribuyen a las células hijas durante la división celular. En general, la replicación del ADN en *E. coli* es un proceso altamente regulado y coordinado que permite la rápida duplicación del genoma durante el ciclo celular (Wendel et al., 2014).

Para invadir al huésped, las proteínas adhesinas de *E. coli* participan en la colonización y la formación de biopelículas en las superficies biológicas y abióticas (Schwidder et al., 2019). El primer paso en la adhesión de *E. coli* a las células epiteliales intestinales es la unión inicial. Estudios recientes han demostrado que el contacto inicial y la unión entre el patógeno y la célula huésped se producen a través de la interacción entre las fimbrias polares largas del patógeno (Ifpgen) y las proteínas de la membrana extracelular en la célula huésped, incluyendo fibronectina, colágeno IV y laminina (Chen et al., 2016). Después de la unión inicial, *E. coli* utiliza un sistema de secreción tipo III (T3SS) para inyectar proteínas efectoras en la célula huésped. Estas proteínas efectoras manipulan la maquinaria celular de la célula huésped para permitir la entrada y el tráfico intracelular de *E. coli*. La proteína efectora Tir (translocada intimina receptor) se inyecta en la célula huésped a través del T3SS y se inserta en la membrana celular de la célula huésped. Tir actúa como un anclaje para la proteína intimina de *E. coli*, que se encuentra en la superficie de la bacteria. La interacción entre Tir e intimina permite que *E. coli* se adhiera estrechamente a la célula huésped y forme una estructura de pedestal de actina debajo de la bacteria. Además, *E. coli* utiliza otras proteínas efectoras inyectadas a través del T3SS para manipular la maquinaria celular de la célula huésped y permitir el tráfico intracelular de la bacteria. Por ejemplo, la proteína efectora EspF (Nougayrède et al., 2003).

Una vez que *E. coli* se localiza en el citoplasma de la célula epitelial, suprime la respuesta inmunitaria del huésped y contrarresta el sistema de defensa inmune mediante el uso de proteínas efectoras para persistir y sobrevivir dentro de los colonocitos (Pakbin et al., 2021). OspF y OspG son proteínas efectoras que inhiben la activación y la transcripción génica de NF- $\kappa$ B, un factor de transcripción que regula la expresión de genes implicados en la respuesta inmunitaria y la inflamación. Además, *E. coli* utiliza otras proteínas efectoras inyectadas a través del T3SS para manipular la maquinaria celular de la célula huésped y evitar la respuesta inmunitaria del huésped. Por ejemplo, la proteína efectora NleE se ha demostrado que inhibe la producción de citocinas proinflamatorias en las células huésped, lo que ayuda a *E. coli* a evitar la respuesta inmunitaria del huésped. En general, *E.*

*coli* utiliza una variedad de estrategias para evitar la respuesta inmunitaria del huésped y persistir dentro de las células huésped. Estas estrategias incluyen la supresión de la activación de NF-κB y la inhibición de la producción de citocinas proinflamatorias (Niu et al., 2011).

*E. coli* es un organismo comensal inofensivo que puede adquirir una mezcla de elementos genéticos móviles integrales que contienen genes que codifican factores de virulencia, convirtiéndose en un patógeno humano emergente capaz de causar un amplio espectro de infecciones intestinales y enfermedades extraintestinales. Nueve patotipos definitivos de *E. coli* entérica han sido bien caracterizados, causando enfermedades que van desde diversos trastornos gastrointestinales hasta infecciones del tracto urinario. Estos patotipos emplean muchos factores de virulencia y efectores que subvierten las funciones de las células huésped para mediar su virulencia y patogenia. Los factores de virulencia de *E. coli* incluyen proteínas adhesinas que permiten la colonización y la formación de biopelículas en las superficies biológicas y abióticas, proteínas efectoras que manipulan la maquinaria celular de la célula huésped para permitir la entrada y el tráfico intracelular de *E. coli*, y proteínas que suprimen la respuesta inmunitaria del huésped y contrarrestan el sistema de defensa inmune. En general, la virulencia de *E. coli* es el resultado de una combinación de factores de virulencia y efectores que permiten al patógeno colonizar, invadir y persistir dentro de las células huésped, evadir la respuesta inmunitaria del huésped y causar enfermedad en el huésped (Cáceres, 2019).

#### **1.2.4 Norovirus**

El norovirus (NV), también conocido como virus Norwalk-like, es un grupo de virus sin envoltura de 26 a 35 nm de diámetro, con RNA monocatenario, que pertenecen a la familia Caliciviridae. Son reconocidos a nivel mundial como una de las principales causas de gastroenteritis aguda. Se subdividen en cinco genogrupos (GI-GV) y más de 31 genotipos diferentes. Los genogrupos GI, GII y GIV se asocian a la gastroenteritis en humanos, siendo GII el genogrupo más diverso y responsable del 70% de los brotes de norovirus. Desde el 2002, se ha reportado que las cepas del genotipo GII.4 son la causa más común de brotes (ACHIPIA, 2017). La enfermedad suele aparecer entre 12 y 48 horas después de la infección, y aunque los síntomas suelen ser leves y autolimitados, pueden ser graves en pacientes inmunodeprimidos y ancianos (Griffin *et al.*, 2014). La enfermedad por NV se considera una enfermedad de transmisión alimentaria, pero la transmisión de persona a persona y los brotes transmitidos por el agua también son fuentes importantes de infección (Barclay *et al.*, 2014). El

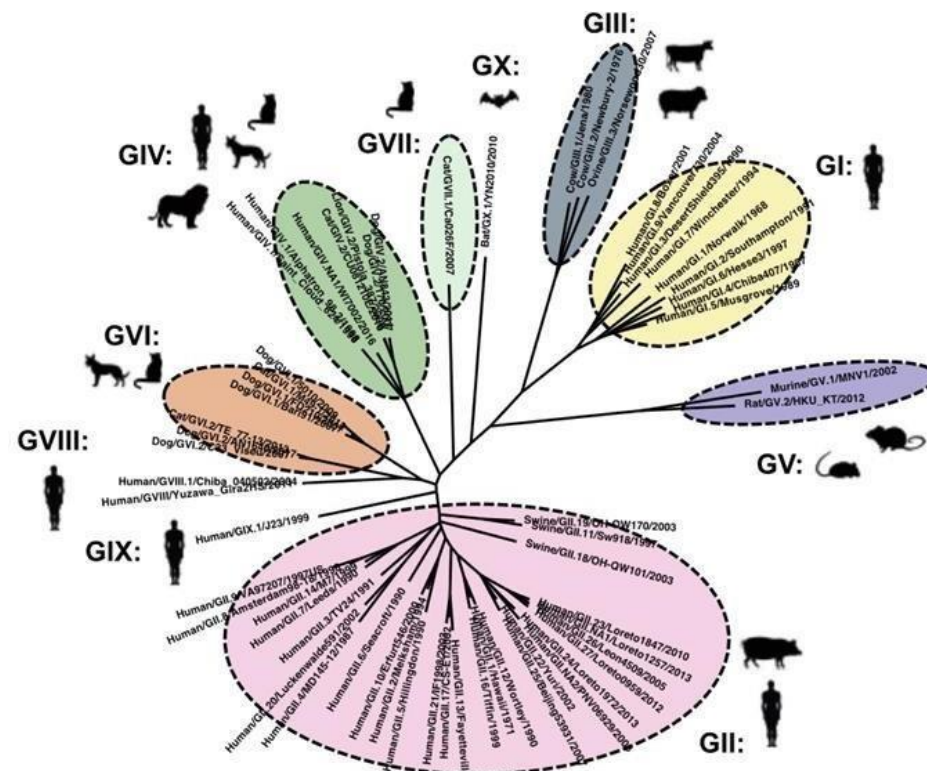
genoma del NV está compuesto por un ARN monocatenario de sentido positivo (+ARNss), con aproximadamente 7,7 kb y tres marcos abiertos de lectura (ORF): ORF1, ORF2 y ORF3 (Green et al., 2013). ORF1 codifica seis proteínas no estructurales, incluida la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) (Bertolotti et al., 2003). Los ORF2 y ORF3 codifican las proteínas estructurales de la cápside mayor (VP1) y menor (VP2), respectivamente (Hardy *et al.*, 2010). La VP1 consta de un dominio de pliegue (S) y dos dominios prominentes (P) (Bower et al., 2000). El dominio P1, que constituye una región destacada de la cápside, está compuesto por dos dominios. Esta región prominente del bucle flexible se encuentra entre los dominios S y P2 (Bertolotti *et al.*, 2003). El dominio P2 es una región hipervariable que se une a la célula huésped (Butot *et al.*, 2007). La estabilidad de la VP1 se ve incrementada por la VP2, que impide su degradación (Bertolotti *et al.*, 2003). El NV se clasifica en seis grupos, los genogrupos I a VI (GI a GVI), basándose en las secuencias de aminoácidos de la RdRp y la VP1 (Donaldson *et al.*, 2010). Los genogrupos GI, GII y GIV se encuentran en humanos 10 y los brotes aparecen con mayor frecuencia dentro de estos genogrupos (Fiore et al., 2006). El GII evoluciona de forma continua en un patrón evolutivo cada 2 o 3 años (Fukuda *et al.*, 2008). Este genotipo equivale al 87% de la aparición de norovirus en todo el mundo (Gingrich *et al.*, 1983). El tipo NV GII. Sydney surgió en la República de Corea entre 2012 y 2013, donde el 60,4% de los diagnósticos de NV mostraron GII (Gingrich *et al.*, 1983). La cepa NV GII presenta dificultades en su identificación mediante la RT-PCR existente debido a la continua variación que experimenta. Además, el conjunto de cebadores no siempre tiene suficiente especificidad para detectar NV y la detección de falsos positivos se produce con frecuencia (Green, 2013).

En la figura 1 se muestra un análisis filogenético de Norovirus (NoV) utilizando la secuencia completa del marco abierto de lectura 2 (ORF2), que abarca todos los genogrupos y genotipos (Patel et al, 2009.)

Los miembros de la familia de virus *Caliciviridae* tienen una proteína viriónica, genoma de ARN de sentido positivo ligado al genoma (VPg) que está poliadenilado y rodeado por una cápside no envuelta, icosaédrica de 27 a 40 nm de diámetro. La cápside se construye predominantemente a partir de una proteína estructural principal, VP1, de aproximadamente 60.000 D.

En cada género se han identificado una o más especies, siendo el parentesco genético la base principal para esta clasificación en la estructura taxonómica actual de los *Caliciviridae*. Es plausible que se establezcan géneros adicionales, especialmente después de la caracterización de genomas

únicos de virus como el de Tulane (simio), (Mandez *et al.*, 2004) el virus de St. (porcino) y el virus de Bayern (aviar). Por debajo del nivel de especie en determinados géneros (Norovirus y Sapovirus), sistemas provisionales de tipificación genética (consistentes en genogrupos subdivididos en clústeres genéticos o genotipos) han resultado útiles en estudios epidemiológicos.



**Figura No 1. Análisis filogenético de NoV utilizando la secuencia completa del ORF2, que abarca todos los genogrupos y genotipos (Cuevas Ferrer, 2023).**

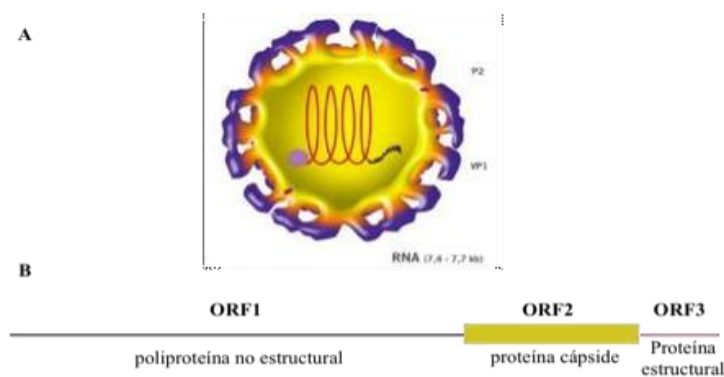
Los calicivirus tienen un genoma lineal de ARN monocatenario de sentido positivo (con una longitud aproximada de 7,3 a 8,5 kb). Los genomas comienzan característicamente con una secuencia pGpU terminal en el extremo 5' que está unida covalentemente a una pequeña proteína, VPg (Torner Gràcia, 2008).

Una región conservada de longitud reducida (CR) se repite internamente en el genoma cerca del inicio de un transcrito de ARN de tamaño subgenómico. Este transcrito subgenómico tiene su extremo 3' terminal con el extremo 5' del genoma (Herbert *et al.*, 1996; Lambden *et al.*, 1993; Meyers *et al.*, 1991; Morales *et al.*, 2004; Morotti *et al.*, 2004).

En la figura 2 se muestra la representación esquemática del virión y la organización genómica del Norovirus en el que se evidencian las distintas proteínas codificadas en cada uno de los tres ORF

(Pérez *et al.*, 2012).

Las proteínas no estructurales son codificadas en la región cercana al extremo 5' del genoma, mientras que las proteínas estructurales (VP1 y VP2) se encuentran hacia el extremo 3' del genoma en una región correspondiente a un ARN subgenómico. Los genomas de los calicivirus se organizan en dos o más ORF principales, dependiendo del género. Los norovirus y los vesivirus codifican la proteína estructural VP1 en un ORF separado (ORF2), mientras que los sapovirus, lagovirus y nebovirus codifican una VP1 contigua a la gran poliproteína no estructural en el ORF1. Todos los calicivirus tienen un ORF relativamente pequeño cerca del extremo 3' que codifica la proteína estructural menor, VP2. La VP2 es de tamaño variable (12.000 a 29.000 D) e identidad de secuencia entre los calicivirus. Los genomas de norovirus murinos analizados hasta ahora contienen un único ORF conservado (ORF4) con una proteína codificada de 23.800 D (Thornhill *et al.*, 1977).



**Figura No. 2. A) Representación esquemática de la estructura del virión. B) Esquema de la organización genómica de NV, en el que se muestran las distintas proteínas codificadas en cada uno de los tres ORF (Pérez *et al.*, 2012).**

Los viriones de calicivirus deben interactuar primero con la célula huésped, carbohidratos, incluidos los presentes en varios antígenos del grupo histosanguíneo (HBGAs), se han implicado en la unión de varias cepas de calicivirus a las células. Los estudios estructurales han verificado que el norovirus VP1 interactúa con carbohidratos HBGA (Cao *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2008).

El reconocimiento de receptores es esencial para los calicivirus, ya que la transfección de ARN infeccioso de calicivirus en células no permeables (es decir, aquellas que no pueden infectarse con viriones) permite la replicación y la recuperación de progenie de virus infecciosos. La molécula de adhesión de unión-1 (JAM-1), una proteína de membrana celular similar a la inmunoglobulina membrana celular, ha sido identificada como un receptor funcional para el Calicivirus felino (FCV),

convirtiéndolo en el primer receptor verificado experimentalmente en la familia (Pesavento et al., 2011).

Estudios estructurales y de modelización han demostrado que el FCV interactúa con la JAM-1 felina (f) través de la unión del dominio P2 de la cápside con el dominio de membrana distal (D1) del FCV distal (D1) de f JAM-13 (Kageyama *et al.*, 2004).

Se han observado variaciones entre los calicivirus en sus requisitos para la entrada en las células y la posterior infección. La replicación del Calicivirus felino fue inhibida por la cloroquina, un reactivo que eleva el pH lisosómico que eleva el pH lisosomal, lo que indica dependencia de la entrada pH bajo. Por el contrario, el norovirus (cepa MNV-1) no dependía de la acidificación de los endosomas para la infectividad. Los Calicivirus felinos utilizan la endocitosis mediada por clatrina para entrar en células de mamíferos, mientras que el MNV-1 aparentemente no entra a través de vías mediadas por clatrina o caveolina. El 90% de los aislados de NoV en casos de gastroenteritis pertenecen al genogrupos II. Dentro de este genogrupos, las cepas mayoritarias son las pertenecientes al genotipo II.4 (Bull *et al.*, 2006; Ramírez *et al.*, 2006; Siebenga *et al.*, 2007). La elevada incidencia de las infecciones causadas por NoV parece estar relacionadas con la aparición secuencial y la rápida propagación de nuevas variantes y/o cepas recombinantes de NoV. Se propuso una vía endocítica para la entrada de MNV-1 que probablemente involucra balsas lipídicas sensibles al colesterol y la dinamina II (al menos en las células RAW) (Stuart *et al.*, 2006; Gerondopoulos *et al.*, 2010; Perry *et al.*, 2009). Los norovirus entran en el organismo predominantemente por vía oral, los virus son estables a los ácidos, lo que indica que pueden sobrevivir al paso a través del estómago. Las pruebas indirectas de estudios epidemiológicos sugieren que los virus también pueden entrar a través de aerosoles, como en los generados por los vómitos explosivos que suelen producirse durante la enfermedad (Caul *et al.*, 1994; Chan *et al.*, 2011; Marionneau *et al.*, 2002; Phillips *et al.*, 2010).

Según los estudios de voluntarios con NV, el periodo de incubación es corto, de 10 a 51 horas, con una media de 24 horas, la enfermedad aguda suele durar entre 24 y 48 horas. El periodo de incubación registrado en 22 brotes de gastroenteritis por norovirus fue de entre 24 a 48 horas en 20 de los brotes, y el intervalo fue de 4 a 77 horas. El periodo de incubación de la enfermedad inducida experimentalmente por el virus Snow Mountain osciló entre 19 y 41 horas, con una media de 27 horas (Atmar *et al.*, 2008; Boillat *et al.*, 2011; Stuart *et al.*, 2006; Wyatt *et al.*, 1974).

El principal lugar de replicación del norovirus es presumiblemente el tracto intestino delgado

superior (duodeno y yeyuno superior), pero hay pruebas de que el virus puede propagarse extraintestinal. Se ha detectado ARN viral en el suero y el líquido cefalorraquídeo de un paciente de 23 meses con encefalopatía un análisis de 39 pacientes con gastroenteritis aguda por norovirus (confirmada por la detección de ARN viral en heces), se detectó ARN de norovirus en el suero de 6 (15%) pacientes mediante PCR en tiempo real. Los norovirus humanos pueden establecerse en lechones gnotobióticos y chimpancés cuando se administran por vía intravenosa (Akanashi *et al.*, 2009).

La inmunidad a los norovirus en humanos es poco conocida, los adultos demuestran sistemáticamente un alto grado de susceptibilidad tanto a la enfermedad NV natural como a la inducida experimentalmente. En ciertos brotes de norovirus, se observó que más del 80% de los adultos resultaron afectados. Además, aproximadamente el 50% de los voluntarios adultos no seleccionados también contrajeron la infección por norovirus. Esto sugiere que la resistencia a la enfermedad por norovirus podría estar relacionada con la inmunidad del huésped y la exposición a cepas en constante evolución de este virus (de Graaf *et al.*, 2016).

No se han definido los determinantes de virulencia de los norovirus humanos, pero las diferencias en los resultados clínicos asintomáticos hasta la diarrea potencialmente mortal, sugieren que existen diferencias entre cepas como se ha demostrado para otros calicivirus. Una característica convincente de la epidemiología del norovirus que apoya las diferencias entre cepas (especialmente en el genotipo GII.4) es la sorprendente variación de la prevalencia de la enfermedad en determinados años, con aumentos bruscos de los brotes globales y de la carga de morbilidad (Hussey *et al.*, 2011).

### **1.2.5. Hepatitis A**

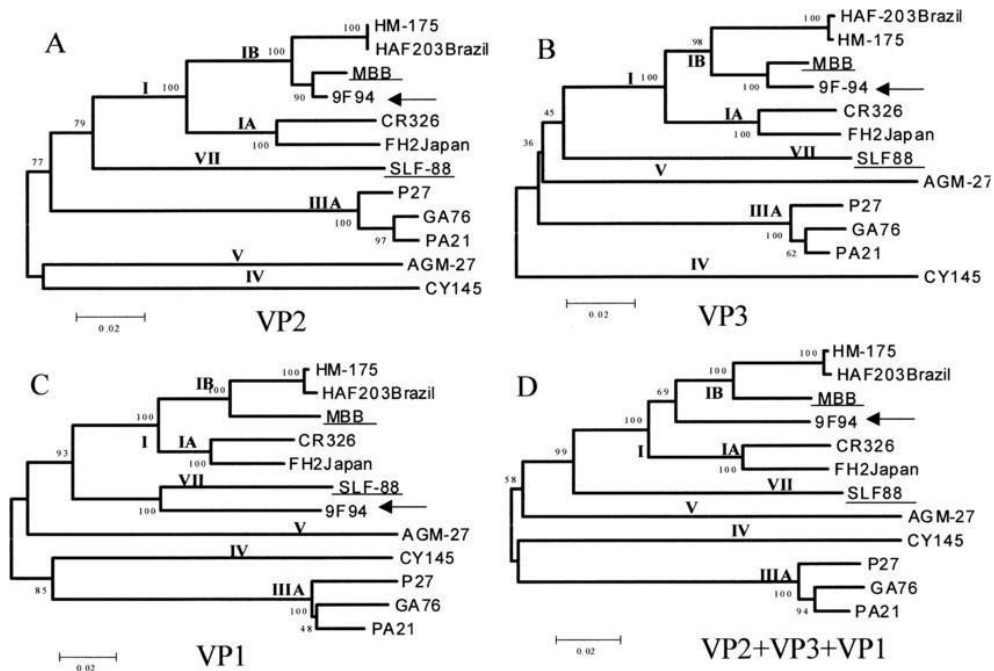
La hepatitis A es una afección viral ocasionada por el virus de la hepatitis A (VHA). El VHA pertenece a la familia Picornaviridae y al género Hepatovirus. Se trata de un virus no envuelto que contiene un genoma de ARN de cadena sencilla de polaridad positiva. Su forma es icosaédrica y su diámetro aproximado es de 27 a 32 nanómetros. El VHA muestra resistencia al calor, a los ácidos y al ambiente ácido presente en el estómago, lo que le permite sobrevivir en condiciones adversas, se transmite principalmente mediante la ingestión de agua o alimentos contaminados con heces de una persona

infectada. También puede transmitirse mediante el contacto directo con una persona infectada, especialmente cuando existen prácticas deficientes de higiene personal. (Herrera & Badilla, 2019). El VHA posee un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo de 7,5 kilo bases (kb). El genoma del VHA está envuelto por una cápside icosaédrica, formada por hasta 60 copias de tres proteínas de superficie, VP1, VP2 y VP3 (denominadas como 1D, 1B y 1C), transcritas en un marco de lectura abierto (ORF) (Griffin *et al.*, 2014). El ORF único de 2 217 a 2280 aminoácidos de los VHA se divide en tres secciones denominadas P1, P2 y P3. La región P1 contiene los polipéptidos de la cápside VP1 a VP4, mientras que las regiones P2 y P3 contienen los polipéptidos no estructurales (Baert *et al.*, 2009). Flanqueando el genoma del VHA hay regiones reguladoras 5' y 3'UTRs con una pequeña cola de poli A 17. Los sitios de neutralización inmunogénica del VHA se localizan en las proteínas estructurales de superficie (Hardy *et al.*, 1996). Los primates son los únicos huéspedes naturales del VHA y la infección les confiere una protección de por vida (Hoa *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2012). Tras la ingestión, absorción en el tracto gastrointestinal y replicación en el hígado, el VHA se excreta en la bilis en altas concentraciones de partículas virales que pueden encontrarse en muestras de heces. En la figura 3 se muestra el árbol filogenético del virus de la Hepatitis A utilizando secuencias completas (Costa-Mattioli *et al.*, 2003).

La transmisión del VHA se produce por vía oral fecal a través del contacto directo con una persona infectada por el VHA o por el consumo de alimentos o agua contaminados por el VHA. La mediana del periodo de latencia (es decir, el tiempo transcurrido desde la exposición hasta la aparición de los síntomas) es de 28 días (rango de 15 a 50 días) (Hoa *et al.*, 2013). La infección alcanza su máximo 2 semanas antes de la aparición de la ictericia y disminuye 1 semana después de la aparición. En personas sin ictericia, los niveles séricos elevados de alanina aminotransferasa [ALT] pueden conducir a una infectividad máxima. La viremia puede detectarse antes de que aumenten los niveles de ALT, y los niveles de ARN del VHA suelen seguir siendo detectables incluso después de que los niveles de ALT se normalicen y los síntomas desaparezcan (Kim *et al.*, 2005). La hepatitis A comienza con síntomas como fiebre, pérdida de apetito, náuseas, vómitos, diarrea, dolores musculares y fatiga. Al principio puede haber ictericia, orina oscura o heces claras, o pueden aparecer síntomas sistémicos al cabo de unos días. Si los hallazgos físicos incluyen sensibilidad abdominal, hepatomegalia o esplenomegalia (Cooke *et al.*, 2019).

En la mayoría de los casos, la hepatitis A dura varias semanas. La Hepatitis A es una infección

hepática que es generada por el virus de la Hepatitis A (VHA). Se disemina generalmente cuando una persona no infectada consume alimentos o agua contaminados con heces de una persona infectada con este virus. Esta enfermedad está relacionada con la falta de acceso a agua potable, un saneamiento deficiente y una mala higiene personal. La recurrencia de los síntomas con nuevos aumentos de los niveles séricos de aminotransferasa se produce en el 10% de los casos y las recaídas pueden durar hasta 6 meses. La mortalidad por cualquier causa es del 0,3%, frente al 1,8% entre las personas de alrededor de 50 años. Las personas con enfermedad hepática crónica subyacente tienen un mayor riesgo de muerte (Kong *et al.*, 2015). La contaminación de los alimentos por el VHA puede producirse en cualquier fase del cultivo, la cosecha, la transformación, la distribución o la preparación. Las infecciones transmitidas por los alimentos pueden ser difíciles de detectar a partir de los datos de vigilancia rutinaria porque los pacientes pueden tener dificultades para recordar su historial dietético entre 2 y 6 semanas antes de la enfermedad (Green *et al.*, 2000; Hoa *et al.*, 2013). Los casos pueden acumularse gradualmente o no ser notificados, un alimento puede estar contaminado focalmente (Kim *et al.*, 2005), algunas personas expuestas pueden tener una infección por VHA no reconocida, (Aguilera Guirao *et al.*, 2006), algunas personas expuestas pueden tener inmunidad preexistente por una infección o vacunación previa, las personas que adquieren la infección a través de alimentos contaminados no son reconocidas en medio de una alta incidencia en curso en la comunidad, y los casos están geográficamente dispersos en varias jurisdicciones de salud pública (Liu *et al.*, 2010).

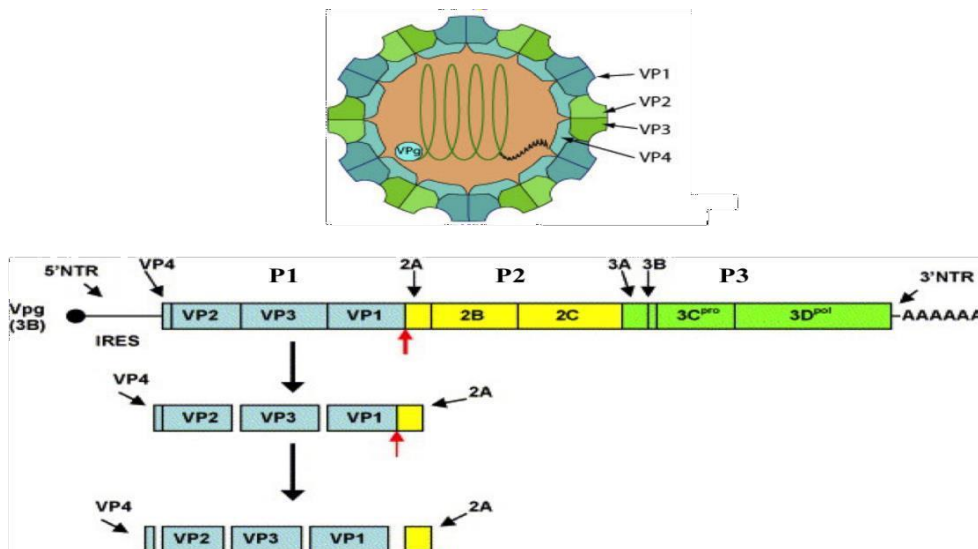


**Figura N° 3. Análisis del árbol filogenético del HAV utilizando secuencias completas.**

Los números en cada nodo muestran los porcentajes de bootstrap obtenidos después de 1000 réplicas. Se muestran las filogenias de la proteína VP1 (C), la proteína VP2 (A), la proteína VP3 (B) y la filogenia P1 [VP2 VP3 VP1] (D). La cepa 9F94 está indicada por una flecha y las dos cepas parentales hipotéticas están subrayadas (Costa-Mattioli *et al.*, 2003).

El VHA es un virus esférico no envuelto de aproximadamente 27 nm de diámetro. El material genético del virus está conformado por una molécula de ARN de cadena sencilla, lineal y de sentido positivo, que tiene aproximadamente 7,5 kilobases de longitud. En los extremos 5' y 3' de esta molécula de ARN se encuentran regiones no codificantes. La región 5'-NCR contiene una señal de poliadenilación y una entrada ribosomal interna (IRES) que guía la síntesis de la poliproteína. En la figura 4 se representa la estructura del virión del virus de la Hepatitis A y cómo se organiza su material genético (Cristina *et al.*, 2007).

La principal forma de transmisión del virus es a través de la ruta fecal-oral, que surge cuando se ingiere agua o alimentos que están contaminados con heces de personas portadoras del virus. La contaminación puede ocurrir por manos sucias o por agua y suministros de alimentos tratados de manera inadecuada (Cohen *et al.*, 2002).



**Figura Nº 4. Esquema que representa la estructura del virión de HAV y cómo se organiza su material genético.**

Se destaca con una flecha roja el primer sitio de corte de la poliproteína P0 durante su procesamiento, lo que resulta en la formación del complejo macromolecular replicativo 2B-3D y las proteínas estructurales que forman la cápside del virus (Cristina *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que el VHA se une a una amplia gama de células animales cultivadas, incluidas las no permisivas. Aunque no se conocen los determinantes virales implicados en la adhesión celular del VHA, se ha observado que los viriones maduros se adhieren relativamente rápido y de forma dependiente del calcio, pero se da liberación del ARN vírico en el citoplasma unas 4 horas después de la infección. Un candidato a receptor celular (HAVcr1), una glicoproteína de membrana integral de clase 1 de 451 aminoácidos, se identificó por primera vez en células AGMK mediante una estrategia de clonación de expresión y un anticuerpo monoclonal que bloqueaba la unión del VHA a la superficie celular (Bishop *et al.*, 1993).

La tabla 2 destaca agentes biológicos infecciosos causante de enfermedades transmitidas por alimentos donde se incluye las principales matrices alimentarias, sintomatología en el huésped y su periodo de incubación.

**Tabla No. 2. Agentes biológicos infecciosos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos.**

ETA	Patógeno	Principales alimentos	Síntomas	Periodo de incubación
Listeriosis	<i>Listeria monocytogenes</i>	Alimentos refrigerados listos, para consumir (carne de res, pollo, pescados, mariscos, lácteos, leche sin pasteurizar y productos lácteos o alimentos elaborados con leche sin pasteurizar).	Fiebre, dolor de cabeza, cansancio, dolores musculares, náuseas, vómitos, diarrea, meningitis y abortos espontáneos.	Pueden surgir entre 9 horas y 6 semanas después de ingerir comida contaminada.
Salmonelosis	<i>Salmonella enteritidis</i>	Huevos crudos o que no estén bien cocidos, carne de res, pollo, pescados y mariscos crudos, leche cruda, productos lácteos y productos frescos.	Diarrea, fiebre, vómitos, dolor de cabeza, náuseas y calambres estomacales información que debe conocer los síntomas pueden ser más graves en grupos en riesgos como por ejemplo las mujeres embarazadas.	12 a 72 horas después de consumir comida contaminada,
Síndrome urémico hemolítico infección por <i>e coli</i> causa común de la diarrea del viajero colitis hemorrágica o infección por <i>e. coli o157:h7</i> .	<i>Escherichia coli</i> patógena	Carne de res, hamburguesas que no estén bien cocidas o crudas, productos frescos no cocidos, leche cruda, jugos sin pasteurizar y agua contaminada.	Calambres estomacales agudos, diarrea con sangre y náuseas. También puede manifestarse como una diarrea sin sangre o ser asintomática puede provocar daños permanentes en los riñones los cuales pueden producir la muerte en niños pequeños.	Entre 1-10 días tras consumir comida contaminada, con un promedio de 3-4 días.
Gastroenteritis viral	Norovirus virus del tipo norwalk.	Ostras/mariscos crudos, ensalada de repollo, ensalada, productos horneados, glaseados, agua contaminada y hielo también puede transmitirse de persona a persona.	Diarrea náuseas vómitos calambres estomacales dolor de cabeza y fiebre.	Entre 12-48 horas, con posible inicio más rápido a las 12 horas tras la exposición.
Hepatitis	Virus Hepatitis A	Frutas y verduras crudas, agua potable contaminada, alimentos sin cocer o alimentos cocidos que no son recalentados luego de haber estado en contacto con una persona infectada que los manipuló.	Diarrea, orina oscura, ictericia y síntomas similares a los de la gripe por ejemplo fiebre, dolor de cabeza, náuseas y dolores abdominales.	28 días en promedio de 15 a 50 días.

### **1.3. Técnicas de detección de microorganismos en alimentos.**

La detección de microorganismos en alimentos involucra una variedad de enfoques, incluyendo métodos tradicionales y bioquímicos, así como métodos moleculares. El recuento en placa y las pruebas bioquímicas, se fundamentan en el desarrollo y la caracterización de los microorganismos en medios de cultivo específicos. Estos métodos han sido ampliamente utilizados debido a su simplicidad y costo relativamente bajo. Por otro lado, los métodos moleculares, como la PCR y la secuenciación de ADN, permiten amplificar y analizar secuencias genéticas específicas, lo que facilita la detección precisa y la identificación de microorganismos patógenos, incluso en cantidades mínimas. La combinación de estas diferentes técnicas ofrece enfoques complementarios para garantizar la seguridad alimentaria y la calidad microbiológica de los alimentos.

#### **1.3.1. Conteo en placa y número más probable (NMP)**

El método del recuento en placa es una técnica tradicional ampliamente utilizada en microbiología de alimentos para determinar la cantidad de microorganismos viables en una muestra (Arcos Guamán, 2022). Este método se basa en diluir la muestra y sembrarla en placas de cultivo con un medio adecuado. Después de un período de incubación, se cuentan y expresan en unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo o mililitro, según corresponda a la muestra. Este método es fundamental para evaluar la inocuidad y calidad microbiológica de los alimentos. El recuento en placa se lleva a cabo mediante diluciones seriadas 1:10 y se extiende 100 µl de cada dilución en una placa. Las placas se incuban hasta que las colonias son visibles y se pueden contar. Aunque este método tiene un límite de detección confiable, requiere tiempo durante el proceso de incubación. Los medios utilizados contienen componentes selectivos y diferenciales que permiten el crecimiento de microorganismos específicos y proporcionan características distintivas para su identificación. Por ejemplo, pueden incluir indicadores de pH, sustratos cromogénicos o inhibidores selectivos para detectar y distinguir diferentes especies bacterianas. La combinación del conteo en placa con la identificación mediante medios específicos proporciona información valiosa sobre la cantidad y la identidad de los microorganismos existentes en una muestra, lo que contribuye a evaluar la calidad microbiológica de los alimentos y a tomar medidas adecuadas de control y prevención (Morales *et al.*, 2012).

El método NMP consta en inocular una muestra de agua diluida en tubos que contienen un medio líquido selectivo y tiene como objetivo determinar si está contaminada con bacterias. Para evitar la contaminación externa, es importante que la muestra se envíe en una funda o botella estéril con cierre hermético. Se utilizan como "microorganismos indicadores" son aquellos que, por su presencia o ausencia, indican la posible contaminación del agua con patógenos o agentes perjudiciales para la salud humana. Su constancia en los alimentos puede ser provocada a un procesamiento insuficiente, contaminación de alimentos ya preparados o crecimiento de alimentos. Los coliformes fecales y *E. coli* también llegan a indicar contaminación fecal, aunque también pueden vivir en ambientes no intestinales, incluidas las instalaciones industriales.

El fundamento de esta técnica consiste en el análisis estadístico y la observación del crecimiento de microorganismos en diluciones variadas de una muestra. Esta técnica se emplea para estimar la concentración de microorganismos existentes en una muestra, siendo particularmente útil en la evaluación de microorganismos indicadores en alimentos y agua (Sutton, 2010).

### **1.3.2. Identificación bioquímica y fenotipado**

El fenotipado bacteriano tradicional se basa en las características observables de las bacterias, como su forma, desarrollo, propiedades bioquímicas y metabólicas. El cultivo sigue siendo el método diagnóstico preferido cuando es posible, ya que permite el aislamiento, la identificación y el estudio de la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos del microorganismo relevante, además de facilitar el uso de marcadores epidemiológicos. Es crucial elegir el sustrato de cultivo y las condiciones de incubación adecuadas para lograr un cultivo exitoso (Isenberg, 2004).

Las pruebas bioquímicas desarrollan un rol significativo en la identificación y distinción de organismos, ya que permiten detectar las características bioquímicas particulares que los hacen únicos. Además de su función en la identificación, estas pruebas también ofrecen detalles sobre el metabolismo, la presencia de enzimas específicas y cómo los organismos responden a diferentes sustratos o condiciones (Fernandez, Garcia, Saez, & Valdezate, 2010).

### 1.3.3. Tinción de Gram

La tinción es un método alternativo ejecutado en microscopía para optimizar el contraste de lo visto bajo el microscopio. El método de tinción más comúnmente utilizado en bacteriología permite clasificar las bacterias en dos grandes grupos taxonómicos según su comportamiento de tinción: grampositivas y gramnegativas. Se piensa que la disparidad de entre ambos grupos de bacterias es a causa de la estructura química distinta de sus paredes celulares (Becerra *et al.*, 2016).

Las bacterias grampositivas poseen una capa gruesa de mureína o peptidoglicano en su pared celular, con un espesor de 20 a 80 nm. En su contraparte, las bacterias gramnegativas presentan una capa más delgada de peptidoglicano (2 nm) y una capa exterior compuesta por lipopolisacáridos, lipoproteínas y proteínas de membrana, en la figura 5 y 6 se representa el esquema general detallando las principales características de la estructura que conforman las paredes celulares de las bacterias Gram positiva y Gram negativa (Pascual, 2005).

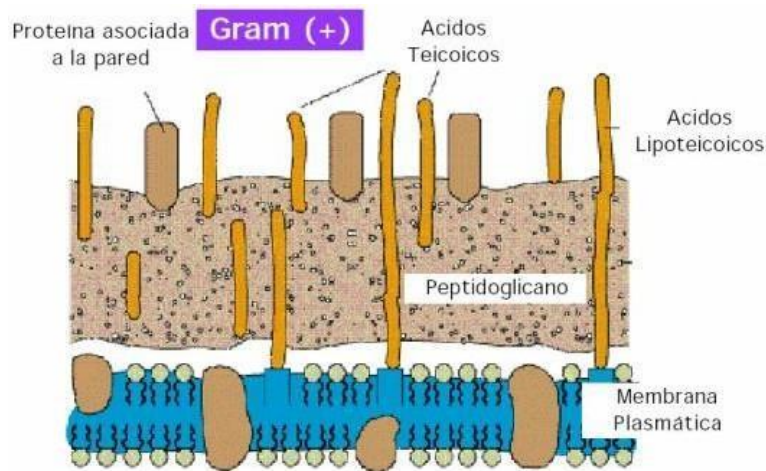
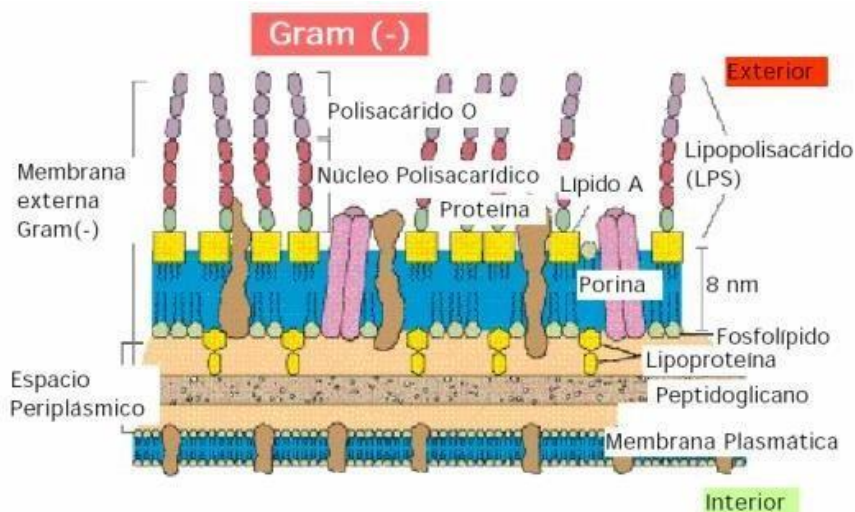


Figura No 5. Esquema general de la pared celular de las bacterias Gram positiva (Rohde, 2019).



**Figura No 6. Esquema general de la pared celular de las bacterias Gram negativa (Rohde, 2019).**

Las bacterias Gram-positivas son aquellas que aparecen de color azul oscuro o púrpura en la tinción de Gram. Esta propiedad química está estrechamente relacionada con la forma de la envoltura celular es más grueso y absorbe el color (Pascual, 2005).

Las bacterias Gram-negativas son de color rojizo pálido cuando se las mira con un microscopio óptico después de la tinción de Gram. Esto se debe a que la estructura de su pared celular no puede mantener el color violeta cristalino, por lo que solo se tiñe con la contratinción de safranina (Bush, 2020).

#### **1.3.4. Pruebas bioquímicas para patógenos de alimentos**

Las pruebas bioquímicas son procedimientos de laboratorio que se utilizan para evaluar y analizar diversas sustancias químicas presentes en muestras biológicas, como sangre, orina, tejidos u otros fluidos corporales. La prueba bioquímica para el aislamiento de *S. enterica* es la prueba de triple azúcar de hierro (TSI) y la prueba de agar verde brillante fenol rojo lactosa sacarosa (BPLS) (Marin Mendez *et al.*, 2020).

La prueba de triple azúcar de hierro se basa en la capacidad de las bacterias para fermentar los azúcares glucosa, lactosa y sacarosa, así como su capacidad para producir sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) y gas. El medio de TSI es un agar con una composición específica que contiene glucosa, lactosa, sacarosa, así como hierro y un indicador de pH (fenol rojo). Cuando se inocula con una muestra bacteriana, se observan diferentes resultados según las características metabólicas de la bacteria.

En el caso del aislamiento de *L. monocytogenes*, se usa el caldo Fraser con suplementos Fraser como medio de enriquecimiento.

Para el *Staphylococcus* se utiliza la prueba de manitol y este se basa en la capacidad de las bacterias para fermentar el manitol, un tipo de azúcar. El medio de agar de manitol contiene manitol como fuente de carbono, además de un indicador de pH, generalmente rojo de fenol. Cuando se inocula con una muestra bacteriana, se observan diferentes resultados según la capacidad de la bacteria para fermentar el manitol.

### **1.3.5. Tinción con azul de metileno**

Es un método simple en el que todos los microorganismos adquieren el mismo color. Esta técnica se basa en la afinidad de carga con los componentes de la superficie celular, lo que proporciona información sobre el tamaño, forma y agregación de los microorganismos. Es un método rápido, directo y positivo.

El azul de metileno es una sustancia que se muestra en forma de cristales o polvo cristalino y tiene una coloración verde oscuro con un brillo bronceado. Es estable e inodoro en el aire. Sus soluciones en alcohol o agua son de color azul intenso.

Cuando las células vivas se exponen al azul de metileno, este penetra en las células y provoca el blanqueamiento de las enzimas presentes en las células vivas. Las células muertas, donde las enzimas están inactivas, no experimentan este blanqueamiento y, por lo tanto, permanecen azules. La proporción de células no teñidas es entonces una medida de viabilidad (Ramírez *et al.*, 2020).

### **1.3.6. Sistemas de identificación bioquímicas**

El sistema API (Analytical Profile Index) es una herramienta de identificación bioquímica ampliamente utilizada en microbiología clínica y microbiología de alimentos. Se basa en un conjunto de pruebas bioquímicas en las que se analizan las respuestas metabólicas de los microorganismos para determinar su identidad.

El sistema API utiliza tiras de plástico o cartuchos que contienen medios de cultivo y reactivos específicos para diferentes pruebas bioquímicas. Estas pruebas incluyen la utilización de diferentes

sustratos, como carbohidratos, aminoácidos y otros compuestos, para evaluar la capacidad del microorganismo para fermentar o utilizar estos sustratos. Además, se pueden realizar pruebas para corroborar la existencia de enzimas específicas y la producción de ciertos productos metabólicos.

Cada prueba bioquímica proporciona un resultado positivo o negativo, y se recopila un conjunto de resultados para generar un perfil bioquímico único para cada organismo. Este perfil se iguala con una base de datos de perfiles conocidos para identificar el microorganismo.

El sistema API es apreciado por su simplicidad y capacidad para identificar una amplia variedad de bacterias y levaduras. Sin embargo, su uso puede requerir experiencia y conocimientos técnicos para interpretar correctamente los resultados.

### **1.3.7. Sistema de identificación biolog OmniLog**

El sistema OmniLog® es un método automatizado y versátil utilizado en microbiología. Se adapta a diferentes flujos de trabajo y condiciones específicas, garantizando una identificación precisa de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. El sistema OmniLog Plus amplía sus capacidades para incluir bacterias anaerobias, levaduras y hongos filamentosos. Ambos sistemas permiten el almacenamiento de resultados, creación de bases de datos personalizadas y seguimiento de características y tasas de aislamiento de organismos específicos. Su software, incluyendo el módulo RetroSpect™, facilita el análisis y seguimiento de los organismos (Brouqui et al., 2006).

El sistema MicroStation™ de Biologi es una herramienta versátil utilizada en microbiología para identificar y caracterizar organismos. Con bases de datos extensas, puede identificar más de 2.650 especies de bacterias, levaduras y hongos, en algunas bacterias en solo dos horas. El procedimiento implica la preparación de una suspensión celular y su inoculación en una microplaca. Después de la incubación, el lector MicroStation analiza el patrón metabólico único generado por el organismo y lo compara con perfiles en la base de datos para su identificación. La química rédox patentada de Biologi permite una amplia gama de pruebas bioquímicas (Silveracei, 2018).

Para entornos de menor volumen o con restricciones presupuestarias, el sistema portátil Biologi ofrece detección básica de bacterias aeróbicas Gram-negativas y Gram-positivas. Los resultados de

la microplaca se lee visualmente y se ingresan en el software MicroLog para su análisis e identificación. El sistema incluye un medidor de turbidez, el software MicroLog y un manual de usuario electrónico (Yanagihara et al., 2010).

La tecnología de reducción química GEN III se puede emplear en una amplia variedad de bacterias, tanto Gram negativas como Gram positivas, de una manera sin precedentes. GEN III descompone y analiza la capacidad de una célula para metabolizar diferentes tipos de productos bioquímicos, y también permite catalogar otras propiedades fisiológicas importantes, como el pH, la tolerancia a la sal y al ácido láctico, la capacidad reductora y la sensibilidad química.

#### **1.4. Identificación molecular**

La identificación molecular es una técnica utilizada en microbiología y genética para determinar la identidad de un organismo mediante el estudio de su material genético, como el ADN o el ARN. Se referencia en la comparación de las cadenas de nucleótidos específicas en el material genético de interés con bases de datos de referencia, lo que permite identificar el organismo de manera precisa. Existen diversos métodos para llevar a cabo la identificación molecular, como la secuenciación del ADN, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la hibridación de ácidos nucleicos y la electroforesis en gel. Estas técnicas permiten detectar y analizar secuencias genéticas específicas que son características de determinados organismos, lo que facilita la identificación precisa de los mismos. La identificación molecular presenta ventajas significativas, como su alta sensibilidad y especificidad, su capacidad para identificar organismos en cantidades mínimas, y su capacidad para identificar especies microbianas que no pueden ser cultivadas utilizando métodos tradicionales. (Rodicio & Mendoza, 2004).

La discrepancia entre las particularidades observadas, fenotípicas y/o morfológicas del aislado en prueba y las cepas de referencia hace que los métodos fenotípicos proporcionen identificaciones probables en lugar de definitivas. Para superar los desafíos inherentes a los sistemas de identificación fenotípica, se han desarrollado métodos genotípicos como alternativas adicionales. No todas las cepas de la misma especie exhiben características distintivas, lo que puede resultar en resultados diferentes en pruebas repetidas. Además, las limitaciones de las bases de datos bacterianas correspondientes también justifican la necesidad de utilizar métodos genotípicos en la identificación bacteriana. A

continuación, se describen los genes más usados para la identificación de microorganismos en alimentos.

#### **1.4.1. ARNr 16S (RRS)**

El ARNr 16S, también conocido como ADN ribosomal 16S (ADN 16S), es un polirribonucleótido codificado por el gen *rrs* que se localiza en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. Este ARNr es un componente esencial y omnipresente en la función celular, y actúa como un "temporizador molecular" debido a su alto grado de conservación. Aunque el ARNr 16S es objeto de ciertos agentes antimicrobianos que inducen mutaciones y llevan a la resistencia fenotípica, su uso en el reconocimiento bacteriano o en la resolución del género y la especie no es un proceso trivial. La secuencia del gen *rRNA16S* tiene aproximadamente 1500 pares de bases, lo cual proporciona suficiente polimorfismo específico para distinguir y realizar análisis estadísticos válidos (Clarridge, 2004).

#### **1.4.2. 16S-23S ARNr**

La región 16S-23S rRNA es un espacio intergénico (ITS). Estos ITS están presentes en números variables según el número de operones de ARNr o alelos *rrs*. Esta alta diversidad, debido a las diferencias en el número, tamaño y composición de los ITS 16S-23S rRNA observados en los ITS en diferentes géneros, diferentes especies, diferentes cepas y dentro de una misma cepa, es la base para su uso en identificación, filogenia (Gürtler, 1996).

#### **1.4.3. ARNr 23S**

Es también una región ribosomal. La secuenciación de esta región puede ser una buena opción en casos donde una fracción de 16s no da resultados definitivos. El aumento de los costos y algunas dificultades técnicas para amplificar fragmentos más grandes pueden limitar su uso, aunque actualmente se utiliza como un procedimiento auxiliar útil para fines filogenéticos y taxonómicos (Hunt et al., 2006).

#### **1.4.4. RpoB (Subunidad $\beta$ de la ARN Polimerasa)**

La ARN polimerasa (RNAP) es una enzima importante en el proceso de transcripción y constituye el objetivo final de varias vías que regulan la expresión génica en los organismos vivos. Debido a la distribución general de bacterias, propuso su uso como un temporizador molecular eficiente. El uso de este marcador ofrece algunas ventajas sobre los marcadores moleculares anteriores, entre ellas, las secuencias de rpoB suelen ser de gran calidad que el 16S rRNA porque son secuencias adquiridas recientemente; Otro factor importante y favorable es que la similitud de secuencia de rpoB tiene una mayor correlación con el criterio de inclusión en la misma especie de hibridación (Karah et al., 2011).

#### **1.4.5. GyrB (Subunidad $\beta$ del ADN Girasa)**

El gen gyrB codifica la subunidad  $\beta$  de la ADN girasa o topoisomerasa II, una enzima que desempeña un rol importante en la replicación del ADN bacteriano. Debido a su distribución amplia y universal, la existencia de una copia única de gyrB permite el aislamiento y reconocimiento de especies estrechamente vinculadas en géneros como *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Bacillus*, así como en bacterias entéricas, micobacterias y bacterias del ácido láctico. Este gen es un marcador valioso en la sistemática bacteriana debido a su número estimado de sustituciones sinónimas o silenciosas (Yáñez et al., 2003).

#### **1.4.6. Transcripción inversa-PCR (RT-PCR):**

Para la identificación molecular, se suspendió un grupo parcial de cada placa de TSA en 50  $\mu$ L de NaOH 20 mM y se calentó en el microondas a alta intensidad hasta que hirviera (24). La suspensión de células hervidas en el microondas se utilizó directamente como plantilla para la reacción de PCR. La secuencia de ADN correspondiente a un fragmento parcial del gen 16S ARNr (región V3 a V4) se amplificó utilizando 1,5  $\mu$ L de la plantilla de ADN preparada anteriormente, 12,5  $\mu$ L de la mezcla maestra GoTaq incolora (Promega, Madison, WI), 10  $\mu$ L de agua destilada doble, 0,5  $\mu$ L de cada cebador (341F: 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG, 806R: 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC) en una

reacción de 25  $\mu$ L (41). Se implementó un control negativo (mezcla maestra sin ADN) en cada ciclo de amplificación. Las condiciones de amplificación de PCR fueron: 95°C durante 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de 95°C durante 1 minuto, 55°C durante 2 minutos y 72°C durante 2 minutos, con una extensión final a 72°C durante 2 minutos. Los productos de PCR, después de verificar su pureza mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, se enviaron al laboratorio de servicios de MacroGenKorea para su secuenciación, y los datos de secuenciación se enviaron a BLAST (NCBI, Bethesda, MD) para obtener el identificador bacteriano.

Para la identificación molecular, se tomaron colonias parciales de cada placa de agar TSA y se suspendieron en una solución de NaOH. Luego, se sometió la suspensión de células hervidas en el microondas a una reacción de PCR. Se amplificó una secuencia de ADN correspondiente a una parte del gen 16S ARNr utilizando cebadores específicos. Se incluyó un control negativo en cada ciclo de amplificación. Los productos de PCR se verificaron por su pureza y se enviaron a un laboratorio de servicios externo para su secuenciación. Los datos de secuenciación se analizaron utilizando la herramienta BLAST para obtener la identificación bacteriana correspondiente.

#### **1.4.7. RT PCR y Heminested**

La PCR tradicional ha experimentado mejoras con la inclusión de la PCR de segunda generación, conocida como PCR en tiempo real, que ha superado muchas de las limitaciones prácticas asociadas con la PCR convencional basada en gel y ha revolucionado el diagnóstico de patógenos. Esta técnica sumamente sensible permite la amplificación y cuantificación simultánea de cadenas específicas de ácidos nucleicos utilizando reporteros fluorescentes en la reacción.

Cuando se combina con sistemas de PCR/RT-PCR en tiempo real, la RT-PCR en tiempo real multiplexada permite un diagnóstico rápido en comparación con las técnicas multiplex basadas en la PCR convencional. Las principales ventajas de este método incluyen su amplio rango de detección, lo que permite descubrir incluso un bajo número de copias de muestra (menos de cinco copias), lo que facilita el análisis de muestras muy pequeñas. Además, requiere 1,000 veces menos ARN que la PCR convencional. También es capaz de medir datos en tiempo real en el transcurso la fase de desarrollo exponencial, a diferencia de un ensayo convencional que mide durante la fase de meseta. La emisión de fluorescencia del fluoróforo utilizado es directamente proporcional a la cantidad de producto

amplificado, lo que elimina la necesidad de procesamiento adicional en la prueba (Valasek et al., 2005), este método tiene una ejecución más rápida y reduce el riesgo de contaminación cruzada. La propagación de la reacción de amplificación PCR se realiza a través de un sistema fluorométrico que utiliza fluoróforos.

Actualmente, la RT-PCR en tiempo real es el método más comúnmente utilizado para el diagnóstico de NoV. Es una técnica altamente sensible y específica que, permite la cuantificación del ácido nucleico presente en las muestras. Además, se ha desarrollado recientemente un ensayo de RT-PCR en tiempo real multiplex que permite la detección simultánea de varios patógenos virales, incluido el NoV, y ha demostrado ser sensible y específico. (Khamrin et al., 2011). Sin embargo, ajustar las condiciones para diferentes pares de cebadores en el mismo protocolo de amplificación, así como la cantidad relativa de ácidos nucleicos de cada patógeno en las muestras clínicas, puede disminuir la sensibilidad de la técnica.

El heminested RT- PCR es una variante de la RT- PCR anidada en la cual se utiliza el mismo cebador en ambas rondas de amplificación (tres cebadores en total). Esta técnica es altamente sensible en comparación con la RT- PCR anidada, pero la posibilidad de contaminación cruzada sigue siendo una limitación significativa.

La RT- PCR semianidada también es altamente sensible en comparación con la PCR anidada, pero la presencia de contaminación cruzada sigue siendo un inconveniente importante (Zhang et al., 2010).

El creciente requerimiento de alimentos listos para el consumo (RTE) ha generado un aumento considerable en la producción a gran escala y en la oferta de una amplia variedad de productos frescos. Este crecimiento del mercado está impulsado principalmente por la creciente demanda de los consumidores de alimentos frescos, saludables, convenientes y sin aditivos (Chen & Chang, 2021).

En Ecuador, la demanda de alimentos listos para comer, así como aquellos que son preparados artesanalmente en la calle es muy alta en las principales ciudades de nuestro país por nuestra población. Sin embargo, los vendedores ambulantes, que muchas veces operan sin permiso legal, no necesariamente cumplen con las normas y regulaciones de inocuidad. De hecho, el escaso conocimiento y prácticas de higiene alimentaria de los vendedores ambulantes de alimentos comprometen la inocuidad alimentaria.

En Guayaquil, Quito y Cuenca, el encebollado, los ceviches, los bolones, la ensalada de frutas y el jugo de frutas suelen consumirse en lugares conocidos como las "huecas", donde en la mayoría de los casos no se cumplen las condiciones higiénicas y sanitarias.

Los citados productos preparados en la calle son más propensos a la proliferación microbiana y la contaminación cruzada porque es menos probable que los ingredientes se almacenen adecuadamente y se utilizan utensilios relativamente sucios. Los vendedores ambulantes de comestibles suelen tener los artículos a temperatura ambiente hasta que el cliente los pide.

#### **1.4.8. Calidad microbiológica global de los alimentos ecuatorianos**

En Ecuador, un país agrícola en vías de desarrollo de Sudamérica, la concienciación, las prácticas y las normativas en materia de inocuidad alimentaria han estado tradicionalmente rezagadas en comparación con la mayoría de los países desarrollados y algunos otros países en proceso de desarrollo. Esta situación plantea desafíos significativos en términos de garantizar la seguridad alimentaria y proteger la salud pública de la población. En medio de una nueva conciencia nacional sobre la importancia de la seguridad alimentaria como un componente crítico de la salud pública, es fundamental impulsar el desarrollo y la implementación de prácticas y reglamentos de inocuidad alimentaria basados en la ciencia en Ecuador. Para lograr esto de manera efectiva, es necesario contar con datos de referencia sólidos para el análisis microbiológico de los alimentos. La calidad de los alimentos en Ecuador se ve directamente afectada por la falta de concienciación, prácticas y normativas sólidas en materia de inocuidad alimentaria. Mejorar la infraestructura, la capacitación del personal, la implementación de sistemas de monitoreo y control, así como el fortalecimiento de la legislación en este ámbito son aspectos clave para elevar los estándares de seguridad alimentaria en el país. Es fundamental promover la investigación, la colaboración interinstitucional y el intercambio de conocimientos a nivel nacional e internacional para fortalecer las capacidades en inocuidad alimentaria en Ecuador y garantizar la protección de la salud pública a través de la mejora de la calidad de los alimentos disponibles para la población (Bruno Salabarría & Fuentes Bedoya, 2021).

## CAPÍTULO 2 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

### 2.1. Introducción

A nivel mundial se estima que anualmente, 600 millones de individuos en todo el planeta se enferman debido al consumo de alimentos contaminados, lo cual representa casi el 10% de la población mundial. Además se estima que 420,000 personas pierden la vida por esta misma razón y esto registra una pérdida de productividad y gastos médicos de alrededor de US\$ 110,000 millones (OMS, 2020).

En el Ecuador, el consumo de alimentos preparados de manera artesanal en lugares de expendio es una práctica muy común y demandada en las principales ciudades del país. Sin embargo, es importante destacar que muchos de estos vendedores ambulantes operan sin contar con los permisos legales y sin estar sujetos a las regulaciones y controles establecidos para garantizar la inocuidad alimentaria. Esta situación plantea un desafío en términos de inocuidad alimentaria y seguridad para los consumidores. Debido al escaso conocimiento y las malas prácticas en inocuidad alimentaria por parte de estos vendedores ambulantes, existe una probabilidad de riesgo significativa de que los consumidores se infecten o enfermen debido a la existencia de patógenos en los alimentos que se venden.

Los vendedores ambulantes, al no estar restringidos por las regulaciones y controles oficiales, pueden no seguir las normas básicas de manejo de alimentos, como el correcto lavado de manos, el uso de utensilios limpios, el almacenamiento adecuado de alimentos y el control de la temperatura. Esto aumenta el riesgo de contaminación bacteriana, viral u otros patógenos en los alimentos preparados y vendidos en la vía pública.

La falta de capacitación y supervisión adecuada de los vendedores ambulantes también contribuye a esta problemática. Muchos de ellos pueden no estar al tanto de las correctas normas de higiene alimentaria, desconociendo la importancia de mantener los alimentos en condiciones seguras y de evitar la proliferación de bacterias y diferentes microorganismos dañinos. Esta situación representa un desafío para las autoridades de salud y los organismos encargados de regular y controlar la seguridad alimentaria en el país. Se requiere una mayor atención y supervisión en el control de los vendedores

ambulantes, así como programas de capacitación y concientización sobre buenas prácticas de higiene alimentaria. Esto no solo protegería la salud de los consumidores, aunque también ayudaría a mejorar la reputación y calidad de los alimentos vendidos en la vía pública.

## **2.2. Justificación**

En países como Ecuador, no se lleva un registro exacto de casos de ETA, pero se estima que este número es muy alto. En el 2019, se estimaron 19487 enfermedades transmitidas por alimentos y agua (Ministerio de Salud Pública, 2021) El efecto de las ETAs también se traduce en pérdidas económicas y disminución de la calidad de vida de las personas. En nuestro país, a estas cifras se suman las cifras por la no venta de alimentos ambulantes a los visitantes extranjeros, quienes se sabe que prefieren consumir alimentos y bebidas industrializadas o traer sus propias bebidas en lugar de comprar los que se producen en nuestro medio.

La identificación de los principales microorganismos causantes de las ETAs es el primer paso para el control de ETAs y al fortalecimiento de la salud de la población. Al identificar los microorganismos patógenos en alimentos de consumo masivo del Ecuador, será posible desarrollar a futuro mecanismos de prevención dirigido a los productores de alimentos, comedores, restaurantes y hogares en general con la finalidad de mejorar su calidad de vida, reducir el número de ETAS, reducir los costos en medicinas y el número de hospitalizaciones por individuo.

## **2.3. Objetivo general**

Contribuir al mejoramiento de la inocuidad alimentaria en el Ecuador mediante la caracterización e identificación de patógenos asociados a los principales tipos de alimentos.

### **2.3.1. Objetivo específico 1**

Identificar bacterias patógenas presentes en alimentos de consumo masivo disponibles en mercados de las ciudades de Guayaquil, Quito y Cuenca.

### **2.3.2. Objetivo específico 2**

Determinar la presencia de Norovirus y Hepatitis A en alimentos de consumo masivo en la ciudad de Guayaquil.

### **2.4. Hipótesis**

La hipótesis de esta investigación es que los alimentos disponibles para el consumo en las ciudades de Quito, Guayaquil y Cuenca contienen bacterias y virus que tienen el potencial de causar enfermedades a los seres humanos. Para probar esta hipótesis, se requeriría llevar a cabo un estudio descriptivo que involucre la recolección y análisis de muestras de alimentos de diferentes proveedores y puntos de venta en estas ciudades.

La identificación y caracterización de agentes biológicos infecciosos como bacterias y virus en las matrices de alimentos evaluadas y la determinación del porcentaje de prevalencia en las mismas es de vital importancia para comprender y abordar los riesgos asociados a la salud pública en el contexto ecuatoriano. Al llevar a cabo una investigación transversal se logrará determinar qué patógenos específicos están presentes en los alimentos y cuáles son responsables de causar el mayor impacto en la población.

Estos estudios permiten evaluar la prevalencia de agentes infecciosos en diferentes productos alimenticios.

## **CAPÍTULO 3 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. Identificación de bacterias patógenas presentes en alimentos de consumo masivo disponibles en mercados de las ciudades de Guayaquil, Quito y Cuenca.**

#### **3.1.1. Selección y recolección de muestras en las ciudades de Quito, Guayaquil y Cuenca y su mantenimiento**

Se seleccionaron diez grupos de alimentos de consumo masivo los que se mencionan a continuación:

1. Pollo crudo
2. Carne picada
3. Queso sin madurar elaborado con leche pasteurizada o hervida
4. Bolón (puré de plátano verde con queso y carne de cerdo, horneado o frito)
5. Ceviche (pescado cocido con cebollas crudas, pimientos, tomates y cilantro marinado en jugo de limón),
6. Encebollado (sopa de pescado y yuca cocida con cebolla cruda y cilantro),
7. Salsas (mayonesa casera y otras salsas crudas a base de tomate y cebolla),
8. Fruta (fresas, manzanas, uvas y peras),
9. Jugo de frutas (jugo fresco de naranja, jugo casero de naranja o limonada sin tratamiento térmico)
10. Ensalada de fruta (fruta cortada variada sin tratamiento térmico).

En las tres ciudades más grandes de Ecuador: Quito, Guayaquil y Cuenca, se muestrearon aleatoriamente mercados populares que expenden alimentos al aire libre. Se tomaron 15 muestras con una cantidad de 100 gramos (tamaño de muestra individual) en cada uno de los grupos mencionados. Se utilizó un diseño de investigación transversal para este estudio el cual se fundamenta en un análisis observacional que proporciona estimaciones de la prevalencia de diferentes grupos de microorganismos con la finalidad de explorar y analizar la hipótesis de la investigación planteada conforme a la cuantificación de carga microbiana presentes en las matrices de alimentos seleccionadas en este estudio.

La selección de los grupos de alimentos y las muestras se realizó en base a la representatividad de los alimentos de consumo masivo en las tres ciudades más grandes de Ecuador, Quito, Guayaquil y Cuenca. Se tomaron en cuenta los alimentos que son comúnmente consumidos por la población, lo que permitió obtener una muestra representativa de la dieta habitual de la población en estas áreas geográficas. Este enfoque admitió obtener datos relevantes sobre la inocuidad alimentaria y la calidad de los alimentos consumidos en estas regiones.

Se tomaron 450 muestras (3 ciudades X 10 grupos de alimentos X 15 muestras) y se enviaron inmediatamente en cadena de frío al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador en Guayaquil. A su recepción en el laboratorio, los alimentos sólidos como pollo, carne molida, queso fresco, bolón y fruta se cortaron asépticamente en trozos de 2 a 5 g. Los trozos de las muestras de pollo se tomaron de las zonas con piel, como se sugiere en otro estudio (Guran *et al.*, 2017). Para las muestras que contenían una mezcla de alimentos líquidos y sólidos, como ceviche, encebollado, ensalada de frutas y salsas, se procedió a esterilizar 10 g de cada muestra del alimento. Inicialmente, se procedió al pesaje de tres muestras individuales pertenecientes al mismo grupo de alimentos y ciudad. Esto implica que se tomaron tres muestras individuales de 10 gramos para muestras sólidas y 10 mililitros para muestras líquidas, cada una del mismo grupo de alimentos y ciudad, las cuales fueron asepticadas y pesadas por separado. Luego, estas muestras individuales se colocaron en 270 ml de agua de peptona para la homogeneización y obtención de una suspensión madre. De manera similar, se emplearon 10 ml de cada muestra de jugo para la composición de cinco muestras individuales, todas provenientes de la misma ciudad. Este procedimiento resultó en un total de 150 muestras compuestas. Cada una de estas muestras de 10 ml o 10 g compuestas se transfirieron a bolsas de muestras estériles que contenían 270 ml de agua de peptona de Neogen (Lansing, MI). Seguidamente, se llevó a cabo la homogeneización de cada muestra compuesta utilizando un Stomacher 80 Biomaster (West Sussex, Reino Unido) a 265 rpm durante 1 minuto, dando lugar a la obtención de una suspensión madre. Cabe resaltar que los trozos de alimento presentes en la suspensión madre fueron mantenidos intactos para permitir la realización de una dilución en serie y posterior siembra en placas con propósitos analíticos. La recolección de muestras de alimentos fue realizada de mayo a septiembre del 2017 y la recolección de muestras para los virus fue realizada desde octubre a noviembre del 2020.

**3.1.2. Análisis de TAM (total aerobios mesófilos bacteria); TC (total coliformes); FC (fecal coliformes); EC (*E. coli*); SE (*Salmonella enterica*); LM, (*Listeria monocytogenes*) para la detección de la calidad microbiológica en las matrices alimentarias.**

**3.1.2.1. Recuento de las poblaciones indicadoras de bacterias para la detección de *E. coli*.**

Las muestras se procesaron siguiendo los protocolos descritos en la normativa local para cada tipo de análisis microbiológico (INEN, 2006). En la tabla 3 se describen las pruebas de cultivo realizadas para cada grupo de muestras. Para el recuento se utilizaron las suspensiones madre de las muestras compuestas a fin de estimar las bacterias mesófilas aerobias totales (TAM), coliformes totales (CT), coliformes fecales (CF) y *E. coli*.

Para el análisis de TAM, se alistaron diluciones seriadas decimales de cada suspensión madre y se inocularon en placas de agar para recuento (PCA; Neogen) y se incubaron a 37°C durante 24 a 48 horas. Las colonias en placas de PCA se enumeraron en placas con recuentos de hasta 300 UFC. El límite de detección fue de 1 UFC/g. TAM no fue analizado en las muestras de carne picada cruda, ya que no es un indicador requerido para este grupo de muestras (INEN, 2006).

Los niveles de CT se estimaron mediante el método del número más probable (NMP) (INEN, 2009) (anexo 3). Para ello, se tomaron alícuotas de 1 ml de cada dilución preparada anteriormente para TAM se transfirieron a tres tubos individuales con 10 ml de caldo biliar lactosado verde brillante (BGLB; Neogen) con tubos Durham en su interior y se incubaron a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 48 h (anexo 3). La dilución en los tubos que mostraban producción de gas se inoculó por muestreo en agar azul de eosina y metileno (EMB; Neogen) y se incubó a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 24 h (INEN, 2009). Los tubos con producción de gas que presentaban colonias negras, rosadas a anaranjadas en agar EMB se consideraron positivos para coliformes. Esto se debe a que el agar EMB es un medio selectivo y diferencial utilizado para el crecimiento de bacterias gramnegativas, como los coliformes. En este medio, las colonias de coliformes suelen mostrar colores característicos, como negro, rosa o anaranjado, lo que facilita su identificación y diferenciación de otras bacterias presentes en la muestra. El número de tubos positivos observados en cada dilución se cargaron en la calculadora de NMP de la Agencia de Protección del Medio Ambiente de EE.UU. (Larrea-Murrell *et al.*, 2013). Los resultados se informaron como NMP por gramo (con un límite de detección de 3 NMP/g con intervalos de confianza del 95%). Las muestras que

dieron positivas para CT se sometieron a análisis de coliformes fecales.

Para las estimaciones de NMP de CF se utilizaron alícuotas de 1 ml de la suspensión madre y de cada una de sus diluciones seriadas se suspendieron en tres tubos con 10 ml de BGLB y tres tubos con 10 ml de agua de tripton (TW) y se incubaron a  $45,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  durante 48 h. Se añadieron tres gotas del reactivo de Kovac a los tubos TW después de la incubación. Pares de tubos que muestran tanto la producción de gas en BGLB y un anillo rojo en TW tras añadir el reactivo de Kovac se consideraron considerados positivos para FC (INEN, 1990). El número de pares de tubos positivos en cada dilución se utilizó para la estimación del NMP (anexo 1) de cada muestra cómo se describe para las pruebas de CT. Las muestras que dieron positivo para FC fueron se sometieron a análisis de *E. coli*. Para la estimación del NMP de *E. coli*, los tubos de BGLB que mostraban producción de gas en agar EMB y se incubaron a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Las colonias que mostraban un distintivo brillo verde metálico se inocularon en agar citrato de Simmon (SCA; Neogen) y se incubaron a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Los tubos se consideraron positivos para *E. coli* si el agar citrato de Simmons permanecía verde (INEN, 1990). La prueba del agar citrato de Simmons es un paso inicial en la identificación de *E. coli*, y se deben realizar pruebas adicionales, como las pruebas IMVIC, para una confirmación más precisa de la presencia de *E. coli* en las muestras analizadas.

El número de tubos positivos se utilizó entonces para la estimación del NMP de *E. coli* en cada muestra, tal como se describe para las pruebas de CT.

**Tabla No 3. Grupos de alimentos muestreados en Guayaquil, Quito y Cuenca con los análisis correspondientes realizados.**

Alimentos <sup>a</sup>			Análisis realizados <sup>b</sup>					
Grupo	Tipo	Especialidad	TAM	TC	FC	E C	S E	LM
Pollo	Crudo	Común	—	—	—	—	X	—
Carne picada	Crudo	Común	—	X	X	X	X	—
Queso fresco	RTE	Ecuador	X	X	X	X	X	X
Bolón	RTE	Ecuador	X	X	X	X	X	X
Ceviche	RTE	Ecuador	X	X	X	X	X	—
Encebollado	RTE	Ecuador	X	X	X	X	X	—
Salsas	RTE	Ecuador	X	X	X	X	X	—
Frutas	Fresco	Común	X	X	X	X	—	—
Jugos de Frutas	RTE	Común	X	X	X	X	—	X
Ensalada de Frutas	RTE	Común	X	X	X	X	—	X

<sup>a</sup> Descripción del grupo de alimentos proporcionada en "Materiales y métodos". RTE, listo para comer.

<sup>b</sup> TAM, total aerobios mesófilos bacteria; TC, total coliformes; FC, fecal coliformes; EC, *E. coli*; SE, S. aislamiento entérico; LM, aislamiento de *L. monocytogenes*; —, análisis no realizado; X, análisis realizado.

### **3.1.4. Detección de *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes* en muestras de alimentos de las ciudades de Quito, Guayaquil y Cuenca en medios de cultivos.**

#### **3.1.4.1. Protocolo de detección para *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes***

El aislamiento de *Salmonella enterica* se aisló en todas las muestras de grupos de alimentos excepto en la fruta, jugo de frutas y ensalada de frutas debido al pH de la matriz alimentaria mencionada. Para el aislamiento de *S. enterica*, se suspendieron 25 g (sólidos) o 25 ml (salsas líquidas) de muestras de alimentos compuestos en 225 ml de agua salina con peptona al 3% y se incubaron a 37°C durante 24 h. A continuación, se inoculó 1 ml de la suspensión en 9 ml de caldo Rapaport (Neogen) y se incubaron a 37°C durante 24 h. El cultivo de enriquecimiento se extendió en placas de agar de hierro con triple azúcar (TSI; Neogen) el agar TSI (anexo 3) es un medio de cultivo diferencial utilizado para la identificación de bacterias entéricas, como *Salmonella*. Aunque el agar TSI se utiliza comúnmente para la identificación de bacterias entéricas, como *Salmonella*, en este caso específico, las muestras se consideraron positivas para *Salmonella* basándose en el cambio de color en las placas de BPLS, donde se volvían rojo oscuro, y no en las placas de TSI y en placas de agar verde brillante fenol rojo lactosa sacarosa (BPLS; Neogen), seguidas de incubación a 37°C durante 24 h. Las muestras se consideraron positivas para *Salmonella* si las placas de BPLS se volvían rojo oscuro y las placas de TSI se volvían rojo oscuro en la superficie y amarillas en el fondo, con o sin oscurecimiento de los medios debido a la producción de sulfuro de hidrógeno (INEN, 2006). Se identificaron las especies a través de las pruebas microbiológicas y reacciones bioquímicas y las cuales se presume corresponde a cada especie, se procedió a confirmar mediante biología molecular extrayendo su ADN y secuenciando la misma para su confirmación.

El aislamiento de *L. monocytogenes* solo se realizaron en queso fresco, bolón, jugo de frutas y ensalada de frutas, debido a que en las muestras restantes no evidenciaron crecimiento de este patógeno en el recuento de las poblaciones indicadoras. Para ello, se suspendieron 25 g (sólido) o 25

ml (líquido) de las muestras compuestas en 225 ml de caldo de enriquecimiento de *Listeria* tamponado (Neogen) y se incubaron a 37°C durante 24 h. A continuación, se transfirió 1 ml de la suspensión a 9 ml de caldo Fraser con suplementos Fraser y se incubaron a 37°C durante 24 h. (anexo 3). Los tubos presuntamente positivos con *Listeria* spp. (oscurecimiento del caldo Fraser) se extendieron en agar Oxford y se incubaron a 37°C durante 24 h. Las colonias negras con un halo translúcido o blanco se seleccionaron para la identificación de *L. monocytogenes* mediante los métodos bioquímicos y moleculares descritos en la sección siguiente (Law *et al.*, 2015).

#### **3.1.4.2. Análisis de datos**

El estudio siguió un plan de investigación observacional transversal (Souza *et al.*, 2019; Nyambura *et al.*, 2017; Odwar *et al.*, 2014). Para ello, se obtuvieron datos de 5 muestras compuestas, para cada uno de los 10 grupos de alimentos en cada ciudad, lo que arrojaron 150 muestras compuestas (5 muestras compuestas por 10 grupos de alimentos en 3 ciudades) en total. A efectos de comparación, los recuentos de NMP de TC, FC y EC se presentaron como UFC y todos los recuentos bacterianos se transformaron logarítmicamente. Para el análisis de los datos, la ciudad de muestreo y el conjunto de alimentos se consideraron variables independientes, mientras que los recuentos de TAM, TC, FC y EC fueron las variables dependientes individuales. La normalidad y la homocedasticidad de cada variable dependiente se verificaron mediante las pruebas de Levene y Kolmogorov-Smirnov, correspondientemente. Los niveles de TAM, TC, FC y EC se compararon entre ciudades y tipos de alimentos, al igual que su interacción, utilizando análisis de diferencias de dos vías (ANOVA) seguidos de pruebas post hoc de Tukey. Todas las pruebas se ejecutaron en Matlab R2020a (MathWorks, Natick, MA), y la significancia se notificó para  $P=0,05$ .

Se construyó un mapa de calor en Heatmapper.ca (Babicki *et al.*, 2016) utilizando la agrupación de vinculación completa y las correlaciones de Pearson aplicadas a los datos de prevalencia.

#### **3.1.6. Identificación bioquímica para la detección de *E. coli*, *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes* en muestras de alimentos de las ciudades de Quito, Guayaquil y Cuenca.**

Se seleccionaron al azar tres colonias de las placas PCA seleccionadas para el recuento de colonias

y todas las placas EMB, BPLS, TSI y Oxford de cada muestra compuesta independientemente del resultado de TC, FC, EC, *Salmonella* o *L. monocytogenes*- y se extendieron en agar de soja trípico (TSA) para su purificación (anexo3). Todas las colonias que dieron positivo para *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* también se purificaron en TSA. Tras incubar a 37 °C durante 24 h, se utilizó una colonia aislada de cada placa de TSA para cada método de identificación bioquímica y molecular.

La identificación bioquímica se llevó a cabo utilizando el kit Omni-Log ID (Biolog, Hayward, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las colonias de TSA se transfirieron a agar sangre (Apracom, Guayaquil, Ecuador) y se incubaron a 33°C durante 24 h. Las colonias resultantes se suspendieron en los fluidos inoculantes A y B de Biolog hasta una transmitancia final del 95% medida en el turbidímetro 3587 (Biolog). Se colocó un volumen de 100 µL de las suspensiones en cada pocillo de una microplaca GEN III (Biolog) y se incubó a 33°C durante 24 h. Los pocillos que adquirieron un color púrpura se consideraron positivos, mientras que los pocillos incoloros se notificaron como negativos. Los resultados se verificaron con los de la base de datos OmniLog Biolog para la identificación de los aislados (Bullock & Aslanzadeh, 2013).

### **3.1.7. Identificación molecular para la detección de *E. coli*, *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes* en muestras de alimentos de las ciudades de Quito, Guayaquil y Cuenca.**

Para la identificación molecular, se suspendió una colonia de cada placa de TSA en 50 µL de NaOH 20 mM y se llevó a ebullición en un microondas (Feliciello & Chinali, 1993). El lisado obtenido se usó para amplificar la región V3 a V4 de ARNr 16 S utilizando la mezcla enzimática de GoTaq Colorless (Promega, Madison, WI), que consistió en 1,5 µL de lisado, 12.5 µL de GoTaq, 10 µL de agua bidestilada, 0,5 µL de cada cebador (341F: 50-CCTACGGGNGGCWGCAG, 806R: 50-GACTACHVGGGTATCTAATCC) en una reacción final de 25 µL (Labbé *et al.*, 2007). Las condiciones de amplificación de la PCR fueron las siguientes: 95°C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de 95°C durante 1 min, 55°C durante 2 min y 72°C por 2 min, con una extensión final a 72°C durante 2 min. Los productos de la PCR fueron separados en un gel de agarosa al 2%. Las bandas que presentaron el tamaño esperado fueron extraídas, purificadas y enviadas para su secuenciación (Macrogen, Korea). Las bandas que presentaron el tamaño esperado, es decir, que

corresponden al fragmento de ADN amplificado de interés (por ejemplo, la región V3 a V4 de ARNr 16S), fueron extraídas y purificadas para su posterior secuenciación. El tamaño específico de las bandas de ADN amplificadas dependerá del fragmento de ADN que se esté amplificando en la PCR. En este caso, se amplificó la región V3 a V4 de ARNr 16S, por lo que el tamaño esperado de las bandas de ADN amplificadas corresponderá a la longitud de esa región específica del gen 16S ARNr. Las secuencias obtenidas se sometieron a BLAST (NCBI, Bethesda, MD) para la identificación bacteriana (Boratyn *et al.*, 2013).

### **3.2. Determinación de la presencia de Norovirus y Hepatitis A en alimentos de consumo masivo en la ciudad de Guayaquil.**

#### **3.2.1. Recolección de muestras para la determinación de virus en alimentos**

Las muestras se obtuvieron en el mercado mayorista de alimentos de Monte Sinaí, Guayaquil, durante octubre y noviembre de 2020. El tamaño de las muestras fue de 25 g (frutas y verduras como fresas y espinacas, salchichas) y 330 ml (agua embotellada) estos tamaños de muestra se refieren a la cantidad de alimento o agua que se utilizó en el estudio para llevar a cabo los análisis y las pruebas correspondientes. Todas las pruebas se analizaron utilizando los protocolos de ensayo específicos facilitados por el laboratorio de Biomedicina de la ESPOL con relación a la matriz correspondiente. Las muestras de matrices de alimentos como frutas y vegetales (fresas y espinacas) y alimentos procesados (agua envasada y salchicha cruda procesada) se investigaron para detectar NV GI y GII y HAV.

#### **3.2.1. Identificación de las secuencias genómicas de NV GI, NV GII y HAV**

Se obtuvieron las secuencias genómicas completas de las cepas NV GI, GII y HAV de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) descritas en la tabla 4. Estas secuencias fueron analizadas utilizando Geneious Prime® 2021.0.3. Para identificar segmentos de alrededor de 500 nucleótidos utilizados en los diagnósticos RT-PCR y los controles positivos, se llevó a cabo un alineamiento de las secuencias genéticas mediante el programa Muscle. Posteriormente, las secuencias seleccionadas se clonaron en un vector impulsado por T7 para la transcripción *in vitro*

de los controles positivos. Puede evidenciarse la información detallada de los fragmentos de genes y los cebadores en las Tablas 5 y 6.

**Tabla No 4. Descripción de las secuencias de NV GI para el análisis genético.**

<b>Número de acceso (GenBank)</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Cepa</b>
<b>FJ515294</b>	GI.2	Leuven/2003/BEL
<b>JN183159</b>	GI.9	S48/2008/Lilla
<b>JN603244</b>	GI.3	S29/2008/Lilla Edet/Sweden
<b>JQ388274</b>	GI.6	Kingston/ACT160D/2010/AU
<b>JQ911594</b>	GI	10360/2010/VNM
<b>KF039725</b>	GI.1	CHA7A009/2010/USA
<b>KF039726</b>	GI.1	/CHA6A003 20091031/2009/USA
<b>KF039727</b>	GI.1	CHA2A014/2008/USA
<b>KF039728</b>	GI.1	CHA2A014/2008/USA
<b>KF039729</b>	GI.1	CHA6A007/2010/USA
<b>KF306212</b>	GI.2	Jingzhou/2013401/CHN
<b>KF429761</b>	GI.1	8MoIII/1972/USA
<b>KF429765</b>	GI.1	8W/1968/USA
<b>KF429770</b>	GI.1	8McIII/1973/USA
<b>KF429773</b>	GI.1	8CKIIIc/1974/USA
<b>KF429774</b>	GI.1	8UIIIIf/1973/USA
<b>KF429783</b>	GI.1	8K/1979/USA
<b>KF429789</b>	GI.1	8MC/1978/USA
<b>KM246914</b>	GI.14	Nanning/2011/CHN
<b>HQ637267</b>	GI	Vancouver730/2004/CAN

**Tabla No 5. Descripción de las secuencias NV GII para el análisis genético.**

<b>Número de acceso (GenBank)</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Cepa</b>
AB447433	GII.4	Aormori/2006/JP
AB541321	GII.4	Osaka2/2007/JP
AB662873	GII.2	OC09104/2009/JP
AY485642	GII.4	Langen 1061/2002/GER
AY502023	GII.4	Farmington Hills/2002/USA
DQ658413	GII.4	MD-2004/2004USA
DQ078814	GII.4	Hunter504D/2004/AU
EF202588	GII.4	Toronto SK/2005/CAN
EU310927	GII.4	TCH186 2002 US
EU373815	GII	Luckenwalde591/2002/DE
EF684915	GII.4	Shellharbour NSW696T/2006/AUS
GQ845369	GII.4	Armidale NSW3901/2008/AU
GU134965	GII.7	1738/2009/USA
GU969058	GII.13	8679/Maizuru/2008 JPN

**Tabla No 6. Descripción de las secuencias del VHA para el análisis genético.**

<b>Número de acceso (GenBank)</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Cepa</b>
JQ425480.1	HAV A	Hepatovirus A
KP879216.1	HAV A	Hepatovirus A
KP879217.1	HAV A	Hepatovirus A
KT891985.1	HAV A	Hepatovirus A
M16632.1	HAV A	Hepatovirus A
M59286.1	HAV A	Hepatovirus A
M59808.1	HAV A	Hepatovirus A
NC_001489	HAV A	Hepatovirus A
NC_008250.2	HAV A	Duck hepatitis A virus 1
NM_012206	HAV A	Homo sapiens

<b>Número de acceso (GenBank)</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Cepa</b>
JQ425480.1	HAV A	Hepatovirus A
KP879216.1	HAV A	Hepatovirus A

<b>KP879217.1</b>	HAV A	Hepatovirus A
<b>KT891985.1</b>	HAV A	Hepatovirus A
<b>M16632.1</b>	HAV A	Hepatovirus A
<b>M59286.1</b>	HAV A	Hepatovirus A
<b>M59808.1</b>	HAV A	Hepatovirus A
<b>NC_001489</b>	HAV A	Hepatovirus A
<b>NC_008250.2</b>	HAV A	Duck hepatitis A virus 1
<b>NM_012206</b>	HAV A	Homo sapiens

---

En la tabla No 7 se describe la secuencia de genes sintetizados para control positivo y diseño de cebadores Norovirus (GI Y GII); Hepatitis A (HAV) obtenida por alineación de cepas de la base de datos de secuencias genéticas en el Centro Nacional de Información Biotécnica (NCBI).

**Tabla No 7. Secuencia de genes sintetizados para control positivo y diseño de cebadores Norovirus (GI Y GII); Hepatitis A (HAV).**

<b>SÍNTESIS DE GENES</b>		
<b>Nombre</b>	<b>PROMOTOR T7+ SEQUENCE</b>	<b>bp</b>
<b>Norovirus GI</b>	<p><b>TAATACGACTCACTATAGGG</b>GAGGAAAAATGTGGATGGACTGGTCTT            CTTGCGGCGCACCATTTCCCGTGATGCGGCAGGGTTCCAAGGCAGGTT            AGATAGGGCTTCGATTGAACGCCAAATCTTCTGGACCCGCGGGCCCAA            TCATTCAGATCCATCAGAGACTCTAGTGCCACACACTCAAAGAAAAATA            CAGTTGATTTCACTTCTAGGGGAAGCTTCACTCCATGGTGAGAAATTTT            ACAGAAAGATTTCCAGCAAGGTCATACATGAAATCAAGACTGGTGGATT            GGAAATGTATGTCCAGGATGGCAGGCCATGTTCCGCTGGATGCGCTT            CCATGACCTCGGATTGTGGACAGGAGATCGCGATCTTCTGCCCGAATT            CGTAAATGATGATGGCGTCTAAGGACGCTACATCAAGCGTGGATGGCG            CTAGTGGCGCTGGTCAGTTGGTACCGGAGGTTAATGCTTCTGACCCTC            TTGCAATGGATCCTGTAGCAGGTTCTTCGACAGCAGTC</p>	520
<b>Norovirus GII</b>	<p><b>TAATACGACTCACTATAGGG</b>ATTTCTGAGGATCTGGATGGTTTAACC            TTTCTGCGGAGAAGTGAACCCGTGATCCAGCTGGTTGGTTTGGTAAAT            TAGAACAGAGCTCAATACTTAGGCAGATGTAAGTGGACTAGGGGCCCA            ACCATGAGGATCCATCTGAAACAATGATACCACATTCCCAAAGGCCCAT            ACAGTTGATGTCTCTAGGTGAAGCTGCATTGCACGGTCCAGCATT            TACAGCAAATCAGTAACTAGTCATTGCAGAGTTGAAGGAAGGTGGCA            TGGACTTTTACGTGCCAGGCAAGAGCCGATGTTGAGATGGATGAGAT            TCTCAGACCTGAGCACGTGGGAGGGCGATCGCAATCTGGCTCCCAGTT            TTGTGAATGAAGATGGCGTGAATGACGCCGCCCATCTAATGATGGT            GCAGCCGGTCTCGTACCAGAGGTCAACAACGAGACGATGGCCCTCGA            ACCGGTGGCTGGGGCTTCTATAGCCGCCCTCTAACCG</p>	521
<b>HAV_Hepatitis A</b>	<p><b>TAATACGACTCACTATAGGG</b>GAGATTCTACATTTGGATTGTTTCTATT            CGAGATTGCAAATTACAATCATTCTGATGAATATTTGTCCTTCAGTTGTT            ATTTGTCTGTCACAGAGCAATCAGAGTTCTATTTTCTAGAGCTCCATTA            AATTCAAATGCTATGTTGTCCACTGAATCCATGATGAGTAGAATTGCAG            CTGGAGACTTGGAGTCATCAGTGGATGATCCCAGATCAGAGGAGGATA            GAAGATTTGAGAGTCATATAGAATGTAGGAAACCATACAAAGAATTGAG            ACTGGAGGTTGGGAAACAAAGACTCAAATATGCTCAGGAAGAGTTATCA            AATGAAGTGCTTCCACCTCCTAGGAAAATGAAGGGGTTATTTTACAAG            CTAAAATTTCTTTTTTATACTGAGGAGCATGAAATAATGAAGTTTTCTT            GGAGAGGAGTGACTGCTGATACTAGGGCTTTGAGAAGATTTGGATTCT            CTCTGGCTGCTGGTAGAAGTGTGTGGACT</p>	520

**Tabla No 8. Secuencia de genes sintetizados de NV GI (a) NV GII (b) y HAV (c) obtenida por alineamiento a partir de cepas de la base de datos de secuencias genéticas del Centro Nacional de Información Biotécnica (NCBI).**

(a) NVGI NVGI primer set	
Primer	NVGI (forward) TGGACYCGHGGSCCCAAYCA
Promotor T7 + aligned sequence NVGI	C C G T
NVGI (reverse)	
Primer	GCGTCCTTAGACGCCATCATC
Promotor T7 + aligned sequence NVGI	TAAG
NVGI (reverse hominized)	
Primer	GAAVCGCATCCAGCGGAACATGG
Promotor T7 + aligned sequence NVGI	CC T A G
(b) NVGII NVGII primer set	
Primer	NVGII (forward) TGGACNAGRGGNCCYAAAYCA
Promotor T7 + aligned sequence NVGII	T G C C C
NVGII (reverse)	
Primer	GTCATTGACGCCATCTTCATTC
Promotor T7 + aligned sequence NVGII	T GC C G A
NVGII (reverse hominized)	
Primer	GARAAAYCTCATCCAAYCTRAAC
Promotor T7 + aligned sequence NVGII	GG T G T G A
(c) HAV HAV primer set	
Primer	HAV (forward) CTATTCAGATTGCAAATTAYAAT
Promotor T7 + aligned sequence NVGII	C
HAV (reverse)	
Primer	AAYTTCATYATTCATGCTCCT
Promotor T7 + aligned sequence NVGII	A G A C
HAV (reverse hominized)	
Primer	CTCCAGCTGCAATTCTACTCATC
Promotor T7 + aligned sequence NVGII	T T T G T

La tabla 8 muestra la identidad de consenso de los primers degenerados con la amplificación de la secuencia.

### 3.2.3. Diseño de cebadores específicos para NV GI, NV GII y HAV.

Se diseñaron cebadores específicos para NV y HAV a partir de regiones conservadas de ORF1 y ORF2. El tamaño previsto para NVGI en la primera PCR es de 288 pb y utilizando la PCR semi-anidada es de 213 pb, para NVGII el tamaño previsto en la amplificación inicial es de 286 pb y utilizando la PCR

semi-anidada el tamaño previsto es de 215 pb mientras que para HAV el tamaño previsto en la PCR inicial es de 395 pb y utilizando la PCR semi-anidada de 160 pb.

### 3.2.2. Verificación de los controles positivos mediante digestión de los plásmidos

Los fragmentos génicos se recibieron en un vector pTop Blunt V2 y se transformaron en células competentes DH5alpha *Escherichia coli*. Los fragmentos génicos se verificaron mediante digestión de restricción con los siguientes tamaños: NV GI 557 pb; NV GII 558 pb; y HAV 557 pb (Fig. 7).

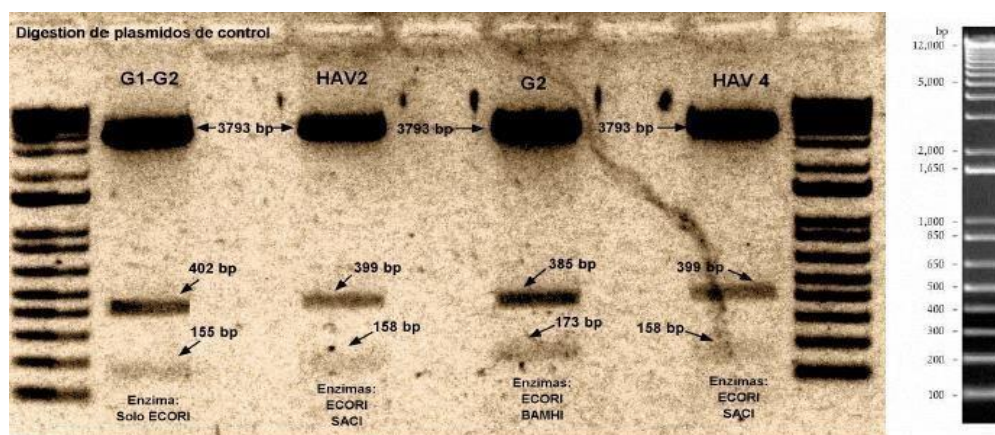


Figura No 7. Digestión del plásmido pTop Blunt V2 con la secuencia insertada de NVGI, NVGII y el gen HAV.

### 3.2.4. Validación de la HNRT-PCR de NVGI, NVGII y el gen HAV.

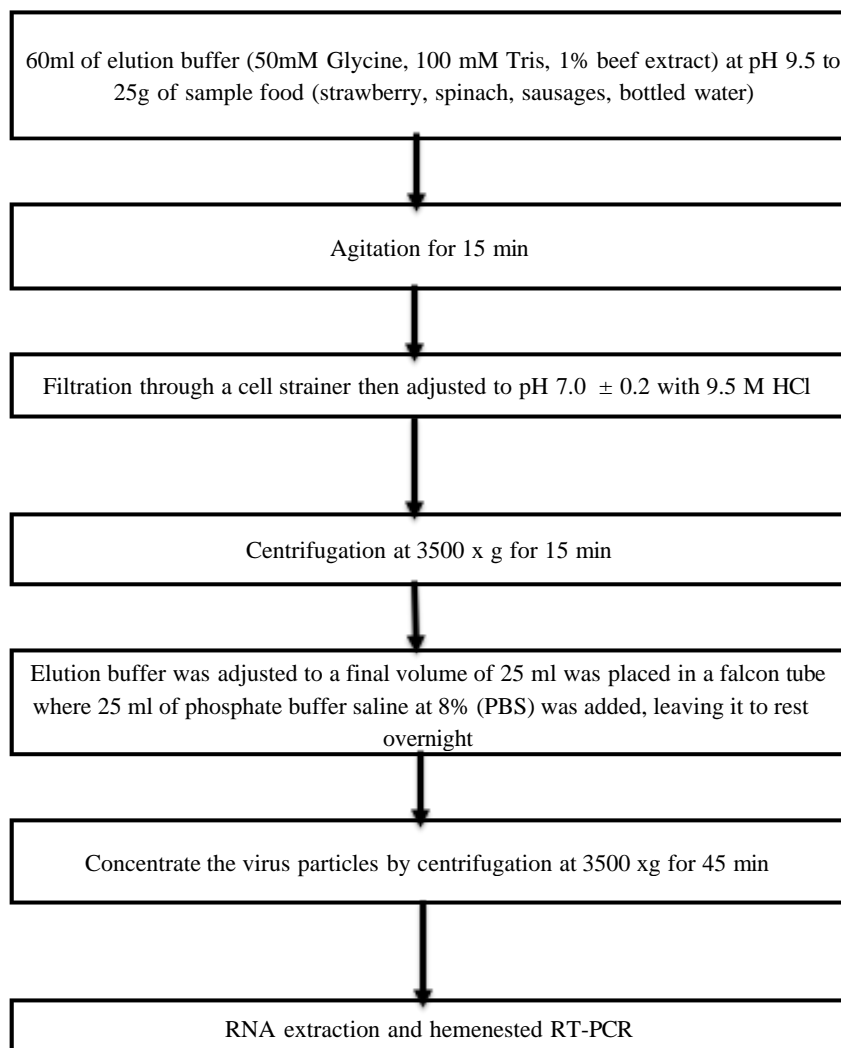
Se introdujeron muestras de ARN positivas para norovirus (NV) de los genotipos GI y GII, así como para el virus de la hepatitis A (HAV). Las muestras de fresas, espinacas y salchichas fueron cuidadosamente lavadas con agua destilada antes de ser transcritas *in vitro*, posteriormente a dichas matrices de alimentos se inocularon transcritos *in vitro* de ARN viral de Norovirus (NV) G1 y G2 y Hepatitis A (HAV). Las muestras de alimentos que previamente no evidenciaron carga viral fueron utilizadas como control negativo. El peso de las fresas, espinacas y salchichas fue de 25 g y 330 ml de agua embotellada para el análisis de presencia de norovirus y VHA (Lowther *et al*, 2019).

Se estableció como control positivo inocular los alimentos con NVGI (600 ng/μl), NVGII (500 ng/μl) y HAV (450 ng/μl). Posteriormente, se estableció un proceso inoculando carga viral sin alimentos NVGI (600 ng/μl), NVGII (500 ng/μl) y HAV (450 ng/μl) establecido como control positivo. Dentro del proceso

se estableció un control positivo a base de ARN sintético obtenido por transcripción inversa del producto PCR de los plásmidos, este control se utilizó para asegurar que la técnica de amplificación de la HNRT-PCR funcionara correctamente y para comparar los resultados obtenidos con las muestras de alimentos inoculadas con carga viral.

### **3.2.5. Extracción de ARN Viral: Protocolo experimental**

En este estudio se utilizaron fresas, espinacas, salchichas y agua embotellada adquiridos localmente en la ciudad de Guayaquil. Las muestras de alimentos (25 g), se mezclaron con 60 ml de tampón de elución (50 mM de glicina, 100 mM de Tris, 1% [p/p] de extracto de carne de vacuno [pH 9,5]) durante 15 min a temperatura ambiente con agitación constante (Fig. 8). A continuación, el tampón de elución se filtró a través de un colador celular de nailon de 40 micrómetros de tamaño de poro (BD Falcon, Basilea, Suiza). El tampón de elución recuperado se reguló a pH 7,0 con HCl 9,5 M y se centrifugó a 3.500 g (fuerza centrífuga relativa) por 15 minutos. El sobrenadante se trasladó a un tubo nuevo, se completó el volumen hasta 25 ml con tampón fosfato salino y se dejó a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, el extracto se centrifugó a 3.500 g por 15 minutos y el sobrenadante se trasladó a un dispositivo de filtración centrífuga Centricon Plus-70 (100K NMWL; Millipore, Molsheim, Francia) y se centrifugó a 3.500 g para concentrar las partículas víricas en un volumen de 400 µl aproximadamente esto se realizó con la finalidad de que los polifenoles, carbohidratos, lípidos y vitaminas contenidos que están en los alimentos no interfieran en el ARN viral o lo degrade porque estas sustancias que son propias de las matrices alimentarias tienen la capacidad de degenerar el ARN viral y no detectarlo en el momento de hacer la prueba. En el caso del agua embotellada, no se aplicó este protocolo ya que no contiene ninguno de estos elementos en su composición, El dispositivo de filtrado se enjuagó posteriormente con 200 µl de tampón de elución para mejorar la recuperación del virus ya que el agente infeccioso no utiliza las matrices alimentarias como huésped para su replicación por ende es fundamental obtener la mayor cantidad de carga viral en las muestras analizadas (Maritschnik *et al.*, 2012) (Fig. 8).



**Figura No 8. Diagrama de flujo del método para inhibición de polifenoles, carbohidratos, lípidos y vitaminas en alimentos.**

El ARN total se extrajo con reactivo trizol (solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina utilizado para aislar ARN de alta calidad) según el protocolo del fabricante (Fukuda *et al.*, 2008). El ARN total se suspendió en 30  $\mu$ L de tampón de elución y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso en el ensayo de RT-hnPCR (técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa y PCR anidada).

### 3.2.8. RT-PCR y PCR Heminested

El ARN extraído se transcribió inversamente y se amplificó utilizando el kit SuperScript III One-Step RT-PCR (Thermo fisher, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de reacción

consistió en 10 µl de tampón de reacción, 0,4 µl de Triton x100, 0,2 µM de cada cebador (NVGI-F/R, NVGII-F/R, HAV-F/R), 0,5 µl de mezcla enzimática (SuperScript III One-Step RT PCR with Platinum Taq DNA Polymerase), 2 µl de molde de ARN y 11,1 µl de agua libre de RNasa.

### 3.2.9. Protocolo de termociclado

En el protocolo de termociclado se realizó el RT a 50°C durante 30 min; desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 min; 40X ciclos de 94 °C durante 30s, hibridación a 60°C (NV GI), 55 C (NV GII), y 45°C (HAV), durante 30 s, extensión a 72 durante 40 s, y una extensión final a 72 °C durante 5 min.

Para el paso de PCR semi-anidada heminested, se mezcló 1 µl de la reacción de RT-PCR con 2 µl de tampón de reacción 10X, 1 µl de 50mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µl de 10uM dNTPs, 1 µl de cebadores 0,2uM, 0,08 µl de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) y 14,52 µl de agua libre de RNasa. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C durante 2min, 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30s, hibridación a cada temperatura óptima durante 30 s, extensión a 72 °C durante 40 s, y una extensión final a 72°C durante 5min. Las tablas 9 , 10 y 11 describen las secuencias genéticas, su localización, región, temperatura de recorrido y polaridad del conjunto de cebadores de NV GI, NV GII y HAV.

**Tabla No 9. Información generada de los conjuntos de cebadores NV GI.**

Primers	Secuencia (5'- 3')	Localización <sup>b</sup>	Región	Temperatura de recorrido (°C)	Polaridad
<b>NVGI-F</b>	TGGACYCGHGGSCCC AAYCA	5092-5112	RdRP	60	(+)
<b>NVGI-R</b>	GCGTCCTTAGACGCC ATCATC	5359- 5380	Capsid	60	(-)
<b>NVGI-RH</b>	GAAVCGCATCCAGCG GAACATGG	5282-5305	RdRP	60	(-)

<sup>a</sup> Los medios de la secuencia alfabética son los siguientes: H= A, C, T; S = C, G; V=A, C, G; Y = C, T.

<sup>b</sup> La localización se basa en el número de acceso M87661 (Norwalk virus).

**Tabla No 10. Información generada de los conjuntos de cebadores NV GII.**

Primers	Secuencia (5'- 3') a	Localización <sup>b</sup>	Región	Temperatura de recorrido (°C)	Polaridad
<b>NVGII-F</b>	TGGACNAGRGGNC CYAAYCA	4820-4839	RdRP	55	(+)
<b>NVGII-R</b>	GTCATTCGACGCC ATCTTCATTC	5083- 5106	Capsid	55	(-)
<b>NVGII-RH</b>	GARAAAYCTCATCC AYCTRAAC	5014-5035	RdRP	55	(-)

<sup>a</sup> Los medios de la secuencia alfabética son los siguientes: N= A, C, G, T; R =A, G; Y = C, T.

<sup>b</sup> La localización se basa en el número de acceso X86557 (Lordsdale virus).

**Tabla No 11. Información generada de los conjuntos de cebadores del VHA.**

Primers	Secuencia (5'- 3') a	Localización <sup>b</sup>	Region	Temperatura de recorrido (°C)	Polaridad
<b>HAV-F</b>	CTATTCAGATTGCAAATTAYAAT	2896-2918	Capsid	45	(+)
<b>HAV-R</b>	AAYTTCATYATTTTCATGCTCCT	3269-3291	Capsid	45	(-)
<b>HAV-RH</b>	CTCCAGCTGCAATTCTACTCATC	3033-3056	Capsid	45	(-)

a. Los medios de la secuencia alfabética son los siguientes: Y= C, T.

b. La localización se basa en el número de acceso M14707 (Hepatitis A virus).

### 3.2.10. Análisis de los productos de PCR

Los productos de RT-PCR y PCR semi-anidada heminested se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE. Las bandas se visualizaron con Sbyr Safe (Invitrogen, EE.UU.).

## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. RESULTADOS

**4.1.1. Identificación de bacterias patógenas presentes en alimentos de consumo masivo disponibles en mercados de las ciudades de Guayaquil, Quito y Cuenca.**

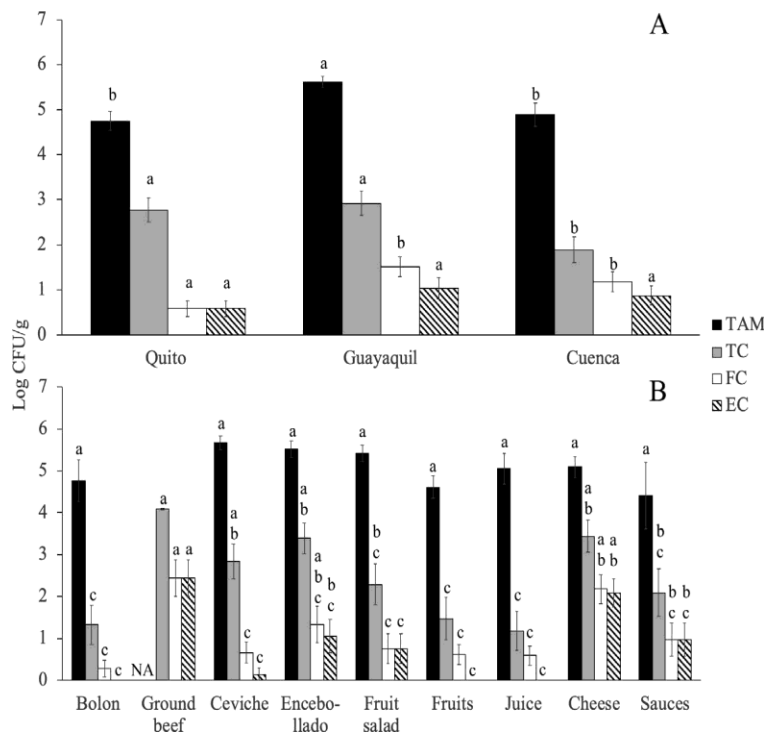
**4.1.1.1 Detección de TAM (total aerobios mesófilos bacteria); TC (total coliformes); FC (fecal coliformes); EC (*E. coli*) para la determinación de la calidad microbiológica en las matrices alimentarias.**

**4.1.1.1.1 Recuentos del número más probable en matrices alimentarias de Quito, Guayaquil y Cuenca.**

Los niveles de aerobios mesófilos totales variaron entre 0,3 y 7,0 log UFC/g (sólido) o log UFC/ml (líquido) en todas las pruebas analizadas, mientras que los recuentos globales de TC, FC y EC estuvieron en el rango entre no detectables (por debajo del límite de detección de 0,48 log UFC/g) y 4,11 log UFC/g en las pruebas realizadas para el recuento de coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli*. A través de la prueba ANOVA de dos vías se evidenciaron efectos individuales y de interacción significativa. Se observó un efecto significativo de la variable independiente de la ciudad para los recuentos de TAM, TC y FC (Fig. 9A). Las muestras de Guayaquil mostraron niveles de TAM más altos ( $5,16 \pm 0,12$  log UFC/g) en comparación con las de Quito ( $4,75 \pm 0,20$  log UFC/g) y Cuenca ( $4,89 \pm 0,25$  log UFC/g). Del mismo modo, los recuentos de CT de Quito ( $2,77 \pm 0,27$  log UFC/g) y Guayaquil ( $2,92 \pm 0,27$  log UFC/g) fueron significativamente superiores a los de Cuenca ( $1,89 \pm 0,29$  log UFC/g), mientras que los niveles de FC de Guayaquil ( $1,51 \pm 0,23$  log UFC/g) y Cuenca ( $1,18 \pm 0,22$  log UFC/g) superaron significativamente a los de Quito ( $0,58 \pm 0,17$  log UFC/g).

#### 4.1.1.1.2 Tipos de alimentos y niveles de contaminación

Se observó una asociación significativa entre el tipo de alimento y los niveles de contaminación microbiana de CT, CF y EC (Fig. 9B). La carne molida ( $4,09 \pm 0,02$  log UFC/g), ceviche ( $2,84 \pm 0,42$  log UFC/g), encebollado ( $3,39 \pm 0,38$  log UFC/g) y queso ( $3,44 \pm 0,48$  log UFC/g) fueron los grupos de alimentos con los niveles de CT más altos, mientras que las muestras de bolón ( $1,32 \pm 0,47$  log UFC/g), fruta ( $1,48 \pm 0,51$  log UFC/g) y jugo ( $1,18 \pm 0,46$  log UFC/g) mostraron los recuentos de CT más bajos. Del mismo modo, los niveles de CF fueron significativamente más altos en la carne picada ( $2,43 \pm 0,44$  log UFC/g), el encebollado ( $1,33 \pm 0,44$  log UFC/g) y el queso ( $2,17 \pm 0,35$  log UFC/g) que en las muestras de bolón ( $0,28 \pm 0,19$  log UFC/g), ceviche ( $0,66 \pm 0,25$  log UFC/g), ensalada de frutas ( $0,75 \pm 0,35$  log UFC/g), fruta ( $0,60 \pm 0,24$  log UFC/g) jugo ( $0,59 \pm 0,23$  log UFC/g), y salsas ( $0,97 \pm 0,40$  log UFC/g). La carne picada ( $2,44 \pm 0,44$  log UFC/g) y el queso ( $2,09 \pm 0,34$  log UFC/g) fueron los tipos de alimentos con mayores recuentos de coliformes totales, mientras que esta especie no se detectó en las muestras de bolón, fruta y jugo.



**Figura No 9. Asociación significativa entre la ciudad y el tipo de alimento con los niveles de bacterias mesófilas aerobias totales (TAM), coliformes totales (TC), coliformes fecales (FC) y E. coli (EC). Las letras distintas sobre las barras representan diferencias significativas entre las ciudades (A) o los grupos de alimentos (B).**

#### 4.1.1.1.3 Interacción entre la ciudad y el tipo de alimento

La interacción entre ciudad y tipo de alimento incidió en los recuentos de TAM, TC, FC y EC. Las muestras de salsa ( $6,65 \pm 0,04$  log UFC/g) y queso ( $5,98 \pm 0,47$  log UFC/g) de Guayaquil, ensalada de frutas de Quito ( $5,81 \pm 0,40$  log UFC/g), y encebollado ( $6,05 \pm 0,08$  log UFC/g), ceviche ( $5,99 \pm 0,11$  log UFC/g) y bolón ( $6,25 \pm 0,43$  log UFC/g) de Cuenca mostraron los niveles más altos de TAM, que fueron significativamente superiores a los observados en las salsas ( $2,70 \pm 1,11$  log UFC/g) de Cuenca y la fruta ( $3,31 \pm 0,30$  log UFC/g) y bolón ( $2,91 \pm 0,30$  log UFC/g) de Quito (Fig. 10A). El encebollado de Quito y la carne molida de res de las tres ciudades mostraron los niveles generales más altos de CT, con recuentos promedio superiores a  $4,00$  log UFC/g, mientras que este grupo bacteriano estuvo ausente en las muestras de ensalada de frutas, fruta y jugo de Cuenca y jugo de Quito (Fig. 10B). La carne molida de Guayaquil mostró los niveles más altos de FC con  $3,29 \pm 0,82$  log UFC/g, mientras que no se detectó FC en el bolón de Quito y Guayaquil, en el encebollado de Quito, o en las muestras de ensalada de frutas, frutas y jugos de Quito y Cuenca (Fig. 10C). De manera similar, la carne molida de Guayaquil mostró los recuentos más altos de EC con  $3,29 \pm 0,82$  log UFC/g, mientras que esta especie no se observó en el ceviche de Guayaquil y Cuenca, encebollado de Quito, ensalada de frutas de Quito y Cuenca, y muestras de bolón, fruta y jugo de las tres ciudades (Fig. 10D).

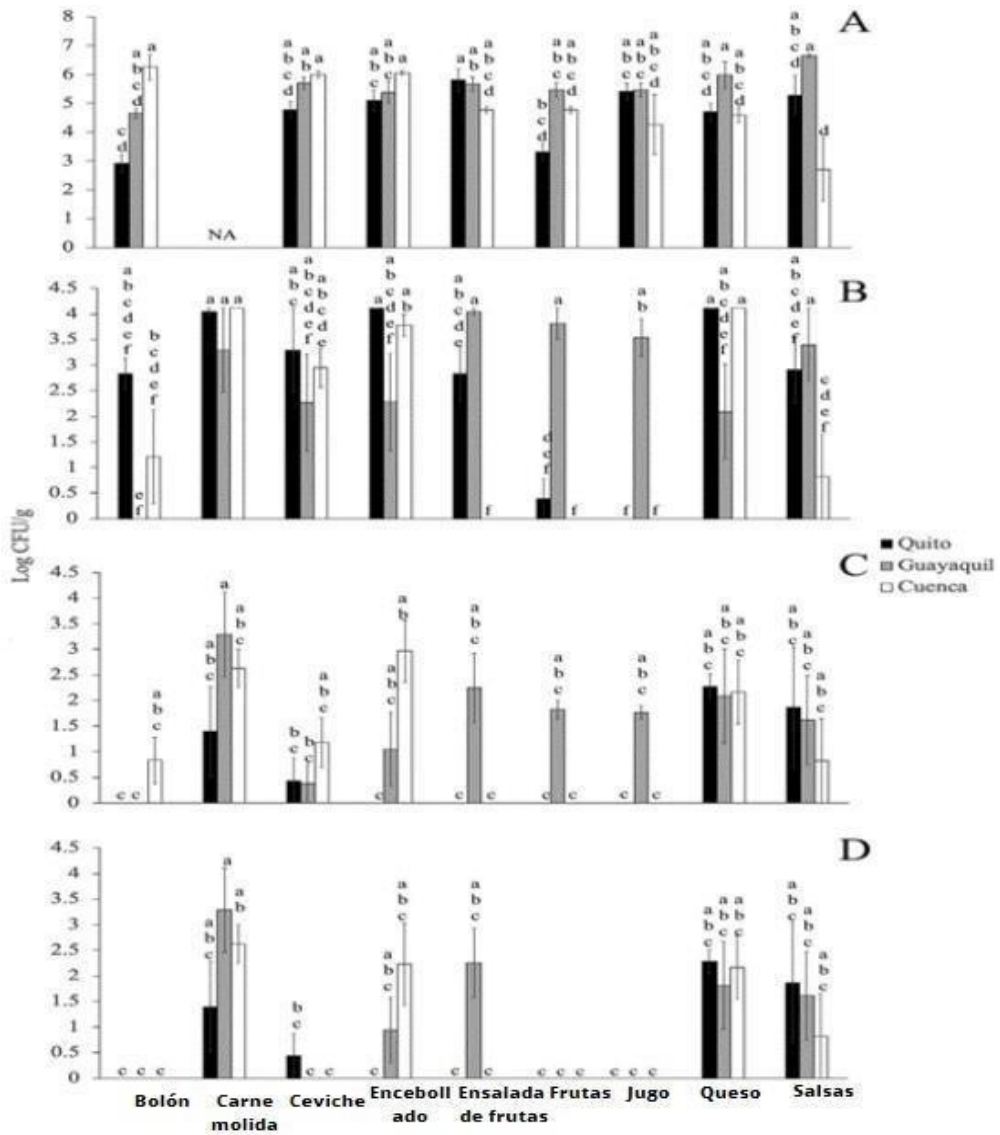


Figura No 10. Bacterias mesófilas aerobias totales (A), coliformes totales (B), coliformes fecales (C) y E. coli (D) de diferentes alimentos muestreados en las ciudades de Quito, Guayaquil y Cuenca. Letras distintas sobre las barras representan diferencias significativas entre ciudades y combinaciones de grupos de alimentos. NA, no analizado.

#### **4.1.1.2. Detección de *E. coli*, *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes* en muestras de alimentos de las ciudades de Quito, Guayaquil y Cuenca**

##### **4.1.1.2.1. Prevalencia de genes de *E. coli*, *S. enterica*, *L. monocytogenes* y patógenos oportunistas.**

Los presuntos aislados de *Salmonella*, *L. monocytogenes* y *E. coli* (*EC*) obtenidos con los métodos basados en cultivos se confirmaron mediante Biolog OmniLog ID y secuenciación del gen 16S rRNA. En la imagen 11 se demuestra la prevalencia de *EC*, *Salmonella* y *L. monocytogenes* en determinados grupos de alimentos. La *EC*, aunque generalmente es comensal, engloba patógenos mortales transmitidos por los alimentos, como los serotipos enterohemorrágicos, y se trata como un patógeno potencial en este estudio.

Fue muy prevalente los patógenos *Serratia* spp. y *Acinetobacter* spp. en la carne picada de vacuno (del 40 al 100%) y en el queso fresco (del 60 al 100%) de las tres ciudades, con medias generales del 73 y el 80%, respectivamente. También se detectó con frecuencia en muestras de salsas (20 a 40%) y encebollado (0 a 80%), con medias generales del 33 y 40%, respectivamente. No se detectó CE en muestras de bolón, fruta y jugo de fruta, pero sí en ensalada de frutas de Guayaquil (80%) y ceviche de Quito (20%).

*S. enterica* fue más prevalente en muestras de pollo crudo, con un rango del 20 al 60% en las tres ciudades para una media general del 40%. El patógeno también se aisló en salsas (prevalencia del 20%) de Quito y Cuenca, así como en ceviche (prevalencia del 20%) y encebollado de Cuenca (prevalencia del 20%). No se aisló *S. entérica* en la carne picada, el queso fresco ni el bolón.

Se detectó *L. monocytogenes* en queso (prevalencia del 20 al 40%) de las tres ciudades, con una media nacional del 27%, y en bolón (prevalencia del 20%) de Cuenca. El patógeno mostró alta prevalencia en ensalada de frutas de Guayaquil (80% de prevalencia) y Cuenca (60% de prevalencia), pero no se detectó en ensalada de frutas de Quito.

La prevalencia de otras bacterias, como *Escherichia coli* (*EC*), *Salmonella enterica* (*S. enterica*) y *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), se determinó mediante análisis específicos. Se identificaron un total de 97 especies bacterianas utilizando tanto el sistema Biolog OmniLog ID como la secuenciación del gen 16S rRNA de colonias seleccionadas al azar. Estas bacterias fueron

previamente aisladas durante el proceso de enumeración de microorganismos indicadores. Este enfoque integral permitió una caracterización exhaustiva de la diversidad bacteriana presente en las muestras analizadas.

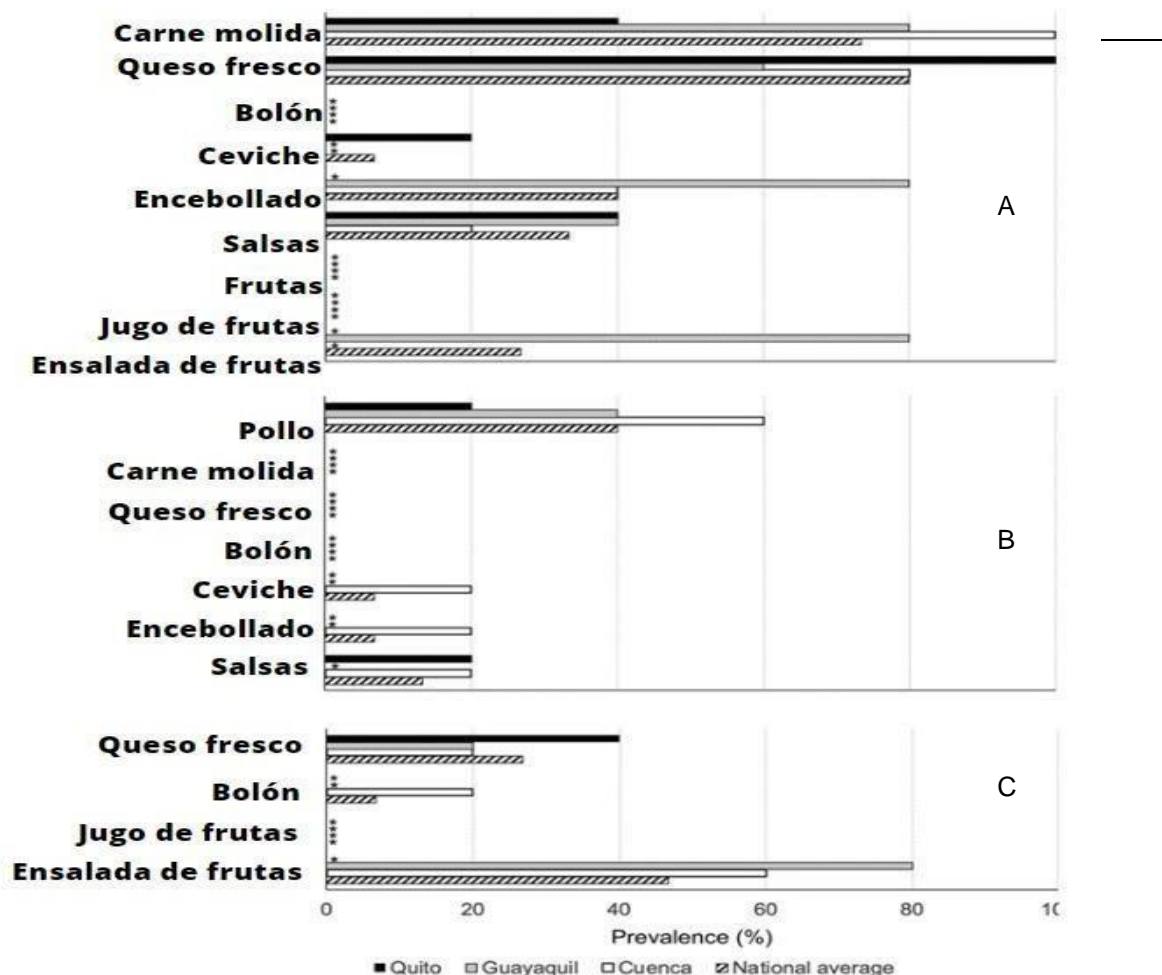


Figura No 11. Prevalencia (%) de *E. coli* (A), *S. enterica* (B) y *L. monocytogenes* (C) en las cinco muestras compuestas de grupos de alimentos seleccionados de cada uno de las tres ciudades ecuatorianas. Promedios nacionales son los valores medios de prevalencia de todas ciudades. \*, no detectado.

Todos los aislados mostraron puntuaciones de identidad de al menos el 80% mediante OmniLog ID y de al menos el 99% mediante secuenciación 16S con valores Blast E de cero. Las 50 especies más prevalentes excluyendo *EC*, *S. enterica* y *L. monocytogenes* se mostraron como un mapa de calor para cada combinación de grupo de alimentos y ciudad (Fig. 12).

Cada especie identificada se clasificó en función de las referencias bibliográficas como posible patógeno transmitido por los alimentos, patógeno oportunista, bacteria de deterioro de los alimentos, agente de biocontrol u otra bacteria. El patógeno *Shigella flexneri* se detectó en muestras de

encebollado y fruta de Cuenca y salsas de Guayaquil. Además, se detectó *EC* en muestras de carne picada, queso y salsas de las tres ciudades, encebollado de Cuenca y Guayaquil, ceviche de Quito y ensalada de frutas de Guayaquil.

Entre los patógenos oportunistas, *Psychrobacter sanguinis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus sciuri*, *Hafnia alvei* *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus hirae*, *Bacillus pumilus* y *Proteus mirabilis* mostraron la mayor prevalencia en todas las muestras, mientras que *Bacillus amyloliquefaciens*, *Serratia* spp., *Acinetobacter* spp. y *Obesum bacterium* spp. fueron las únicas bacterias de deterioro alimentario observadas. En gran parte de los grupos de alimentos se detectaron bacterias potenciales de biocontrol, como *E. faecalis*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. faecium* y otras *Enterococcus* spp.; *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, *B. subtilis* y otras *Bacillus* spp.; y *Lactococcus lactis* (Fig. 12).

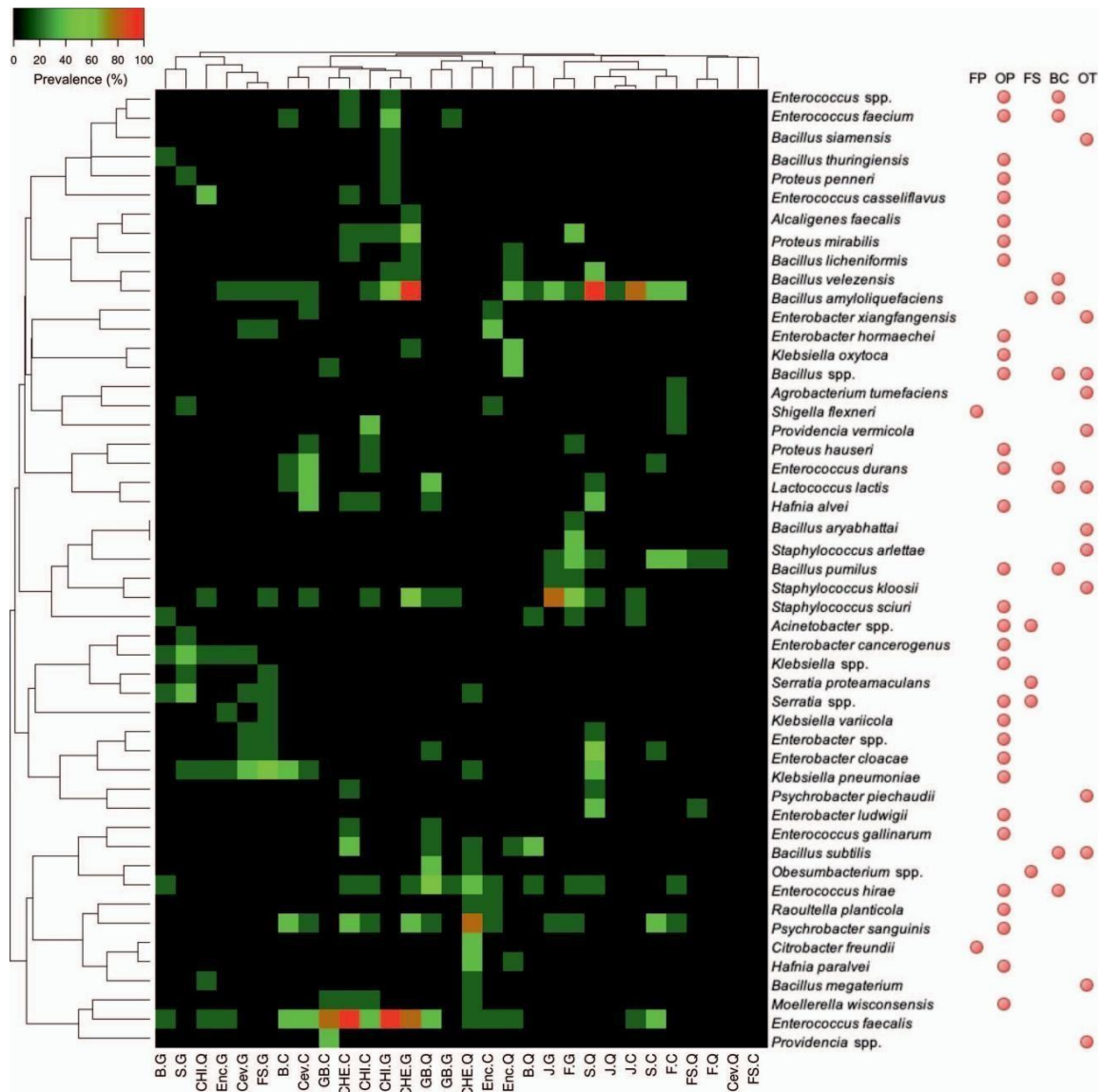


Figura No 12. Mapa de calor que muestra la correlación de Pearson y la agrupación de vinculación completa de las 50 especies bacterianas más prevalentes. Las entradas de alimentos están etiquetadas (tipo de alimento)-(ciudad). Los tipos de alimentos fueron ensalada de frutas (FS), queso (CHE), encebollado (E), bolón (B), pollo (CHI), salsas (S), carne molida (GB), jugo (J), fruta (F) y ceviche (CEV). Las muestras procedían de las ciudades de Quito (Q), Guayaquil (G) y Cuenca (C). Las especies detectadas se clasificaron como patógenos transmitidos por los alimentos (FP), patógenos oportunistas (PO), bacterias del deterioro de los alimentos (FS), bacterias de control biológico (BC) u otras bacterias (OT).

## **4.1.2 Determinación de la presencia de Norovirus y Hepatitis A en alimentos de consumo masivo en la ciudad de Guayaquil.**

### **4.1.2.1. Evaluación de eficacia y método de extracción del ARN.**

Para evaluar la eficacia de los nuevos conjuntos de cebadores (NVGI-F/R, NVGII-F/R y HAV-F/R) para detectar NV y HAV, se utilizó RT-PCR seguida de una PCR heminested para mejorar la sensibilidad del diagnóstico actual. Con este fin, se recogieron cuatro muestras de alimentos (fresas, espinacas salchichas y agua embotellada) en el mercado mayorista de alimentos local para obtener ARN viral contaminante y diagnosticar para NV GI y GII y HAV. Se evaluó la existencia de inhibidores de la RT-PCR como se ha descrito previamente.

También se evaluó el método de extracción del ARN junto con el proceso de tratamiento de las muestras de alimentos para evitar la inhibición del ARN viral por sustancias presentes en ellos (fenoles, vitaminas, proteínas, carbohidratos). Esto se evidenció ya que, al amplificar el material genético, se observó amplificación de las bandas en las muestras de alimentos que fueron inoculadas intencionalmente con el virus (NVGI / GII y HAV). El método de inhibición de sustancias inherentes al alimento no influye en la extracción del material genético, por lo tanto, el método está validado con relación a los resultados alcanzados.

El NVGII se detectó en las espinacas, mientras que el HAV se detectó en el agua embotellada. Cada virus mostró un producto de amplificación claro en 213pb, 215 y 160pb, respectivamente (Figuras 13, 14, 15, 16, 17, 18).

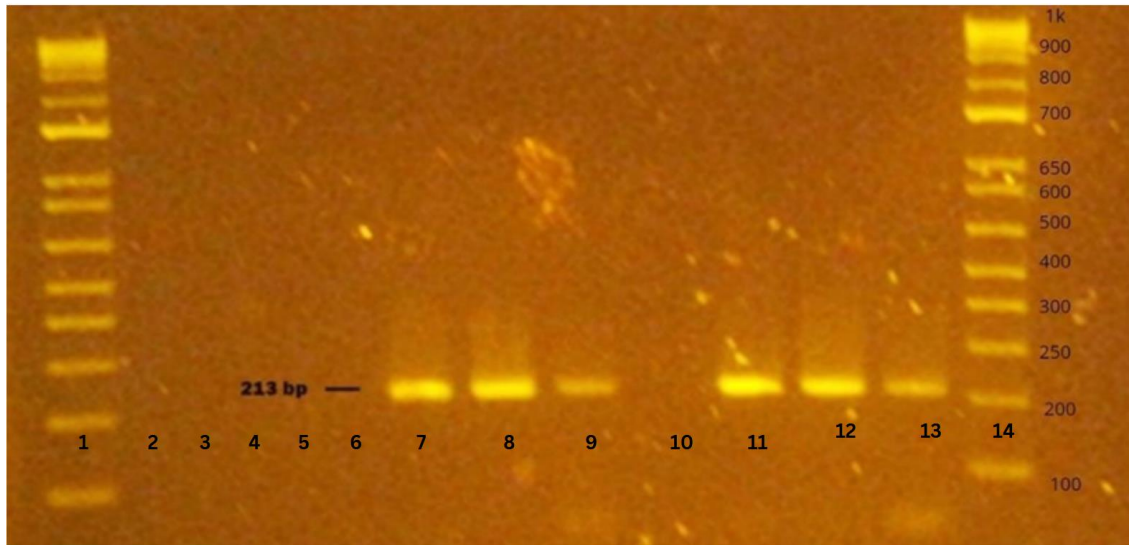


Figura N° 13. Genogrupo GI NV obtenido de alimentos contaminados naturalmente durante el muestreo de octubre de 2020 en Monte Sinaí, Guayaquil, Ecuador. Carriles 1 y 14: DNA Ladder 12000 pb; carril 2 control negativo PCR; carril 3 control de extracción negativo; carril 7 NVGI identificado en fresa (213 pb) (Control Positivo); carril 8 virus NVGI inoculado sin fresa (Control Positivo); carril 9 salchicha inoculada con NVGI (Control positivo); carril 10 muestra de salchicha lavada; carril 11 NVGI identificado en espinacas (213 pb) (Control Positivo); carril 12 virus NVGI inoculado sin espinaca (Control Positivo); carril 13 Control Positivo de NVGI (Arn sintético). Las muestras se analizaron en geles de agarosa al 2% y tiñéndose con colorante de cianina.

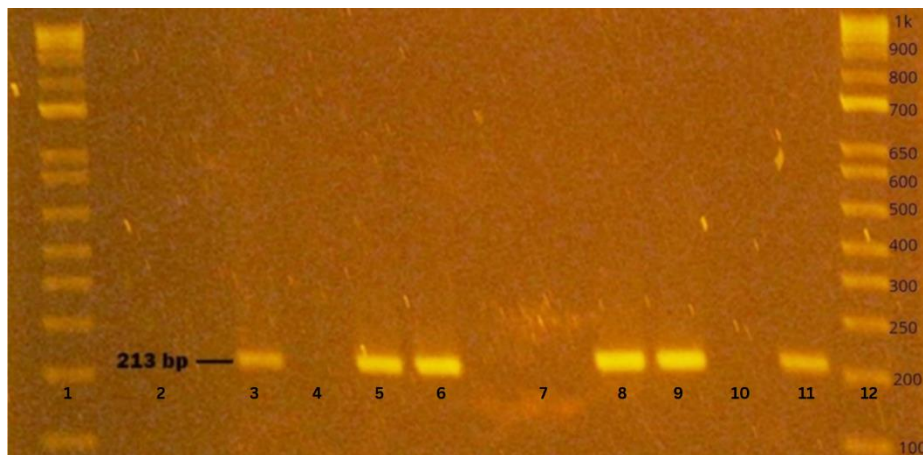
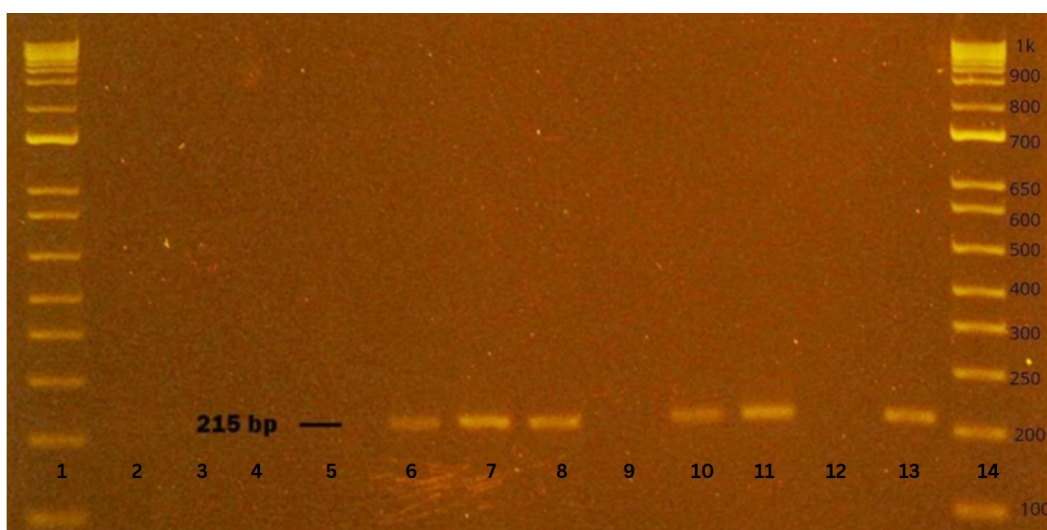
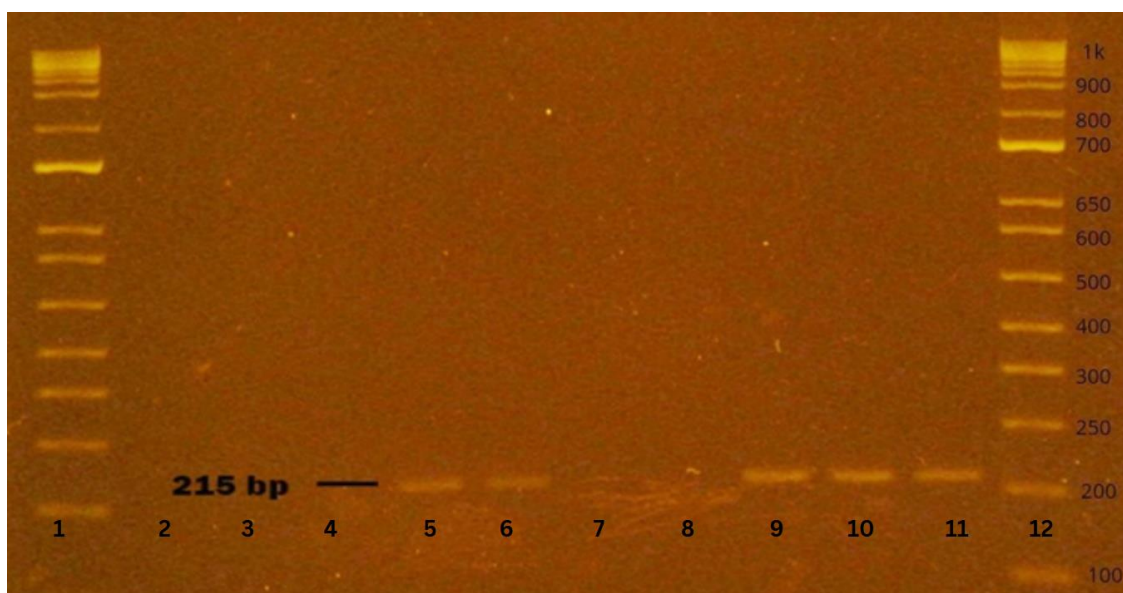


Figura No 14. Genogrupo GI NV obtenido de alimentos contaminados naturalmente durante el muestreo de octubre a noviembre de 2020 en Monte Sinaí, Guayaquil- Ecuador. Carriles 1 y 12: Carril 1:DNA ladder 12000 pb; carril 2 control negativo PCR; carril 3 NV G I (Control positivo); carril 4 muestra de agua embotellada (negativo NVGI); carril 5 muestra de agua embotellada inoculada con NVGI (Control Positivo); carril 6; virus NVGI inoculado sin agua embotellada (Control Positivo); carril 7 espinacas lavadas (Control negativo); carril 8 NVGI identificado en espinacas (213pb) ; carril 9 espinacas inoculadas con NVGI (Control Positivo); carril 10 Control Negativo NVGI; carril 11 Control Positivo NVGI (ARN Sintético). Las muestras se analizaron en geles de agarosa al 2 % y tiñéndose con colorante de cianina.



**Figura No 15. Genogrupo GII NV obtenido de alimentos contaminados naturalmente durante el muestreo de octubre a noviembre de 2020 en Monte Sinaí, Guayaquil- Ecuador. Carriles 1 y 14: DNA ladder 12000 pb; carril 2 control negativo PCR; carril 3 control de extracción; carril 4 muestra de salchicha; carril 5 muestra de salchicha lavada; carril 6 NVGII identificado en espinaca (215pb) (Control Positivo); carril 7 virus NVGII inoculado sin salchicha (Control Positivo); carril 8 salchicha inoculada con NVGII (Control Positivo); carril 9 muestra de espinaca lavada; carril 10 espinaca inoculada con NVGII (Control Positivo); carril 11 virus NVGII inoculado sin espinaca (Control Positivo); carril 12 muestra de fresa; carril 13 Control Positivo de NVGII (ARN Sintético). Las muestras se analizaron en geles de agarosa al 2 % y tiñéndose con colorante de cianina.**



**Figura No 16. Genogrupo GII NV obtenido de alimentos contaminados naturalmente durante el muestreo de octubre a noviembre de 2020 en Monte Sinaí, Guayaquil- Ecuador. Carriles 1 y 12: DNA ladder 12000 pb; carril 2 control negativo PCR; carril 3 control de extracción; carril 4 muestra de fresa lavada; carril 5 muestra de fresa inoculada con NVGII (Control Positivo); carril 6 virus NVGII inoculado sin fresa (Control Positivo); carril 7 muestra de agua embotellada; carril 8 muestra de agua embotellada (duplicado); carril 9 agua embotellada inoculada con NVGII**

(Control Positivo); carril 10 virus NVGII inoculado sin agua embotellada (Control Positivo); carril 11 Control Positivo NVGII (ARN Sintético). Las muestras se analizaron en geles de agarosa al 2 % y tiñéndose con colorante de cianina.

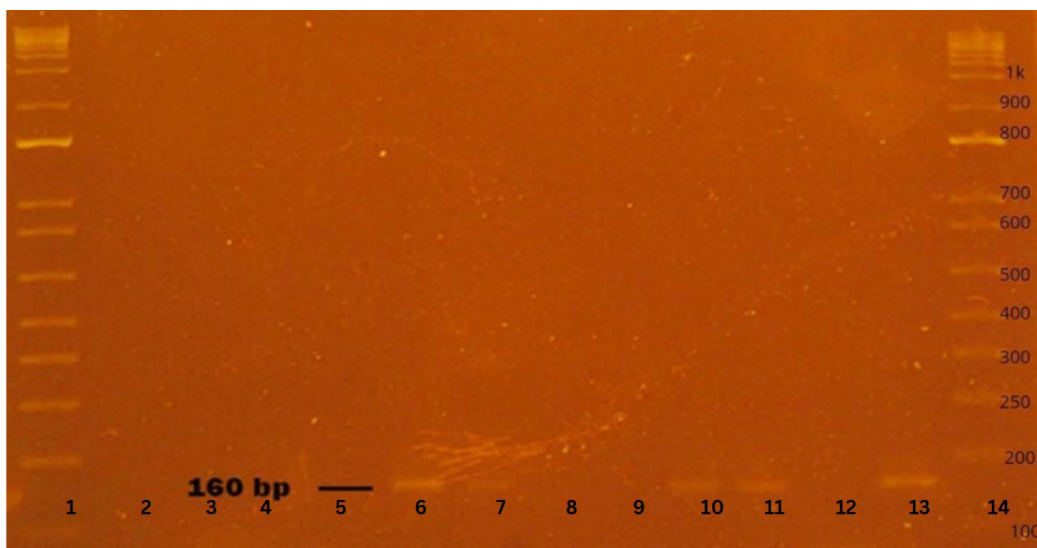


Figura No 17. Virus VHA obtenido de alimentos contaminados naturalmente durante el muestreo de octubre a noviembre de 2020 en Monte Sinaí, Guayaquil- Ecuador. Carriles 1 y 14: DNA ladder 12000 pb; carril 2 control negativo PCR; carril 3 control de extracción; carril 4 muestra de salchicha; carril 5 salchicha lavada (negativo); carril 6 salchicha inoculada con HAV (Control Positivo); carril 7 virus HAV inoculado sin salchicha (Control Positivo); carril 8 muestra de espinaca negativo; carril 9 muestra de espinaca lavada; carril 10 espinaca inoculada con VHA (Control Positivo); carril 11 virus VHA inoculado sin espinaca (Control Positivo); carril 12 muestra de fresa negativo para VHA ; carril 13 Control Positivo NVGII (ARN Sintético). Las muestras se analizaron en geles de agarosa al 2 % y tiñéndose con colorante de cianina.

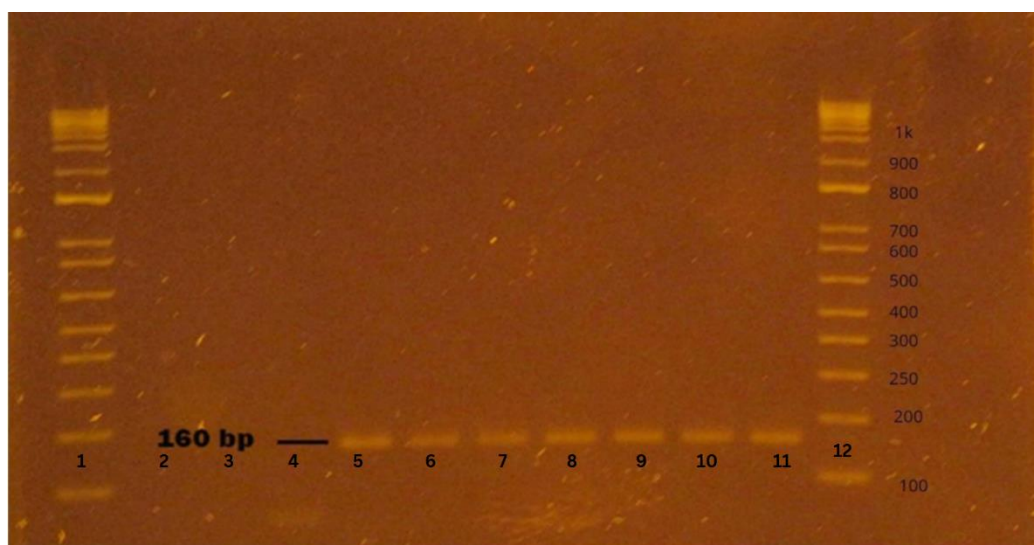


Figura No 18. Virus VHA obtenido de alimentos contaminados naturalmente durante el muestreo de octubre a noviembre de 2020 en Monte Sinaí, Guayaquil- Ecuador. Carriles 1 y 12: DNA ladder 12000 pb; carril 2 control negativo PCR; carril 3 control de extracción control negativo; carril 4 muestra de fresa

lavada; carril 5 HAV identificado en duplicado de muestra de agua embotellada (160pb) (Control Positivo); carril 6 virus HAV inoculado sin fresa (Control Positivo); carril 7 HAV identificado en muestra de agua embotellada (160pb) (Control Positivo); carril 8 muestra de fresa inoculada con HAV (Control Positivo); carril 9 agua embotellada inoculada con HAV (Control Positivo); carril 10 virus HAV inoculado sin agua embotellada (Control Positivo); carril 11 HAV Control Positivo (ARN Sintético). Las muestras se analizaron en geles de agarosa al 2 % y tiñéndose con colorante de cianina.

#### 4.1.2.2. Evaluación de los cebadores

Para la evaluación de los cebadores (NVGI-F/R, NVGII-F/R y HAV-F/R), se amplificaron un total de 36 fragmentos, refiriéndose a las secuencias de ADN amplificadas a partir de las muestras de alimentos utilizando la técnica de PCR, a partir de las matrices de alimentos previamente seleccionadas (fresas, espinacas, agua embotellada y salchicha procesada) El diseño de esquematización propuesto para la amplificación fue el siguiente:

- Muestra del ARN del alimento.
- Muestra del ARN del alimento que previamente fue lavado y desinfectado.
- Muestra del ARN del alimento inoculado con el virus de estudio (Control positivo).

De las 36 muestras entre las cuales incluían alimentos como fresas, espinacas, salchichas y agua embotellada, 12 (33,3 %) resultaron positivas para la presencia de NVGI. En el caso de los NVGII, su presencia se detectó en 11 (30,6%) de las muestras analizadas. En 12 muestras (33,3 %) se detectaron VHA con cebadores diseñados para la detección de VHA. La especificidad de los cebadores es importante para asegurar que solo se amplifiquen los fragmentos de ADN deseados y no se produzcan resultados falsos positivos. En este caso, los cebadores específicos para HAV permiten detectar específicamente este virus en las muestras analizadas.

A excepción del control negativo, es decir, que no contienen el material genético, el resto fueron amplificadas, demostrando la validación del método de detección de NV GI, NVGII y HAV mediante el diseño de los cebadores del presente estudio. Es importante destacar que la especificidad de los cebadores utilizados en el estudio es crucial para garantizar que solo se amplifiquen los fragmentos de ADN deseados y evitar la generación de resultados falsos positivos. En este caso, los cebadores específicos diseñados para la detección de NVGI, NVGII y VHA demostraron ser efectivos al detectar específicamente los virus en las muestras analizadas. Es fundamental tener en cuenta que, a

excepción del control negativo que no contiene material genético, el resto de las muestras fueron amplificadas con éxito, lo que valida el método de detección utilizado en el estudio para NVGI, NVGII y VHA.

#### 4.1.2.3. Análisis de correspondencias múltiples

El Biplot obtenido mediante el análisis de correspondencias múltiples (Fig.19) muestra la relación significativa entre el agua embotellada y la presencia de Hepatitis A (Val-p = 0,004). También detalla una coincidencia (no relevante) de las espinacas con la presencia de Norovirus GI y GII (valor p > 0,05).

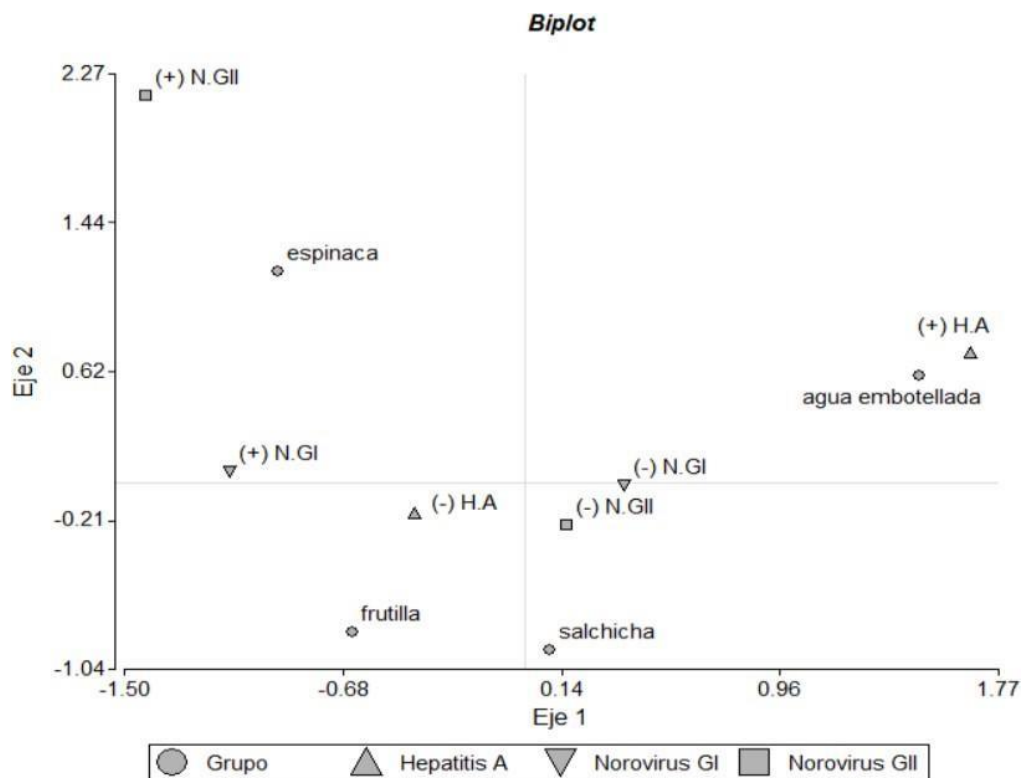


Figura No 19. Biplot obtenido mediante la A. Correspondencia Múltiple, que muestra las relaciones entre patógenos y grupos de alimentos. Fuente: Salazar et al.

## **4.2. DISCUSIÓN**

### **4.2.1. Identificación de bacterias patógenas presentes en alimentos de consumo masivo disponibles en mercados de las ciudades de Guayaquil, Quito y Cuenca.**

#### **4.2.1.1 Calidad microbiológica general de los alimentos ecuatorianos.**

El crecimiento y la aplicación de prácticas y normativas de inocuidad alimentaria con fundamentos científicos requieren datos de referencia sobre la calidad microbiológica de los suministros nacionales de alimentos. En este análisis, se evaluó la calidad microbiológica de 10 grupos de alimentos de consumo habitual en las tres ciudades más grandes de Ecuador, Quito, Guayaquil y Cuenca, que abarcan aproximadamente el 40% de la población nacional. Estos grupos de alimentos incluyeron alimentos conocidos a nivel mundial, así como alimentos específicos de Ecuador o de la región, alimentos crudos y alimentos listos para el consumo, alimentos ricos en proteínas de origen animal y alimentos frescos de origen vegetal. Las pruebas de alimentos se obtuvieron de mercados a la intemperie, los lugares predominantes de abastecimiento de alimentos para los consumidores ecuatorianos. Por lo tanto, este estudio proporcionó una visión integral del carácter microbiológico de los alimentos de consumo habitual en Ecuador, lo cual contribuye al conocimiento sobre la inocuidad alimentaria en la región. Estos hallazgos pueden ser útiles como parte de un conjunto de datos y estudios que contribuyen a la comprensión general de la inocuidad alimentaria en Ecuador y la región. Las cargas microbiológicas generales de los alimentos ecuatorianos de alta demanda (TAM de 0,3 a 7,0 log UFC/g, excluyendo la carne molida y los pollos enteros, y TC, FC y EC de no detectables a 4,11 log UFC/g) (Estrada *et al.*, 2002; Mensah *et al.*, 2002; Nyenje *et al.*, 2012). Las muestras de Guayaquil mostraron los niveles más altos de TAM, TC y FC. Guayaquil está en la costa del Pacífico, con temperaturas significativamente más altas en comparación con las ciudades de las tierras altas de Quito y Cuenca. En Guayaquil, la temperatura ambiente varía entre 19 y 33°C a lo largo del año, mientras que los rangos de temperatura de 7 a 21°C son comunes en Quito y Cuenca. Las altas temperaturas ambientales favorecen el crecimiento y la prevalencia de bacterias transmitidas por los alimentos, otros factores como la higiene durante la manipulación de alimentos, las prácticas de almacenamiento, la cadena de frío, la calidad del agua utilizada en la preparación de alimentos y las condiciones de higiene en general también pueden influir en los niveles de contaminación microbiana

en las muestras analizadas. (Smith *et al.*, 2019).

La prevalencia de *Salmonella* en el pollo crudo (entre el 20 y el 60% en cada ciudad) coincide con los hallazgos de otras regiones como en la ciudad de Mymensingh en Bangladesh (Guran *et al.*, 2017; Khan *et al.*, 2018), pero la prevalencia del 20% de este patógeno en las salsas de Quito y Cuenca es superior al 5% registrado en las salsas de Chile de México (Estrada *et al.*, 2004). La clave para la inocuidad microbiana de las salsas es un valor de pH inferior a 4,5, que se consigue mediante la adición de ácidos acético o cítrico (Smittle *et al.*, 2000). Por lo tanto, la preparación y manipulación inadecuada de las salsas probablemente fue lo que más contribuyó a la incidencia de *Salmonella* en este tipo de alimentos. Las muestras de ceviche y encebollado de Cuenca también mostraron una prevalencia elevada (20%) de *Salmonella*. En este contexto, la comparación se establece con la ausencia de *Salmonella* en las muestras analizadas, es decir, se indica que el 20% de las muestras de ceviche y encebollado de Cuenca presentaban contaminación por *Salmonella*. La preparación del encebollado y el ceviche requiere un alto nivel de manipulación de los ingredientes después de la cocción, y los resultados pueden sugerir unas condiciones higiénicas o de preparación inadecuadas. La elevada cantidad de jugo de limón o lima añadida al ceviche no impidió la aparición del patógeno. Aunque el jugo de limón puede lograr una reducción de hasta 5 log de patógenos (Mathur *et al.*, 2013), el efecto antibacteriano disminuye en el pescado y otros ingredientes del ceviche (Herrera *et al.*, 2010; Mathur *et al.*, 2013). La prevalencia del 20 al 40% de *L. monocytogenes* en el queso de las tres ciudades es superior al 0,8% notificado en el queso fresco de Europa (Martínez *et al.*, 2018), pero relativamente inferior a la prevalencia del 25 al 53% del patógeno en los productos de diferentes queserías de México (Rosas *et al.*, 2014). Se considera que la composición fisicoquímica del queso y del tipo de queso favorecen el crecimiento de patógenos transmitidos por los alimentos (Ibarra *et al.*, 2017). Del mismo modo, la elevada prevalencia (60%) de *L. monocytogenes* en ensalada de frutas de Cuenca y Guayaquil es superior a la prevalencia del 5,06% del patógeno en melón fresco cortado procedente de Canadá, esto sugiere una marcada diferencia en las condiciones de higiene y manipulación de los alimentos entre los dos contextos (Denis *et al.*, 2016). Se usó el análisis molecular, que puede incluir técnicas como la secuenciación del gen 16S rRNA u otros métodos moleculares, lo cual es fundamental para la identificación precisa de microorganismos patógenos como *L. monocytogenes* en muestras de alimentos. Otros múltiples patógenos potenciales y patógenos oportunistas fueron aislados de

múltiples alimentos analizando colonias tomadas al azar, lo que implica una mayor prevalencia en las muestras de alimentos e indica la necesidad de perfeccionar los procesos de elaboración y distribución de alimentos en el país.

Los recuentos de TAM, TC, FC y EC se han utilizado como indicadores de inocuidad alimentaria durante décadas (Buchanan *et al.*, 2012), y los valores de TAM inferiores a 5 log UFC/g se consideran aceptables para los alimentos listos para el consumo INEN 1334:2012 (Nyenje *et al.*, 2012). Sin embargo, se detectaron los patógenos de transmisión alimentaria *S. flexneri* y *L. monocytogenes* en muestras de fruta y ensalada de frutas de Cuenca, respectivamente, a pesar de la ausencia de TC, FC y EC y de los bajos recuentos de TAM observados en ambos tipos de alimentos. Del mismo modo, la fruta de Guayaquil no mostró bacterias patógenas a pesar de tener niveles de TAM, TC, FC y EC similares a los de otros tipos de alimentos en los que se detectaron patógenos, como el ceviche. Estos resultados concuerdan con informes anteriores que muestran que las bacterias indicadoras no se correlacionan necesariamente con la presencia de patógenos en los alimentos (Ávila *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2011). Tradicionalmente, las bacterias indicadoras, como las coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli*, se han utilizado como indicadores de la calidad microbiológica de los alimentos, ya que su presencia se asocia con la posible contaminación fecal y la presencia de otros microorganismos patógenos. Sin embargo, los resultados de este estudio, respaldados por informes anteriores, sugieren que la presencia de bacterias indicadoras no siempre garantiza la ausencia de patógenos en los alimentos, también se realizaron análisis estadísticos para evaluar la correlación entre la presencia de bacterias indicadoras y la ausencia de patógenos en los alimentos. Esto plantea un desafío significativo para los sistemas de monitoreo de la inocuidad alimentaria, ya que la detección de bacterias indicadoras dentro de los límites aceptables no garantiza la ausencia de patógenos que representen un riesgo para la salud pública. Esta falta de correlación subraya la necesidad de implementar enfoques más integrales para evaluar la seguridad microbiológica de los alimentos, que vayan más allá de la simple detección de bacterias indicadoras. Es fundamental considerar la presencia de patógenos específicos, como virus y bacterias patógenas, para evaluar de manera más precisa el riesgo asociado con el consumo de alimentos. Además, esta falta de correlación destaca la importancia de utilizar métodos de detección y análisis más sensibles y específicos para identificar la presencia de patógenos en los alimentos, lo que puede requerir el uso de técnicas moleculares avanzadas y enfoques multidisciplinarios.

#### 4.2.1.2. Prevalencia de patógenos oportunistas en alimentos

En la mayoría de las muestras de alimentos prevalecían diversos patógenos oportunistas. Los patógenos oportunistas suelen aprovecharse de la debilidad del sistema de defensa de las personas inmunodeprimidas y han causado enfermedades nosocomiales transmitidas por los alimentos (14). Los *Enterococcus* detectados en la mayoría de las muestras se consideran patógenos oportunistas, porque *E. faecium*, *E. durans* y *E. faecalis* son capaces de causar bacteriemia en personas inmunodeprimidas (Britt *et al.*, 2016; Dicipinigaitis *et al.*, 2015). Sin embargo, *Enterococcus* spp. puede producir bacteriocinas con potencial de aplicación para el control de bacterias de deterioro y patógenas (Hanchi *et al.*, 2018). Se necesitan más investigaciones para evaluar el riesgo y el potencial de biocontrol de los *Enterococcus* spp. de Ecuador.

*K. pneumoniae*, también se ha asociado a varios brotes de origen alimentario, causando septicemia, abscesos hepáticos y diarrea (Zhang *et al.*, 2018). Este patógeno oportunista se ha detectado con frecuencia en frutas y verduras de diversos países como, Colombia, Brasil, China, Argentina, Venezuela entre otros (Al-Kharousi *et al.*, 2016), y la presencia de esta bacteria en el ceviche y el encebollado puede relacionarse con la producción de la toxina escombroide histamina en el pescado (Ariño *et al.*, 2003). Del mismo modo, *P. sanguinis* se ha asociado a bacteriemia y meningitis en individuos inmunodeprimidos, y la presencia de esta bacteria en los platos RTE de Ecuador puede deberse a la contaminación cruzada con alimentos refrigerados como el queso (Lim *et al.*, 2017). *P. sanguinis* también estaba presente en las muestras de queso analizadas en este estudio. Asimismo, la prevalencia de *S. sciuri* en carne molida de res de Ecuador concuerda con informes anteriores que muestran la prevalencia de esta bacteria en carne de res al menudeo (Goja *et al.*, 2013; Jackson, *et al.*, 2013). *S. sciuri* se considera inofensiva en la mayoría de los casos, pero se ha asociado a infecciones de heridas, infecciones del tracto urinario, endoftalmitis y otros síntomas en personas inmunodeprimidas menudeo (Dakić *et al.*, 2005; Nemeghaire *et al.*, 2014). Del mismo modo, la presencia de *S. flexneri* en muestras de fruta, salsa y encebollado sugiere un saneamiento deficiente y falta de agua limpia (Jennison *et al.*, 2004).

#### 4.2.1.3. Organismos de deterioro detectados

Entre los organismos de deterioro detectados en este estudio, se ha informado de que *Serratia spp.* provoca la descomposición de alimentos ricos en proteínas (Fougy *et al.*, 2017), mientras que *Acinetobacter spp.* se consideran organismos de deterioro psicrófilos (Betts *et al.*, 2006). Sin embargo, *Serratia spp.* también puede causar neumonía (Fusco *et al.*, 2018), y varias *Acinetobacter spp.* se han asociado con diarrea en personas inmunodeprimidas (De Amorim *et al.*, 2017). La existencia de ambas bacterias en comidas procedentes de Ecuador como bolones, jugos y otros alimentos, se debió probablemente a la contaminación cruzada por ingredientes ricos en proteínas y refrigerados, como la carne y el queso. Esto puede ocurrir si no se siguen prácticas adecuadas de higiene y manipulación de alimentos, lo que puede permitir la contaminación de los alimentos listos para el consumo. Estos alimentos, a menudo vendidos por vendedores ambulantes sin permisos legales, están expuestos a condiciones que favorecen la contaminación microbiológica. La falta de cumplimiento de normas de inocuidad alimentaria aumenta el riesgo. La práctica común de mantener los alimentos a temperatura ambiente hasta la solicitud del cliente puede propiciar el crecimiento bacteriano si no se mantienen las condiciones adecuadas. La falta de refrigeración, el uso de utensilios no higienizados y la exposición a contaminantes ambientales también contribuyen a la presencia de bacterias patógenas en los alimentos preparados.

Se necesita investigación para evaluar los riesgos para la inocuidad alimentaria de *Serratia spp.* y *Acinetobacter spp.* detectados en bolones, jugos y otros alimentos de Ecuador.

La *B. amyloliquefaciens*, detectado en la mayoría de las muestras de alimentos de este estudio, se ha asociado al deterioro de los alimentos (Pereira *et al.*, 2018) y al biocontrol alimentario, porque este microorganismo puede producir la bacteriocina BaCf3, capaz de inhibir patógenos como *S. enterica serovar Typhimurium* y *Clostridium perfringens* (Bindiya *et al.*, 2019). En este estudio, la alta prevalencia de *B. amyloliquefaciens* coincidió con la ausencia de patógenos transmitidos por los alimentos en las pruebas de jugo recién exprimido en los mercados callejeros. La presencia de *Bacillus spp.* en el jugo de naranja ya se había descrito anteriormente (Aneja, *et al.*, 2014), pero se necesitan más investigaciones para evaluar el papel de *B. amyloliquefaciens* en la conservación del jugo de fruta.

*Bacillus subtilis* (Starosila et al., 2017), *B. pumilus* (Saggese et al., 2018) y *L. lactis* (Song et al., 2017) detectados en varias muestras también pueden producir compuestos antimicrobianos. Se requieren más indagaciones para constatar el rol de estas bacterias como agentes de biocontrol en los alimentos procedentes de Ecuador. Estudios adicionales podrían evaluar la capacidad de estas bacterias para producir compuestos antimicrobianos que inhiban el crecimiento de microorganismos no deseados en los alimentos, lo que podría contribuir a mejorar la seguridad alimentaria y prolongar la vida útil de los productos. Además, se podría investigar la interacción de *Serratia spp.* y *Acinetobacter spp.* con otros microorganismos presentes en los alimentos para comprender mejor su papel en la microbiota alimentaria y su potencial efecto beneficioso o perjudicial para la salud humana.

#### **4.2.2. Determinación de la presencia de Norovirus y Hepatitis A en alimentos de consumo masivo en la ciudad de Guayaquil.**

##### **4.2.2.1. Uso generalizado de RT-PCR y heminested PCR**

Los virus encontrados en los análisis de este estudio fueron NVGI en muestras de alimentos como fresas y espinacas, NVGII en las espinacas, y HAV en el agua embotellada. Cada virus mostró un producto de amplificación claro en las pruebas realizadas, lo que indica la presencia de estos agentes infecciosos en las muestras analizadas. La estimación de muertes por infección proporciona un contexto importante para comprender la gravedad de las enfermedades transmitidas por alimentos y resalta la importancia de abordar la contaminación de los alimentos. Se estima que en EE.UU. mueren anualmente entre 570 y 800 personas por enfermedades asociadas a la infección por el NV. Se producen brotes del virus con regularidad y se identifican nuevas variantes en todo el mundo cada 2 o 3 años (Marshall et al., 2011).

El uso generalizado de RT-PCR y Heminested PCR para la detección de NV y HAV puede atribuirse a su sensibilidad superior en comparación con otros métodos (Mattison, 2011). La detección del virus es muy sensible en los alimentos porque en gran parte de las situaciones la carga viral es baja, el virus no infecta los alimentos y por lo tanto no replica su material genético. Antes de la extracción del ARN del alimento, se recomienda inhibir cualquier sustancia que forme parte del alimento como fenoles, vitaminas, proteínas, carbohidratos utilizando el método descrito como protocolo experimental

(Maritschnik *et al.*, 2013).

#### **4.2.2.2. Detección de norovirus y Hepatitis A**

Se detectó Norovirus GI tanto en fresas como en espinacas, Norovirus GII en espinacas y VHA en agua embotellada. El origen de la contaminación de los virus a los alimentos se debe probablemente al agua contaminada para el riego de cultivos o la contaminación cruzada por manipuladores de alimentos enfermos pueden ser posibles fuentes de infección vírica.

El manipulador de alimentos es un eslabón importante en la transmisión del NV, estando epidemiológicamente implicado en el 80% de los brotes de NV en Bélgica y Chile entre otros (Morillo *et al.*, 2008).

La contaminación de alimentos con VHA es posible que pueda producirse en algún punto del proceso alimentario, desde la granja hasta la mesa. El contacto con aguas residuales incorrectamente tratadas o contaminadas, con manipuladores de alimentos infectados y, en menor medida, con superficies contaminadas representan las vías más comunes de contaminación de los alimentos por el VHA. Aproximadamente el 2-7% de todos los brotes de VHA en el mundo pueden atribuirse a alimentos contaminados (Galvañ & Beneyto, 2009). En Ecuador hasta la SE 01 - 09 / 2020, se han notificado 540 casos de Hepatitis A, los que en su mayoría fueron reportados por la provincia de Pichincha 152 casos. El grupo de edad más afectado es de 21 a 49 años (MSP, 2020).

La importancia en la determinación de carga viral en alimentos donde inicialmente es baja ya que el virus no utiliza al alimento como huésped para replicar su material genético, se basó en el desarrollo de la técnica utilizada para detectar la Hepatitis A y Norovirus en matrices alimentarias muestreadas en la ciudad de Guayaquil, identificándose la presencia de estos agentes infecciosos biológicos y probablemente la asociación de enfermedades a infecciones significativas transmitidas por los alimentos asociadas con la transmisión de manipuladores de alimentos y alimentos contaminados con aguas residuales para estos virus.

#### **4.2.2.3. Desarrollo y evaluación de cebadores**

En el presente estudio, se desarrollaron cebadores específicos para detectar NV GI, GII y HAV, dirigidos a los genes ORF1, ORF2 y de la cápside, respectivamente. Se utilizó un protocolo de RT-PCR de único paso y PCR heminested para mejorar aún más la capacidad de detectar virus alimentarios entéricos humanos. El estudio realizado es inédito en Ecuador ya que no se ha examinado la existencia de virus en alimentos en el país. Los resultados obtenidos en muestras como fresa, espinaca y agua embotellada en un sector popular de la ciudad de Guayaquil, sugieren que las enfermedades gastrointestinales en la ciudad pudieran ser de importante etiología viral además de la contaminación bacteriana.

En el presente estudio, se demostró que los conjuntos de cebadores NVGI-F/R, NVGII-F/R y HAV-F/R son importantes para el diagnóstico epidemiológico de NVGI, NVGII y HAV considerando el método de extracción e inhibición de sustancias específicas de alimentos que podrían inhibir o degradar el ARN viral en matrices alimentarias (Morillo *et al.*, 2008).

El Biplot muestra que sólo el agua embotellada tiene una fuerte relación con la presencia de VHA. Se observan otras relaciones, aunque no tan fuertes, como la de las espinacas con la presencia de N.GI y N.GII. Las salchichas y las fresas muestran relaciones con la ausencia de patógenos, las salchichas y las fresas mostraron relaciones con la ausencia de patógenos en el Biplot, lo que sugiere que estos alimentos podrían tener una menor probabilidad de estar contaminados con los virus analizados en el estudio. Estas relaciones identificadas en el Biplot son importantes para comprender las posibles fuentes de contaminación de los alimentos con patógenos específicos y pueden guiar futuras investigaciones y medidas de control de calidad en la producción y manipulación de alimentos para prevenir la transmisión de enfermedades transmitidas por alimentos

#### **4.2.2.4. Relevancia de estudio**

Este estudio es muy relevante en nuestro país en el campo de la salud pública y la inocuidad alimentaria porque la presencia de estos patógenos en los alimentos demuestra que los problemas gastrointestinales asociados a la población no son causados exclusivamente por bacterias, lo que plantea un estudio posterior para determinar en qué otro tipo de alimentos es probable detectar carga viral por NV y HAV en relación con una matriz de riesgo.

En el caso de virus como Hepatitis A y Norovirus presentes en muestras de espinacas, fresas y agua, demuestran que muchos de los problemas gastrointestinales que se presentan en Ecuador pueden no ser necesariamente causados por bacterias, sino también por virus.

La presencia de patógenos transmitidos por alimentos, como Norovirus y Hepatitis A, en alimentos consumidos en Ecuador, cobra mayor importancia al compararla con la información del Ministerio de Salud. Según el Ministerio de Salud, las enfermedades transmitidas por alimentos representan un problema significativo para la salud pública en Ecuador, ya que en datos reportados en el año 2023 de la semana 1-12 se notifican 70 casos de tifoidea en la provincia del Guayas, 24 casos en Pichincha y 2 casos en Azuay, en relación a casos de Salmonelosis se reportan 181 casos en Guayas, 32 casos en Pichincha y 10 casos en Azuay, contagio por Hepatitis A se reportan 14 casos en Pichincha y 6 casos tanto en Guayaquil como en Azuay. Todos estos reportes están basados en agua y alimentos de manera general. Adicionalmente se han reportado como otras intoxicaciones alimentarias en agua y alimentos sin especificar las cuáles pueden ser provocadas por bacterias, virus o parásitos que penetran en el organismo a través del agua o alimentos contaminados siendo el grupo de edad más afectado de 20 a 49 años y las mujeres el sexo más prevalente notificándose 672 casos en Pichincha, 379 casos en Guayas y 78 casos en Azuay (MSP, 2023), creando un impacto considerable en la morbilidad y la carga económica asociada. Esta información es relevante para el Ministerio de Salud, ya que puede ayudar a mejorar las estrategias de prevención y control de enfermedades transmitidas por alimentos en el país. Además, al identificar la presencia de norovirus y hepatitis A en alimentos de consumo masivo en la ciudad de Guayaquil, el estudio destaca la necesidad de ampliar los programas de monitoreo y control de la calidad microbiológica de los alimentos en Ecuador. Esta información puede ser utilizada por el Ministerio de Salud para fortalecer las políticas y regulaciones relacionadas con la inocuidad alimentaria, con el fin de proteger la salud de la población ecuatoriana.

## CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusiones

El estudio proporciona datos de referencia sobre la calidad microbiológica sobre algunos alimentos que se consumen en el Ecuador. La investigación determinó la calidad microbiológica de 10 grupos de alimentos comúnmente consumidos en las tres ciudades más grandes de Ecuador y encontró que las cargas microbiológicas generales de los alimentos ecuatorianos son comparables a las de otros países como México, cabe resaltar que las muestras de Guayaquil tuvieron los niveles más altos de contaminación, posiblemente debido a las temperaturas más altas en esa ciudad.

Se encontró que la incidencia de *Salmonella* en salsas y pollo crudo era alta en relación con otros alimentos analizados en el estudio, lo que sugiere una manipulación y preparación inadecuada de los alimentos. También se observó una alta prevalencia de *Salmonella* en ceviche y encebollado, a pesar de agregar jugo de limón, que tiene propiedades antibacterianas limitadas. La prevalencia de *L. monocytogenes* en ensalada de frutas y queso fue alta, lo que se atribuye a la composición fisicoquímica del queso y las condiciones de higiene de los alimentos. Además, se encontraron múltiples patógenos potenciales y patógenos oportunistas en diferentes alimentos. Los recuentos de TAM, TC, FC y EC se han utilizado como indicadores de inocuidad alimentaria, pero la detección de patógenos transmitidos por alimentos en alimentos con bajos recuentos de TAM indica la necesidad de mejorar los sistemas de elaboración y distribución de alimentos en el país.

El estudio encontró una alta prevalencia de *Salmonella* y *L. monocytogenes* en varios alimentos en las ciudades de Guayaquil, Quito y Cuenca en Ecuador. La prevalencia de *Salmonella* en salsas fue del 20%, lo que sugiere una posible preparación y manipulación inadecuadas de las mismas. Las muestras de ceviche y encebollado también mostraron una alta prevalencia de *Salmonella*, lo que indica una higiene o condiciones de preparación inadecuadas. La prevalencia del 20% al 40% de *L. monocytogenes* en queso y la alta incidencia de *L. monocytogenes* en ensalada de frutas sugieren que la composición fisicoquímica de estos alimentos es propicia para el desarrollo de patógenos transmitidos por los alimentos. El estudio encontró múltiples patógenos potenciales y patógenos oportunistas en los alimentos analizados, lo que indica la necesidad de perfeccionar los sistemas de elaboración y distribución de alimentos en el país.

Durante décadas, los recuentos de ciertas bacterias, como TAM, TC, FC y EC, se han utilizado como indicadores de inocuidad alimentaria. Aunque se consideran aceptables los valores de TAM inferiores a 5 log UFC/g para los alimentos RTE, se han encontrado patógenos como *S. flexneri* y *L. monocytogenes* en frutas y ensaladas de frutas de Cuenca, a pesar de la ausencia de TC, FC y EC y los bajos recuentos de TAM, esto sugiere que la mera evaluación de los recuentos de bacterias indicadoras no es suficiente para garantizar la seguridad alimentaria, especialmente en el caso de patógenos transmitidos por los alimentos. Por lo tanto, es importante considerar la necesidad de implementar medidas adicionales de control y monitoreo para garantizar la ausencia de patógenos en los alimentos, especialmente en aquellos que se consumen crudos o sin un tratamiento térmico que pueda eliminar los microorganismos patógenos. También se encontraron patógenos en algunos alimentos que tenían niveles de bacterias indicadoras similares a los de otros alimentos sin patógenos. Además, se detectaron varios patógenos oportunistas en la mayoría de las muestras de alimentos, como especies de *Enterococcus* y *K. pneumoniae*, que pueden causar enfermedades en personas inmunocomprometidas. Se requiere más indagación para evaluar el riesgo y el potencial de biocontrol de estas bacterias en Ecuador. También se encontró *P. sanguinis* y *S. sciuri* en algunos alimentos, que pueden causar infecciones en personas inmunocomprometidas, se encontró que *Serratia* spp. y *Acinetobacter* spp. La presencia de estas bacterias en los alimentos de Ecuador podría ser debido a la contaminación cruzada de ingredientes refrigerados como carne y queso.

La presencia de patógenos oportunistas y niveles elevados de microorganismos indicadores en los alimentos de los mercados callejeros sugiere una manipulación inadecuada de los mismos. Es necesario implementar programas de capacitación sobre buenas prácticas de manipulación de alimentos para mejorar la inocuidad alimentaria. Estos programas educan a los trabajadores sobre la higiene personal, la prevención de la contaminación cruzada y el cumplimiento de regulaciones, reduciendo riesgos de contaminación microbiológica, química y física. Además, contribuyen a la mejora de la calidad del producto, protegen la salud del consumidor al prevenir enfermedades transmitidas por alimentos y fomentan una cultura alimentaria consciente. La capacitación no solo se centra en las prácticas de manipulación, sino también en la gestión eficiente de alimentos, lo que reduce desperdicios y optimiza recursos. Además, se requiere más investigación para caracterizar la patogenicidad y la actividad antimicrobiana de las bacterias detectadas y para evaluar la prevalencia de otros patógenos transmitidos por alimentos no estudiados en este trabajo.

El norovirus y la hepatitis A son dos clases de virus que han sido diagnosticados dentro del grupo de agentes biológicos infecciosos como los principales responsables de las enfermedades transmitidas por los alimentos, incluso según los informes documentados por el Centro de Enfermedades de los Estados Unidos Control y Prevención (CDC), 50% de casos de enfermedad gastrointestinal en la población estadounidense se debe a Norovirus, que puede infectar con una dosis relativamente baja. El gran desafío de este trabajo de investigación fue desarrollar un método que permite determinar la presencia de Norovirus y Hepatitis A en los alimentos, considerando lo complejo que es detectar virus en los alimentos porque estos como tal no proporcionan los requisitos requeridos para llevar a cabo el proceso de replicación y el aumento de la carga viral. Para detectar la carga viral en matrices alimentarias como fresas, espinacas, agua y embutidos, antes era necesario inhibir los compuestos que forman parte del proceso químico y la composición del alimento, como fenoles, vitaminas, proteínas y carbohidratos, para evitar la inhibición del material genético del virus presente en la superficie de la comida.

El estudio presenta ciertas limitaciones que deben ser consideradas en un futuro. En primer lugar, la investigación se concentró en tres ciudades ecuatorianas, lo que podría limitar la generalización de los resultados a nivel nacional, dado que la situación microbiológica de los alimentos puede variar en diferentes regiones del país. Adicionalmente se debió hacer más extensa el tamaño de muestras considerando la diversidad de alimentos consumidos en el Ecuador, tomando muestras en diferentes mercados o expendios de alimentos del país aquello hubiera fortalecido los datos y resultados obtenidos en este estudio abarcando más la situación.

En relación a patógenos importantes no considerados se incluye el *Campilobacter jejuni* presente en alimentos como carnes de ganado vacuno y avícola que fueron tomados como muestras para la caracterización de patógenos considerados en este estudio, la detección de este microorganismo al ser un bacilo microaerófilo que crece en atmósfera con composiciones bajas de oxígeno presenta un grado de complejidad en base a la técnica de muestreo y su análisis microbiológicos para su detección lo cual fue una limitación. Esto implica un desafío importante para futuras investigaciones con la finalidad de determinar la incidencia del patógeno en productos cárnicos que se expenden en el Ecuador.

## 5.2. Recomendaciones

Para resguardar la salud de la población ecuatoriana resulta fundamental asegurar y garantizar la calidad e inocuidad de los productos que son elaborados o procesados para consumo humano. Para ello se debe aplicar un conjunto de medidas preventivas, como buenas prácticas de higiene y manipulación, para evitar la contaminación cruzada y garantizar la ausencia de un peligro potencial para los consumidores. Las diferentes medidas preventivas desarrolladas por diferentes organismos e instituciones deben ser validadas mediante aplicaciones prácticas en cadenas productivas, lugares de expendio de alimentos y distribución enfocando recursos y capacitaciones en las personas, de manera que se sientan comprometidas en aplicar las metodologías de mejora de calidad e inocuidad. La mayoría de los programas de inocuidad alimentaria en el Ecuador se basan en agentes biológicos infecciosos como bacterias y hongos, pero muy poco enfoque sobre los virus transmitidos por alimentos como norovirus y hepatitis A.

Para evaluar los riesgos de inocuidad alimentaria de manera integral se requiere de más estudios, específicamente abordando los siguientes aspectos: 1. Aislamiento y caracterización de las bacterias, en particular de aquellas identificadas en este estudio como *S. flexneri* y *L. monocytogenes*, para comprender mejor sus propiedades genéticas, fisiológicas y patogénicas; 2. Evaluación de la prevalencia y distribución de estas bacterias en una muestra más amplia de alimentos en diferentes regiones de Ecuador, lo que permitiría comprender mejor su impacto a nivel nacional; 3. Análisis de riesgos específico para evaluar el potencial impacto en la salud pública de la presencia de estas bacterias en los alimentos consumidos en Ecuador, y 4. Establecimiento de medidas de prevención y control para reducir el riesgo de contaminación por estas bacterias en los alimentos, basándose en los hallazgos de esta investigación. Por ejemplo, el *Bacillus amyloliquefaciens*, detectado en la mayoría de las muestras, puede ser tanto un agente de deterioro como un biocontrolador de alimentos. En este estudio, su alta prevalencia coincidió con la ausencia de patógenos transmitidos por alimentos en muestras de jugo fresco exprimido en los mercados callejeros. Otras bacterias detectadas, como *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* y *Lactococcus lactis*, también pueden producir compuestos antimicrobianos y se necesita más investigación para evaluar su papel como agentes de biocontrol en los alimentos de Ecuador.

Además, se deben buscar herramientas y tecnologías efectivas para asegurar que el control de virus en los procesos de la cadena alimentaria que permitan disminuir significativamente las infecciones

virales transmitidas por los alimentos. Por lo tanto, se recomienda trabajar a futuro en procedimientos de inocuidad para evitar la propagación del virus a humanos, estudios acerca de los virus que son más persistentes al tratamiento térmico de los alimentos, y para identificar los mecanismos de mutaciones virales asociadas con las condiciones de manipulación y procesamiento de alimentos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Achipia (2017). <https://www.achipia.gob.cl>. Obtenido de <https://www.achipia.gob.cl:https://www.achipia.gob.cl/wp-content/uploads/2018/03/Ficha-Peligro-02-Norovirus-v01.pdf>
2. Aguilera Guirao, A., Romero Yuste, S., & Regueiro, B. J. (2006). Epidemiología y manifestaciones clínicas de las hepatitis virales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 24(4), 264–276. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(06\)73773-9](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(06)73773-9)
3. Akanashi S, Hashira S, Matsunaga T, et al. Detection, genetic characterization, and quantification of norovirus RNA from sera of children with gastroenteritis. *J Clin Virol* 2009; 44:161–163.
4. Al-Kharousi, Z. S., N. Guizani, A. M. Al-Sadi, I. M. Al-Bulushi, and B. Shaharoon. 2016. Hiding in fresh fruits and vegetables: opportunistic pathogens may cross geographical barriers. *Int. J. Microbiol.* 2016:14.
5. Adzitey, F. (2020). Incidence and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from beef (meat muscle, liver and kidney) samples in Wa Abattoir, Ghana. *Cogent Food and Agriculture*, 6 (1). <https://doi.org/10.1080/23311932.2020.1718269>
6. Allender, H. D., S. Buchanan, N. Abdelmajid, I. Arnold, J. Tankson, and J. M. Carter. 2020. Procedure for microbiological baseline surveys conducted by US Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service. *Food Control* 111:6.
7. Anachinaba, A., Adzitey, F., & Teye, GA 2015. Assessment of the Microbial Quality of Locally Produced Meat (Beef and Pork) in Bolgatanga Municipal of Ghana. *Internet Journal of Food Safety*, 17.
8. Anand, V., J. Holmen, M. Neely, P. S. Pannaraj, and J. Dien Bard. 2016. The brief case: neonatal meningitis caused by *Listeria monocytogenes* diagnosed by multiplex molecular panel. *J. Clin. Microbiol.* 54:2846–2849.

9. Aneja, K. R., R. Dhiman, N. K. Aggarwal, V. Kumar, and M. Kaur. 2014. Microbes associated with freshly prepared juices of citrus and carrots. *Int. J. Food Sci.* 2014:7.
10. Andre FE, D'Hondt E, Delem A. Clinical assessment of the safety and efficacy of an inactivated hepatitis A vaccine: rationale and summary of findings. *Vaccine* 1992;10(Suppl 1): S160–S168.
11. Arcos Guamán, T. M. (2022). Evaluación de la calidad microbiológica en función de la norma Inen 2395 en yogures artesanales expandido en la feria de la Plaza Jesús Camañero parroquia matriz del Cantón Alausí. [masterThesis, Ecuador: Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC)]. <http://localhost/handle/27000/8863>
12. Ariño, A., J. A. Beltrán, and P. Roncalés. 2003. Fish: dietary importance of fish and shellfish, p. 2471–2478. In *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Academic Press, London.
13. Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, et al. Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerg Infect Dis* 2008; 14:1553–1557.
14. Ávila-Vega, D. E., B. Álvarez-Mayorga, S. M. Arvizu-Medrano, R. Pacheco-Aguilar, R. Martínez-Peniche, and M. Hernández-Iturriaga. 2014. Microbiological profile and incidence of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* on hydroponic bell peppers and greenhouse cultivation environment. *J. Food Prot.* 77:1904–1910.
15. Azimi, T., Zamirasta, M., Sani, M. A., Soltan Dallal, M. M., & Nasser, A. (2020). Molecular Mechanisms of Salmonella Effector Proteins: A Comprehensive Review. *Infection and Drug Resistance*, 13, 11–26. <https://doi.org/10.2147/IDR.S230604>
16. Babicki, S., D. Arndt, A. Marcu, Y. Liang, J. R. Grant, A. Maciejewski, and D. S. Wishart. 2016. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Res.* 44: W147–W153.
17. Baert, L., M. Uyttendaele, A. Stals, E. Van Coillie, K. Dierick, J. Debevere and N. Botteldoorn. 2009. Reported foodborne outbreaks due to norovirus in Belgium: The link between food and patient investigations in an international context. *Epidemiol. Infect.* 137:316–325.

18. Balayan, M. S. 1992. Natural hosts of hepatitis A virus. doi.org/10.1016/0264-410X(92)90537-T.
19. Bances Torres, F. del S. (2023). Indicadores microbiológicos de calidad sanitaria en las etapas del proceso industrial de agua embotellada de la empresa industrial de bebidas AJEPER – Chiclayo, enero 2021 – julio 2021. <http://repositorio.unprg.edu.pe/handle/20.500.12893/12042>
20. Barclay, L., G. W. Park, E. Vega, A. Hall, U. Parashar, J. Vinjé, and B. Lopman. 2014. Infection control for norovirus. *Clin Microbiol and infect.* 20:731-740. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12674>
21. Becerra, S. C., Roy, D. C., Sanchez, C. J., Christy, R. J., & Burmeister, D. M. (2016). An optimized staining technique for the detection of Gram positive and Gram negative bacteria within tissue. *BMC Research Notes*, 9(1), 216. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-1902-0>
22. Becerril, D., Torres, E., Moreno, G., Aguilar, A., Guzmán, R., & Hernández, R. (2015). <https://www.medigraphic.com>. Obtenido de <https://www.medigraphic.com>: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2015/dcm153e.pdf>
23. Belliot, G., S.V. Sosnovtsev, T. Mitra, C. Hammer, M. Garfield and K.Y Green. 2003. In Vitro Proteolytic Processing of the MD145 Norovirus ORF1 Nonstructural Polyprotein Yields Stable Precursors and Products Similar to Those Detected in Calicivirus-Infected Cells. *J. Virol.* 77:10957-10974. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.20.10957-10974.2003>
24. Bertolotti-Ciarlet, A., S. E. Crawford, A. M. Hutson, and M. K. Estes. 2003. The 3' End of Norwalk Virus mRNA Contains Determinants That Regulate the Expression and Stability of the Viral Capsid Protein VP1: a Novel Function for the VP2 Protein. *J. Virol.* 77:11603-11615. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.21.11603-11615.2003>
25. Bertolotti-Ciarlet, A., L. J. White, R. Chen, B. V. V. Prasad and M. K. Estes. 2002. Structural Requirements for the Assembly of Norwalk Virus-Like Particles. *J. Virol.* 76:4044-4055. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.8.4044-4055.2002>
26. Betts, G. 2006. Other spoilage bacteria, p. 668–695. In *Food spoilage microorganisms*.

Elsevier, Boca Raton, FL.

27. Bindiya, E. S., K. J. Tina, R. S. Sasidharan, and S. G. Bhat. 2019. BaCf3: highly thermostable bacteriocin from *Bacillus amyloliquefaciens* BTSS3 antagonistic on food-borne pathogens. *3 Biotech.* 9:1–7.
28. Bishop NE, Anderson DA. RNA-dependent cleavage of VP0 capsid protein in provirions of hepatitis A virus. *Virology* 1993; 197:616–623.
29. Boillat Blanco N, Kuonen R, Bellini C, et al. Chronic norovirus gastroenteritis in a double hematopoietic stem cell and lung transplant recipient. *Transpl Infect Dis* 2011; 13:213–215.
30. Boratyn, G. M., C. Camacho, P. S. Cooper, G. Coulouris, A. Fong, N. Ma, T. L. Madden, W. T. Matten, S. D. McGinnis, Y. Merezuk, Y. Raytselis, E. W. Sayers, T. Tao, J. Ye, and I. Zaretskaya. 2013. BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Res.* 41: W29–W33.
31. Bower, W. A., O. V. Nainan, X. Han and H. S. Margolis. 2000. Duration of viremia in hepatitis A virus infection. *J. infect.* 182:12-17 <https://doi.org/10.1086/315701>
32. Britt, N. S., and E. M. Potter. 2016. Clinical epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus* bloodstream infections. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 5:57–61.
33. Bruno Salabarría, M. S., & Fuentes Bedoya, E. A. (2021). Análisis de peligros y puntos críticos de control (haccp): Sistema para la gestión de la inocuidad en las industrias agroalimentarias en Colombia. <https://repositorio.unicordoba.edu.co/entities/publication/cb172a85-396d-4b81-9635-0c3a0a482983>
34. Buchanan, R. L., and R. Oni. 2012. Use of microbiological indicators for assessing hygiene controls for the manufacture of powdered infant formula. *J. Food Prot.* 75:989–997.
35. Bullock, N. O., & Aslanzadeh, J. (2013). Biochemical Profile-Based Microbial Identification Systems. In Y.-W. Tang & C. W. Stratton (Eds.), *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology* (pp. 87–121). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3970-7\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3970-7_6)

36. Butot, S, T. Putallaz and G. Sánchez. 2007. Procedure for rapid concentration and detection of enteric viruses from berries and vegetables. *Appl. Environ.* 73:186-192. <https://doi.org/10.1128/AEM.01248-06>
37. Bush, Larry M. 2020. Introducción a las bacterias grampositivas. Manual MDS.
38. Cáceres, M. E. (2019). Formación de biofilms por cepas *Escherichia coli* verocitotoxigénica (VTEC) y *Escherichia coli* enteropatogénica (EPEC) sobre distintas superficies, sometidas a distintas condiciones de estrés. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/84043>
39. Calbo, E., N. Freixas, M. Xercavins, M. Riera, C. Nicolás, O. Monistrol, M. D. M. Solé, M. R. Sala, J. Vila, and J. Garau. 2011. Foodborne nosocomial outbreak of SHV1 and CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology and control. *Clin. Infect. Dis.* 52:743–749.
40. Camargo, AC, Woodward, JJ, Call, DR, & Nero, LA (2017). *Listeria monocytogenes* in Food-Processing Facilities, Food Contamination, and Human Listeriosis: The Brazilian Scenario. *Foodborne Pathogens and Disease*, 14 (11). <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2274>
41. Cao, T., Liu, P., Li, Y., Cui, M., Zhang, C., Wang, Y., Shen, Z., Shen, J., Ke, Y., Wang, S., & Wu, Y. (2021). Prevalence of *Salmonella* and Antimicrobial Resistance in Isolates from Food Animals Six PLADs, China, 2019. *China CDC Weekly*, 3 (24). <https://doi.org/10.46234/ccdcw2021.132>
42. Cao S, Lou Z, Tan M, et al. Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus. *J Virol* 2007; 81:5949–5957.
43. Cartelle Gestal, M., Zurita, J., Paz y Mino, A., Ortega-Paredes, D., & Alcocer, I. (2016). Characterization of a small outbreak of *Salmonella enterica* serovar Infantis that harbor CTX-M-65 in Ecuador. In *Brazilian Journal of Infectious Diseases* (Vol. 20, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2016.03.007>
44. Cartelle Gestal, M., J. Zurita, A. Paz y Mino, D. Ortega-Paredes, and Alcocer. 2016. Characterization of a small outbreak of *Salmonella enterica* serovar Infantis that harbour CTX-

M-65 in Ecuador. *Brazilian J. Infect. Dis.* 20:406–407.

45. Carvajal, C. P. M., Zavala, A. M. M., Ortiz, M. I. P., & Pincay, I. G. P. (2019). Síndrome diarreico infeccioso causado por *Salmonella* spp. *RECIMUNDO*, 3(3), Article 3. [https://doi.org/10.26820/recimundo/3.\(3\).septiembre.2019.493-508](https://doi.org/10.26820/recimundo/3.(3).septiembre.2019.493-508)
46. Caul EO. Small round structured viruses: airborne transmission and hospital control [see comments]. *Lancet* 1994; 343:1240–12
47. Chang KO, Sosnovtsev SV, Belliot G, et al. Stable expression of a Norwalk virus RNA replicon in a human hepatoma cell line. *Virology* 2006; 353:463–473.
48. Chan MC, Ho WS, Sung JJ. In vitro whole-virus binding of a norovirus genogroup II genotype 4 strain to cells of the lamina propria and Brunner's glands in the human duodenum. *J Virol* 2011; 85:8427–8430.
49. Chen, P.-A., Hung, C.-H., Huang, P.-C., Chen, J.-R., Huang, I.-F., Chen, W.-L., Chiou, Y.-H., Hung, W.-Y., Wang, J.-L., & Cheng, M.-F. (2016). Characteristics of CTX-M Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Multiple Rivers in Southern Taiwan. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(6), 1889–1897. <https://doi.org/10.1128/AEM.03222-15>
50. Chomba Valiente, W. W. (2022). Factores relacionados al aborto espontáneo en gestantes adolescentes en el Hospital General de Jaén, Cajamarca 2021. Universidad Nacional de Cajamarca. <http://repositorio.unc.edu.pe/handle/20.500.14074/489>
51. Ceyhun Sezgin, A., & Artık, N. (2015). Toplu tüketim yerlerinde Gıda Güvenliği see HACCP Uygulamaları. *Tourism and Gastronomy Studies*, 3 (2).
52. Cohen L, Benichou D, Martin A. Analysis of deletion mutants indicates that the 2A polypeptide of hepatitis A virus participates in virion morphogenesis. *J Virol* 2002; 76:7495–7505.
53. Corry, J.E.L., Curtis, G.D.W., Baird, R.M. 2003. *Handbook of Culture Media for Food Microbiology*, volumen 37, Elsevier Science.
54. Costa-Mattioli, M., Ferré, V., Casane, D., Perez-Bercoff, R., Coste-Burel, M., Imbert-Marcille,

- B., André-Garnier, E., Bressollette-Bodin, C., Billaudel, S., & Cristina, J. (2003). Evidence of recombination in natural populations of hepatitis A virus. *Virology*, 311, 51–59. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(03\)00109-0](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00109-0)
55. Chen, X., & Chang, X. (2021). Explanation of laws and regulations on fresh-cut fruits and vegetables. *Acta Horticultura*, 1319. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2021.1319.21>
  56. Chiluisa, A., & Gabriela, Y. (2012). Estudio de la calidad de las aguas, y la elaboración del plan de manejo ambiental de protección de fuentes de agua en la microcuenca alta en la comunidad de Apawa, de la parroquia Pilaló – cantón Pujilí – provincia Cotopaxi. <http://localhost/handle/27000/575>
  57. Chiluisa- Guacho, C., Escobar- Perez, J., & Dutra -Asensi, M. (2018). First detection of the CTXM-15 producing *escherichia coli* O25-ST131 pandemic clone in Ecuador. In *Pathogens* (Vol. 7, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/pathogens7020042>
  58. Chowdhury, R., Das, S., Ta, A., & Das, S. (2019). Epithelial invasion by Salmonella Typhi using STIV–Met interaction. *Cellular Microbiology*, 21(3), e12982. <https://doi.org/10.1111/cmi.12982>
  59. Clarridge III JE. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. *Clin Microbiol Rev*. 2004; 17: 840–62.
  60. Clesceri, L.S., Greenberg A.E., Eaton A.D. 1998. Part 9000, Microbiological Examination., *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20th Edition*, APHA.
  61. Choi JM, Hutson AM, Estes MK, et al. Atomic resolution structural characterization of recognition of histo-blood group antigens by Norwalk virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:9175–9180
  62. Cooke, G. S., Andrieux-Meyer, I., Applegate, T. L., Atun, R., Burry, J. R., Cheinquer, H., Dusheiko, G., Feld, J. J., Gore, C., Griswold, M. G., Hamid, S., Hellard, M. E., Hou, J., Howell, J., Jia, J., Kravchenko, N., Lazarus, J. V., Lemoine, M., Lesi, O. A., ... Yau, J. (2019). Accelerating the elimination of viral hepatitis: A Lancet Gastroenterology & Hepatology Commission. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 4(2), 135–184.

[https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(18\)30270-X](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(18)30270-X)

63. Cuevas Ferrer, S. G. (2023). Detección molecular de Norovirus a partir de muestras clínicas y ambientales en Montevideo  
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/42102>.
64. Curtis, G.D.W., Mitchell, R.G., King, A.F. And Griffin, E.J. 1989a. A selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol. 8, 95-98.
65. Dalzini, E., Bernini, V., Bertasi, B., Daminelli, P., Losio, MN, & Varisco, G. (2016). Survey of prevalence and seasonal variability of *Listeria monocytogenes* in raw cow milk from Norther Italy. Food Control, 60. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.08.019>
66. Dakić, I., D. Morrison, D. Vuković, B. Savić, A. Shittu, P. Ježek, T. Hauschild, and S. Stepanović. 2005. Isolation and molecular characterization of *Staphylococcus sciuri* in the hospital environ- ment. J. Clin. Microbiol. 43:2782–2785.
67. De Amorim, A. M. B., and J. D. S. Nascimento. 2017. Acinetobacter: ¿an underrated foodborne pathogen? J. Infect. Dev. Ctries 11:111–114.
68. de Graaf, M., van Beek, J., & Koopmans, M. P. G. (2016). Human norovirus transmission and evolution in a changing world. Nature Reviews Microbiology, 14(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.48>
69. De Souza Couto Oliveira, J., and J. Freitas Brilhante de São José. 2019. Food handling practices and microbial quality in street food. J. Food Nutr. Res. 7:319–324.
70. Denis, N., H. Zhang, A. Leroux, R. Trudel, and H. Bietlot. 2016. Prevalence and trends of bacterial contamination in fresh fruits and vegetables sold at retail in Canada. Food Control 67:225–234.
71. Devleesschauwer, B., J. A. Haagsma, F. J. Angulo, D. C. Bellinger, D. Cole, D. Döpfer, A. Fazil, E. M. Fèvre, H. J. Gibb, T. Hald, M. D. Kirk, R. J. Lake, C. Maertens De Noordhout, C. D. Mathers, S. A. McDonald, S. M. Pires, N. Speybroeck, M. K. Thomas, P. R. Torgerson, F. Wu, A. H. Havelaar, and N. Praet. 2015. Methodological framework for World Health

- Organization estimates of the global burden of foodborne disease. PLoS One 10: e0142498.
72. Dicipinigaitis, P. V., M. De Aguirre, and J. Divito. 2015. *Enterococcus hirae* bacteremia associated with acute pancreatitis and septic shock. Case Rep. Infect. Dis. 2015:1–3.
  73. Donaldson, E. F., L. C. Lindesmith, A.D. Lobue and R. S. Baric. 2010. Viral shape-shifting: Norovirus evasion of the human immune system. Nat. Rev. Microbiol. 8: 231-241.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2296>
  74. Ecuadorian Institute for standardization. (1990). NTE INEN 1529-8 (1990) (Spanish): Microbiological control of food. Determination of fecal coliforms and *E. coli*.
  75. EFSA. (2019). *The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017*. Obtenido de <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2018.5500>
  76. Estrada-García, T., J. F. Cerna, M. R. Thompson, and C. López- Saucedo. 2002. Faecal contamination and enterotoxigenic *Escherichia coli* in street-vended chili sauces in Mexico and its public health relevance. Epidemiol. Infect. 129:223–226.
  77. Estrada-Garcia, T., C. Lopez-Saucedo, B. Zamarripa-Ayala, M. R. Thompson, L. Gutierrez-Cogco, A. Mancera-Martinez, and A. Escobar-Gutierrez. 2004. Prevalence of *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* in street-vended food of open markets (tianguis) and general hygienic and trading practices in Mexico City. Epidemiol. Infect. 132:1181–1184.
  78. Evaluation of microbiological risks in food. Guide for implementation in the countries. (2021). In Microbiological risk assessment in food. Guide for implementation in the countries.  
<https://doi.org/10.37774/9789275323250>
  79. Farmacopea Nacional Argentina, Codex Medicamentarius argentino, Séptima Edición, volumen 1. 2003. Control Microbiológico de Productos no Obligatoriamente Estériles.
  80. Feliciello, I., and G. Chinali. 1993. A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from *Escherichia coli*. Anal. Biochem. 212:394–401.

81. Fernandez, A., Garcia, C., Saez, J., & Valdezate, S. (2010). <https://www.seimc.org>. Obtenido de <https://www.seimc.org>:  
<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>
82. Fiore, A. E. 2004. Hepatitis A transmitted by food. *Clin. Infect. Dis.* 38:705-715  
<https://doi.org/10.1086/381671>
83. Fiore, A. E., A. Wasley and B.P. Bell. 2006. Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR. Recommendations and Reports: Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations and Reports / CDC*, 55: RR-7.
84. Fougy, L., G. Coeuret, M. C. Champomier-Vergès, and S. Chaillou. 2017. Draft genome sequence of *Serratia proteamaculans* MFPA44A14-05, a model organism for the study of meat and seafood spoilage. *Genome Announc.* 5:2.
85. Forbes, Sahm and Weissfeld. 1998. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 10th ed. Mosby, Inc. St. Louis, Mo.
86. Fukuda, S., Y. Sasaki, S. Takao and M. Seno. 2008. Recombinant norovirus implicated in gastroenteritis outbreaks in Hiroshima Prefecture, Japan. *J. Virol.* 80:921-928  
<https://doi.org/10.1002/jmv.21151>
87. Fusco, V., H. Abriouel, N. Benomar, J. Kabisch, D. Chieffi, G.-S. Cho, and C. M. A. P. Franz. 2018. Opportunistic food-borne pathogens, p. 269–306. In *Food safety and preservation*. Elsevier, London.
88. Galvañ, P. J. V., & Beneyto, M. S. (2009). *Curso de manipulador de agua de consumo humano*. Universidad de Alicante.
89. Gerondopoulos A, Jackson T, Monaghan P, et al. Murine norovirus-1 cell entry is mediated through a non-clathrin-, non-caveolae-, dynamin- and cholesterol-dependent pathway. *J Gen Virol* 2010; 91:1428–1438.

90. Gingrich, G. A., S. C. Hadler, H. A. Elder and K.O. Ash. 1983. Serologic investigation of an outbreak of hepatitis A in a rural day-care center. *Am. J. Public Health.* 73:1190-1194  
<https://doi.org/10.2105/AJPH.73.10.1190>
91. Glass PJ, White LJ, Ball JM, et al. Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *J Virol* 2000; 74:6581–6591.
92. Goja, A. M., T. A. A. Ahmed, S. A. M. Saeed, and H. A. Dirar. 2013. Isolation and identification of *Staphylococcus* spp. in fresh beef. *Pakistan J. Nutr.* 12:114–120.
93. Gómez-Duarte, O. G. (2014). Enfermedad diarreica aguda por *Escherichia coli* patógenas en Colombia. *Revista Chilena de Infectología: Órgano Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología*, 31(5), 577–586. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182014000500010>
94. Gonzalez, J., Pereira, N., Soto, Z., Hernandez, E., & Villareal, J. (2014). <http://www.scielo.org.co>. Obtenido de <http://www.scielo.org.co>: <http://www.scielo.org.co/pdf/sun/v30n1/v30n1a09.pdf>
95. Goodfellow I, Chaudhry Y, Gioldasi I. Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF 4 E. *EMBO Rep* 2005; 6:968–972.
96. Goswami BB, Kulka M, Ngo D. Apoptosis induced by a cytopathic hepatitis A virus is dependent on caspase activation following ribosomal RNA degradation but occurs in the absence of 2'-5' oligoadenylate synthetase. *Antiviral Res* 2004; 63:153–166.
97. Grace, D. 2015. Food safety in low and middle income countries. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12:10490–10507.
98. Green, K. Y. 2013. Caliciviridae: The noroviruses. In *Fields Virology: Sixth Edition*
99. Green, K. Y., T. Ando, M.S. Balayan, T. Berke, I. N. Clarke, M. K. Estes, H. J. Thiel. 2000. Taxonomy of the caliciviruses. *J. Infect.* 181 Suppl 2: S322–30 <https://doi.org/10.1086/315591>
100. Green KY, Mory A, Fogg MH, et al. Isolation of enzymatically active replication complexes from feline calicivirus-infected cells. *J Virol* 2002; 76:8582–8595
101. Griffin, S., Falzon, O., Camilleri, K., & Valdramidis, VP (2020). Bacterial and fungal

- contaminants in caprine and ovine cheese: A meta-analysis assessment. *Food Research International*, 137. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109445>
102. Griffin, S. M., N.E. Brinkman, E. J. Hedrick, E. R. Rhodes, and G. S. Fout. 2014. Comparison of nucleic acid extraction and reverse transcription-qPCR approaches for detection of GI and GII noroviruses in drinking water. *J. Virol.* 199:76-85  
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.01.005>
103. S., D. Mann, and W. Q. Alali. 2017. *Salmonella* prevalence associated with chicken parts with and without skin from retail establishments in Atlanta metropolitan area, Georgia. *Food Control* 73:462–467.
104. Guran, H.S., Mann, D., & Alali, W.Q. (2017). *Salmonella* prevalence associated with chicken parts with and without skin from retail establishments in Atlanta metropolitan area, Georgia. *Food Control*, 73. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.08.038>
105. Gürtler V, Stanisich VA. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiol.* 1996; 142: 3 – 16.
106. OieHanchi, H., W. Mottawea, K. Sebei, and R. Hammami. 2018. The genus *Enterococcus*: between probiotic potential and safety concerns—an update. *Front. Microbiol.* 9:1–16.
107. Häfliger, D., M. Gilgen, J. Lüthy, and P. Hübner. 1997. Seminested RT-PCR systems for small round structured viruses and detection of enteric viruses in seafood. *Int. J. Food Microbiol.* 37:27-36 [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)00041-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00041-X)
108. Hardy, M. E., and M. K. Estes. 1996. Completion of the Norwalk virus genome sequence. *Virus Genes*, 12:287-290 <https://doi.org/10.1007/BF00284649>
109. Herbert TP, Brierley I, Brown TD. Detection of the ORF3 polypeptide of feline calicivirus in infected cells and evidence for its expression from a single, functionally bicistronic, subgenomic mRNA. *J Gen Virol* 1996; 77:123–127.

110. Herrera, A., B. J. Espinosa, G. Nuñez, N. Espinoza, R. C. Maves, and G. J. Martin. 2010. The effect of preparation of cebiche on the survival of enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, and *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Travel Med.* 17:395–399.
111. Herrera, J., & Badilla, J. (31 de Mayo de 2019). <https://www.scielo.sa.cr>. Obtenido de <https://www.scielo.sa.cr>: <https://www.scielo.sa.cr/pdf/mlcr/v36n2/2215-5287-mlcr-36-02-101.pdf>
112. Hedman, HD, Eisenberg, JNS, vasco, KA, Blair, CN, Trueba, G., Berrocal, VJ, & Zhang, L. (2019). High prevalence of extended-spectrum beta-lactamase ctx -m-producing *Escherichia coli* in small-scale poultry farming in rural Ecuador. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 100 (2). <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0173>
113. Hoa Tran, T. N., E. Trainor, T. Nakagomi, N. A. Cunliffe, and O. Nakagomi. 2013. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: Global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. *J. Clin. Virol.* 56:269-277 <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.11.011>
114. Hoffmann, S., Devleeschauwer, B., Aspinall, W., Cooke, R., Corrigan, T., Havelaar, A., Angulo, F., Gibb, H., Kirk, M., Lake, R., Speybroeck, N., Torgerson, P., & Hald, T. (2017). Attribution of global foodborne disease to specific foods: Findings from a World Health Organization structured expert elicitation. *PLOS ONE*, 12 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183641>
115. Hussey RJ, Coates L, Gill RS, et al. A structural study of norovirus 3C protease specificity: binding of a designed active site-directed peptide inhibitor. *Biochemistry* 2011; 50:240–249
116. Hunt DE, Klepac-Ceraj V, Acinas SG, Gautier C, Bertilsson S, Polz MF. Evaluation on 23 s rRNA PCR primers for use in phylogenetic studies of bacterial diversity. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72: 2221–5.
117. IAEA. (2018, March 29). Contaminantes de los alimentos [Text]. IAEA.

<https://www.iaea.org/es/temas/contaminantes-de-los-alimentos>

118. Ibarra-Sánchez, L. A., M. L. Van Tassell, and M. J. Miller. 2017. Invited review: Hispanic-style cheeses and their association with *Listeria monocytogenes*. *J. Dairy Sci.* 100:2421–2432.
119. Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo. España, 25 de Febrero de 2022. <https://www.insst.es>. Obtenido de <https://www.insst.es>: <https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/bacterias/listeria-monocytogenes#bibliografia0>
120. Intriago, L., Talledo, V., Arteaga, R., Pazmiño, A., Cuenca-Nevárez, G., Intriago, L., Talledo, V., Arteaga, R., Pazmiño, A., & Cuenca-Nevárez, G. (2023). Análisis de la inhibición de microorganismos proteolíticos en filetes de tilapia roja (*Oreochromis spp.*) conservados con propóleo (*Apis mellifera* Linnaeus). *LA GRANJA. Revista de Ciencias de la Vida*, 38(2), 17–32. <https://doi.org/10.17163/lgr.n38.2023.02>
121. ISO 4831:2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms. Most probable number techniques.
122. Isenberg HD, editor. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, American Society for Microbiology. Washington DC: ASM Press; 2004. p. 3213–323.
123. Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN). 1990. Control microbiológico de los alimentos. Determinación de coliformes fecales y *E. coli*. NTE INEN 1529-8, p. 1–11. INEN, Quito, Ecuador.
124. Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN). 2006. Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos. NTE INEN 1529-5. INEN, Quito, Ecuador.
125. Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN). 2009. Control microbiológico de los alimentos. Determinación de microorganismos coliformes por la técnica del número más probable. NTE INEN 1529-6, p. 11. INEN, Quito, Ecuador.
126. Jackson, C. R., J. A. Davis, and J. B. Barrett. 2013. Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from retail meat and humans in Georgia.

- J. Clin. Microbiol. 51:1199–1207.
127. Jacobsen, A., Hendriksen, R. S., Aaresturp, F. M., Ussery, D. W., & Friis, C. (2011). The *Salmonella enterica* Pan-genome. *Microbial Ecology*, 62(3), 487–504. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9880-1>
128. Jean-Gilles Beaubrun, J., C. M. Cheng, K. S. Chen, L. Ewing, H. Wang, M. C. Agpaoa, M. C. J. Huang, E. Dickey, J. M. Du, D. M. Williams-Hill, B. Hamilton, S. A. Micallef, R. E. Rosenberg Goldstein, A. George, S. W. Joseph, A. R. Sapkota, A. P. Jacobson, B. D. Tall, M. H. Kothary, K. Dudley, and D. E. Hanes. 2012. The evaluation of a PCR-based method for identification of *Salmonella enterica* serotypes from environmental samples and various food matrices. *Food Microbiol.* 31:199–209.
129. Jennison, A. V., and N. K. Verma. 2004. *Shigella flexneri* infection: Pathogenesis and vaccine development. *FEMS Microbiol. Rev.* 28:43–58.
130. Jiang X, Wang M, Graham DY. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol* 1992; 66:6
131. Jiang X, Wilton N, Zhong WM, et al. Diagnosis of human caliciviruses by use of enzyme immunoassays. *J Infect Dis* 2000;181(Suppl 2): S349–S359.
132. Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2003; 41:1548–1557.
133. Kaplan JE, Gary GW, Baron RC, et al. Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of Norwalk virus in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis. *Ann Intern Med* 1982; 96:756–761.
134. Karah N, Haldorsen B, Hegstad K, Simonsen GS, Sundsfjord A, Samuelsen O, on behalf of the Norwegian Study Group of *Acinetobacter*. Species identification and molecular characterization of *Acinetobacter spp.* blood culture isolates from Norway. *J Antimicrob*

Chemother. 2011; 66: 738 – 44.

135. Khan, A. S., K. Georges, S. Rahaman, W. Abdela, and A. A. Adesiyun. 2018. Prevalence and serotypes of *Salmonella spp.* on chickens sold at retail outlets in Trinidad. PLoS One 13: e0202108.
136. Kim, J., T. Demeke, R. M. Clear, and S. K. Patrick. 2006. Simultaneous detection by PCR of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* in artificially inoculated wheat grain. Int. J. Food Microbiol. 111:21–25.
137. Kim, H. S., J. Hyun, H. S. Kim, J. S. Kim, W. Song, and K. M. Lee. 2013. Emergence of GII.4 Sydney norovirus in South Korea during the winter of 2012-2013. J. Microbiol. Biotechnol. 23:1641-1643 <https://doi.org/10.4014/jmb.1308.08053>
138. Kim, S. H., D. S. Cheon, J. H. Kim, D. H. Lee, W.H Jheong, Y. J. Heo, and J. S. Lee. 2005. Outbreaks of gastroenteritis that occurred during school excursions in Korea were associated with several waterborne strains of norovirus. J. Clin. Microbiol. 43:4836-4839. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4836-4839.2005>
139. Kirs M, Depaola A, Fyfe R, Jones JL, Krantz J, Van Laanen A, D. Cotton and Castle. A survey of oysters (*Crassostrea gigas*) in New Zealand for *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. Int J Food Microbiol. 2011;147(2):149–53.
140. Koff, R. S. 1992. Clinical manifestations and diagnosis of hepatitis A virus infection. Vaccine, 10: S15-S17. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(92\)90533-P](https://doi.org/10.1016/0264-410X(92)90533-P)
141. Kong, B. H., S. G. Lee, S. H. Han, J. Y. Jin, W. H. Jheong, and S. Y. Paik. 2015. Development of enhanced primer sets for detection of norovirus. BioMed Res. Int. 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/103052>
142. Krugman, S., and J. P. Giles. 1970. Viral hepatitis: new light on an old disease. Trans Assoc Am Physicians. 212:6 <https://10.1001/jama.1970.03170190035005>

143. Labbé, D., R. Margesin, F. Schinner, L. G. Whyte, and C. W. Greer. 2007. Comparative phylogenetic analysis of microbial communities in pristine and hydrocarbon-contaminated alpine soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 59(2):466–475.
144. Lake R, Hudson A, Cressey P, Nortje G. Risk profiles for the foods New Zealanders eat: Project F13ra3. New Zealanders: Ministry of Health; 2000.
145. Lake R, Hudson A, Cressey P, Gilbert S. Risk profile: *Listeria monocytogenes* in soft cheeses. NZFSA; 2005.
146. Lambden PR, Caul EO, Ashley CR, et al. Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. *Science* 1993; 259:516–519
147. Larrea-Murrell, J. A., Rojas-Badía, M. M., Romeu-Álvarez, B., Rojas-Hernández, N. M., & Heydrich-Pérez, M. (2013). Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: Revisión de la literatura. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 44(3), 24–34.
148. Law, J. W.-F., Ab Mutalib, N.-S., Chan, K.-G., & Lee, L.-H. (2015). An insight into the isolation, enumeration, and molecular detection of *Listeria monocytogenes* in food. *Frontiers in Microbiology*,  
<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2015.01227>
149. Leiva, J., Alonso, M. F., Rubio, M., & Ruiz-Bravo, A. (2018). Infecciones por *Salmonella* y *Yersinia*. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 12(50), 2941–2951. <https://doi.org/10.1016/j.med.2018.02.011>
150. Lista Pombo, I. (2020). Efecto de las mutaciones en la posición 458 del ARNr 23S de *Escherichia coli*. <https://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/27133>
151. Le Gall G, Huguet S, Vende P, et al. European brown hare syndrome virus: molecular cloning and sequencing of the genome. *J Gen Virol* 1996; 77:1693–1697
152. Lank CA, Anderson DA, Beard M, et al. Infection of polarized cultures of human intestinal epithelial cells with hepatitis A virus: vectorial release of progeny virions through apical cellular membranes. *J Virol* 2000; 74:6476–6484.

153. Lednar, W. M., S. M. Lemon, J. W. Kirkpatrick, R. R. Redfield, M. L. Fields, and P. W. Kelley. 1985. Frequency of illness associated with epidemic hepatitis A virus infection in adults. *Am. J. Epidemiol* 122:226-233. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a114093>
154. Lemon, S. M., R. W. Jansen, and E. A. Brown. 1992. Genetic, antigenic and biological differences between strains of hepatitis A virus. *Vaccine*. 10: S40-S44 [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(92\)90540-Z](https://doi.org/10.1016/0264-410X(92)90540-Z)
155. Levy AG, Widerlite L, Schwartz CJ, et al. Jejunal adenylate cyclase activity in human subjects during viral gastroenteritis. *Gastroenterology* 1976; 70:321–325.
156. Lim, S., H.-J. Yu, S. Lee, E.-J. Joo, J.-S. Yeom, H.-Y. Woo, H. Park, and M.-J. Kwon. 2017. First case of *Psychrobacter sanguinis* bacteremia in a Korean patient. *Ann. Clin. Microbiol.* 20:74.
157. Liu, W., J. Zhai, J. Liu, and Y. Xie. 2010. Identification of recombination between subgenotypes IA and IB of hepatitis A virus. *Virus Genes*. 40:222-224 <https://doi.org/10.1007/s11262-009-0431-5>
158. Lowther, J. A., A. Bosch, S. Butot, J. Ollivier, D. Mâde, S. A. Rutjes, A. Leclercq, 2019. Validation of EN ISO method 15216 - Part 1 – Quantification of hepatitis A virus and norovirus in food matrices. *Int. J. Food Microbiol*, 288:82-90. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.014>
159. MacFaddin. 1985. Media for isolation-cultivation-identification maintenance of medical bacteria, volume 1. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
160. MacFaddin. 2000. Biochemical tests for identification of medical bacteria, 3rd ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
161. Mandez-Vega V, Sosnovtsev SV, Belliot G, et al. Norwalk virus N terminal nonstructural protein is associated with disassembly of the Golgi complex in transfected cells. *J Virol* 2004;

78:4827–4837.

162. Manual de microbiología general / María M. Reynoso et al., -1a ed. -Río Cuarto: Uní Río Editora,2015. ISBN 978-987-688
- <https://www.unrc.edu.ar/unrc/comunicacion/editorial/repositorio/978-987-688-124-1.pdf>
163. Marin Mendez, M., Rodríguez Julian, A. R., Minier Pouyou, L., Zayas Tamayo, E., Soler Santana, R., Marin Mendez, M., Rodríguez Julian, A. R., Minier Pouyou, L., Zayas Tamayo, E., & Soler Santana, R. (2020). Caracterización de agentes bacterianos aislados en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. MEDISAN, 24(2), 235–251.
164. Martín Juárez, B. (2005). Estudio de las comunidades microbianas de embutidos fermentados ligeramente acidificados mediante técnicas moleculares. Estandarización, seguridad y mejora tecnológica. In TDX (Tesis Doctoral en Xarxa) (east=2.821426400000064; north=41.9794005; name=Girona). Universitat de Girona. <https://dugi-doc.udg.edu/handle/10256/4480>
165. Mattison, K. 2011. Norovirus as a Foodborne Disease Hazard. In Adv. Food Nutr.62:1-39. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385989-1.00001-6>
166. Mathur, P., and D. W. Schaffner. 2013. Effect of lime juice on *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella enterica* inactivation during the preparation of the raw fish dish ceviche. J. Food Prot. 76:1027–1030.
167. Maritschnik, S., E. E. Kanitz, E. Simons, M. Höhne, H. Neumann, F. Allerberger, I. Lederer. 2013. A Food Handler-Associated, Foodborne Norovirus GII.4 Sydney 2012- Outbreak Following a Wedding Dinner, Austria, October 2012. Food Environ Virol. 5:220-225 <https://doi.org/10.1007/s12560-013-9127-z>
168. Marshall, J. A., and L. D. Bruggink, 2011. The dynamics of norovirus outbreak epidemics: recent insights. Int. J. Environ. Res. Public Health. 8:1141-1149 <https://doi.org/10.3390/ijerph8041141>
169. Marshall (ed.). 1993. Standard methods for the examination of dairy products, 16th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

170. Martinez-Rios, V., and P. Dalgaard. 2018. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in European cheeses: a systematic review and meta- analysis. *Food Control* 84:205–214.
171. Marionneau S, Ruvoen N, Le Moullac-Vaidye B, et al. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology* 2002; 122:1967–1977.
172. Mehboob, A., and T. Abbas. 2019. Evaluation of microbial quality of street food in Karachi City, Pakistan: an epidemiological study. *Microbiol. Res. (Pavia)* 10:1–7.
173. Mensah, P., D. Yeboah-Manu, K. Owusu-Darko, and A. Ablordey. 2002. Street foods in Accra, Ghana: ¿how safe are they? *Bull. W.H.O.* 80:546–554.
174. Martin D Kirk et al., 2015. World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: a data synthesis. *PLoS Medicine*, 3 (12).
175. Meyers G, Wirblich C, Thiel HJ. Genomic and subgenomic RNAs of rabbit hemorrhagic disease virus are both protein-linked and packaged into particles. *Virology* 1991; 184:677–686.
176. Ministry of Public Health. (2020). *Vigilance Subsystem \_ Sive - Alert Diseases Transmitted by Water and Food Ecuador*. National Epidemiological Surveillance Directorate, 53 (2).
177. *Microbiological control of food. Determination of the amount of mesophilic aerobic microorganisms*. Rep., Ecuadorian Institute for Standardization (2006).
178. Ministerio de Salud Pública. (29 de Enero de 2021). <https://www.salud.gob.ec>. Obtenido de <https://www.salud.gob.ec>: <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2021/01/Etas-SE-03.pdf>
179. Ministerio de Salud Pública. (2021). <https://www.salud.gob.ec>. Obtenido de <https://www.salud.gob.ec>: <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2021/05/Etas-SE-18.pdf>
180. Morillo, S. G., A. Cilli, R. D. C .C Carmona, and M. D. C. S. T. Timenetsky. 2008. Identification

- and molecular characterization of norovirus in São Paulo State, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 39:619-622 <https://10.1590/S1517-83822008000400004>
181. Morales M, Barcena J, Ramirez MA, et al. Synthesis in vitro of rabbit hemorrhagic disease virus subgenomic RNA by internal initiation on (-) sense genomic RNA: mapping of a subgenomic promoter. *J Biol Chem* 2004; 279:17013–17018
182. Morales, Y., Corral, A., Pazos, L., Ramirez, A., Martinez, R., & Muñoz, J. (02 de Diciembre de 2012). <http://www.scielo.org.co>. Obtenido de <http://www.scielo.org.co>: <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v14n2/v14n2a16.pdf>
183. Morotti RA, Kaufman SS, Fishbein TM, et al. Calicivirus infection in pediatric small intestine transplant recipients: pathological considerations. *Hum Pathol* 2004; 35:1236–1240.
184. MSP. (2020). <https://www.salud.gob.ec>. Obtenido de <https://www.salud.gob.ec>: [https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2020/03/ETAS-SE-09\\_2020.pdf](https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2020/03/ETAS-SE-09_2020.pdf)
185. MSP. (2023). Enfermedades-Transmitidas-por-agua-o-alimentos-2023 – Ministerio de Salud Pública. <https://www.salud.gob.ec/enfermedades-transmitidas-por-agua-o-alimentos-2023/>
186. Murata T, Katsushima N, Mizuta K, et al. Prolonged norovirus shedding in infants <or=6 months of age with gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J* 2007; 26:46–49
187. Murray P.R., Baron, Pfaller, Tenover and Tenover. 1999. *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
188. Nemeghaire, S., M. A. Argudín, A. T. Feßler, T. Hauschild, S. Schwarz, and P. Butaye. 2014. The ecological importance of the *Staphylococcus sciuri* species group as a reservoir for resistance and virulence genes. *Vet. Microbiol.* 171:342–356.
189. Nejati, M., A. Teimori, R. Taherkhani, S. Jalilian, and M. Makvandi. 2019. Investigation of the complete sequence of hepatitis A virus 1B isolated in Ahvaz City, Iran. *Jundishapur J Microbiol.* 12:2 <https://doi.org/10.5812/jjm.83965>
190. Njiru ZK, Mikosza AS, Armstrong T, Enyaru JC, Ndung'u JM, Thompson AR. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method for Rapid Detection of *Trypanosoma brucei*

- rhodesiense. PLoS Negl Trop Dis. 2008;2(2): e147. doi: 10.1371/journal.pntd.0000147.
191. Niu, J., Wang, K., Graham, S., Azfer, A., & Kolattukudy, P. E. (2011). MCP-1-induced protein attenuates endotoxin-induced myocardial dysfunction by suppressing cardiac NF- $\kappa$ B activation via inhibition of I $\kappa$ B kinase activation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 51(2), 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.04.018>
192. Nougayrède, J.-P., Fernandes, P. J., & Donnenberg, M. S. (2003). Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. *Cellular Microbiology*, 5(6), 359–372. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00281.x>
193. Nyambura Kariuki, E., Z. Waithera Ng'ang'a, and P. Wanzala. 2017. Food-handling practices and environmental factors associated with food contamination among street food vendors in Nairobi County, Kenya: a cross-sectional study. *East African Heal. Res. J.* 1:62–71.
194. Nyenje, M. E., C. E. Odjadjare, N. F. Tanih, E. Green, and R. N. Ndip. 2012. Foodborne pathogens recovered from ready-to-eat foods from roadside cafeterias and retail outlets in Alice, Eastern Cape Province, South Africa: public health implications. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 9:2608–2619.
195. Odeyemi, O. A. 2016. Public health implications of microbial food safety and foodborne diseases in developing countries. *Food Nutr. Res.* 60:29819.
196. Odwar, J. A., G. Kikvi, J. N. Kariuki, and S. Kariuki. 2014. A cross-sectional study on the microbiological quality and safety of raw chicken meats sold in Nairobi, Kenya. *BMC Res. Notes* 7:1–8.
197. Ogidi, O. C., V. O. Oyetayo, and B. J. Akinyele. 2016. Microbial quality and antibiotic sensitivity pattern of isolated microorganisms from street foods sold in Akure Metropolis, Nigeria. *Jordan J. Biol. Sci.* 9:227–234.
198. Ojer-Usoz, E., González, D., & Vitas, Al 2017. Clonal diversity of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from environmental, human and food samples. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14 (7). <https://doi.org/10.3390/ijerph14070676>

199. OMS. (2020). Inocuidad de los alimentos. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
200. OMS. (2023, September 25). Botulismo. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/botulism>
201. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2010. Guía para muestreo de alimentos. [en línea]  
<http://www.rlc.fao.org/es/inocuidad/codex/rla3014/pdf/muest02.pdf>
202. Ortega-Paredes, D., Barba, P., Espinel, N., Mena, S., Crespo-Pérez, V., & Zurita, J. (2019). *Escherichia coli* Producing CTX-M-Type Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL) Isolated from an Urban River, Drinking Water and Raw Vegetables in Quito, Ecuador. *ASM Microbe* 2016.
203. Pakbin, B., Brück, W. M., & Rossen, J. W. A. (2021). Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 9922. <https://doi.org/10.3390/ijms22189922>
204. Pascual, M 2005 Tinción de Gram. Sitio web. Obtenido de [https://www2.ulpgc.es/hege/almacen/download/35/35696/tincion\\_de\\_gram.pdf](https://www2.ulpgc.es/hege/almacen/download/35/35696/tincion_de_gram.pdf)
205. Patel, M. M., A. J. Hall, J. Vinjé, and U. D. Parashar. 2009. Noroviruses: A comprehensive review. *J. Clin. Virol.* 44:1-8 <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2008.10.009>
206. Pesavento, P. A., Stokol, T., Liu, H., van der List, D. A., Gaffney, P. M., & Parker, J. S. (2011). Distribution of the Feline Calicivirus Receptor Junctional Adhesion Molecule A in Feline Tissues. *Veterinary Pathology*, 48(2), 361–368. <https://doi.org/10.1177/0300985810375245>
207. Pereira, K. S., C. A. Cayres, J. Q. Chaves, J. T. De Brito, L. Rabinovitch, and A. M. Vivoni. 2018. Deterioração em molhos para salada com formação de gás causada por *Bacillus amyloliquefaciens*. *Brazilian J. Food Technol.* 21:1–6.
208. Pérez LJ, Perera CL, Frías MT, Núñez JI, Ganges L, Díaz de Arce H. A multiple SYBR Green I-based real-time PCR system for the simultaneous detection of porcine circovirus type 2, porcine parvovirus, pseudorabies virus and Torque teno sus virus 1 and 2 in pigs. *J Virol*

- Methods. 2012; 179:233-241.
209. Perry JW, Taube S, Wobus CE. Murine norovirus-1 entry into permissive macrophages and dendritic cells is pH-independent. *Virus Res* 2009; 143:125–129
210. Phillips G, Tam CC, Rodrigues LC, et al. Prevalence and characteristics of asymptomatic norovirus infection in the community in England. *Epidemiol Infect* 2010;138(10):1454–145
211. Pintó, R. M., L. Aragonés, M. I. Costafreda, E. Ribes and A. Bosch. 2007. Codon usage and replicative strategies of hepatitis A virus. *Virus Res.* 127:158-163.  
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.04.010>
212. Pires, S. M., Desta, B. N., Mughini-Gras, L., Mmbaga, B. T., Fayemi, O. E., Salvador, E. M., Gobena, T., Majowicz, S. E., Hald, T., Hoejskov, P. S., Minato, Y., & Devleeschauwer, B. (2021). Burden of foodborne diseases: Think global, act local. *Current Opinion in Food Science*, 39, 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.01.006>
213. Polkowska, A., M. Rönqvist, O. Lepistö, M. Roivainen, L. Maunula, S. Huusko, R. Rimhanen-Finne. 2014. Outbreak of gastroenteritis caused by norovirus GII.4 Sydney variant after a wedding reception at a resort/activity centre, Finland, August 2012. *Epidemiol. Infect.* 142:1877- 1883. <https://doi.org/10.1017/S0950268813002847>
214. Prasad, B. V. V., M. E. Hardy, T. Dokland, J. Bella, M. G. Rossmann and M. K. Estes, M. K. 1999. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science*, 286:287-290.  
<https://doi.org/10.1126/science.286.5438.287>
215. Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, et al. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 1999; 286:287–290.
216. Prasad BV, Matson DO, Smith AW. Three-dimensional structure of calicivirus. *J Mol Biol* 1994; 240:256–264.
217. Pramono, H., Kurniawan, A., Andika, N., Putra, TF, Hazwin, MAR, Utari, S., Kurniawan, AP, Masithah, ED, & Sahidu, AM (2019). Detection of antibiotic-resistant *Salmonella* sp. in the

- seafood products of Surabaya local market. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 236 (1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/236/1/012115>
218. Ramírez, L. C. C., Lozano, L. C., Ramírez, L. C. C., & Lozano, L. C. (2020). Principios físicoquímicos de los colorantes utilizados en microbiología. *Nova*, 18(33), 73–100. <https://doi.org/10.22490/24629448.3701>
219. Rajat Nag R, Russell, Nolan R *et al.* 2021 Quantitative microbial risk assessment associated with ready-to-eat salads following the application of farmyard manure and slurry or anaerobic digestate to arable lands. *Rev. Elsevier B.V.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151227>
220. Rio, D. C., M. Ares, G.J. Hannon, and T. W. Nilsen. 2010. Purification of RNA using TRIzol (TRI Reagent). *Cold Spring Harbor Protoc.* 2010:6. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5439>
221. Rodicio, M. del R., & Mendoza, M. del C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4), 238–245.
222. Rohde, M. (2019). The Gram-Positive Bacterial Cell Wall. *Microbiology Spectrum*, 7(3), 10.1128/microbiolspec.gpp3-0044–2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0044-2018>
223. Rojas, P. (2018). <https://www.researchgate.net>. Obtenido de [https://www.researchgate.net](https://www.researchgate.net/publication/326557298_Metodos_de_Secuenciacion_de_ADN): [https://www.researchgate.net/publication/326557298\\_Metodos\\_de\\_Secuenciacion\\_de\\_ADN](https://www.researchgate.net/publication/326557298_Metodos_de_Secuenciacion_de_ADN)
224. Rosas-Barbosa, B. T., A. L.-J. Morales, R. Alaniz, A. Ramírez- Álvarez, J. P. Soltero-Ramos, R. de la Mora-Quiroz, P. Martin, and C. Jacquet. 2014. Presencia y persistencia de *Listeria* en cuatro queserías artesanales de Jalisco, México. *e-CUCBA* 2:3–37.
225. Saggese, A., R. Culurciello, A. Casillo, M. M. Corsaro, E. Ricca, and L. Baccigalupi. 2018. A marine isolate of *Bacillus pumilus* secretes a pumilacidin active against *Staphylococcus aureus*. *Mar. Drugs* 16:1– 13.
226. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, et al. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg Infect Dis* 2011; 17:7–15
227. Schiff, E. R. (1992). Atypical clinical manifestations of hepatitis A. *Vaccine*, 10: S18-S20.

[https://doi.org/10.1016/0264-410X\(92\)90534-Q](https://doi.org/10.1016/0264-410X(92)90534-Q)

228. Schwidder, M., Heinisch, L., & Schmidt, H. (2019). Genetics, Toxicity, and Distribution of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Hemolysin. *Toxins*, 11(9), 502. <https://doi.org/10.3390/toxins11090502>
229. Siebenga, J. J., H. Vennema, B. Renckens, E. de Bruin, B. van der Veer, R. J Siezen, and M. Koopmans. 2007. Epochal Evolution of GGII.4 Norovirus Capsid Proteins from 1995 to 2006. *J. Virol.* 81:9932-9941. <https://doi.org/10.1128/jvi.00674-07>
230. Silvera (2018). MicroStation-Silvera <https://www.silveracei.com.mx/equipos/microstation/>
231. Smith, B., and A. Fazil. 2019. How will climate change impact microbial foodborne disease in Canada? *Can. Commun. Dis. Rep.* 45:108–113.
232. Smittle, R. B. 2000. Microbiological safety of mayonnaise, salad dressings, and sauces produced in the United States: a review. *J. Food Prot.* 63:1144–1153.
233. Stuart AD, Brown TD. Entry of feline calicivirus is dependent on clathrin-mediated endocytosis and acidification in endosomes. *J Virol* 2006; 80:7500–7509.
234. Sobel, J., N. Tucker, A. Sulka, J. McLaughlin, and S. Maslanka. 2004. Foodborne botulism in the United States, 1990–2000. *Emerg. Infect. Dis.* 10:1606–1611.
235. Soltan Dallal, M. M., Motalebi, S., Masoumi Asl, H., Sharifi Yazdi, M. K., & Rahimi Forushani, A. (2020). Antimicrobial investigation on the multi-state outbreak of salmonellosis and shigellosis in Iran. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*, 34, 49. <https://doi.org/10.34171/mjiri.34.49>
236. Song, A., L. In, S. Lim, and R. Rahim. 2017. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. *Microb. Cell Fact.* 16:1–15.
237. Soria Segarra, C., Soria Baquero, E., & Cartelle Gestal, M. (2018). High Prevalence of CTX-M-1-Like Enzymes in Urinary Isolates of *Escherichia coli* in Guayaquil, Ecuador. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, NY)*, 24 (4). <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0325>
238. Starosila, D., S. Rybalko, L. Varbanetz, N. Ivanskaya, and I. Sorokulova. 2017. Anti-influenza

- activity of a *Bacillus subtilis* probiotic strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61:1–11.
239. Stuart AD, Brown TD. Entry of feline calicivirus is dependent on clathrin-mediated endocytosis and acidification in endosomes. *J Virol* 2006; 80:7500–7509.
240. Sosnovtsev SV, Green KY. Identification and genomic mapping of the ORF3 and VPg proteins in feline calicivirus virions. *Virology* 2000; 277:193–203
241. Sosnovtsev SV, Belliot G, Chang KO, et al. Feline calicivirus VP2 Is essential for the production of infectious virions. *J Virol* 2005; 79:4012–4024
242. Sosnovtseva SA, Sosnovtsev SV, Green KY. Mapping of the feline calicivirus proteinase responsible for autocatalytic processing of the nonstructural polyprotein and identification of a stable proteinase-polymerase precursor protein. *J Virol* 1999; 73:6626–6633.
243. Subsecretaría Nacional de Vigilancia de la Salud Pública. 2020. Enfermedades transmitidas por agua y alimentos. Subsecretaría Nacional de Vigilancia de la Salud Pública, Quito, Ecuador.
244. Sutton, S. (2010). The Most Probable Number Method and Its Uses in Enumeration, Qualification, and Validation. <https://www.semanticscholar.org/paper/The-Most-Probable-Number-Method-and-Its-Uses-in-and-Sutton/2185acb4e79908a9e68e4b80f5b484398042dfff>
245. Tack, DM, Marder, EP, Griffin, PM, Cieslak, PR, Dunn, J., Hurd, S., Scallan, E., Lathrop, S., Muse, A., Ryan, P., Smith, K., Tobin-D'Angelo, M., Vugia, DJ, Holt, KG, Wolpert, BJ, Tauxe, R., & Geissler, AL (2019). Preliminary incidence and trends of infections with pathogens commonly transmitted through food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 US sites, 2015–2018. *American Journal of Transplantation*, 19 (6). <https://doi.org/10.1111/ajt.15412>
246. Tay, MYF, Adzitey, F., Sultan, SA, Tati, JM, Seow, KLG, & Schlundt, J. (2019). Whole-Genome Sequencing of Nontyphoidal *Salmonella enterica* Isolates Obtained from Various Meat Types in Ghana. *Microbiology Resource Announcements*, 8 (15).

<https://doi.org/10.1128/mra.00033-19>

247. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. (2019). *EFSA Journal*, 17 (12).

<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>

248. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. (2018). *EFSA Journal*, 16 (12).

<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>

249. Thornhill TS, Wyatt RG, Kalica AR, et al. Detection by immune electron microscopy of 26- to 27-nm viruslike particles associated with two family outbreaks of gastroenteritis. *J Infect Dis* 1977; 135:20–27

250. Torner Gràcia, N. (2008). Estudio epidemiológico de los brotes de gastroenteritis aguda de etiología vírica en Cataluña. Universitat de Barcelona.

<https://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/42983>

251. Torrens, H. R., Argilagos, G. B., Cabrera, M. S., Valdés, J. B., Sáez, S. M., & Viera, G. G. (2015). Las enfermedades transmitidas por alimentos, un problema sanitario que hereda e incrementa el nuevo milenio. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 16(8), 1–27.

252. Totsuka, A., and Y. Moritsugu. 1999. Hepatitis A virus proteins. *Intervirology*. 42:63-68

<https://doi.org/10.1159/000024967>

253. United States Department of Agriculture (USDA). Food and Drug Administration (FDA). Risk profile: pathogens and filth in spices. 2017. Available from: [https://](https://www.fda.gov/media/108126/download)

[www.fda.gov/media/108126/download](https://www.fda.gov/media/108126/download)

254. U.S. Environmental Protection Agency (EPA). 2013. Most probable number (MPN) user and system installation and administration manual, 2nd ed. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

255. United States Pharmacopeia (USP 31). 2008. (61) Microbiological Examination of Nonsterile products: Microbial Enumeration Tests. Harmonized Method.

256. United States Pharmacopeia (USP 31). 2009. (62) Microbiological Examination of Nonsterile

products: Tests for Specified Microorganisms. Harmonized Method.

257. Vipham, J. L., B. D. Chaves, and V. Trinetta. 2018. Mind the gaps: ¿how can food safety gaps be addressed in developing nations? *Anim. Front.* 8:16–25.
258. Vinueza-Burgos, C., Ortega-Paredes, D., Narváez, C., de Zutter, L., & Zurita, J. (2019). Characterization of cefotaxime resistant *Escherichia coli* isolated from broiler farms in Ecuador. *PLOS ONE*, 14 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207567>
259. Vose D. Risk analysis: a quantitative guide. 3. ed. West Sussex, UK: John Wiley & Sons; 2008.
260. Wendel, B. M., Courcelle, C. T., & Courcelle, J. (2014). Completion of DNA replication in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(46), 16454–16459. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415025111>
261. Wollants, E., and M. Van Ranst. 2013. Detection of false positives with a commonly used Norovirus RT-PCR primer set. *J. Clin. Virol.* 56:84-85 <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.09.007>
262. Wu, J., S. C. Long, D. Das, and S. M. Dorner. 2011. Are microbial indicators and pathogens correlated? A statistical analysis of 40 years of research. *J. Water Health* 9:265–278
263. Wyatt RG, Dolin R, Blacklow NR, et al. Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. *J Infect Dis* 1974; 129:709–714.
264. Xie, B., S. Li, M. Chen, F. Wang, and D. Chen. 2020. Microbial quality of ready-to-eat foods sold in school cafeterias in Chongqing, China. *J. Food Prot.* 83:890–895.
265. Yang, N. Y., P. H. Yu, Z. X. Mao, N. L. Chen, S. A. Chai, and J. S. Mao. 1988. Inapparent infection of hepatitis A virus. *Am. J. Epidemiol* 127:599-604 <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a114835>
266. Yong, H. T., and R. Son. 2009. Review Article Hepatitis A virus – a general overview. *Food Res. Int.* 467:455-467
267. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR green I, its structure determination and methodological implications.

Nucleic Acids Res. 2004; 32:103.

268. Zhang, S., G. Yang, Q. Ye, Q. Wu, J. Zhang, and Y. Huang. 2018. Phenotypic and genotypic characterization of *Klebsiella pneumoniae* isolated from retail foods in China. *Front. Microbiol.* 9:1–11.
269. Zheng, D. P., T. Ando, R. L. Fankhauser, R. S. Beard., R. I. Glass, and S. S. Monroe. 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, 346:312-323. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.11.015>
270. Zurita, J., Solís, MB, Ortega-Paredes, D., Barba, P., Paz y Miño, A., & Sevillano, G. (2019). High prevalence of B2-ST131 clonal group among extended-spectrum  $\beta$  -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from bloodstream infections in Quito, Ecuador. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 19. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.219>

## Publicaciones

### Publicaciones generadas

- Salazar Llorente, EJ, Morales, M., Sornoza, I., Maridueña-Zavala, MG, Gu Ganyu, Nou XiangWu, Ortiz Johana, Maldonado-Alvarado Pedro y Cevallos-Cevallos. JM (2021). Calidad microbiológica de alimentos de alta demanda de tres principales Ciudades en Ecuador. Journal of Food Protection, 84 (1), 128-138.
- Salazar Llorente, EJ, Guerrero, M.J, Villaquiran, J.A, Suárez, K.S, y Cevallos-Cevallos. JM (2023). Desarrollo de juegos de cebadores mejorados para la detección de Norovirus y Hepatitis A en muestras de alimentos de Guayaquil (Ecuador) por PCR heminestada con transcriptasa inversa Bionatura, 8 (01), 2.

## **ANEXOS**

### **ANEXO 1. Procedimiento recuento número más probable**

Para realizar la inoculación, es necesario diluir la muestra en tres o más diluciones de diez veces cada una. Estas diluciones se colocan en tubos de cultivo líquido y se incuban a una calidez y tiempo determinados. A partir de la existencia o ausencia de los microorganismos en los cultivos, se calcula el número más viable de microorganismos de los tres grupos utilizando la tabla estadística estándar de NMP (ISO, 2006).

### **ANEXO 2. Procedimiento de tinción de bacterias**

En extensión se mezcla la solución de color con un volumen igual de la suspensión de la muestra, luego colocar la gota de agua en el portaobjetos y extiende la muestra con ayuda del asa de inoculación. La concentración de células debe ser de 40 a 60 células por campo microscópico con un aumento de 600x.

- Efectuar un extendido fino.
- Fijar a la llama.
- Cubrir con colorante durante un minuto.
- Lavar el portaobjeto con agua.

Muchos microorganismos, tanto procarióticos como eucarióticos, pueden acumular gránulos de volutina que se tiñen con colorantes principales como el azul de metileno. Estas piezas también se denominan gránulos metacromáticos porque tienen un efecto metacromático que aparece rojo cuando se tiñe con pintura azul, Cuando las células se sumergen en azul de metileno, introduce en las células y blanquea las enzimas de las células vivas. Las células muertas, donde la enzima está inactiva, no hacen esto y, por lo tanto, permanecen azules. El porcentaje de células que no se tiñen es entonces un promedio de viabilidad (Reynoso et al., 2015).

## **ANEXO 3. Medios de cultivos**

### **3.1. Agar de recuento en placa (PCA)**

La productividad de este medio se basa en el elevado contenido de nutrientes de sus componentes, lo que permite que las bacterias de la muestra prosperen. Al analizar leche y productos lácteos, algunos ejecutores recomiendan complementarlo con 1 g/l de leche desnatada estéril para uso bacteriológico, el agar es solidificante, para la enumeración de bacterias aeróbicas en aguas residuales, agua, productos lácteos y otros alimentos. También se recomienda como una herramienta general para determinar las poblaciones microbianas (Marshall, 1993).

#### **3.1.1. Procedimiento**

Se suspenden 23,5 g de polvo en 1 L de agua purificada, se deja reposar descansar 5 minutos. Caliente, revolviendo constantemente, y hierva hasta que se disuelva en su totalidad. Verter en contenedores adecuados y proceder a esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

#### **3.1.2. Inoculación**

Para realizar una siembra en superficie, se inocula directamente la muestra, en cambio en profundidad se inocula una alícuota del medio directa o de su dilución, posteriormente verter un volumen del medio de cultivo fundido y enfriado a 40-45°C. Homogeneizar mediante balanceo y volteo.

#### **3.1.3. Incubación**

Se debe incubar en aerobiosis, a 32-35°C durante 24-48 horas (Clesceri et al., 1998).

### **3.2. Tripteína soja agar**

La productividad de este medio aporta nutrientes ricos en péptidos, aminoácidos libres, bases

púricas y pirimidínicas, minerales y vitaminas. La peptona de soja también es una fuente de carbohidratos que estimulan el crecimiento de varios microorganismos, el cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico y el agar es sólido.

Puede utilizarse como base a la que se le han añadido nutrientes o agentes antimicrobianos, resultando un medio enriquecido o selectivo según el aditivo, este cultivo beneficia el desarrollo y aislamiento de muchos microorganismos aerobios, así como anaerobios facultativos y estrictos (USP, 2008).

### **3.2.1. Procedimiento**

Disolver 40 g de polvo en 1 L de agua purificada, mezclar y dejar en reposo durante 5 minutos. Caliente, removiendo levemente, y hierva durante 1-2 minutos hasta que se diluya totalmente, posteriormente dividir en contenedores propicios y esterilizar en autoclave a una temperatura de 118-121°C durante 15 minutos.

### **3.2.2. Inoculación**

Para realizar una siembra de debe inocular directamente en el material de prueba, encima de la superficie del medio.

### **3.2.3. Incubación**

El tiempo, las condiciones y la temperatura de incubación varían según el microorganismo que se desea cultivar. Para bacterias de crecimiento rápido, se recomienda incubar en condiciones de aerobiosis a una temperatura de 35-37°C entre 18-24 horas. En el caso de bacterias con necesidades nutricionales específicas, se requiere un ambiente con un 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y una temperatura de 35-37°C durante un período de incubación de 24-48 horas. (USP, 2009).

### **3.3. Caldo verde brillante bilis 2%**

La composición de este medio favorece el crecimiento adecuado de bacterias, mientras que la

presencia de bilis y color verde brillante actúa como agentes selectivos al inhibir el crecimiento de bacterias grampositivas y gramnegativas, excluyendo los coliformes. Además, la presencia de lactosa, un carbohidrato fermentable, permite detectar la fermentación de la lactosa por los coliformes, lo que se manifiesta en la producción de ácido y gas. Este medio se utiliza para contar y enumerar tanto los coliformes fecales como los coliformes totales utilizando el método de conteo más probable.

### **3.3.1. Procedimiento**

Se disuelven 40 g de polvo en 1 litro de agua purificada, se disuelve y dispense 10 mililitros con una campana de Durham. Calentar a 100 °C durante 30 minutos. Se recomienda no esterilizar en el autoclave (Clesceri et al., 1998).

### **3.3.2. Inoculación**

Para sembrar coliformes totales en muestras fluidas se debe realizar por triplicado: 10 mililitros en caldo doble concentración y 1 mililitro y 0,1 mililitro de caldo simple concentración, en muestras sólidas, las diluciones seriadas 10-1, 10-2 y 10-3 y sembrar cada dilución por triplicado en medio de cultivo simple concentración.

Una vez detectado coliformes totales transferir con un asa a un tubo con Verde Brillante y Bilis al 2%, incubando a 44,5 - 45,5 °C y otra en Agua Triptona para asegurar la producción de indol en coliformes fecales.

### **3.3.3. Incubación**

La incubación en coliformes totales anaerobios a 33 - 37°C durante 48 horas y para coliformes (fecales) a 44,5 - 45,5°C aproximadamente 24 horas (Curry et al., 2003).

### **3.4. Agar (con eosina y azul de metileno)**

Este medio de cultivo es una combinación de las fórmulas de Holt-Harris y Teague y la fórmula de Levine para mejorar el aislamiento selectivo de Enterobacteriaceae y otros tipos de bacilos Gram-negativos

Es un medio nutritivo que contiene peptona, que beneficia el crecimiento microbiano además entre organismos capaces de utilizar lactosa y/o sacarosa y organismos incapaces de por medio de indicadores de eosina y azul de metileno; tienen un efecto inhibitor sobre muchas bacterias grampositivas, el agar es sólido, cepas de *Escherichia coli* y *Citrobacter spp.*, tienen el típico brillo metálico. Las cepas que usan lactosa tienen un centro oscuro con un borde azulado o rosado, mientras que la no usan lactosa, está coloreada, las especies de *Candida* también pueden crecer y se ven como rosadas exactamente, la siembra profunda permite el desarrollo de clamidosporas en *C. albicans*. *Enterococcus spp.*, se desarrolla en ese medio como colonias punteadas transparentes, mientras que *Acinetobacter spp.* y otras bacterias oxidantes se ven como formaciones azul lavanda; esto puede ocasionarse incluso si las cepas no pueden acidificar la lactosa al 0,5% y se debe a la incorporación de azul de metileno en sus membranas, en este entorno también se logra un buen desarrollo de especies de *Shigella* y *Salmonella*.

#### **3.4.1. Procedimiento**

Se disuelven 36 g del polvo en 1 L de agua. Se deja reposar 5 minutos, posteriormente se calienta con agitación constante y alcanzar la ebullición hasta su disolución total. Se debe esterilizar en autoclave 121°C durante al menos 15 minutos y dividir en cajas Petri estériles.

#### **3.4.2. Inoculación**

Para realizar la siembra en superficie se debe realizar por el método de estriado principal a partir de la muestra, en profundidad favorece la formación de clamidosporas.

### **3.4.3. Incubación**

La incubación se debe realizar a 33-37 °C durante 18-24 horas (Macfaddin, 1985).

## **3.5. Agua peptonada**

Este medio de enriquecimiento no selectivo contiene peptona que proporciona los nutrientes necesarios para el crecimiento microbiano, en tanto que el cloruro de sodio sostiene el equilibrio osmótico. Se emplea para restaurar células enterobacterianas que han sido dañadas por procesos fisicoquímicos durante el contacto con los alimentos.

Además, este medio puede ser empleado como diluyente de muestras en lugar de solución salina y como sustrato principal en la fermentación de carbohidratos. En este escenario final, se deben añadir el medidor de Andrade y el carbohidrato correspondiente con una concentración final del 1% para realizar el recuento más probable.

### **3.5.1. Procedimiento**

Se disuelven 15 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Se mezcla calentando hasta que hierve por 1 minuto. Distribuir en recipientes estériles y posteriormente llevar a la autoclave a 121°C durante 15 minutos.

### **3.5.2. Inoculación**

Se siembra directamente en el material de estudio.

### **3.5.3. Incubación**

La incubación se debe realizar a 33-37 °C durante 18-48 horas (Forbes & Weissfeld, 1998).

### **3.6. Citrato agar Simmon**

La característica principal de este medio es que el citrato de sodio y el fosfato monoamónico son los exclusivos orígenes de carbono y nitrógeno, correspondientemente, necesarias para el crecimiento bacteriano. Las sales de fosfato actúan como un mecanismo tampón, el magnesio es un cofactor enzimático y el cloruro de sodio sostiene el equilibrio osmótico. El indicador de pH azul de bromotimol se vuelve azul en un medio alcalino, y el agar proporciona una consistencia sólida al medio.

Este medio de cultivo se distingue porque los microorganismos idóneos de manejar el citrato como origen exclusivo de carbono utilizan las sales de amonio como exclusivo origen de nitrógeno. Esto resulta en la producción de alcalinidad, ya que el metabolismo del citrato ocurre mediante el ciclo del ácido tricarbónico mediante la permeasa del citrato. La descomposición del citrato produce oxalacetato y piruvato gradualmente, y este al final genera ácidos orgánicos en presencia de un medio alcalino. A partir de estos ácidos, se forman carbonatos y bicarbonatos, lo que causa un cambio de color a azul, indicando la producción de permeasa del citrato.

#### **3.6.1. Procedimiento**

Se disuelven 24,2 g de polvo en 1 L de agua purificada. Se deja descansar durante 5 minutos. Procede a calentar revolviendo con frecuencia durante 1 o 2 minutos para que se disuelva por completo. Verter en tubos y esterilizar mediante autoclave a 121°C aproximadamente 15 minutos, posteriormente se enfría y solidifica en una posición diagonal (pico de flauta).

#### **3.6.2. Inoculación**

Se siembra por el método de estrías en la superficie del medio de cultivo.

#### **3.6.3. Incubación**

La incubación se debe realizar en aerobiosis, a 33-37 °C durante 24-72 horas.

Ciertos microorganismos llegan a necesitar incluso de 7 días de incubación. A 33-37°C durante 18

a 48 horas (Macfaddin, 2000).

### **3.7. Caldo Rappaport Vassiliadis**

Este medio es altamente nutritivo debido a su contenido de fosfatos, sales de magnesio y sodio, y la existencia de la coloración verde de malaquita (oxalato). Los microorganismos que pueden sobrevivir y multiplicarse en condiciones de alta presión osmótica (a causa de la alta concentración de cloruro de magnesio en el medio) y a pH relativamente bajos encuentran un entorno favorable en este medio. Además, la presencia de cloruro de magnesio contrarresta la consecuencia del tóxico del verde de malaquita frente a las *salmonellas*. La incubación a una temperatura de 41-42 °C promueve la selectividad hacia las *salmonellas*.

#### **3.7.1. Procedimiento**

Se disuelven 42,5 gramos del polvo en 1 litro de agua purificada y se deja reposar por 5 minutos y mezclar hasta que se homogenice. Después se calienta agitando frecuentemente hasta disolución total. Distribuir en recipientes adecuados y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 115°C.

#### **3.7.2. Inoculación**

Se siembra en 10 ml de caldo Rappaport con 0.1 ml del caldo de enriquecimiento primario el cual ha sido incubado por 20-24 horas. Incubar por  $26 \pm 2$  horas a 41.5°C en aerobiosis

#### **3.7.3. Incubación**

La incubación se debe realizar de 24-48 horas a 41-42 °C.

Después de haber incubado incubar, subcultivar en medios selectivos para el crecimiento del microorganismo que vaya a cultivar (European Pharmacopoeia, 2007).

### **3.8. Agar hierro azúcar triple**

La productividad de este medio es que la pulpa de carne y la pluripectona aportan suficientes nutrientes requeridos en el crecimiento bacteriano, la sacarosa, glucosa y lactosa son carbohidratos fermentables. El tiosulfato de sodio es un sustrato necesario para la producción de sulfuro de hidrógeno, el sulfato de amonio ferroso es una fuente de iones  $Fe^{3+}$  que se combinan con sulfuro de hidrógeno para formar sulfuro de hierro negro. El color rojo de fenol es un indicador de pH y el cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico, la fermentación de azúcares produce ácidos, que son detectados por el indicador rojo de fenol, que se vuelve amarillo en un ambiente ácido. El tiosulfato de sodio se minimiza a sulfuro de hidrógeno, que luego cambia con una sal de hierro para producir el característico sulfuro de hierro negro.

#### **3.8.1. Procedimiento**

Se disuelven 62,5 g del polvo en 1 litro de agua depurada y se deja descansar por 5 minutos se mezcla hasta que se homogenice. Después se calienta agitando frecuentemente hasta disolución total. Se distribuye en los tubos y se llena con un volumen que ocupe hasta la tercera parte de estos. Posteriormente esterilizar mediante el autoclave durante 15 minutos a 121°C.

#### **3.8.2. Inoculación**

La siembra se realiza con aguja para inocular, inocular pinchando el fondo y esparciendo sobre el ámbito de este.

#### **3.8.3. Incubación**

La incubación se debe realizar en aerobiosis a 33-37°C durante 18 a 24 horas (Murray et al., 1999).

### **3.9. Verde brillante agar**

La productividad de este medio es que la pluripectona y el extracto de levadura forman una fuente

de vitaminas, minerales y nitrógeno. La sacarosa y la lactosa son carbohidratos fermentables, el color rojo de fenol es un medidor de pH que se vuelve amarillo cuando los azúcares fermentables se acidifican, el cloruro de sodio sostiene el equilibrio osmótico y el color verde brillante actúa como un agente selectivo que previene esencialmente la formación sobre la flora grampositiva y otros microorganismos gramnegativos. Tiene un valor excepcional cuando se examinan grandes cantidades de muestras de alimentos debido a su alta capacidad para distinguir colonias sospechosas.

### **3.9.1. Procedimiento**

Se disuelven 58 g del polvo en 1 litro de agua purificada y se deja descansar por 5 minutos y remover hasta que se homogenice. Posteriormente se calienta agitando constantemente hasta su disolución total. Se distribuye recipientes adecuados. Posteriormente se esteriliza en autoclave durante al menos 15 minutos a 118-121°C, enfriar y verter en cajas Petri esterilizadas.

### **3.9.2. Inoculación**

La siembra se lleva a cabo en la superficie por método de estriado un inóculo denso de la muestra directa o de una dilución.

### **3.9.3. Incubación**

La incubación se debe realizar en aerobiosis a 33-37°C durante 48 horas (Farmacopea Nacional Argentina & Codex Medicamentarius Argentino, 2003).

### **3.10. Oxford modificado agar base**

La productividad de este medio incluye los nutrientes esenciales para un desarrollo bacteriano óptimo. *Listeria* spp. durante el desarrollo es diferente porque el producto de hidrólisis de la esculina en presencia de iones Fe<sup>3</sup> realiza un compuesto fenólico negro. La adición del aditivo selectivo Oxford Modified Agar Base asegura un crecimiento adecuado y *Listeria* spp.

### **3.10.1. Procedimiento**

Se disuelven 26,3 g del polvo en 500 ml de agua depurada y se deja reposar por 5 minutos y mezclar hasta que se homogenice. Después se calienta agitando frecuentemente hasta disolución total. Se distribuye en los recipientes adecuado. Posteriormente esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C, enfriar a 50 °C y agregar asépticamente 2 ml del contenido de un vial Suplemento Selectivo para Oxford Modificado Agar Base y verter en cajas Petri esterilizadas.

### **3.10.2. Inoculación**

La siembra se realiza por el método de estriado sobre la superficie del medio de cultivo.

### **3.10.3. Incubación**

La incubación se debe realizar en una atmósfera con 5-10% CO<sub>2</sub>, a 33-37 °C, entre 24-48 horas (Curtis *et al*, 1989).

## **3.11. Agar de sangre base**

La productividad de este medio contiene la infusión de miocardio y peptona le otorga a médium un alto valor nutricional, lo que permite el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos, incluso demandantes de nutrientes. El cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico y el agar es sólido.

La adición de 5-10% de sangre de carnero desfibrilada estéril promueve el crecimiento de bacterias que requieren sus necesidades nutricionales y un control adecuado de la reacción hemolítica.

### **3.11.1. Procedimiento**

Se disuelven 40 g de polvo en 1L de agua depurada y se deja en reposo por 5 minutos y mezclar hasta que se homogenice. Después se calienta agitando frecuentemente hasta disolución total. Se divide en los recipientes adecuados. Posteriormente esterilizar en autoclave durante 15 minutos a

121°C durante 20 min. Agregar 5-10 % de la sangre ovina desfibrilada estéril al medio esterilizado, fundido y enfriado a 45-50 °C y posteriormente homogeneizar.

### **3.11.2. Inoculación**

La siembra se realiza por el método de estriado sobre la superficie del medio de cultivo.

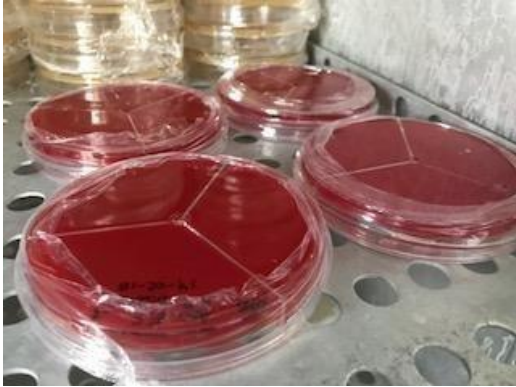
### **3.11.3. Incubación**

La incubación se debe realizar en bacterias con sencillo crecimiento como en aerobiosis, a 33-37 °C durante 48 horas y en bacterias demandantes en sus necesidades nutricionales en atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub>, a 33-37 °C durante 24-48 horas (Forbes *et al*, 1998).

## ANEXO 4.

a) Agar sangre b) Medio TSA y agar sangre c) Medio PCA d) Inoculación en TSA e) Tinción de bacterias f) Tinción de bacterias g) Tinción de bacterias h) Tinción de bacterias i) Tinción de bacterias j) Identificación de bacterias gram negativa k) Identificación de bacteria gram positiva l) Identificación de bacteria gram negativa

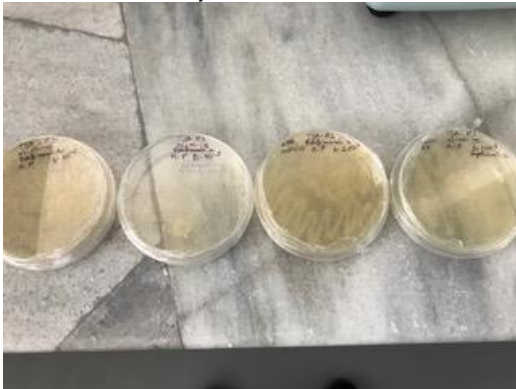
a) Agar sangre para diferenciación de Bacterias



b) Medio TSA y Agar sangre



c) Medio Pca



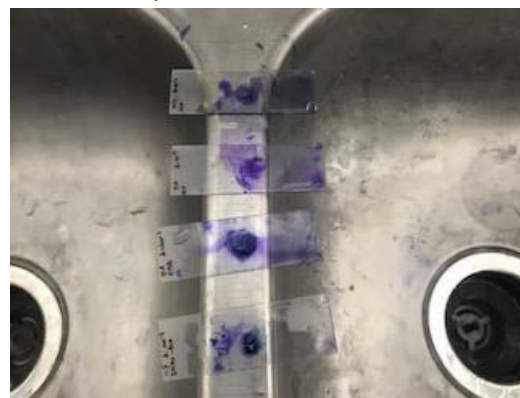
d) Inoculación en Tsa



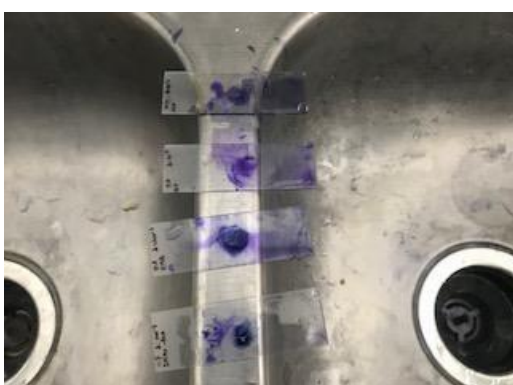
e) Tinción de bacterias



f) Tinción de bacterias



g) Tinción de bacterias



h) Tinción de bacterias

