



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO Y RESISTENCIA BACTERIANA
EN EL CEVICHE DE CHOCHOS, EXPENDIDOS EN LOS
ALREDEDORES DE LA ESPOCH Y UNACH, Y SU POSIBLE
IMPACTO EN LA SALUD PÚBLICA DE RIOBAMBA 2019”**

Trabajo de Titulación

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: VIVIANA ROCÍO HERNÁNDEZ DONOSO

DIRECTORA: Dra. SANDRA NOEMÍ ESCOBAR ARRIETA MSc.

Riobamba – Ecuador

2021

© 2021, **Viviana Rocío Hernández Donoso**

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

Yo, Viviana Rocío Hernández Donoso, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

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




Riobamba, 24 de febrero 2021



Viviana Rocío Hernández Donoso
060352052-9

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

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de Titulación: Tipo: Proyecto de Investigación, **ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO Y RESISTENCIA BACTERIANA EN EL CEVICHE DE CHOCHOS, EXPENDIDOS EN LOS ALREDEDORES DE LA ESPOCH Y UNACH, Y SU POSIBLE IMPACTO EN LA SALUD PÚBLICA DE RIOBAMBA 2019**, realizado por la señorita: **VIVIANA ROCÍO HERNÁNDEZ DONOSO**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el tribunal autoriza su presentación.

FIRMA	FECHA
Digitally signed by AIDA ADRIANA MIRANDA BARROS 	
BQF. Aída Adriana Miranda Barros MSc. ----- PRESIDENTE DEL TRIBUNAL	2021-02-24
 Firmado electrónicamente por: SANDRA NOEMI ESCOBAR ARRIETA	
Dra. Sandra Noemí Escobar Arrieta MSc. ----- DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	2021-02-24
 Firmado electrónicamente por: VERONICA MERCEDES CANDO BRITO	
Dra. Verónica Mercedes Cando Brito MSc. ----- MIEMBRO DE TRIBUNAL	2021-02-24

DEDICATORIA

A mis padres, por darme la vida, por sus enseñanzas, su ejemplo, paciencia y dedicación.

A mi esposo, por su apoyo incondicional en todo este largo caminar.

A mi hermano, por su compañía.

A mis amigos, que son la familia que uno escoge.

Viviana

AGRADECIMIENTO

A Dios por todas y cada una de sus bendiciones.

A mis padres por su esfuerzo diario.

A mi esposo por ser mi compañero.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por permitirme cumplir una meta tan anhelada.

A la Doctora Sandra Escobar por ser una guía en el desarrollo de este proyecto, por sus consejos y por compartir sus conocimientos.

A la Doctora Anita Albuja por su colaboración y aporte de conocimientos, a la Bioquímica Yolanda Buenaño por su acompañamiento y compromiso, a Luciana Calvache por su compañerismo y amistad.

Viviana

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xi
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO.....	2
1.1. Bases teóricas.....	2
1.1.1. <i>Chocho (Lupinus mutabilis sweet)</i>	2
1.1.1.1. <i>Proceso de desamargado del chocho</i>	2
1.1.1.2. <i>Composición química y valor nutricional del chocho (Lupinus mutabilis sweet)</i>	4
1.1.1.3. <i>Problemas que se producen por una mala manipulación y mal almacenamiento del Chocho</i>	5
1.1.2. <i>Ceviche</i>	6
1.1.2.1. <i>Ceviche de chocho de la ciudad de Riobamba</i>	6
1.1.2.2. <i>Cualidades que contiene los ingredientes principales del ceviche de chocho</i>	7
1.1.3. <i>Ventas ambulantes</i>	7
1.1.4. <i>Enfermedades de Transmisión Alimentaria (ETAs)</i>	8
1.1.4.1. <i>Infecciones transmitidas por alimentos</i>	9
1.1.4.2. <i>Intoxicaciones transmitidas por alimentos</i>	9
1.1.5. <i>Resistencia antimicrobiana</i>	10
1.1.6. <i>Medios de cultivo</i>	11
1.1.7. <i>Tinción Gram</i>	13

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO.....	15
2.1. Localización de estudio.....	15
2.2. Población de estudio.....	15

2.3.	Periodo de la investigación	15
2.4.	Materiales, Equipos y Reactivos	15
2.4.1.	<i>Materiales</i>	15
2.4.2.	<i>Equipos</i>	16
2.4.3.	<i>Reactivos</i>	16
2.5.	Metodología	18
2.6.	Métodos	19
2.6.1.	<i>Recolección y Transporte de muestras en base a la normativa: NTE INEN 1529-2: Control microbiológico de los alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el Análisis Microbiológico</i>	19
2.6.2.	<i>Homogenización de las muestras</i>	20
2.6.3.	<i>Análisis de pH</i>	20
2.6.4.	<i>Determinación de parásitos por el método de flotación</i>	20
2.6.5.	<i>Solución madre y diluciones</i>	21
2.6.6.	<i>Recuento de aerobios mesófilos por la técnica de siembra con vertido en placa</i>	21
2.6.7.	<i>Recuento de mohos y levaduras por la técnica de siembra en profundidad</i>	22
2.6.8.	<i>Recuento de Staphylococcus aureus por la técnica de siembra en profundidad</i>	22
2.6.9.	<i>Pruebas de confirmación de Staphylococcus aureus</i>	23
2.6.10.	<i>Recuento de coliformes totales por la técnica del número más probable (NMP)</i>	23
2.6.11.	<i>Determinación de Escherichia coli en agar Eosina azul de metileno (EMB)</i>	24
2.6.12.	<i>Activación de Salmonella en caldo tetrionato</i>	25
2.6.13.	<i>Determinación de Salmonella en agar Salmonella – Shigella (SS)</i>	25
2.6.14.	<i>Aislamiento y purificación de colonias de bacterias gram negativas</i>	26
2.6.15.	<i>Tinción Gram</i>	26
2.6.16.	<i>Identificación de bacterias gram negativas mediante Pruebas Bioquímicas</i>	27
2.6.17.	<i>Identificación molecular de bacterias por PCR</i>	27
2.6.18.	<i>Antibiograma</i>	28

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	29
3.1.	Análisis microbiológico del ceviche de chochos	29
3.1.1.	<i>Análisis de pH</i>	29
3.1.2.	<i>Recuento de parásitos</i>	30
3.1.3.	<i>Recuento de aerobios mesófilos</i>	31
3.1.4.	<i>Recuento de mohos y levaduras</i>	33
3.1.5.	<i>Recuento de Staphylococcus aureus</i>	34

3.1.6.	<i>Recuento de coliformes totales</i>	36
3.1.7.	<i>Resultados confirmatorios de Escherichia coli en agar EMB</i>	37
3.1.8.	<i>Cualificación de Salmonella</i>	38
3.1.9.	<i>Identificación de cepas puras mediante pruebas bioquímicas</i>	40
3.1.10.	<i>Antibiograma</i>	43
3.1.11.	<i>Identificación molecular de bacterias por PCR</i>	44
3.1.12.	<i>Check list</i>	47
	CONCLUSIONES	51
	RECOMENDACIONES	52
	GLOSARIO	
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Análisis Bromatológico del chocho amargo y desamargado	5
Tabla 2-1: Cualidades que contiene los ingredientes principales del ceviche de chocho	7
Tabla 3-1: Tipos de medios de cultivo	11
Tabla 4-1: Medios de cultivo de acuerdo con su estado físico.....	11
Tabla 5-1: Medios de cultivos utilizados en la investigación	12
Tabla 6-1: Diferencias entre bacterias gram positivas y negativas.	14
Tabla 1-3: Análisis de pH en cada muestra analizada de los locales en estudio.	29
Tabla 2-3: Recuento del número de parásitos presentes en los locales analizados y su identificación.	30
Tabla 3-3: Recuento de aerobios mesófilos encontrados en cada uno de los puestos (Diluciones 10^{-4} y 10^{-5}).....	31
Tabla 4-3: Presencia o ausencia de mohos y levaduras en los puestos analizados.....	33
Tabla 5-3: Recuento de colonias de <i>Staphylococcus aureus</i> en agar manitol salado.	34
Tabla 6-3: Recuento de coliformes totales en caldo verde bilis brillante.....	36
Tabla 7-3: Confirmación de colonias de <i>Escherichia coli</i> en agar Eosina azul de metileno (EMB).....	37
Tabla 8-3: Identificación por características fenotípicas de <i>Salmonella</i> en agar SS.	38
Tabla 9-3: Identificación cepas aisladas mediante el uso de pruebas bioquímicas en agar SS.....	40
Tabla 10-3: Identificación de cepas aisladas mediante el uso de pruebas bioquímicas en agar EMB.	41
Tabla 11-3: Identificación de cepas de cocos gram positivos mediante pruebas específicas.	42
Tabla 12-3: Antibiograma para Enterobacterias identificadas y aisladas.	43
Tabla 13-3: Antibiograma para cocos gram positivos identificados y aislados.	44
Tabla 14-3: Resultados de la identificación molecular por PCR de microorganismos.	45
Tabla 15-3: Evaluación sanitaria para puestos de expendio ambulatorio de alimentos preparados (Ceviche de chochos).....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Ventajas del desamargado del chocho.....	3
Figura 2-1: Desventajas del Desamargado del Chocho.....	3
Figura 3-1: Desamargado tradicional del chocho.....	4
Figura 4-1: Aceites presentes en el chocho.....	4
Figura 5-1: Ingredientes del cevichocho Riobambeño.....	6
Figura 6-1: Factores de Riesgo ante intoxicaciones alimentarias.....	10
Figura 1-2: Metodología para el recuento de aerobios mesófilos por la técnica de.....	21
Figura 2-2: Metodología para el recuento de mohos y levaduras por la técnica de.....	22
Figura 3-2: Metodología para el recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> por la técnica.....	22
Figura 4-2: Metodología para las pruebas de confirmación de <i>Staphylococcus aureus</i>	23
Figura 5-2: Metodología para el recuento de coliformes totales por la.....	23
Figura 6-2: Índice del Número más probable de bacterias cuando se utiliza tres alícuotas de de 1 cm ³ por dilución.....	24
Figura 7-2: Metodología para la determinación de <i>Escherichia coli</i> en agar Eosina.....	24
Figura 8-2: Metodología para la activación de <i>Salmonella</i> en caldo tetracionato.....	25
Figura 9-2: Metodología determinación de <i>Salmonella</i> en agar <i>Salmonella-Shigella</i> (SS)....	25
Figura 10-2: Metodología para el aislamiento y purificación de colonias de bacterias.....	26
Figura 11-2: Metodología para el desarrollo de la Tinción Gram.....	26
Figura 12-2: Metodología para la identificación de bacterias gram negativas mediante.....	27
Figura 13-2: Procedimiento para identificación molecular por PCR.....	28
Figura 14-2: Metodología para el desarrollo del Antibiograma.....	28
Figura 1-3: Visualización en gel de agarosa 2% de los seis.....	46

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-2: Metodología para el análisis microbiológico del ceviche de chochos.	18
Gráfico 1-3: Recuento de aerobios mesófilos en UFC/g	32
Gráfico 2-3: Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> en UFC/g.....	35
Gráfico 3-3: Recuento de coliformes totales por la técnica del número más probable (NMP).36	
Gráfico 4-3: Porcentaje de cumplimiento de la evaluación sanitaria para puestos de expendio ambulatorio de alimentos preparados (Ceviche de chochos).	50

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ETA's	Enfermedades transmitidas por alimentos
NMP	Número más probable
pH	Potencial hidrógeno
UFC/g	Unidades formadoras de colonias por gramo

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: EVIDENCIAS FOTOGRÁFICAS DEL ESTUDIO

ANEXO B: CERTIFICADO DE CUMPLIMIENTO DE NORMATIVA

RESUMEN

El análisis microbiológico y resistencia bacteriana en el ceviche de chochos expendidos en los alrededores de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y Universidad Nacional de Chimborazo y su posible impacto en la salud pública de Riobamba, pretende analizar mediante recuentos microbiológicos utilizando diferentes medios de cultivos, la identificación de dichos microorganismos de forma precisa para verificar si este alimento se encuentra apto para el consumo humano o no. Esta investigación se realizó en siete puestos de expendio, con análisis por duplicado de acuerdo con las normativas: NTE INEN 1529-2: Control microbiológico de los alimentos; NTE INEN 2390: Leguminosas. Grano desamargado de chocho. Requisitos; y la Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano del Perú. Artículo 15, sección XV. Se analizaron microorganismos aerobios mesófilos, mohos y levaduras, parásitos, *Staphylococcus aureus*, Coliformes totales, *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* Se analizaron las diluciones $10e^{-4}$ y $10e^{-5}$ inoculándolas en medios de cultivo convencionales para cada microorganismo con una posterior incubación y recuento. Se realizó también el aislamiento de colonias para identificación mediante pruebas bioquímicas y finalmente, el antibiograma; encontrándose como resultados: $6,63 \times 10^6$ UFC/g de aerobios mesófilos; $2,2 \times 10^6$ UFC/g de *Staphylococcus aureus*; coliformes totales y *Escherichia coli* valores incontables; por lo tanto, sobrepasan todos los máximos permisibles resultando en un problema de salud pública por atentar contra la misma, teniendo en cuenta que la calidad higiénico-sanitaria en la que se expende este alimento de consumo masivo está por debajo de lo ideal; es por ello que se hace un llamado a las autoridades pertinentes para que actúen realizando un mayor control en el análisis microbiológico de este alimento que garantice inocuidad y seguridad en el consumidor.

Palabras clave: <ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO>, <CEVICHE DE CHOCHOS>, <RESISTENCIA BACTERIANA>, <BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA>, <RIOBAMBA (CANTÓN)>.

LEONARDO

FABIO MEDINA
NUSTE

Firmado digitalmente
por LEONARDO FABIO

MEDINA NUSTE

Fecha: 2021.09.27
16:29:25 -05'00'



1834-DBRA-UTP-2021

ABSTRACT

The microbiological analysis and bacterial resistance in the ceviche de chochos sold in the surroundings of the Escuela Superior Politécnica de Chimborazo and Universidad Nacional de Chimborazo and its possible impact on the public health of Riobamba. Intends to analyze microbiological counts using different cultivation ways, the identification of these microorganisms precisely to verify if this food is suitable for human consumption or not. This research was carried out in seven stalls, where the analysis was duplicated in accordance with the regulations: NTE INEN 1529-2: Microbiological control of food; NTE INEN 2390: Legumes, debittered grain of chocho. And the Requirements for the sanitary standard that establish the microbiological criteria of sanitary quality and safety for food and beverages for human consumption in Peru. Article 15, section XV. Mesophilic aerobic microorganisms, molds and yeasts, parasites, *Staphylococcus aureus*, coliforms, *Escherichia coli*, and *Salmonella* spp, were analyzed. The 10e-4 and 10e5 dilutions were analyzed by inoculating them in a conventional cultivation way for each microorganism with a subsequent incubation and counting. Colonies were also isolated for identification through the biochemical tests and finally, the antibiogram; found as results: 6,63x10e6 CFU/g of mesophilic aerobes; 2.2 x10e6 CFU/g of *Staphylococcus aureus*; coliforms and *Escherichia coli* with uncountable values; Therefore, they exceed all the maximum permissible resulting in a public health problem by attempting against it, taking into account that the hygienic-sanitary quality in which this mass-consumption food is sold is below the ideal one; that is why a call is made to the relevant authorities to carry out a greater control in the microbiological analysis of this food, that guarantees the safety and security for the consumer.

Keywords: <MICROBIOLOGICAL ANALYSIS>, <CEVICHE DE CHOCHOS>, <BACTERIAL RESISTANCE>, <PHARMACEUTICAL BIOCHEMISTRY>, <RIOBAMBA (CANTON)>.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son cualquier enfermedad que se produce por la ingesta de algún alimento contaminado y que produce efectos nocivos para la salud de quien lo consume; según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima que cada año estas enfermedades se cobran la vida de 2,2 millones de personas, en su mayoría niños. En Ecuador, según cifras del Ministerio de Salud Pública hasta junio de 2019 se reportaron 11411 casos de enfermedades de transmisión alimentaria (MSP, 2018, pp. 1-6).

El expendio de alimentos en la vía pública provee al consumidor diferentes ventajas, como: la rapidez en su entrega, facilidad de acceso y le permite escoger entre un sin número de opciones la que mejor le agrade; sin embargo, estos alimentos generalmente son manipulados y expendidos por personas de bajo nivel sociocultural y económico y son adquiridos diariamente por un gran número de personas, quienes desconocen exactamente el tipo de riesgo al que se exponen al consumir dichos alimentos (Pérez, 2005).

El desconocimiento de las condiciones higiénico-sanitarias en que se expenden estos alimentos y el gran número de sus consumidores nos permite realizar un estudio y análisis del impacto en la salud pública, de esta práctica que data de hace muchos años atrás.

Los ceviches de chochos son un alimento único y tradicional en la ciudad de Riobamba y por su combinación de ingredientes sugieren un riesgo para la salud del consumidor, no sólo por su ingrediente principal, el chocho y sus formas de desamargado, sino también por la manipulación del producto final durante su preparación y expendio.

Es importante resaltar también que el chocho es un alimento rico en proteínas, vitaminas y minerales; y que combinado con los demás ingredientes que componen el ceviche como tal, es necesario promover su consumo por considerarlo un alimento completo.

Es por ello, que el objetivo de esta investigación es analizar la calidad microbiológica del ceviche de chochos, expendidos en los alrededores de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH) y Universidad Nacional de Chimborazo (UNACH) y su posible impacto en la salud pública de Riobamba, mediante recuentos microbiológicos utilizando diferentes medios de cultivos (sólidos y líquidos), que garanticen una identificación precisa de dichos microorganismos, para así proporcionar datos que permitan realizar controles que garanticen protección al consumidor de este tipo de alimentos expendidos de forma ambulante.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Bases teóricas

1.1.1. Chocho (*Lupinus mutabilis sweet*)

El chocho (*Lupinus mutabilis*) es una especie leguminosa que ha sido cultivada en su gran mayoría en la zona andina de Sudamérica, siendo consumida desde la época pre inca especialmente en los territorios de Perú, Colombia, Ecuador, Venezuela, Bolivia, Chile y Argentina, debido a su alto contenido nutricional (Gamarra, 2008).

En cuanto a su composición química, ofrece un alto contenido de nutrientes, tales como: proteínas, grasas y extracto no nitrogenado. El valor proteico de esta semilla supera a los de otras materias primas, en relación con la soya que muestra valores aproximados de 40%, mientras que el chocho presenta entre el 49.22 % y 51% de proteína, lo que lo convierte en un alimento excepcionalmente nutritivo para el hombre (Ortega et al., 2010, pp. 111-118).

Con respecto a sus características físicas, el chocho es una planta anual que consigue una altura entre 1.8 y 2 metros, mostrando unas vainas alargadas, en donde se encuentran los granos con coloraciones que pueden ser blanca, gris marrón o negro (Villacrés et al., 2006, pp. 1-19).

1.1.1.1. Proceso de desamargado del chocho

(Rodríguez, 2009) por su parte menciona que, debido al alto contenido de alcaloides que posee el chocho, no es posible un consumo directo de esta semilla por lo que, antes de ser ingerido deben eliminarse estos compuestos. Tras el proceso de desamargado se obtiene un producto líquido, el cual ha sido utilizado por muchos agricultores como fertilizante de cultivos de maíz, trigo, soja y papa, a más de ser usado para combatir garrapatas en ganado ovino y camélidos, notando la dualidad que tiene este producto, si bien es consumido por los pobladores, también es utilizado en beneficio de los procesos agrícolas.

El proceso de desamargado es sencillo y no necesita de maquinaria ni tecnología sofisticada, además presenta las ventajas expuestas en la figura 1-2.

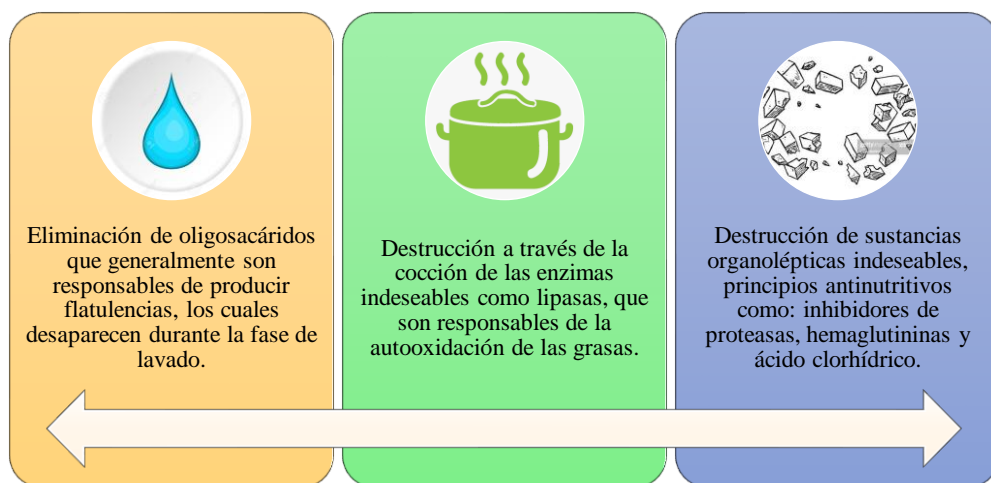


Figura 1-1: Ventajas del desamargado del chocho.

Fuente: Aranda et al., 2018, p. 10.

Realizado por: (Autor, 2020)..

Por otro lado, el desamargado del chocho también presenta desventajas, las cuales se visualizan en la figura 2-1.

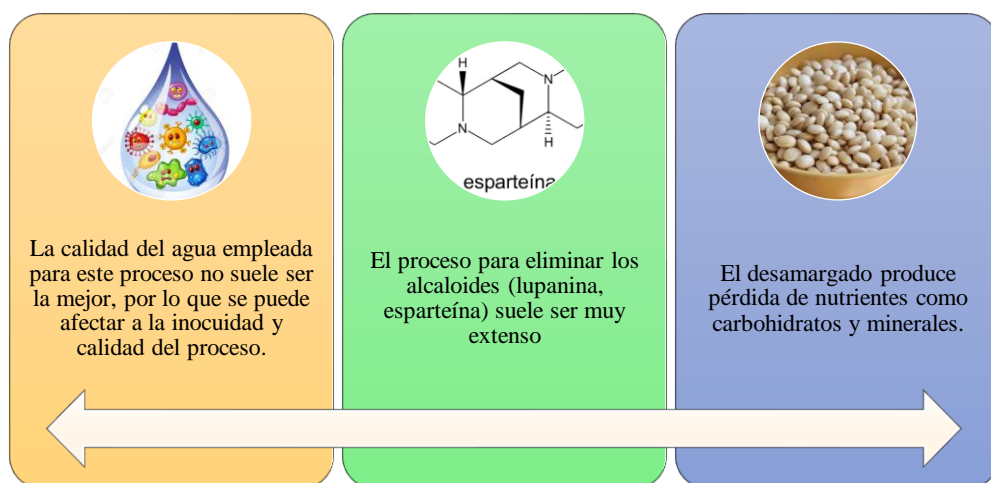


Figura 2-1: Desventajas del Desamargado del Chocho.

Fuente: Aranda et al., 2018, p. 10.

Realizado por: (Autor, 2020).

Los chochos presentan un sabor amargo debido a la presencia de alcaloides, cuyos valores varían de 0.02 a 4.45% y el follaje de 0.1 a 0.4 %; dentro de los alcaloides que contiene esta planta, se reporta la lupanina, esparteína, 13- hidroxilupanina, 4-hidroxilupanina, isolupanina, entre otros, por lo que es estrictamente necesario el proceso de desamargado para su consumo, para esto existen dos formas: la tradicional e industrial (Aranda et al., 2018, p. 10).

El desamargado industrial es un método en el cual se utiliza como insumo principal el agua potable, para la extracción de los alcaloides, pasando por la etapa de hidratación, cocción, lavado, agitación y escurrido, todos estos procesos con tiempos, porciones y temperaturas establecidas, mientras que el desamargado tradicional lleva un proceso más cultural, puesto que se ha venido

repetiendo desde siglos atrás, en la figura 3-1 se muestran los pasos a seguir, iniciando con una selección manual de los granos hasta terminar con el lavado de los mismos, este proceso tiene una duración de 7 a 8 días donde las técnicas a utilizarse son rústicas y tradicionales (Aranda et al., 2018, p. 11).

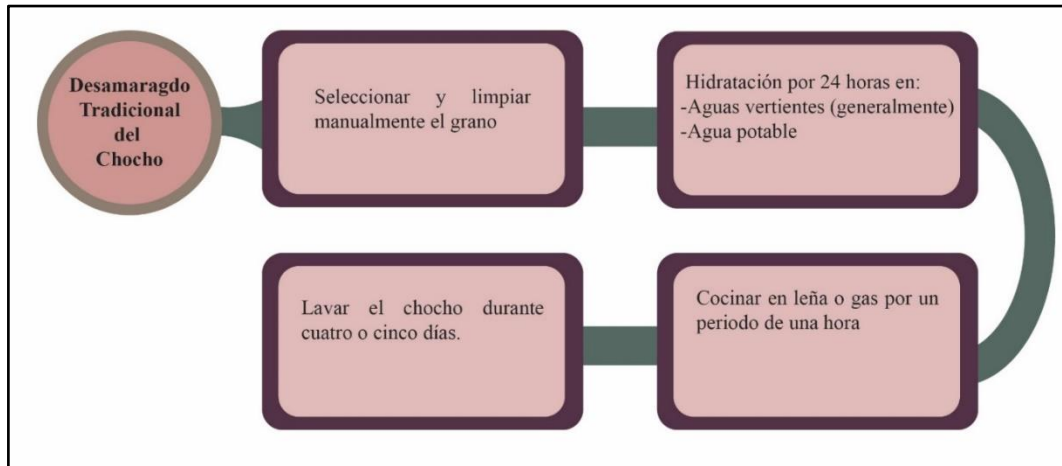


Figura 3-1: Desamargado tradicional del chocho.

Fuente: Aranda et al., 2018, p. 10.

Realizado por: (Autor, 2020).

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

Se ha señalado que el chocho tiene un gran valor nutricional, pues tiene un alto contenido de proteínas y aceites, elevando su importancia en la alimentación humana y, por tanto, sumando a su dieta diaria con mayor frecuencia. Si bien, el chocho tiene un gran porcentaje de proteínas, estas varían de acuerdo al estado de este, ya que en estado seco contiene un 42%, mientras que con el proceso de desamargado y eliminación de alcaloides este contenido se incrementa, llegando a un 51%, en fase seca (Villacrés et al., 2006, pp. 1-19).

El *Lupinus mutabilis* así también, cuenta con un alto valor de aceites que van entre el 18 y 22 %, en la figura 4-1 se muestran los tipos de aceites con sus respectivos porcentajes (Villacrés et al., 2006, pp. 1-19).

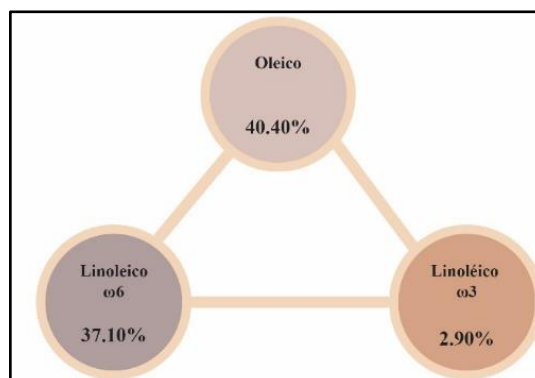


Figura 4-1: Aceites presentes en el chocho.

Fuente: Villacrés et al. 2006, p. 5.

Realizado por: (Autor, 2020).

En la Tabla 1-1 se muestra un análisis bromatológico del chocho amargo y desamargado, destacando porcentajes de su composición química.

Tabla 1-1: Análisis Bromatológico del chocho amargo y desamargado

COMPONENTE	CHOCHO AMARGO	CHOCHO DESAMARGADO
Proteína (%)	47.8	54.06
Grasa (%)	18.9	21.22
Fibra (%)	11.07	10.37
Cenizas (%)	4.52	2.54
Humedad (%)	10.13	77.05
ELN (%)	17.62	11.82
Alcaloides (%)	3.26	0.03
Azúcares totales (%)	1.96	0.73
Azúcares reductores (%)	0.42	0.61
Almidón total (%)	4.34	2.88
Potasio (%)	1.22	0.02
Magnesio (%)	0.24	0.07
Calcio (%)	0.12	0.48
Fósforo (%)	0.6	0.43
Hierro (ppm)	78.45	74.25
Zinc (ppm)	42.84	63.21
Manganeso (ppm)	36.72	18.47
Cobre (ppm)	12.65	7.99

Fuente: Villacrés et al. 2006, p. 5.

Realizado por: (Autor, 2020).

1.1.1.3. Problemas que se producen por una mala manipulación y mal almacenamiento del Chocho

Dentro de las prácticas en las que se ve involucrado al chocho se pueden generar contaminaciones, pudiéndose originar esto, en la selección y pesado, donde existe una falta o nula desinfección de superficies o un mal lavado de manos, siendo estos factores los que provocan la proliferación de microorganismos. En el proceso de almacenamiento, la temperatura ambiente favorece a la descomposición del grano, existiendo un crecimiento de bacterias, lo que finalmente desencadena intoxicaciones alimenticias (Ibarra et al., 2017, p. 20).

Un aspecto clave en cuanto la asepsia del grano es la calidad del agua, debido a que, generalmente se utilizan aguas provenientes de acequias o sin potabilizar, facilitando una contaminación de origen biológico (Sanmartín et al., 2014).

1.1.2. Ceviche

Según (Abrecht Group SAC, 2012) afirma que, el ceviche es uno de los platos con mayor aceptación en Latinoamérica y en todo el mundo. Del mismo modo, no se tiene seguridad del lugar de origen de este plato, ni en su escritura, pues lo denotan como cebiche, ceviche, sebiche o seviche, causando confusión a la hora de redactarlo. En cuanto a los ingredientes que forman parte de este plato, tiene como base principal los mariscos y el limón, sin embargo, existe muchas varianzas, sea esto por influencias árabes, españolas o culturales.

1.1.2.1. Ceviche de chocho de la ciudad de Riobamba

La gastronomía de la ciudad de Riobamba propone desde hace más de 20 años, un ceviche un tanto peculiar, a base de chochos, jugo de tomate, cuero de cerdo, limón, cebollas y picadillo, acompañado con ají, mote, tostado, chifles y canguil. La importancia de este plato, radica al punto que el Instituto Nacional de Patrimonio Cultural del Ecuador lo ha llegado a declarar como un plato tradicional en la provincia de Chimborazo, siendo esto también una motivante para el tema de estudio (Gobierno Autónomo Descentralizado de Riobamba, 2020).



Figura 5-1: Ingredientes del cevichocho Riobambeño.

Fuente: Gobierno Autónomo Descentralizado de Riobamba, 2020.

Realizado por: (Autor, 2020).

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

En la tabla 2-1 se muestra los principales ingredientes del ceviche de chocho, con su respectiva descripción, acerca de las bondades que tiene cada uno de estos alimentos.

Tabla 2-1: Cualidades que contiene los ingredientes principales del ceviche de chocho

INGREDIENTES	DESCRIPCIÓN
Limón	Permite aportar gran cantidad de vitamina C y algunos minerales como el potasio. Intervienen también en muchas reacciones enzimáticas como la producción del colágeno. Es un excelente antioxidante y ayuda a reducir el riesgo de algunas enfermedades
Tomate fresco y maduro	Eficaz remedio para eliminar o disminuir el ácido úrico Alivia algunas enfermedades del estómago, hígado y los intestinos. Contiene vitamina B y C y algunos minerales como el potasio y fósforo. Presenta un alto contenido en carotenos como el licopeno, una importante fuente de antioxidantes.
Maíz tostado	Es una fuente de hidratos de carbono. Contiene fibra que es esencial para la digestión porque ayuda a acelerar el transporte de los alimentos por el tracto intestinal. Ayuda a mantener saciedad entre comidas, ya que la proteína que posee es de 4 gramos por cada 48 gramos, lo que equivale a ¼ taza.
Cebolla	Rica en vitamina A, B1, C y E Contiene minerales como calcio, magnesio, yodo, cobalto, cobre, hierro, bromo, fósforo, cloro, potasio, níquel, silicio, zinc. El azufre, es uno de los antioxidantes más poderosos, también es importante para mantener el cuerpo bien nutrido, en especial el sistema nervioso y los huesos.
Cuero de cerdo	Se compone principalmente de proteína como el colágeno, que es un tejido conectivo que se convierte en gelatina cuando llega al punto de ebullición, la albumina es una proteína soluble, la elastina es sumamente inerte al ataque químico. Como la mayoría de las materias biológicas, contiene lípidos, carbohidratos, sales inorgánicas y agua.

Fuente: Afrian et al. 2017.

Realizado por: (Autor, 2020).

1.1.3. Ventas ambulantes

La inocuidad de los alimentos es uno de los temas fundamentales dentro de seguridad alimentaria, debido a que, de esto depende la salud de los consumidores, siendo este tema una gran problemática al estudiar las ventas ambulantes, las cuales difícilmente cumplen con todas las normas de asepsia, que evitan la contaminación microbiana (Barbosa, 2012).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA), los alimentos de venta callejera se definen como aquellos que están listos para su consumo, los cuales son preparados o comercializados por vendedores fijos o ambulantes, en lugares públicos y calles, los cuales se caracterizan por tener bajo costo, sin embargo, al hablar de este tema es probable que existan riesgos sanitarios (Barbosa, 2012).

La venta ambulante de alimentos, resulta ser una práctica habitual alrededor del mundo, sin embargo, de cada nación depende los lineamientos o normativas que deben establecerse con la finalidad de controlar su expendio, por lo que en Ecuador se ha establecido un “Reglamento para el control sanitario de alimentos que se expenden en la vía pública (Acuerdo No. 14381)”, y cuyos principales artículos relacionados con esta investigación, se detallan a continuación (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2013, pp. 1689-1699):

- Los puestos de venta ambulante de alimentos son considerados como una amenaza o alto riesgo epidemiológico, por lo que es necesario que cuenten con un sistema de conservación en caliente mayor a 60°C y/o refrigeración menor a 5°C.
- La persona encargada del expendio y preparación de los alimentos deberá capacitarse en buenas prácticas de manipulación, que incluyen el uso de vestimenta apropiada como delantal o mandil, los cuales deben estar limpios y en buen estado, además, es importante tener el cabello recogido o cubierto con un gorro o redecilla, uñas cortas y no portar anillos, pulseras o reloj, lo que facilita una asepsia correcta de las manos.
- El artículo 30 de este reglamento menciona que, la venta de ceviches deberá realizarse únicamente en lugares que tengan una infraestructura sanitaria adecuada, además de tener una correcta cadena de frío que garantice la conservación y frescura de los productos, debido a que, este alimento es considerado de alto riesgo epidemiológico (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2013, pp. 1689-1699).

El tema de ventas ambulantes se ha convertido en un problemática sanitaria por lo que en Ecuador en el año 2017 se realizó un estudio por la Secretaría de Salud, en donde se reveló que el 47% de muestras de alimentos que fueron tomadas en varias ciudades, no cumplían con los requerimientos de calidad y tenían algún grado de contaminación, sobre todo aquellos que involucraban mote, cevichochos, jugos, tripas, frutas, entre otros (El Comercio, 2017).

1.1.4. Enfermedades de Transmisión Alimentaria (ETAs)

La OMS (2016) afirma que las enfermedades de transmisión alimentaria, constituyen un verdadero problema sanitario y económico creciente en todo el mundo. Causado principalmente por la ingesta de alimentos que están contaminados por alguna sustancia química o por microorganismos. La contaminación puede generarse en cualquier etapa de la producción del alimento, ya sea en el origen o a la hora de servir al consumidor, así también la contaminación puede venir del ambiente.

Miles de personas mueren por consumir alimentos insalubres, siendo un tema de interés general, ya que los síntomas a evidenciarse suelen ser en ciertos casos algo severos, inicialmente con síntomas gastrointestinales, pero también puede generarse síntomas neurológicos, ginecológicos, inmunológicos y de otro tipo; mientras que los cuadros que llegan a considerarse más graves

pueden provocar una insuficiencia multiorgánica, incluso se puede llegar al cáncer, por lo que representa una carga considerable de discapacidad en el consumidor (OMS, 2016).

1.1.4.1. Infecciones transmitidas por alimentos

La contaminación de los alimentos puede ser ocasionada por bacterias, virus o parásitos, que afectan la salud de los individuos. En el grupo de las bacterias se encuentran la *Salmonella*, *Campylobacter* y *Escherichia coli* enterohemorrágica que son los patógenos más comunes en la transmisión alimenticia, provocando síntomas como: fiebre, dolores de cabeza, náuseas, vómitos, dolores abdominales y diarrea. Generalmente la *Salmonella*, se encuentra en productos de origen animal (carne de ave, huevos), mientras que, la infección por *Campylobacter* es ocasionada principalmente por la ingesta de leche cruda, carne de ave cruda o poco cocinada, y finalmente la *Escherichia coli* enterohemorrágica se relaciona con el consumo de leche no pasteurizada, carne poco cocinada y fruta y hortalizas contaminadas (OMS, 2020a).

Las infecciones producidas por virus causan síntomas como náuseas, vómitos explosivos, diarrea acuosa y dolores abdominales, pudiendo transmitirse por alimentos contaminados, en fase de cocción o la manipulación de estos, por personas infectadas. El virus de la Hepatitis A provoca problemas hepáticos, transmitiéndose generalmente por consumir mariscos crudos o poco cocinados (OMS, 2020a).

1.1.4.2. Intoxicaciones transmitidas por alimentos

Al consumir alimentos contaminados por productos químicos o por toxinas provenientes de microorganismos se pueden generar intoxicaciones en el ser humano, de las cuales la enterotoxina B estafilocócica (EBE) producida por la bacteria *Staphylococcus aureus*, suele ser la más común, siendo originada ante la inadecuada manipulación de alimentos como postres, ensaladas, comidas horneadas, que han sido contaminadas (Agencia Nacional de Regulación Control y Vigilancia Sanitaria, 2015, pp. 0-40).

Existen varios factores de riesgo que pueden alertar una intoxicación por alimentos, de modo que, en la figura 6-1 se muestran algunos de ellos:



Figura 6-1: Factores de Riesgo ante intoxicaciones alimentarias.

Fuente: ARCSA 2015, p. 9.

Realizado por: (Autor, 2020).

1.1.5. Resistencia antimicrobiana

La resistencia antimicrobiana (RAM) se origina cuando los microorganismos presentan cambios al exponerse a los antimicrobianos, como antibióticos, antifúngicos, antivíricos, antipalúdicos o antihelmínticos. Al producirse este fenómeno los medicamentos resultan ineficaces, persistiendo las infecciones en el organismo e incrementado el riesgo de propagación a otros individuos (OMS 2020).

La RAM es motivo de interés mundial, debido a que, siguen apareciendo nuevos mecanismos de resistencia que se van propagando y ponen en peligro la capacidad de tratar enfermedades infecciosas comunes, desencadenando discapacidades e incluso muerte de los pacientes. Así también, se incrementa el costo de la atención sanitaria puesto que, esto resulta en una mayor duración de las hospitalizaciones y una atención más intensiva de los individuos (OMS 2020).

Se ha indicado que, las enfermedades causadas por cepas resistentes pueden ser incluso más graves que las provocadas por las cepas sensibles, lo que refiere en muchas ocasiones a la necesidad del uso de antibióticos de amplio espectro o a su vez, combinaciones de antibióticos que nos permita combatir cuadros infecciosos, lo que provoca consecuentemente efectos negativos sobre el sistema gastrointestinal (Puig et al., 2011, p. 32).

1.1.6. Medios de cultivo

Un medio de cultivo se define como el conjunto de nutrientes y factores que crean las condiciones óptimas para el crecimiento, metabolismo y desarrollo de microorganismos. Las sustancias alimenticias son creadas artificialmente en laboratorios, tomando en consideración que estos deben tener las características y composición similar a los líquidos orgánicos del cuerpo humano (Ortega et al., 2009, p. 2). A continuación, en la tabla 3-1 se indican los diferentes tipos de medios de cultivo:

Tabla 3-1: Tipos de medios de cultivo

Medios de cultivo	Descripción
Generales	Permiten el crecimiento de una extensa variedad de microorganismos.
De enriquecimiento	Favorecen el crecimiento de determinados microorganismos sin inhibir totalmente a los demás.
Selectivos	Favorecen el crecimiento selectivo de determinados microorganismos, inhibiendo completamente el desarrollo de los demás.
Diferenciales	Estos medios de cultivo ponen de manifiesto las propiedades de determinados microorganismos.

Fuente: Medios de cultivo (Ortega et al, 2009).

Realizado por: (Autor, 2020).

Por otro lado, los medios de cultivo también pueden clasificarse en función de su estado físico, como se observa en la tabla 4-1, a continuación:

Tabla 4-1: Medios de cultivo de acuerdo con su estado físico

Medios de cultivo	Descripción
Sólidos	Estos se caracterizan por usar un agente gelificante (agar – agar) que da solidez a los medios de cultivo, en donde el componente mayoritario es un polisacárido obtenido de algas marinas, el cual además es utilizado como nutriente (Ortega et al., 2009, p. 2). Ejemplo: Agar SS.
Líquidos	Estos medios se caracterizan por ser líquidos enriquecidos que permiten el desarrollo de microorganismos que no pueden crecer fácilmente en medios sólidos, Ejemplo: Caldos de cultivo o aguas peptonadas (Ortega, 2012).
Semisólidos	Estos medios de cultivo se caracterizan por un menor contenido de agar, por lo que no se solidifican completamente a temperatura ambiente, se utilizan preferentemente como pruebas de bioquímicas, de motilidad, fermentación o selectividad de bacterias Ejemplo: Agar SIM (Ortega, 2012).

Fuente: Medios de cultivo (Ortega et al., 2009).

Realizado por: (Autor, 2020).

A continuación, en la tabla 5-1, se observan los medios de cultivo utilizados para el desarrollo de las bacterias presentes en el ceviche de chochos:

Tabla 5-1: Medios de cultivos utilizados en la investigación

Medio	Descripción	Modo de acción
Medios de cultivo líquidos		
Agua peptonada	Este medio de cultivo se utiliza como diluyente y enriquecedor para bacterias presentes en alimentos o muestras de interés sanitario (Laboratorio Britania S.A, 2018, pp. 1-2).	Este medio es enriquecedor no selectivo, en el cual la peptona es el nutriente fundamental para el desarrollo microbiano, mientras que el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. Además, se utiliza como diluyente en reemplazo de suero fisiológico (Laboratorio Britania S.A, 2018, pp. 1-2).
Caldo verde bilis brillante	Este medio de cultivo se utiliza para el enriquecimiento de <i>Escherichia coli</i> y coliformes fecales de diversas muestras que incluyen el agua (Laboratorio Britania, 2013, pp. 217-220).	La bilis y el verde brillante resultan ser selectivos para el crecimiento de coliformes, mientras que inhiben el crecimiento de bacterias gran positivas y negativas. Por otro lado, la peptona aporta los nutrientes y la lactosa es el hidrato de carbono fermentable (Laboratorio Britania, 2013, pp. 217-220)
Medios de cultivo sólidos		
Agar eosina azul de metileno (EMB)	Medio de cultivo utilizado para aislar bacilos Gram negativos (familia Enterobacteriaceae) de rápido desarrollo y escasas exigencias nutricionales (Laboratorios Britania S.A., 2015, pp. 10-11).	Este medio se utiliza para aislar selectivamente a enterobacterias y otras especies de bacilos Gram negativos. La eosina y el azul de metileno inhiben el crecimiento de bacterias gran positivas, que son incapaces de utilizar la lactosa y sacarosa. <i>Escherichia coli</i> y <i>Citrobacter</i> spp. En este medio, presentan un característico brillo metálico. Por otro lado, las especies de <i>Cándida</i> forman colonias rosadas puntiformes (Laboratorios Britania S.A., 2015, pp. 10-11).
Agar Manitol Salado	Medio de cultivo usado para aislar y diferenciar de estafilococos (Laboratorios Britania S.A., 2015, pp. 1-2).	La fuente de carbono lo constituyen el extracto de carne, peptona y tripteína, mientras que el nitrógeno, vitaminas y minerales promueven el desarrollo. El cloruro de sodio se encuentra en concentraciones altas por lo que inhibe el desarrollo de otros microorganismos. El manitol es el carbohidrato fermentable y el rojo fenol el indicador de pH, el cual varía hacia amarillo cuando las bacterias fermentan el manitol y producen ácidos. Los estafilococos pueden o no fermentar el manitol (Laboratorios Britania S.A., 2015, pp. 1-2).
Agar PCA (Recuento en Placa Agar)	Medio de cultivo utilizado para el recuento de bacterias aeróbicas en agua y alimentos (Laboratorios Britania S.A., 2010, pp. 1-2).	Este medio contiene nutrientes que permiten el desarrollo bacteriano como glucosa, tripteína, mientras que el agar es el agente gelificante (Laboratorios Britania S.A., 2010, pp. 1-2).
Agar Sabouraud	Medio de cultivo utilizado para aislar, identificar y conservar hongos que pueden ser patógenos o saprofitos, siendo además útil para el crecimiento de levaduras (Laboratorios Britania S.A., 2001b, pp. 1-2).	La peptona, tripteína y glucosa son utilizados como nutrientes, además esta última junto con el cloranfenicol y el pH ácido impiden el desarrollo de bacterias, favoreciendo el crecimiento de hongos y levaduras. El agar es utilizado como agente solidificante (Laboratorios Britania S.A., 2001b, pp. 1-2).

Tabla 6-1 (Continuación): Medios de cultivos utilizados en la investigación

Agar Salmonella shigella (SS)	Es un medio de cultivo selectivo para el aislamiento de <i>Salmonella</i> spp. y también para algunas especies de <i>Shigella</i> spp. de alimentos, heces o muestras en donde se tenga sospecha de su presencia (Laboratorios Britania S.A., 2011, pp. 3-5).	La pluripeptona y el extracto de carne son fuente de nutrientes para el crecimiento microbiana, por otro lado, las sales biliares junto con el verde brillante interfieren en el desarrollo de bacterias gran positivas, el tiosulfato de sodio permite que se forme anhídrido sulfúrico. <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> no fermentan la lactosa y crecen adecuadamente en este medio de cultivo (Laboratorios Britania S.A., 2011, pp. 3-5).
Medios semisólidos (Pruebas bioquímicas)		
Prueba de catalasa	Esta prueba permite diferencias <i>Streptococcus</i> y <i>Staphylococcus</i> , debido a que los últimos, son capaces de descomponer el peróxido de hidrógeno (Laboratorios Britania S.A., 2011, pp. 3-5).	Las bacterias aerobias contienen catalasa que descompone el peróxido de hidrogeno en agua y oxigeno cuya reacción se caracteriza por el desprendimiento de burbujas para resultados positivos (Laboratorios Britania S.A., 2011, pp. 3-5).
Prueba coagulasa	La coagulasa es una enzima capaz de coagular el plasma sanguíneo, sirviendo para la diferenciación de <i>Staphylococcus Aureus</i> de otros <i>Staphylococcus</i> (Laboratorios Britania S.A., 2011, pp. 3-5).	La coagulasa desnaturaliza la fibrina del plasma formando un coagulo, el que indicara un resultado positivo (Laboratorios Britania S.A., 2011, pp. 3-5).
Prueba de ureasa	La enzima urea presente en algunos organismos es capaz de catalizar la hidrólisis de la urea, para obtener dióxido de carbono y amoniaco como productos finales (Ortega, 2012).	La ureasa presente en el microorganismo es capaz de alcalinizar el medio y cambiarlo de color de acuerdo al indicador rojo fenol (Ortega, 2012).
Prueba Citrato de Simmons	Este medio es utilizado como una prueba bioquímica para diferencias bacilos gramnegativos entéricos, de muestras de alimentos, agua o laboratorio (Ortega, 2012).	Las bacterias capaces de utilizar el citrato sódico y el amonio como única fuente de nitrógeno, crecerán en este medio y lo cambiaran de color de verde a azul, debido al indicador de azul de bromotimol al aumentar el pH (Ortega, 2012).
Kligler Hierro agar	Medio de cultivo utilizado para la diferenciación de enterobacterias en base a su fermentación de hidratos de carbono y producción de anhídrido sulfúrico (Laboratorios Britania S.A., 2001a, pp. 1-2).	La peptona de carne y tripteína aportan nutrientes, mientras que la lactosa y glosa con los carbohidratos fermentables, en tanto que el tiosulfato de sodio es el sustrato para la producción del anhídrido (Laboratorios Britania S.A., 2001a, pp. 1-2).

Fuente: Medios de cultivo (Ortega et al., 2009, pp. 1-5).

Realizado por: (Autor, 2020).

1.1.7. Tinción Gram

Durante la década de 1880 el médico danés Hans Christian Gram, desarrolló una de las técnicas bacteriológicas más importantes hasta la actualidad, al observar tejidos pulmonares de pacientes con neumonía, de modo que, ahora es conocida como la “Tinción Gram” que diferencia a las bacterias en dos grandes grupos de acuerdo a su coloración (Rodríguez et al., 2018, p. 166).

A las que se teñían de color azul-violeta las denominó gram positivas, mientras que a las que toman una coloración roja las llamó gram negativas. Estas bacterias se diferencian de acuerdo a la estructura de sus paredes celulares y cuyas características se observan en la tabla 6-1 a continuación (Rodríguez et al., 2018, p. 166):

Tabla 7-1: Diferencias entre bacterias gram positivas y negativas.

Características	Bacterias Gram Positivas	Bacterias Gram Negativas
Color de la tinción	Violeta	Rojo
Pared celular	Gruesa	Delgada
Presencia de lipopolisacáridos en la pared celular	Ausente	Presente
Presencia de ácidos lipoproteicos y teicoicos en la pared celular	Presente	Ausente

Fuente: (Rodríguez et al., 2018, p. 166).

Realizado por: (Autor, 2020).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Localización de estudio

La toma de muestras del ceviche de chochos se realizó en la ciudad de Riobamba, en los lugares de venta más concurridos de los alrededores de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y la Universidad Nacional de Chimborazo.

El análisis microbiológico se desarrolló en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2. Población de estudio

Los ceviches de chochos expendidos en los 7 puestos de mayor concurrencia de los alrededores de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (4 puestos) y Universidad Nacional de Chimborazo (3 puestos).

2.3. Periodo de la investigación

La investigación se desarrolló durante el periodo Octubre – Diciembre del año 2019.

2.4. Materiales, Equipos y Reactivos

2.4.1. *Materiales*

- Algodón
- Asas bacteriológicas
- Bajalenguas
- Bolsas para esterilización
- Cajas petri de vidrio
- Cinta indicadora de esterilización
- Cooler
- Frascos estériles
- Fundas Ziploc
- Gradillas

- Matraces Erlenmeyer
- Mecheros de alcohol
- Micropipetas
- Papel aluminio
- Papel parafilm
- Peras de succión
- Pipetas estériles
- Placas cubreobjetos
- Placas portaobjetos
- Probetas
- Puntas para micropipetas
- Toallas de papel
- Tubos de ensayo

2.4.2. Equipos

- Autoclave
- Balanza
- Cámara de flujo laminar
- Estufa
- Homogenizador Stomacher
- Microscopios
- pH metro
- Refrigerador
- Reverbero

2.4.3. Reactivos

- Aceite de inmersión
- Agar Eosina azul de metileno
- Agar Kligler
- Agar manitol salado
- Agar Mueller-Hinton
- Agar nutriente
- Agar PCA

- Agar Saboraud
- Agar SS
- Agar triptona de soya
- Agar urea
- Agua destilada
- Agua oxigenada
- Agua peptonada
- Alcohol potable
- Alcohol-acetona
- Caldo cerebro corazón
- Caldo tetracionato
- Caldo triptona de soya
- Caldo verde bilis brillante
- Cloranfenicol
- Cristal violeta
- Discos de antibiograma
- Estándar de McFarland
- Lugol
- Plasma sanguíneo
- Solución saturada de NaCl
- Yodo
- Yoduro de potasio
- Zafranina

2.5. Metodología

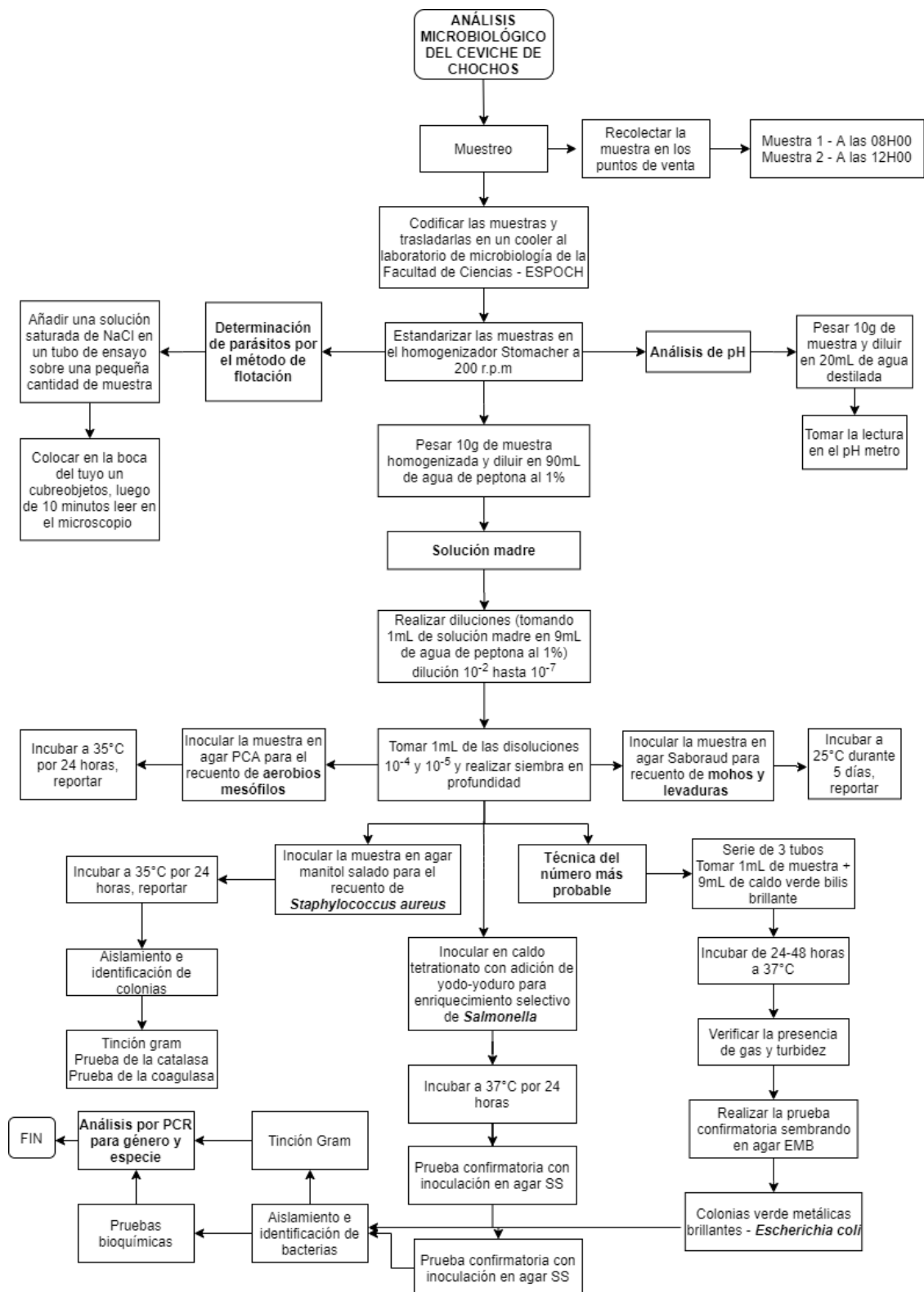


Gráfico 1-2: Metodología para el análisis microbiológico del ceviche de chochos.

Realizado por: (Autor, 2020).

2.6. Métodos

2.6.1. *Recolección y Transporte de muestras en base a la normativa: NTE INEN 1529-2: Control microbiológico de los alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el Análisis Microbiológico*

Protocolo de análisis microbiológico del ceviche de chochos expendidos en los alrededores de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y la Universidad Nacional de Chimborazo.

1. **Objeto del muestreo:** Ceviche de chochos
2. **Objetivo del muestreo:** Analizar microbiológicamente los ceviches de chochos expendidos en los alrededores de la ESPOCH y UNACH, Riobamba.
3. **Características a evaluar:** Cuantificar las unidades formadoras de colonias y cualificar la presencia o ausencia de bacterias, parásitos, mohos y levaduras de interés para el estudio, con un posible impacto en la salud pública de la Ciudad.
4. **Puntos de muestreo:** Alrededores de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y la Universidad Nacional de Chimborazo.
5. **Plan de muestreo:** Recolección de 4 unidades de muestra por cada uno de los locales ubicados en los anteriores puntos de muestreo, dos unidades en la mañana y dos unidades en la tarde.
6. **Envases de recolección:** Recipientes plásticos estériles en los cuales se entrega el alimento al consumidor.
7. **Toma de muestra:** Dos unidades de ceviches de chochos de cada uno de los locales con su respectiva codificación.
8. **Transporte de la muestra:** Recipientes cooler's que permiten conservar la muestra a una temperatura de 2 a 8 °C, hasta llegar al laboratorio de microbiología para su posterior análisis.
9. **Informe de muestreo:** Listado de locales y de los vendedores registrados en el GADM Riobamba con sus respectivas direcciones.
10. **Análisis de laboratorio:** Protocolo de análisis microbiológico en los diferentes medios de cultivo: Agar PCA, agar S.S, agar EMB, agar Manitol Salado, agar Saboraud, caldo verde bilis brillante, caldo tetracionato.
11. **Normativas a utilizarse:**
 - NTE INEN 2390: Leguminosas. Grano desamargado de chocho. Requisitos
 - Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano – Perú. Artículo 15, sección XV
 - NTE INEN 1529-2: 1999: Control microbiológico de los alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el Análisis Microbiológico.

- NTE INEN 1529-5: 2006: Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos.
- NTE INEN 1529-14: 2013: Control microbiológico de los alimentos. *Staphylococcus aureus*.
- NTE INEN 1529-6: 1990: Control microbiológico de los alimentos. Determinación de microorganismos coliformes por la técnica del número más probable.
- NTE INEN 1529-8: 2016: Control microbiológico de los alimentos. Detección y recuento de *Escherichia coli* presuntiva por la técnica del número más probable.
- NTE INEN 1529-15: 2013: Control microbiológico de los alimentos. *Salmonella*. Método de detección.

2.6.2. Homogenización de las muestras

Procedimiento:

1. Desinfectar con alcohol potable el equipo y los materiales a usar.
2. Colocar cada una de las muestras en fundas Ziploc previamente rotuladas.
3. Ubicar cada muestra en el homogenizador stomacher a 200 r.p.m por un tiempo de 1 minuto.
4. Colocar las muestras homogenizadas en la cámara de flujo laminar.

2.6.3. Análisis de pH

Se utilizó un pH metro perfectamente calibrado.

Procedimiento:

1. Pesar en un vaso de precipitación 10g de muestra homogenizada.
2. Diluir con 20mL de agua destilada.
3. Agitar muy bien.
4. Medir directamente en el equipo.
5. Enjuagar y limpiar el electrodo después de cada medición.

2.6.4. Determinación de parásitos por el método de flotación

Procedimiento:

1. Preparar una solución saturada de NaCl (36,0g de NaCl_(s) en 100mL de agua destilada).
2. Colocar 1g de muestra representativa homogenizada en tubos de ensayo estériles.
3. Cubrir con la solución saturada hasta el borde el tubo.
4. Dejar reposar los tubos colocando un cubreobjetos en la boca del tubo.
5. Colocar el cubreobjetos en una placa portaobjetos y observar directamente en el microscopio.

2.6.5. Solución madre y diluciones

Antes de empezar se debe realizar una limpieza y desinfección completa en el área de trabajo y los materiales a utilizar.

Procedimiento:

1. Preparación del agua de peptona al 1%:
2. Pesar en un matraz Erlenmeyer 1g de agar de peptona.
3. Añadir 100mL de agua destilada.
4. Diluir perfectamente.
5. Esterilizar en el autoclave por 30 minutos a 121°C.
6. Pesar dentro de la cámara de flujo 10g de muestra previamente homogenizada.
7. Colocar en los frascos estériles los 10g de muestra más 90mL de agua de peptona (Solución madre).
8. Tomar 1mL de la solución madre y diluir en 9mL de agua de peptona (Dilución 10^{-2}).
9. Seguir realizando diluciones hasta llegar a la Dilución 10^{-6} .

Es importante indicar que para los análisis microbiológicos se trabajó con las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} por duplicado y empleando un **blanco** en cada uno de los análisis.

2.6.6. Recuento de aerobios mesófilos por la técnica de siembra con vertido en placa

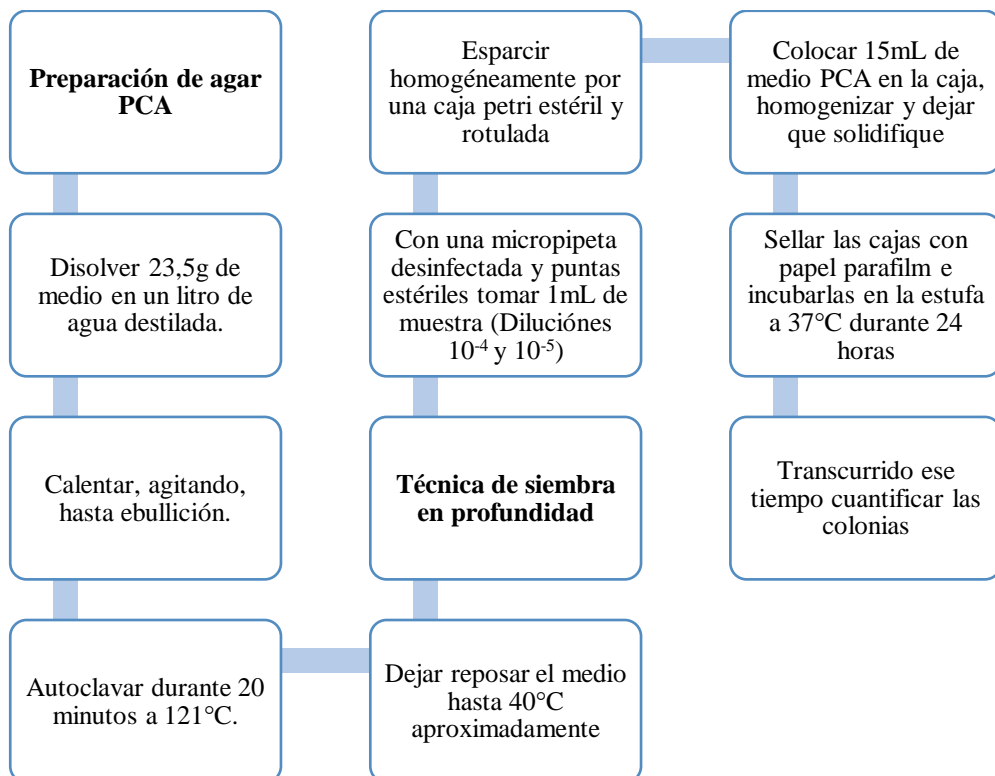


Figura 1-2: Metodología para el recuento de aerobios mesófilos por la técnica de siembra con vertido en placa.

Realizado por: (Autor, 2020).

2.6.7. Recuento de mohos y levaduras por la técnica de siembra en profundidad

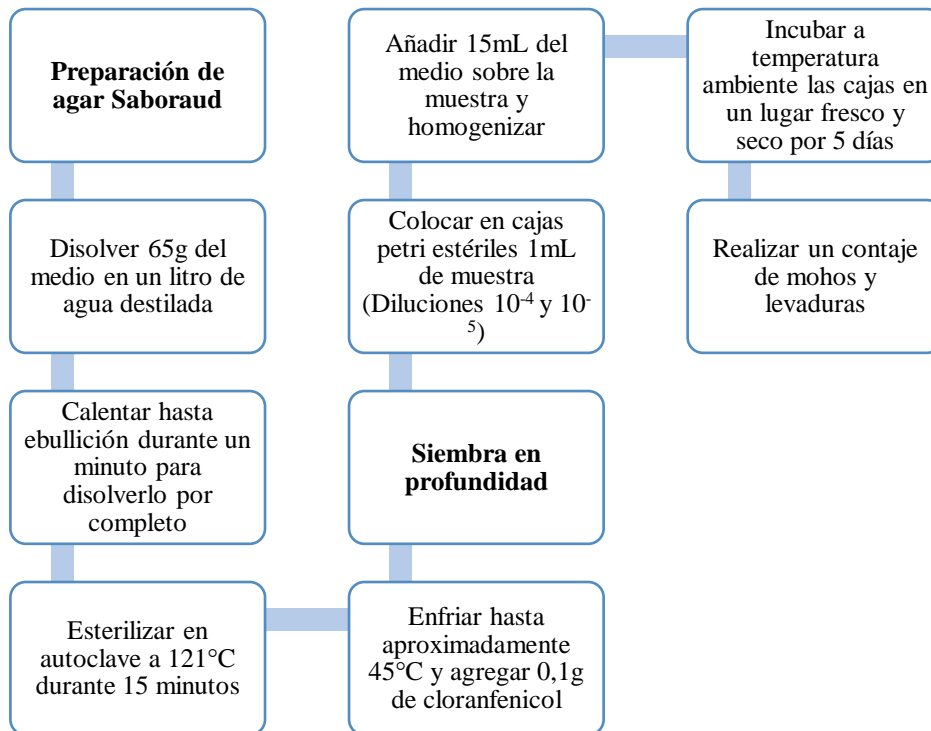


Figura 2-2: Metodología para el recuento de mohos y levaduras por la técnica de siembra en profundidad.

Realizado por: (Autor, 2020).

2.6.8. Recuento de *Staphylococcus aureus* por la técnica de siembra en profundidad

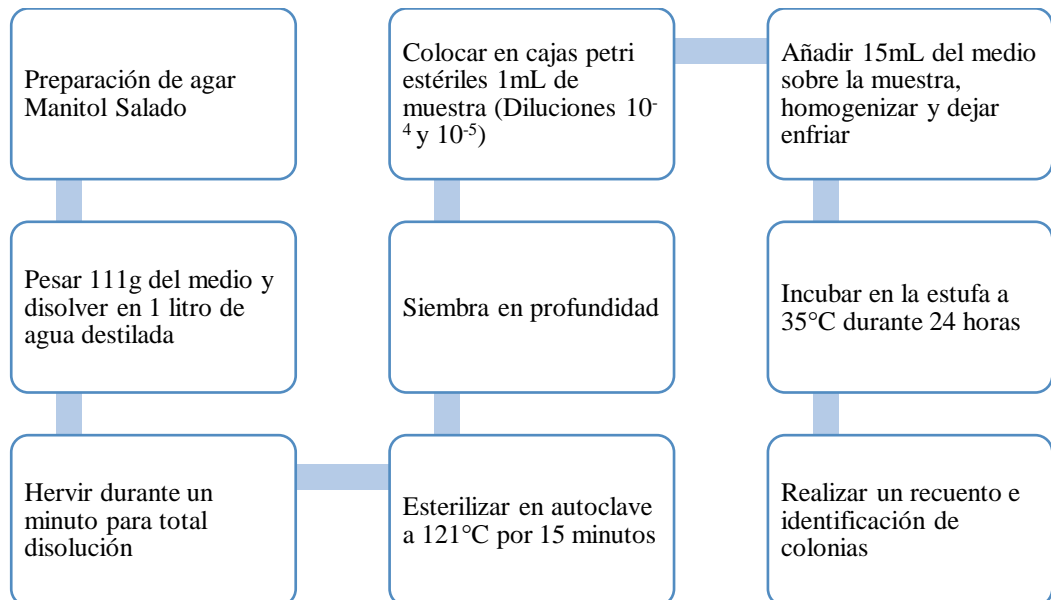


Figura 3-2: Metodología para el recuento de *Staphylococcus aureus* por la técnica de siembra en profundidad.

Realizado por: (Autor, 2020).

2.6.9. Pruebas de confirmación de *Staphylococcus aureus*

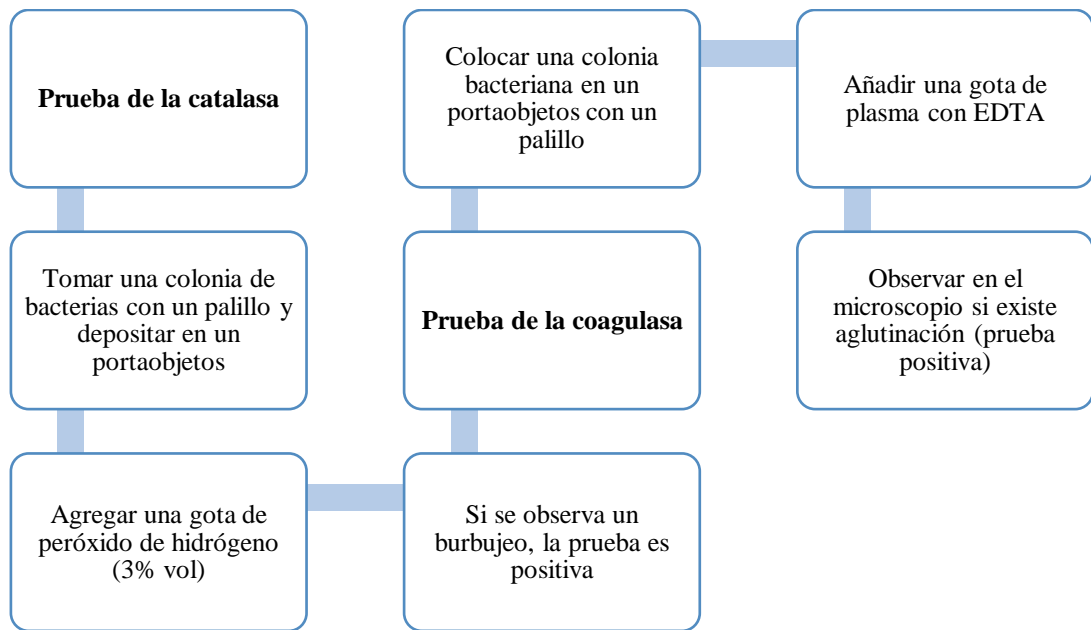


Figura 4-2: Metodología para las pruebas de confirmación de *Staphylococcus aureus*.

Realizado por: (Autor, 2020).

2.6.10. Recuento de coliformes totales por la técnica del número más probable (NMP)

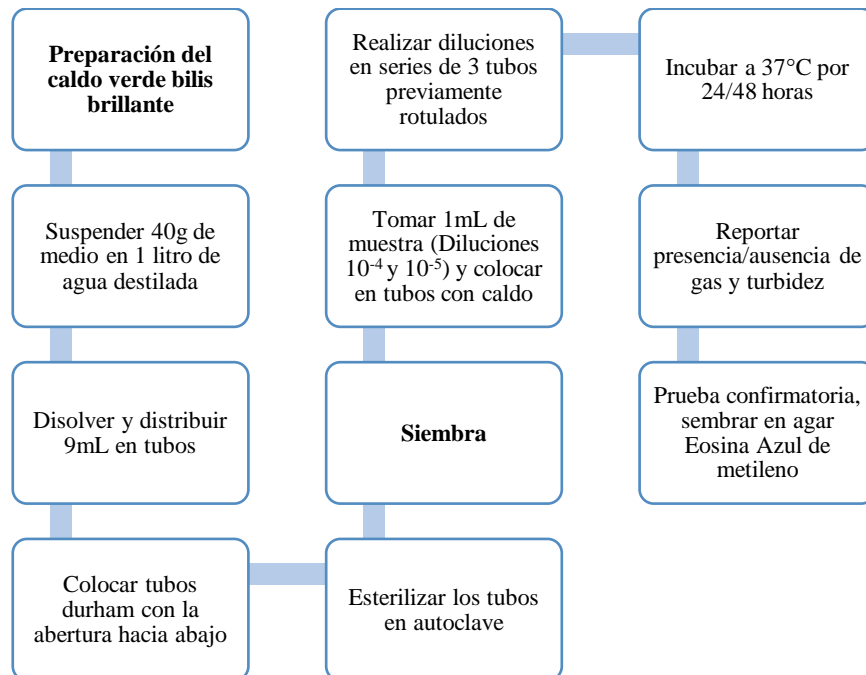


Figura 5-2: Metodología para el recuento de coliformes totales por la técnica del número más probable (NMP).

Realizado por: (Autor, 2020).

NUMERO DE TUBOS POSITIVOS EN CADA DILUCION			NMP POR GRAMO O cm ³	LIMITES DE CONFIANZA DEL 95%		CATEGORIA
DILUCION 10 ⁻¹	DILUCION 10 ⁻²	DILUCION 10 ⁻³		INFERIOR	SUPERIOR	
0	0	0	0	-	-	-
0	0	1	3	0,5	9	3
0	1	0	3	0,5	13	2
1	0	0	4	0,5	20	1
1	0	1	7	1	21	3
1	1	0	7	1	23	2
1	1	1	11	3	36	4
1	2	0	11	3	36	3
2	0	0	9	1	36	1
2	0	1	14	3	37	3
2	1	0	15	3	44	2
2	1	1	20	7	89	4
2	2	0	21	4	47	3
2	2	1	28	10	150	4
3	0	0	23	4	120	1
3	0	1	39	7	130	2
3	0	2	64	15	380	4
3	1	0	43	7	210	1
3	1	1	75	14	230	2
3	1	2	120	30	380	3
3	2	0	93	15	380	1
3	2	1	150	30	440	2
3	2	2	210	35	470	3
3	3	0	240	36	1 300	1
3	3	1	460	71	2 400	1
3	3	2	1 100	150	4 800	1

Figura 6-2: Índice del Número más probable de bacterias cuando se utiliza tres alícuotas de 1 cm³ por dilución.

Fuente: (INEN, 1990, p. 5).

2.6.11. Determinación de *Escherichia coli* en agar Eosina azul de metileno (EMB)

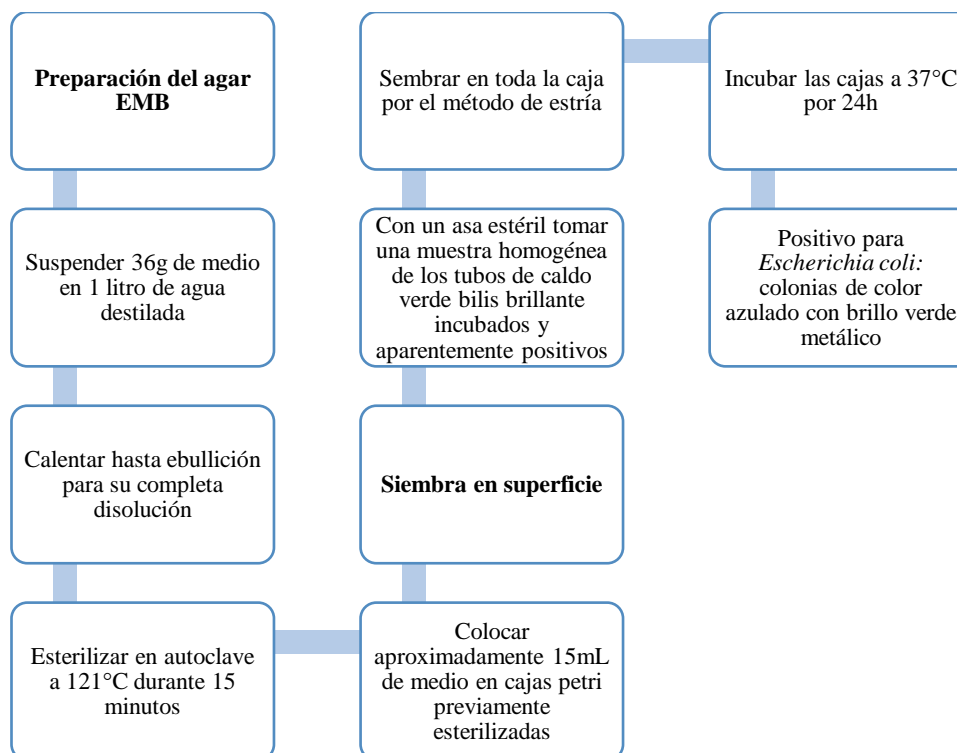


Figura 7-2: Metodología para la determinación de *Escherichia coli* en agar Eosina azul de metileno (EMB).

Realizado por: (Autor, 2020).

2.6.12. Activación de *Salmonella* en caldo tetratonato

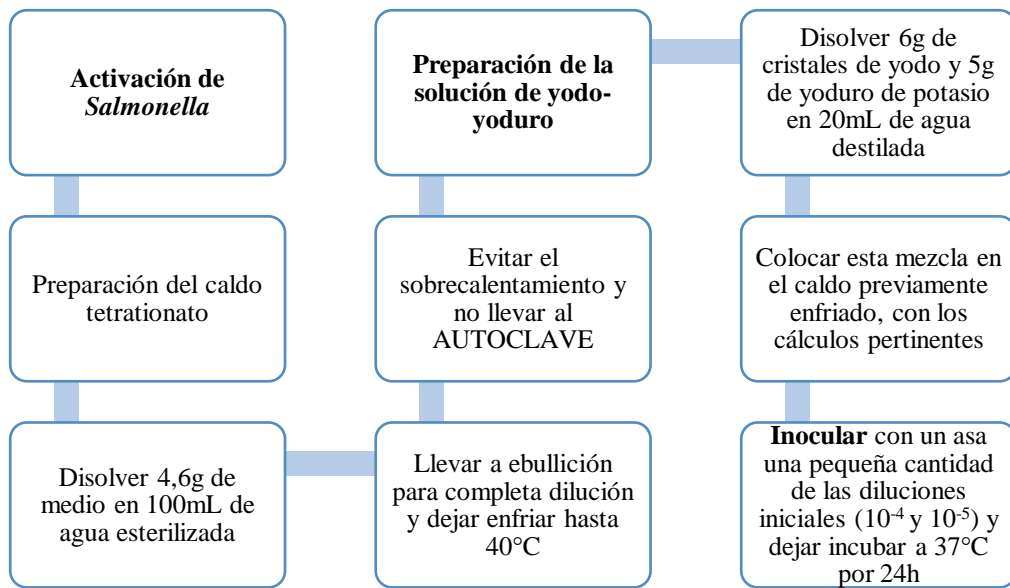


Figura 8-2: Metodología para la activación de *Salmonella* en caldo tetratonato.
Realizado por: (Autor, 2020).

2.6.13. Determinación de *Salmonella* en agar *Salmonella – Shigella* (SS)

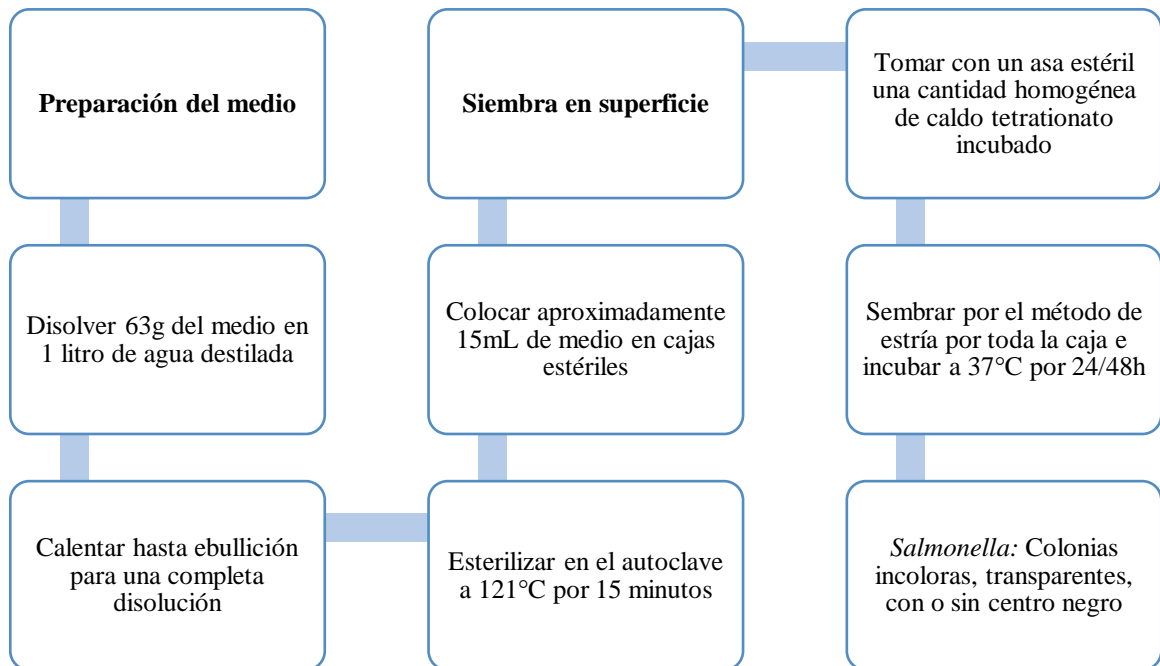


Figura 9-2: Metodología para la determinación de *Salmonella* en agar *Salmonella– Shigella* (SS).
Realizado por: (Autor, 2020).

2.6.14. Aislamiento y purificación de colonias de bacterias gram negativas

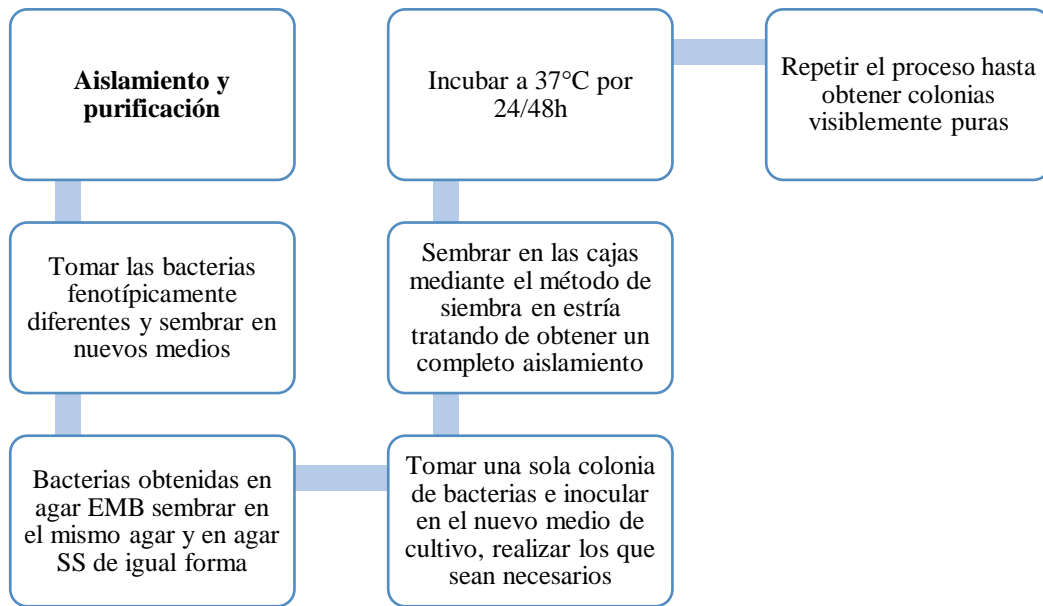


Figura 10-2: Metodología para el aislamiento y purificación de colonias de bacterias gram negativas.

Realizado por: (Autor, 2020).

2.6.15. Tinción Gram

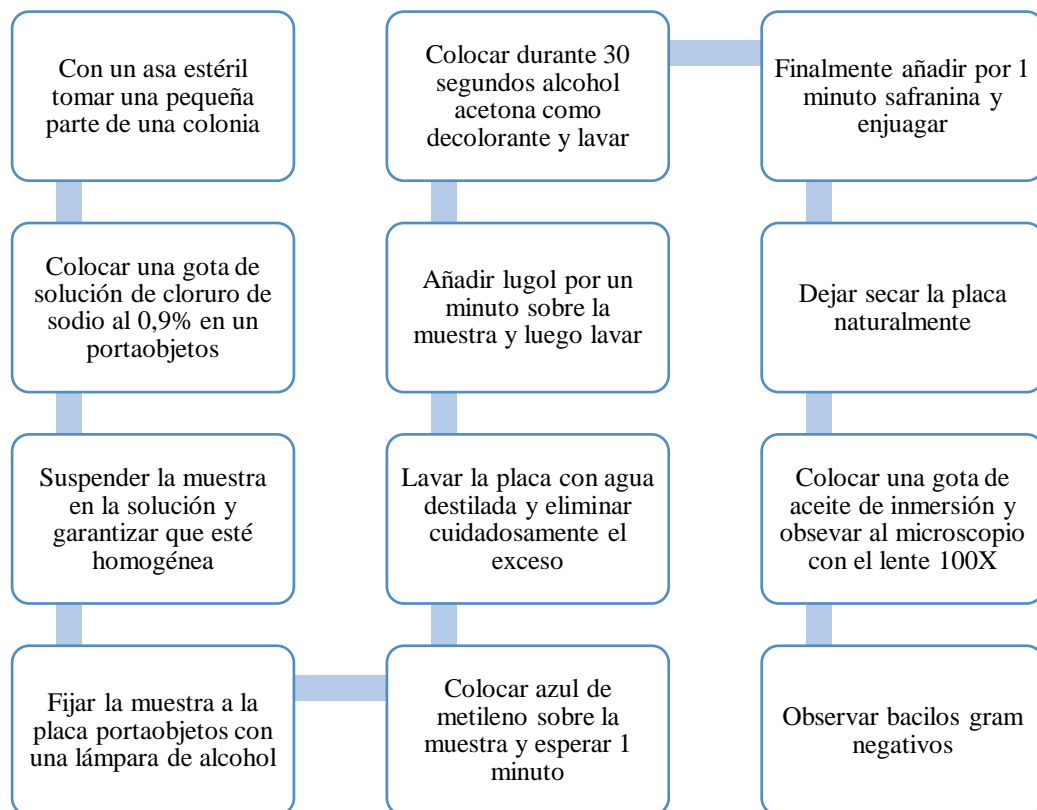


Figura 11-2: Metodología para el desarrollo de la Tinción Gram.

Realizado por: (Autor, 2020).

2.6.16. Identificación de bacterias gram negativas mediante Pruebas Bioquímicas

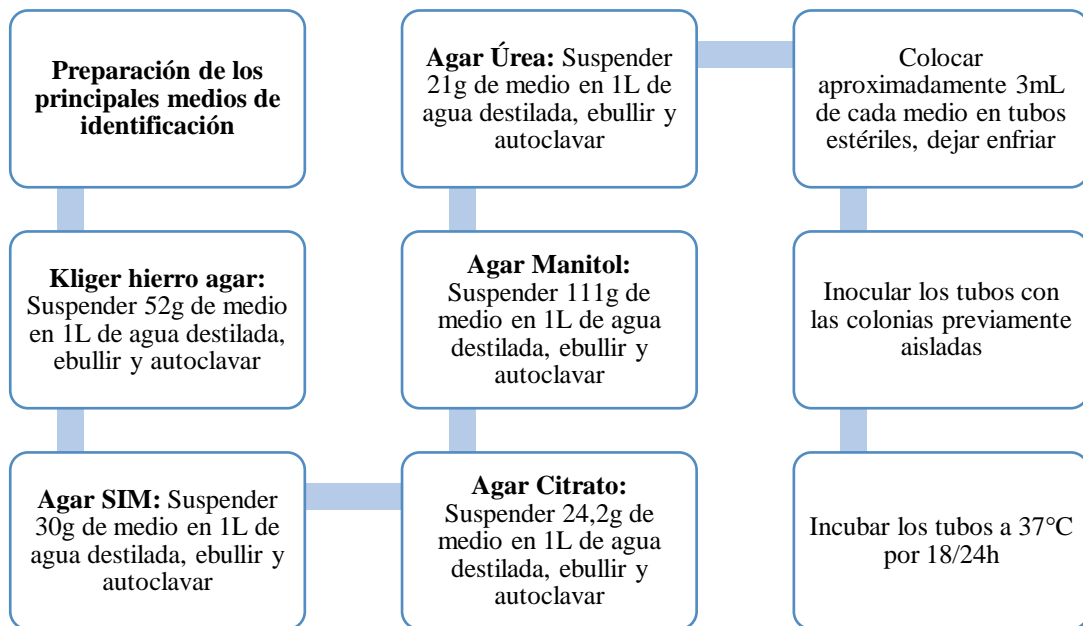


Figura 12-2: Metodología para la identificación de bacterias gram negativas mediante Pruebas Bioquímicas.

Realizado por: (Autor, 2020).

2.6.17. Identificación molecular de bacterias por PCR

Estudio: Identificación molecular (extracción de ADN, amplificación de barcode, secuenciación estándar, ensamblaje de productos de PCR y búsqueda en base de datos).

Detalles técnicos:

- Muestras usadas: Aislados puros en caja Petri.
- Método de determinación: Identificación molecular por barcoding.

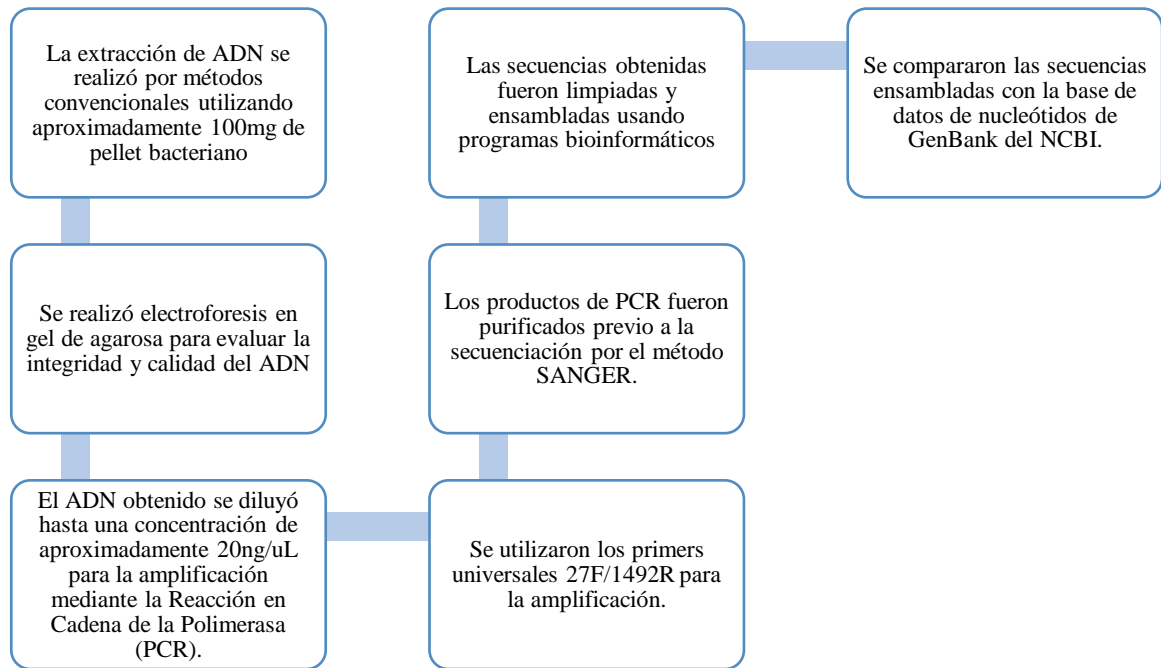


Figura 13-2: Procedimiento para identificación molecular por PCR.

Fuente: IdGen, Identificación Molecular. Informe No.: A-164

Realizado por: (Autor, 2020).

2.6.18. Antibiograma

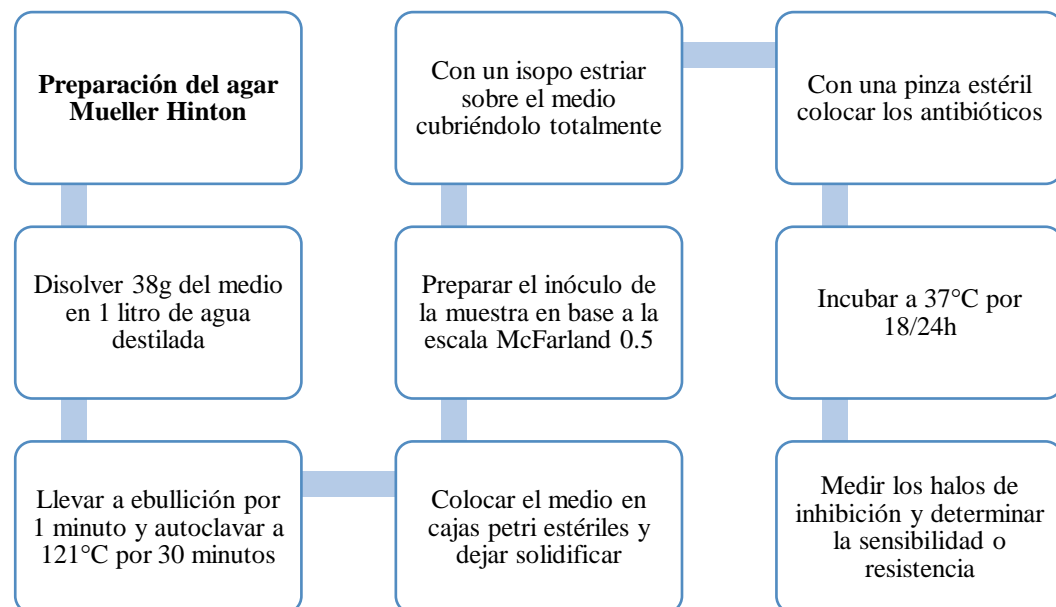


Figura 14-2: Metodología para el desarrollo del Antibiograma.

Realizado por: (Autor, 2020).

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1. Análisis microbiológico del ceviche de chochos

Después de realizadas todas las pruebas para el análisis y la posterior identificación de microorganismos en el ceviche de chochos se exponen los siguientes resultados de acuerdo con las muestras tomadas de cada uno de los locales estudiados.

3.1.1. Análisis de pH

A continuación, se observa la medición de pH de cada una de las muestras analizadas de los distintos puestos en estudio.

Tabla 1-3: Análisis de pH en cada muestra analizada de los locales en estudio.

PUESTO DE EXPENDIO	MUESTREO	pH
P1	M1	4,95
	M2	5,02
P2	M1	4,88
	M2	4,94
P3	M1	5,09
	M2	4,89
P4	M1	4,93
	M2	4,85
P5	M1	4,67
	M2	4,93
P6	M1	4,78
	M2	4,86
P7	M1	4,94
	M2	4,78

Realizado por: (Autor, 2020).

En la Tabla 1-3, se observa la medición de pH en cada local analizado, cuyos valores oscilan entre 4,67 hasta 5,09; es decir que las muestras presentan un pH ácido. Es importante mencionar que las bacterias se desarrollan de mejor manera en un pH neutro, mientras que en un pH ácido se detiene su crecimiento, por lo que a muchos alimentos se les añade ácido láctico para aumentar su conservación (Chavarrías, 2013).

3.1.2. Recuento de parásitos

Se exponen a continuación el número de parásitos y su identificación en cada una de las muestras de los locales analizados.

Tabla 2-3: Recuento del número de parásitos presentes en los locales analizados y su identificación.

PUESTO DE EXPENDIO	MUESTREO	PRESENCIA DE PARÁSITOS	IDENTIFICACIÓN
P1	M1	+*	<i>Entamoeba coli</i>
	M2	+*	<i>Entamoeba coli</i>
P2	M1	++**	<i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Entamoeba coli</i>
	M2	+*	<i>Entamoeba coli</i>
P3	M1	+*	<i>Entamoeba coli</i>
	M2	++**	<i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Entamoeba coli</i>
P4	M1	-	-
	M2	-	-
P5	M1	+*	<i>Entamoeba histolytica</i>
	M2	+*	<i>Entamoeba coli</i>
P6	M1	-	-
	M2	-	-
P7	M1	++**	<i>Entamoeba coli</i>
	M2	+*	<i>Entamoeba histolytica</i>

*Un parásito por campo

**De 2 a 20 parásitos por campo

Realizado por: (Autor, 2020).

En la Tabla 2-3 se puede observar la presencia de parásitos presentes en cada uno de los puestos analizados y su identificación, en vista de que en Ecuador no existe una normativa sanitaria que haga mención a los criterios microbiológicos de calidad sanitaria en alimentos, se ha utilizado como referencia a la norma sanitaria del Perú, referente a los alimentos preparados (DIGESA, 2003, pp. 1-24); dicha normativa no contempla la presencia de parásitos. Por lo tanto, los puestos 1, 2, 3, 4 y 7 no se encuentran aptos para el consumo humano, poniendo en riesgo la salud de quien consuma este alimento y según una investigación realizada en la ciudad de Guatemala en el año 2011 (Rosales Martínez, 2011), la ingestión de un solo quiste de amebas (*E. histolytica* y *E. coli*) puede causar diferentes patologías, entre las que se encuentran diarreas crónicas, úlceras intestinales y

pueden llegar a diseminarse hasta el hígado; sin olvidar que la persona infectada puede eliminar hasta 50 millones de quistes, lo que hace que esta situación sea altamente contaminante.

3.1.3. Recuento de aerobios mesófilos

Se muestra a continuación el recuento de aerobios mesófilos presentes en las muestras de los ceviches de chochos en los puestos analizados, cultivados en agar PCA.

Tabla 3-3: Recuento de aerobios mesófilos encontrados en cada uno de los puestos (Diluciones 10^{-4} y 10^{-5}).

PUESTO	MUESTREO	Nº DE MICROORGANISMOS $\times 10^6$ UGC/G	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
P1	M1	6,1	6,63x10 ⁶	6,33x10 ⁵
	M2			
	T1			
	T2			
P2	M1	6,4		
	M2			
	T1			
	T2			
P3	M1	6,7		
	M2			
	T1			
	T2			
P4	M1	7,5		
	M2			
	T1			
	T2			
P5	M1	6,5		
	M2			
	T1			
	T2			
P6	M1	5,8		
	M2			
	T1			
	T2			
P7	M1	7,4		
	M2			
	T1			
	T2			

Realizado por: (Autor, 2020).

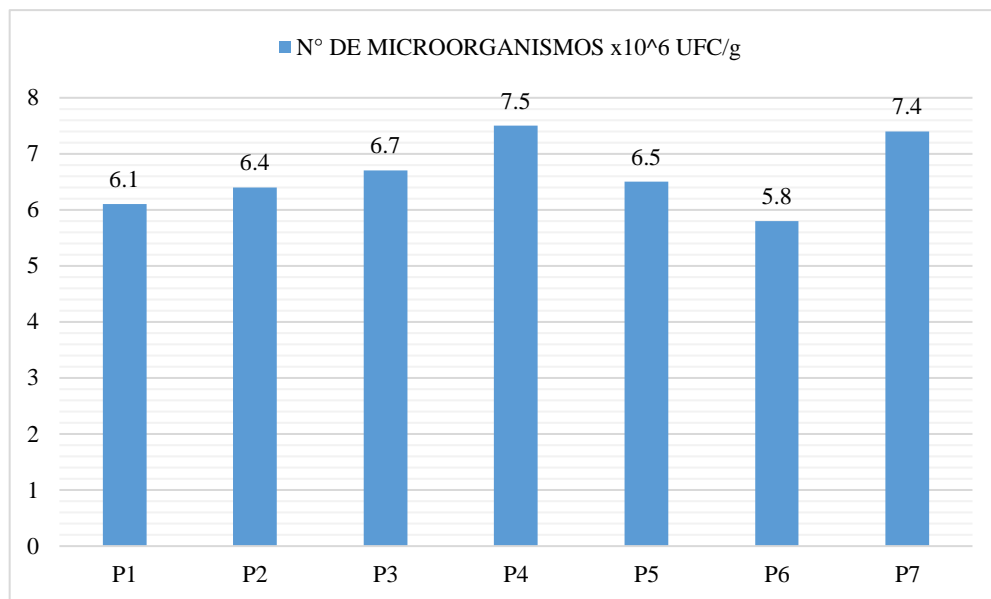


Gráfico 1-3: Recuento de aerobios mesófilos en UFC/g.

Realizado por: (Autor, 2020).

En la tabla 3-3 se puede observar el recuento de aerobios mesófilos encontrados en cada uno de los puestos analizados; se obtuvo un promedio de microorganismos, teniendo en cuenta que en cada puesto se realizaron 2 muestreos y de cada uno se tomó las 2 diluciones más representativas (10^4 y 10^5), se realizó un promedio para conocer la cantidad de microorganismos por puesto de acuerdo con la norma: NTE INEN 1529-5 (2006): Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos. Obteniendo como resultados que la carga microbiana según la normativa sanitaria del Perú (DIGESA, 2003, pp. 1-24), contempla de la cantidad de aerobios mesófilos dentro de un número aceptable es igual o menor a 10^5 , de acuerdo con nuestros resultados, todos los puestos brindan resultados inaceptables, por tanto, el alimento representa un riesgo para la salud de quien lo consume. En el gráfico 1-3 se observa que los puestos P4 y P5 contienen la carga de aerobios mesófilos más alta en comparación con los demás puestos, siendo el puesto P6 el que menor carga microbiana contiene, sin embargo, se encuentra fuera de los límites permisibles. Es importante mencionar un estudio realizado en la ciudad de Bogotá en puestos de comida ambulantes alrededor de dos universidades (Campuzano et al., 2015, pp. 81-92), donde concluyen que los niveles de aerobios mesófilos hallados en estos alimentos, no se encuentran dentro de los límites permisibles y, por tanto, presentan un riesgo sanitario alto.

3.1.4. Recuento de mohos y levaduras

A continuación, se exponen los resultados del recuento de mohos y levaduras en cada uno de los locales analizados, se expresa como presencia o ausencia ya que en la normativa no se contempla la presencia de mohos y levaduras en estos alimentos preparados.

Tabla 4-3: Presencia o ausencia de mohos y levaduras en los puestos analizados.

PUESTO	MUESTREO	MOHOS	LEVADURAS
P1	M1	Ausencia	Presencia
	M2	Ausencia	Presencia
	T1	Ausencia	Presencia
	T2	Presencia	Presencia
P2	M1	Presencia	Presencia
	M2	Ausencia	Presencia
	T1	Ausencia	Presencia
	T2	Ausencia	Presencia
P3	M1	Ausencia	Presencia
	M2	Ausencia	Presencia
	T1	Ausencia	Presencia
	T2	Ausencia	Presencia
P4	M1	Ausencia	Presencia
	M2	Ausencia	Presencia
	T1	Ausencia	Presencia
	T2	Ausencia	Presencia
P5	M1	Ausencia	Presencia
	M2	Ausencia	Presencia
	T1	Ausencia	Presencia
	T2	Ausencia	Ausencia
P6	M1	Presencia	Presencia
	M2	Ausencia	Presencia
	T1	Ausencia	Presencia
	T2	Ausencia	Presencia
P7	M1	Presencia	Presencia
	M2	Ausencia	Presencia
	T1	Ausencia	Presencia
	T2	Ausencia	Presencia

Realizado por: (Autor, 2020).

En la tabla 4-3 se observa la presencia o ausencia de mohos y levaduras en los puestos analizados, es importante resaltar que en la normativa sanitaria del Perú (DIGESA, 2003, pp. 1-24), no contempla la presencia de mohos y levaduras, por lo tanto, todos los puestos analizados al contar con presencia ya sea de mohos o levaduras en alguna de sus muestras representan un riesgo para la

salud del consumidor, porque reflejan en mayor parte el uso de algún alimento contaminado con dichos microorganismos. Según la OPS, en su capítulo de Control Sanitario (OPS, 2018), algunos hongos pueden producir sustancias tóxicas (micotoxinas) que representan un peligro potencial para la salud del hombre, dependiendo de la micotoxina puede llevarlo hasta la muerte; debido a su naturaleza química se considera un potencial peligro químico. En los ceviches de chochos analizados, la contaminación con mohos y levaduras puede deberse al tomate de carne, ya que por su alto contenido de agua permite un desarrollo rápido de estos microorganismos.

3.1.5. Recuento de *Staphylococcus aureus*

A continuación, se expone el resultado de colonias de *Staphylococcus aureus* identificadas fenotípicamente como colonias fermentadoras en agar manitol salado y coagulasa positiva. (Diluciones 10^{-4} y 10^{-5}).

Tabla 5-3: Recuento de colonias de *Staphylococcus aureus* en agar manitol salado.

PUESTO	MUESTREO	Nº DE MICROORGANISMOS EN UFC/G	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
P1	M1	9,1*10 ⁵	2,2*10 ⁶	1,58*10 ⁶
	M2			
	T1			
	T2			
P2	M1	2,4*10 ⁶		
	M2			
	T1			
	T2			
P3	M1	1,4*10 ⁶		
	M2			
	T1			
	T2			
P4	M1	1,4*10 ⁶		
	M2			
	T1			
	T2			
P5	M1	7,3*10 ⁵		
	M2			
	T1			
	T2			
P6	M1	4,1*10 ⁶		
	M2			
	T1			
	T2			

Tabla 6-3 (Continuación): Recuento de colonias de *Staphylococcus aureus* en agar manitol salado.

P7	M1	4,6*10 ⁶		
	M2			
	T1			
	T2			

Realizado por: (Autor, 2020).

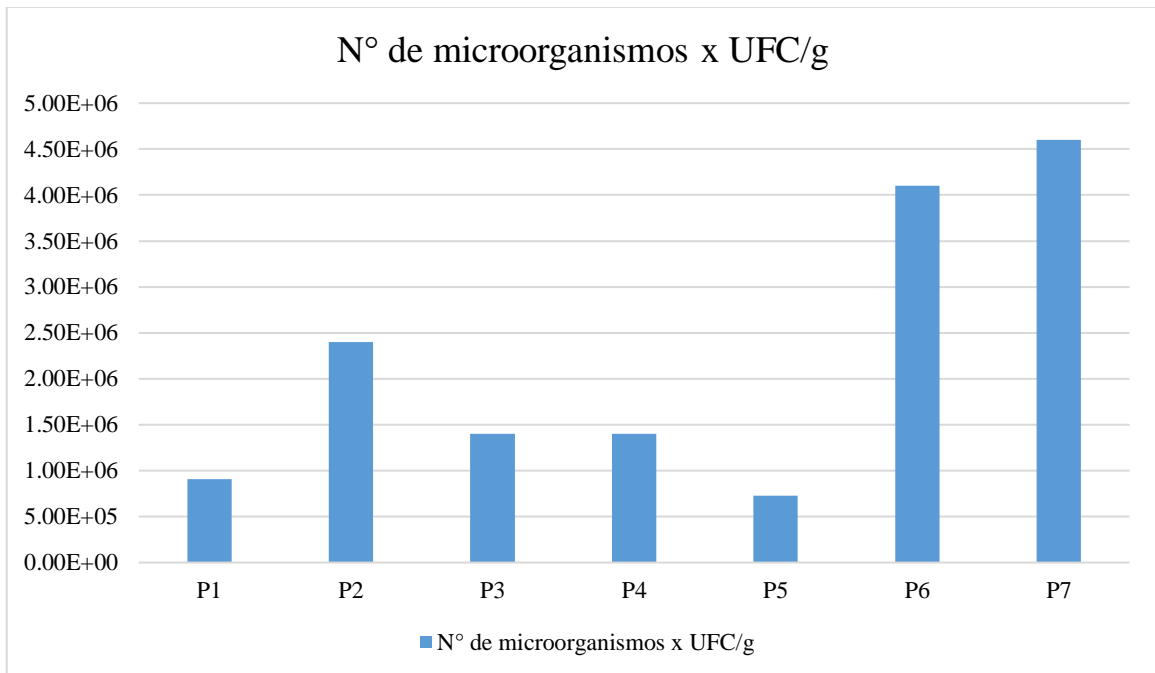


Gráfico 2-3: Recuento de *Staphylococcus aureus* en UFC/g.

Realizado por: (Autor, 2020).

Se puede observar en la tabla 5-3 la cantidad de *Staphylococcus aureus* en promedio por cada puesto analizado, los cálculos del total de unidades formadores de colonias (UFC) se realizaron de acuerdo con la norma NTE INEN 1529-14:2013 CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. *Staphylococcus aureus*. Por lo tanto, teniendo en cuenta la normativa sanitaria del Perú (DIGESA, 2003, pp. 1-24), contempla un valor permisible de *S. aureus* un valor hasta 10 UFC/g y de acuerdo con los resultados analizados, todos los puestos reportan cantidades extremadamente altas de los valores permisibles, concluyendo que ninguno de los alimentos expendidos en estos puestos se encuentra apto para el consumo humano. Sin embargo, como se puede observar en el gráfico 2-3, los puestos P1 y P5 contienen la menor cantidad de microorganismos, mientras que los puestos P6 y P7 contienen la carga microbiana más alta de todos los analizados, presentando un riesgo para la salud de quien consume dichos alimentos; por tanto, las intoxicaciones alimentarias causadas por *S. aureus*, son producidas por haber consumido alimentos contaminados con las enterotoxinas que producen estos microorganismos, dando como resultado diarreas y vómitos. Dichas toxinas no se eliminarán con los tratamientos convencionales de cocción de alimentos y en el análisis de las infecciones no se detectarán bacterias (por ser

eliminadas en la cocción). El origen de esta contaminación se debe a que *S. aureus* se encuentra en las fosas nasales y garganta de los portadores de la infección, siendo muy fácil su dispersión por el ambiente mientras la persona toce, estornuda o simplemente respira; a eso se le suma la incorrecta manipulación de los alimentos a expenderse (Alarcón et al., 2017, pp. 1559-1564).

3.1.6. Recuento de coliformes totales

A continuación, se exponen los resultados del recuento de coliformes totales, fenotípicamente identificados en caldo verde bilis brillante como presencia de turbidez o gas.

Tabla 7-3: Recuento de coliformes totales en caldo verde bilis brillante.

PUESTO	NÚMERO DE TUBOS POSITIVOS EN CADA DILUCIÓN			NMP/g
	DILUCIÓN 10 ⁻³	DILUCIÓN 10 ⁻⁴	DILUCIÓN 10 ⁻⁵	
P1	3	2	2	210
P2	3	2	1	150
P3	3	1	1	75
P4	3	2	1	150
P5	3	2	2	210
P6	3	2	2	210
P7	3	3	2	1100

Realizado por: (Autor, 2020).

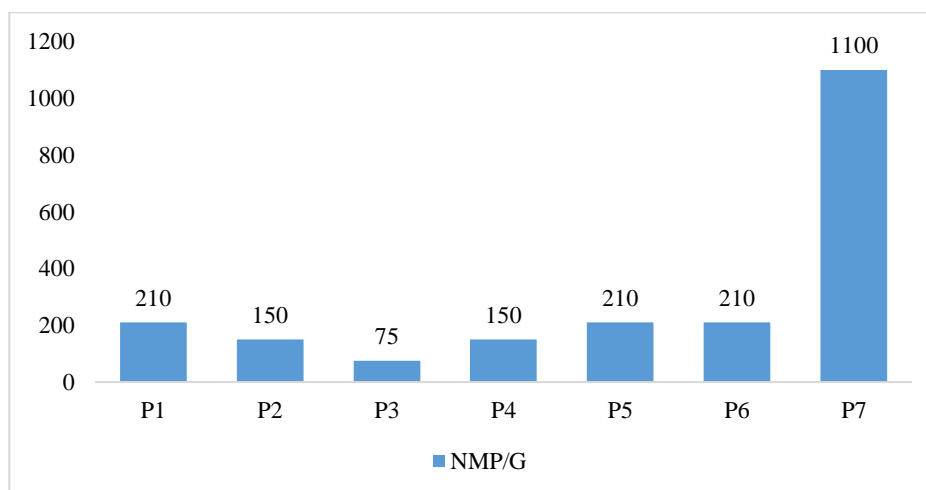


Gráfico 3-3: Recuento de coliformes totales por la técnica del número más probable (NMP).

Realizado por: (Autor, 2020).

El recuento de coliformes totales en base a la técnica del número más probable se reportar en NMP/g o cm³; por ello, de cada dilución se realizan 3 diluciones y se obtienen los resultados de acuerdo con la turbidez o presencia de gas en los tubos. De acuerdo con la Tabla 1 de la normativa NTE INEN 1529-6: Control microbiológico de los alimentos. Determinación de microorganismos

coliformes por la técnica del número más probable, los resultados analizados se expresan en la tabla 5-3. Y como se puede observar en el gráfico 3-3, el puesto P7 es el que contiene el número más elevado de coliformes totales encontrándose fuera de los límites permitidos (10^2 o menos) que se detalla en la normativa sanitaria del Perú, para alimentos preparados (DIGESA, 2003, pp. 1-24), concluyendo que el alimento sugiere un riesgo para la salud de quien lo consume. Por ello, es importante mencionar que, los microorganismos coliformes totales se utilizan como indicadores de la calidad sanitaria ya sea de un alimento o del agua para consumo y elaboración de estos, o a su vez puede ayudar a determinar la durabilidad de este. Deben cumplir con indicadores específicos, como la presencia (detectabilidad) de estos microorganismos en el alimento en estudio, pero su crecimiento debe ser inversamente proporcional a la calidad que presenta este alimento. Dentro del grupo de estos microorganismos se encuentran cuatro grandes grupos de la familia de las enterobacterias: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*; las cuales se encuentran distribuidas ampliamente en la naturaleza; en el agua, vegetales, suelo, entre otros. Y por esto se encuentra en el tracto intestinal de los seres humanos y animales, de ahí su fácil contaminación (Vázquez et al., 2013).

3.1.7. Resultados confirmatorios de *Escherichia coli* en agar EMB

Se exponen a continuación los resultados confirmatorios de *Escherichia coli* en cada uno de los puestos analizados, identificados fenotípicamente como colonias azuladas con brillo verde metálico en agar eosina azul de metileno (EMB).

Tabla 8-3: Confirmación de colonias de *Escherichia coli* en agar Eosina azul de metileno (EMB).

Puestos	Repetición de tubos por diluciones	Resultado en agar EMB (Colonias verde metálicas brillantes + tinción Gram)
P1	Dilución 10^{-3}	+
	Dilución 10^{-4}	+
	Dilución 10^{-5}	+
P2	Dilución 10^{-3}	+
	Dilución 10^{-4}	+
	Dilución 10^{-5}	+
P3	Dilución 10^{-3}	+
	Dilución 10^{-4}	+
	Dilución 10^{-5}	+
P4	Dilución 10^{-3}	+
	Dilución 10^{-4}	+
	Dilución 10^{-5}	+

Tabla 9-3 (Continuación): Confirmación de colonias de *Escherichia coli* en agar Eosina azul de metileno (EMB).

P5	Dilución 10 ⁻³	+
	Dilución 10 ⁻⁴	+
	Dilución 10 ⁻⁵	+
P6	Dilución 10 ⁻³	+
	Dilución 10 ⁻⁴	+
	Dilución 10 ⁻⁵	+
P7	Dilución 10 ⁻³	+
	Dilución 10 ⁻⁴	+
	Dilución 10 ⁻⁵	+

Realizado por: (Autor, 2020).

En la tabla 7-3 se observan los resultados confirmatorios del crecimiento de *E. coli* en agar EMB, es importante identificar que todas las cajas inoculadas con una parte de los tubos con caldo verde bilis brillante dieron un resultado positivo y fenotípicamente se pudo identificar colonias de *E. coli* por presentar éstas un color azulado y un brillo verde metálico particular, sin embargo, es necesario profundizar su identificación mediante pruebas bioquímicas y si no se logra identificar se recomienda realizar pruebas moleculares por PCR. La presencia de *E. coli* en alimentos indica una contaminación fecal posible, si bien, el calor puede destruir estos microorganismos, pueden estar presentes en aquellos alimentos que tienen poca cocción o se los consume de forma fresca; por lo tanto, el consumidor estaría en riesgo de contraer una infección de tipo entérica al ingerir dichos alimentos contaminados (Vázquez et al., 2013).

3.1.8. Cualificación de *Salmonella*

A continuación, se expone una cualificación de *Salmonella* identificada mediante características fenotípicas en agar SS.

Tabla 10-3: Identificación por características fenotípicas de *Salmonella* en agar SS.

Cualificación de <i>Salmonella</i> sp.		
Agar S.S.		
Puesto	Presencia/Ausencia	Código de muestra
P1	Ausencia	
P2	Presencia	H
P3	Presencia	H
P4	Ausencia	
P5	Presencia	H
P6	Presencia	H
P7	Presencia	H

Realizado por: (Autor, 2020).

En la tabla 8-3 se puede observar la presencia o ausencia fenotípica de colonias de *Salmonella*, de acuerdo con las características de las colonias se otorgó un código para cierto tipo de colonias, las cuales se procedió a aislar para su posterior identificación con pruebas bioquímicas o pruebas moleculares. Se observa también que solo los puestos P1 y P4 no cuentan con presencia de colonias de *Salmonella* y de acuerdo a la normativa sanitaria del Perú, para alimentos preparados (DIGESA, 2003, pp. 1-24); un valor aceptable es aquel que presenta ausencia de este microorganismo, por tanto, solo los puestos antes mencionados (P1 y P4) estarían aptos para expender este tipo de alimento sin que represente un peligro para la salud del consumidor, los otros puestos se encuentran fuera de los límites permisibles. Es importante indicar que la *Salmonella* causa en el ser humano la enfermedad conocida como salmonelosis, que es una de las causas principales de gastroenteritis, cuyos síntomas incluyen náuseas, vómitos, dolores abdominales, fiebre y dolores de cabeza (Lozano et al., 2016, p. 97). Los alimentos llegan a contaminarse ya sea por una cocción inadecuada o por contaminación cruzada, comúnmente el microorganismo se encuentra en productos de origen avícola pero también se lo puede hallar en carnes y algunas frutas y vegetales; en Estados Unidos, Chile y la Unión Europea, esta enfermedad representa una de las principales causas de intoxicación alimentaria (Barreto et al., 2015, p. 547).

3.1.9. Identificación de cepas puras mediante pruebas bioquímicas

Tabla 11-3: Identificación de cepas aisladas mediante el uso de pruebas bioquímicas en agar SS.

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

Realizado por: (Autor, 2020).

Después de realizar el aislamiento y purificación de bacterias, se las identificó mediante pruebas bioquímicas de acuerdo con las características expuestas en el Manual de técnicas en Microbiología Clínica (Álvarez Benito & Boquet Jiménez, 1988), se realizó un análisis completo incluyendo características fenotípicas de las colonias y la tinción gram, de esa forma se pudieron identificar las diferentes bacterias con su género y especie. Las bacterias identificadas se describen brevemente a continuación:

***Klebsiella pneumoniae*:** Es un bacilo gram negativo, perteneciente a la familia de las enterobacterias, no móvil. Representa la especie más estudiada por su relevancia clínica en el género *Klebsiella*. Está asociada en patogénesis del tracto urinario como también del tracto respiratorio y puede conducir a neumonía por proliferación de estos microorganismos (López et al., 2010, p. 158).

Salmonella spp: Es una bacteria de tipo bacilo gram negativo, pertenece a la familia enterobacteria, bacilo intracelular facultativo; causa la enfermedad de la salmonelosis cuya transmisión es principalmente fecal-oral ya sea de forma directa o indirectamente a través de los alimentos, se la puede hallar en los huevos, en la piel de los tomates o de aquellos alimentos que han tenido contacto con el suelo (Barreto et al., 2015).

Enterobacter ludwigii: Es una enterobacteria en forma de bacilo gram negativo, fermentativa, móvil. Puede producir infección de las vías respiratorias y urinarias. Representa una nueva especie de enterobacteria de relevancia clínica aislada en el año 2005 (Hoffman et al., 2005).

Tabla 12-3: Identificación de cepas aisladas mediante el uso de pruebas bioquímicas en agar EMB.

Agar EMB (Eosina azul de metileno)													
Codificación de la Colonia	Morfología	Coloración	Gram	Pruebas Bioquímicas									
				SIM		Citrato	Kligler				Úrea	Manitol	Identificación
				Indol	Movilidad		Glucosa	Gas/Glucosa	Lactosa	H2S			
N	Colonias redondas	Verde metálico brillante.	Bacilos Gram -	+	+	V-	+	+	V+	-	-	+	Escherichia coli.
P	Colonias redondas lisas.	Lilas pálidas sin brillo.	Bacilos Gram -	-	V-	-	+	-	-	-	+	-	Shigella flexneri
Q	Colonias mucosas	Atomatadas.	Bacilos Gram -	+	-	+	+	+	+	-	+	V+	Klebsiella oxytoca.

Realizado por: (Autor, 2020).

En el agar EMB también se logró identificar diferentes cepas bacterianas de acuerdo con su análisis fenotípico, luego estas bacterias fueron aisladas y purificadas para mediante pruebas bioquímicas y tinción gram definir su género y especie; obteniendo así 3 bacterias gram negativas en forma de bacilos, como se puede observar en la tabla 10-3. Las características para su identificación se tomaron del Manual de técnicas en Microbiología Clínica (Alvarez et al., 1988). La importancia del uso de pruebas bioquímicas para la identificación bacteriana se basa en la capacidad que tienen dichas bacterias para fermentar azúcar, la presencia o ausencia de enzimas, su potencial al degradar compuestos, dar como producto de la reacción compuestos coloreados, entre otros; es por esto, que estas pruebas bioquímicas son ampliamente utilizadas en dicha diferenciación (Vizcarrondo et al., 2008, p. 4). Las bacterias identificadas se describen brevemente a continuación:

Escherichia coli: Es un bacilo gram negativo, anaerobio, que predomina en la flora intestinal del ser humano, puede producir enfermedades entéricas en general y diarreas; por lo tanto, representa un problema de salud pública en países en vías de desarrollo (Canata et al., 2016, pp. 12-16).

Shigella flexneri: Género de bacteria perteneciente al grupo de las enterobacterias, de tipo bacilo gram negativo, no móvil. Principal causante de shigelosis en países en desarrollo, enfermedad que se produce por el consumo de alimentos contaminados con material fecal, dichos alimentos que han sido poco preparados o crudos (ACHIPIA, 2013, pp. 235-249).

Klebsiella oxytoca: Bacilo gram negativo redondeado, se diferencia de *Klebsiella pneumoniae* por ser indol positivo, aunque se encuentra estrechamente relacionada con ésta. En el humano puede ser causante de infecciones urinarias o pueden presentarse también infecciones en las vías biliares (Nava et al., 2019, pp. 9-14).

Tabla 13-3: Identificación de cepas de cocos gram positivos mediante pruebas específicas.

Identificación de cepas:						
Agar Manitol Salado						
Codificación de la Colonia	Morfología	Coloración	Gram	Catalasa	Coagulasa	Identificación
AU1	Colonias pequeñas	Amarillas doradas	Cocos Gram +	+	+	Staphylococcus aureus
AU2	Microscópicamente se agrupan en tétradas	Pigmentación rosa	Cocos Gram +	+		Micrococcus roseus

Realizado por: (Autor, 2020).

Se identificaron mediante métodos convencionales (tinción gram y pruebas de catalasa y coagulasa) 2 tipos de cocos gram positivos, como se observa en la tabla 11-3, los mismos que presentaron diferentes características fenotípicas en agar Manitol salado, por ello se aislaron y purificaron para su posterior análisis. A continuación, una breve descripción de estas bacterias:

Staphylococcus aureus: Es un coco gram positivo, ampliamente distribuido en el ambiente y que se encuentra presente en la microbiota humana, puede producir una diversidad de patologías, como: infecciones a la piel, a los tejidos blandos, infección del tracto génito-urinario y hasta puede llegar al sistema nervioso central, presentan resistencia a la meticilina y a otros antibióticos (Gil, 2000, pp. 145-152).

Micrococcus roseus: Es un coco gram positivo, catalasa positiva, se presenta en forma de tétradas. Debe su nombre al carotenoide que produce, desarrollando colonias de color rosáceo, es estrictamente aerobio (Miloslav et al., 2017).

3.1.10. Antibiograma

Tabla 14-3: Antibiograma para Enterobacterias identificadas y aisladas.

Antibiograma para Enterobacterias identificadas y aisladas.								
Antibióticos y Diámetros Críticos para Enterobacterias								
Bacteria Identificada	Ciprofloxacina 5 µg R=<15mm I=16-20mm S=>21mm		Cefuroxima 30 µg R=<14mm I=15-22mm S=>23mm		Amoxicilina + Ác. Clavulánico 20/10µg R=<13mm I=14-17mm S=>18mm		Ampicilina 10µg R=<13mm I=14-16mm S=>17mm	
	Diámetro del halo (mm)	Ciprofloxacina 5 µg	Diámetro del halo (mm)	Cefuroxima 30µg	Diámetro del halo (mm)	Amoxicilina + Ác. Clavulánico 20/10µg	Diámetro del halo (mm)	Ampicilina 10µg
Klebsiella pneumoniae	36	Sensible	24	Sensible	0	Resistente	0	Resistente
Salmonella spp.	30	Sensible	23	Sensible	0	Resistente	13	Resistente
Enterobacter ludwiggi	35	Sensible	24	Sensible	0	Resistente	0	Resistente
Escherichia coli	35	Sensible	24	Sensible	23	Sensible	9	Resistente
Shigella flexneri	42	Sensible	22	Medianamente Sensible	0	Resistente	0	Resistente
Klebsiella oxytoca	40	Sensible	33	Sensible	25	Sensible	13	Resistente

Diámetros críticos adaptados del CFA-SFM, 2000-2001

Realizado por: (Autor, 2020).

En la tabla 12-3 se puede observar la sensibilidad o resistencia de las bacterias aisladas e identificadas, es importante mencionar que los antibióticos especiales para bacterias gram negativas son: ciprofloxacina, cefuroxima, amoxicilina + ac. Clavulánico y ampicilina; donde se puede observar que *Klebsiella pneumoniae* es resistente a amoxicilina + ac. Clavulánico y ampicilina, de igual forma *Salmonella spp.* es resistente a amoxicilina + ac. Clavulánico y ampicilina, *Enterobacter ludwiggi* también presenta resistencia a amoxicilina + ac. Clavulánico y ampicilina, *Escherichia coli* es resistente a ampicilina, *Shigella flexneri* es resistente a amoxicilina + ac. Clavulánico y ampicilina, *Klebsilla oxytoca* es resistente a ampicilina; por lo

tanto, ciprofloxacina y cefuroxima aun eliminan estos microorganismos, siendo estos antibióticos los únicos para tratar infecciones con estos patógenos. Según la OMS, la resistencia bacteriana constituye uno de los mayores problemas no solo a nivel local sino a nivel mundial, dicha resistencia se desarrolla no solo por selección natural sino también por mutaciones de las bacterias al azar; el problema de salud radica en que las personas no pueden controlar las enfermedades infecciosas y esto aumenta la morbi-mortalidad, reduce la efectividad terapéutica y esto produce costos a nivel de salud en general (Calderón et al., 2016, p. 758). Según un estudio realizado en hospitales y clínicas en el departamento del César en Colombia durante el año 2014, las principales bacterias gram negativas aisladas fueron: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli*, presentando resistencia a ampicilina-sulbactam y cefalosporinas de tercera y cuarta generación, por lo que se recomienda reforzar la vigilancia epidemiológica para así disminuir dicha resistencia y evitar problemas médicos más graves (Yaneth Giovanetti et al., 2017, p. 387).

Tabla 15-3: Antibiograma para cocos gram positivos identificados y aislados.

Antibiograma para Cocos Gram Positivos identificados y aislados.								
Antibióticos y Diámetros Críticos.								
	Claritromicina 15µg R=<10mm I=11-12mm S=>13mm		Azitromicina 15µg S=>12mm		Tetraciclina 30µg R=<14mm I=15-18mm S=>19mm		Gentamicina 10µg R=<12mm I=13-14mm S=>15mm	
Codificación de la Colonia	Diámetro del halo (mm)	Claritromicina 15µg	Diámetro del halo (mm)	Azitromicina 15µg	Diámetro del halo (mm)	Tetraciclina 30µg	Diámetro del halo (mm)	Gentamicina 10µg
Micrococcus caseolyticus	35	Sensible	30	Sensible	32	Sensible	26	Sensible
Staphylococcus aureus	30	Sensible	22	Resistente	10	Resistente	27	Sensible

Realizado por: (Autor, 2020).

En la tabla 13-3, se observan los principales antibióticos que actúan sobre bacterias gram positivas: claritromicina, azitromicina, tetraciclina, gentamicina. Y solo se identifica resistencia por parte de *Staphylococcus aureus* a azitromicina y tetraciclina; *Micrococcus caseolyticus* presenta sensibilidad a todos los antibióticos usados.

3.1.11. Identificación molecular de bacterias por PCR

Luego de identificar a las bacterias aisladas y purificadas, existieron 3 cepas que no se pudieron identificar por los métodos convencionales, es por ello que se realizó un aislamiento y posterior identificación molecular por PCR. Obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 16-3: Resultados de la identificación molecular por PCR de microorganismos.

Muestra	Código IDgen	Longitud	% de Calidad	Organismo	Fragmento	% de identidad
A	B71	1412	94.8	<i>Citrobacter freundii</i>	16S	99.79
Au4	B72	1193	85.2	<i>Macrococcus caseolyticus</i>	16S	99.32
E	B73	815	94.6	<i>Enterobacter ludwigii</i>	16S	99.26

Fuente: IdGen, Identificación Molecular. Informe No.: A-164.

Realizado por: (Autor, 2020).

En la tabla 14-3 se puede identificar 3 bacterias aisladas, con un porcentaje de pureza que va desde el 99,26% al 99,79% garantizando así que el aislado corresponde a dicha especie; estas bacterias no se lograron identificar por lo métodos convencionales ya que compartían características similares con otras cepas bacterianas, por ello fue necesario este análisis donde se indica el género y especie de los microorganismos. A continuación, se explica el estudio realizado:

Estudio: Identificación molecular (extracción de ADN, amplificación de barcode, secuenciación estándar, ensamblaje de productos de PCR y búsqueda en base de datos).

Muestras usadas: Aislados puros en caja Petri

Método de determinación: Identificación molecular por barcoding. Es una técnica de identificación molecular de varias especies que consiste en la utilización de una región de un gen conocido como DNA Barcode que ha sido elegido para la identificación de diferentes especies, ya sean plantas, animales y hongos (Sánchez Barrado, 2016).

Resultados: Se obtuvo ADN de alta calidad para el proceso de PCR convencional. Se ensambló la reacción de PCR visualizándose fragmentos de aproximadamente 1500 en las muestras amplificadas con primers 27F/1492R (Fig. 1-3)

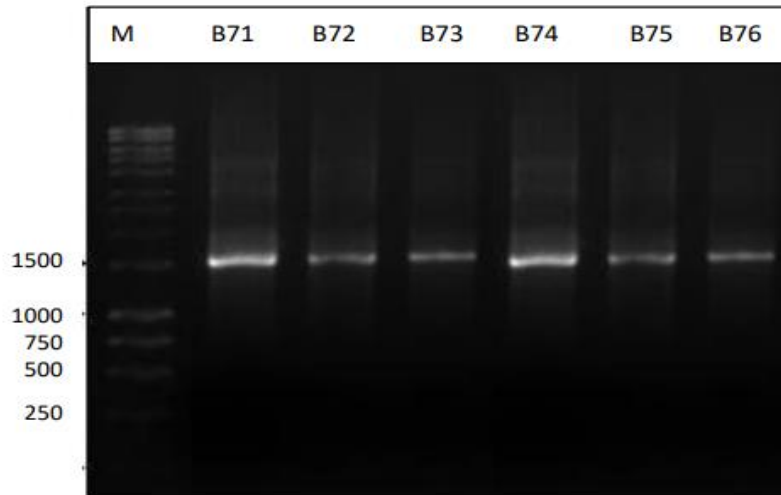


Figura 1-3: Visualización en gel de agarosa 2% de los seis amplicones de aproximadamente 1500 pb amplificados con primers 27F/1492R. M: marcador de peso molecular.

Fuente: IdGen, Identificación Molecular. Informe No.: A-164.

Conclusiones:

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

3.1.12. Check list

Tabla 17-3: Evaluación sanitaria para puestos de expendio ambulatorio de alimentos preparados (Ceviche de chochos).

	P1		P2		P3		P4		P5		P6		P7	
	SI CUMPLE	NO CUMPLE	SI CUMPLE	NO CUMPLE	SI CUMPLE	NO CUMPLE	SI CUMPLE	NO CUMPLE	SI CUMPLE	NO CUMPLE	SI CUMPLE	NO CUMPLE	SI CUMPLE	NO CUMPLE
¿Posee registro/permiso sanitario de venta otorgado por la municipalidad?	X		X		X		X		X		X		X	
DEL VENDEDOR														
Vestimenta apropiada, delantal o mandil que cubra la ropa casual preferentemente blanco o de colores claros, limpios y en buen estado de presentación	X		X			X	X		X		X		X	
Cabello corto o recogido, cubierto con un gorro o redecilla		X		X	X		X		X			X	X	
Uso de guantes limpios		X		X		X	X		X		X		X	
No portar anillos, pulseras ni reloj	X		X		X			X	X			X	X	
No debe manipular alimentos y dinero en forma conjunta		X		X	X		X		X		X			X
LA PREPARACIÓN														
Las materias primas deberán guardarse en envases adecuados y en buen estado de conservación y limpieza		X		X		X	X			X	X			X
Para el lavado de utensilios se utilizará agua potable circulante y jabón, desechando el uso de baldes y recipientes con agua sin renovar		X		X		X	X		X		X		X	
TRANSPORTE														

Tabla 18-3 (Continuación): Evaluación sanitaria para puestos de expendio ambulatorio de alimentos preparados (Ceviche de chochos).

El transporte de alimentos se realizará en condiciones higiénicas y de temperatura que garanticen la conservación e inocuidad de estos		X		X	X		X		X			X	X	
El vehículo o medio de transporte es adecuado para proteger los alimentos de la contaminación		X		X	X		X		X			X	X	
COMERCIALIZACIÓN														
Los alimentos que se exponen a la vista del público se colocan en vitrinas cerradas		X		X	X		X		X		X		X	
Los alimentos se despachan utilizando material desechable, caso contrario debe ser en material inalterable y lavado con agua potable circulante y jabón después de cada utilización	X		X		X		X		X		X		X	
En caso de utilizarse papel o plástico para el expendio deberá ser de primer uso	X		X		X		X		X		X		X	
Sillas y mesas limpias y en buen estado		X		X	X			X	X		X			X
SANEAMIENTO														
El expendedor dispondrá de un depósito para los desperdicios y será de material de fácil limpieza, con tapa y con una funda plástica para facilitar su eliminación	X			X	X		X		X		X		X	
El expendedor no podrá arrojar a la vía pública desperdicios o agua de lavado	X		X		X		X		X		X		X	
Desagües con tapa y rejilla con buen funcionamiento y libres de basura		X		X	X		X		X		X		X	
No se permite la presencia de animales domésticos en el puesto, cerca de él o en sus alrededores		X		X	X		X		X			X	X	

Tabla 19-3 (Continuación): Evaluación sanitaria para puestos de expendio ambulatorio de alimentos preparados (Ceviche de chochos).

Es responsabilidad del vendedor, en coordinación con las autoridades de salud correspondiente, realizar un control permanente de vectores (moscas, cucarachas, roedores, etc.) mediante campañas de fumigación	X		X		X		X		X		X		X	
PORCENTAJE (%)	42,11	57,89	47,37	52,63	78,95	21,05	89,47	10,53	94,74	5,26	73,68	26,32	84,21	15,79

Fuente: Reglamento para el control sanitario de alimentos que se expenden en la vía pública.

Realizado por: (Autor, 2020).

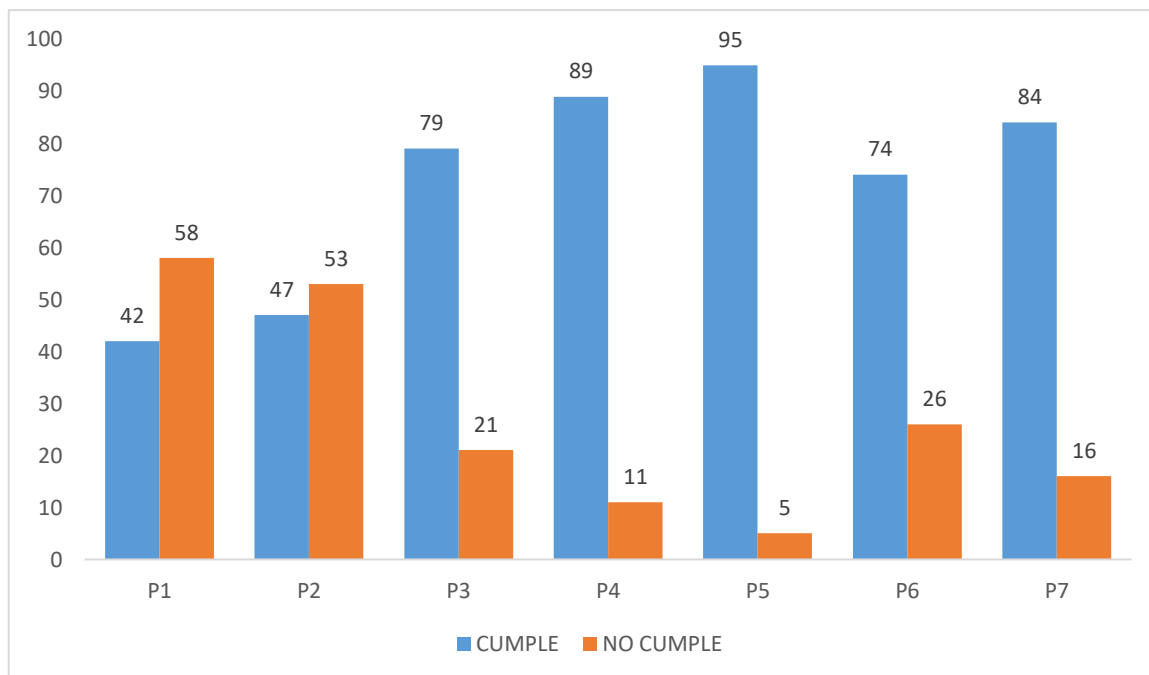


Gráfico 4-3: Porcentaje de cumplimiento de la evaluación sanitaria para puestos de expendio ambulatorio de alimentos preparados (Ceviche de chochos).

Realizado por: (Autor, 2020).

En la tabla 15-3 se puede observar el check list de cumplimiento o no cumplimiento de la evaluación sanitaria para puestos de expendio ambulatorio de alimentos preparados, aplicado a los 7 puestos analizados; identificando 5 puntos críticos de control que se reflejan en el gráfico 4-3, observándose que los puestos P1 y P2 no presentan una evaluación sanitaria aceptable, presentando un riesgo para la salud del consumidor; mientras que los puestos P4 y P5 presentan la mejor aceptabilidad dentro de esta evaluación.

CONCLUSIONES

- Los ceviches de chochos que se expenden en los alrededores de la ESPOCH y UNACH, poseen una elevada contaminación de microorganismos, lo que representa un riesgo para la salud del consumidor.
- El alto cultivo microbiano reflejó que no existen buenas prácticas manipulación y expendio de los ceviches de chochos, y se corroboró con el check list evaluado en cada puesto de venta del producto.
- Se evidenció una contaminación con materia fecal en el alimento por presencias elevadas de *Escherichia coli* en los productos evaluados, evidenciando la falta de aseo en la elaboración y expendio de dicho producto.
- Se comprobó también la presencia de parásitos en las muestras analizadas, en la normativa del Perú no se contempla la presencia de dichos parásitos, por lo tanto, no se encuentra apto para el consumo.
- Se pudieron aislar diferentes enterobacterias, entre ellas *Salmonella spp*; las cuales representan un riesgo potencial para la salud de las personas y evidencian el poco control por parte de las autoridades del GADM Riobamba.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda al GADM Riobamba que se realicen controles microbiológicos de forma periódica en los puestos de venta de ceviches de chochos, para de esta forma minimizar el impacto negativo en la salud del consumidor.
- Las autoridades deben realizar charlas enfocadas a las buenas prácticas de manipulación de alimentos dirigidas a las y los expendedores de este alimento de consumo tradicional en la ciudad de Riobamba.
- Se deben realizar análisis microbiológicos en los materiales usados para el transporte de los ingredientes del ceviche de chochos; así como también en los utensilios y superficies en general, para determinar la fuente de contaminación inicial.

GLOSARIO

Alcaloide: Se considera como alcaloide un compuesto orgánico de origen natural generalmente vegetal nitrogenado derivado generalmente de aminoácidos de carácter más o menos básico de distribución restringida con propiedades farmacológicas importantes a dosis bajas y que responden a reacciones comunes de precipitación (Rodríguez, 2009).

Alimento alterado: Es aquel que por acción de agentes físicos, químicos o biológicos, ha sufrido variaciones o deterioro en sus características organolépticas, composición intrínseca o valor nutritivo, de tal forma que su aptitud para la alimentación haya quedado anulada o sensiblemente disminuida (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2013, pp. 1689-1699).

Ceviche: Según (Abrecht Group SAC, 2012) afirma que, el ceviche es uno de los platos con mayor aceptación en Latinoamérica y en todo el mundo. Del mismo modo, no se tiene seguridad del lugar de origen de este plato, ni en su escritura, pues lo denotan como cebiche, ceviche, sebiche o seviche, causando confusión a la hora de redactarlo. En cuanto a los ingredientes que forman parte de este plato, tiene como base principal los mariscos y el limón, sin embargo, existe muchas varianzas, sea esto por influencias árabes, españolas o culturales.

Chocho (*Lupinus mutabilis* sweet): El chocho (*Lupinus mutabilis*) es una especie leguminosa que ha sido cultivada en su gran mayoría en la zona andina de Sudamérica, siendo consumida desde la época pre inca especialmente en los territorios de Perú, Colombia, Ecuador, Venezuela, Bolivia, Chile y Argentina, debido a su alto contenido nutricional (Gamarra, 2008).

Desamargado industrial: Es un método en el cual se utiliza como insumo principal el agua potable, para la extracción de los alcaloides, pasando por la etapa de hidratación, cocción, lavado, agitación y escurrido, todos estos procesos con tiempos, porciones y temperaturas establecidas (Aranda et al., 2018, p. 11).

Desamargado tradicional: Lleva un proceso más cultural, puesto que se ha venido repitiendo desde siglos atrás, iniciando con un selección manual de los granos hasta terminar con el lavado de los mismos, este proceso tiene una duración de 7 a 8 días donde las técnicas a utilizarse son rústicas y tradicionales (Aranda et al., 2018, p. 11).

Enterobacter ludwigii: Es una enterobacteria en forma de bacilo gram negativo, fermentativa, móvil. Puede producir infección de las vías respiratorias y urinarias. Representa una nueva especie de enterobacteria de relevancia clínica aislada en el año 2005 (Hoffman et al., 2005).

Escherichia coli: Es un bacilo gran negativo, anaerobio, que predomina en la flora intestinal del ser humano, puede producir enfermedades entéricas en general y diarreas; por lo tanto, representa un problema de salud pública en países en vías de desarrollo (Canata et al., 2016, p. 14).

Gastronomía: Se entiende por gastronomía el conocimiento razonado que el hombre tiene con respecto a su alimentación, tiene como objetivo cuidar la subsistencia del hombre empleando los

mejores alimentos, esto lo consigue preparando materia prima en algo agradable para la vista y el paladar (Ibarra et al., 2017, p. 25).

Klebsiella oxytoca: Bacilo gram negativo redondeado, se diferencia de *Klebsiella pneumoniae* por ser indol positivo, aunque se encuentra estrechamente relacionada con ésta. En el humano puede ser causante de infecciones urinarias o pueden presentarse también infecciones en las vías biliares (Nava et al., 2019, p. 13).

Salmonella spp: Es una bacteria de tipo bacilo gram negativo, pertenece a la familia enterobacteria, bacilo intracelular facultativo; causa la enfermedad de la salmonelosis cuya transmisión es principalmente fecal-oral ya sea de forma directa o indirectamente a través de los alimentos, se la puede hallar en los huevos, en la piel de los tomates o de aquellos alimentos que han tenido contacto con el suelo (Barreto et al., 2015).

Shigella flexneri: Género de bacteria perteneciente al grupo de las enterobacterias, de tipo bacilo gram negativo, no móvil. Principal causante de shigelosis en países en desarrollo, enfermedad que se produce por el consumo de alimentos contaminados con material fecal, dichos alimentos que han sido poco preparados o crudos (ACHIPIA, 2013, p. 235).

Ventas ambulantes: La inocuidad de los alimentos es uno de los temas fundamentales dentro de seguridad alimentaria, debido a que, de esto depende la salud de los consumidores, siendo este tema una gran problemática al estudiar las ventas ambulantes, las cuales difícilmente cumplen con todas las normas de asepsia, que evitan la contaminación microbiana (Barbosa, 2012).

BIBLIOGRAFÍA

ABRECHT GROUP SAC. Origen e Historia del Ceviche - Abrecht. 2012.

ACHIPIA. Shigella spp. *Food Associated Pathogens*. 2013, pp. 235-249. DOI 10.1201/b15475-16.

AGENCIA NACIONAL DE REGULACIÓN CONTROL Y VIGILANCIA SANITARIA. Manual de Practicas Correctas de Higiene y Manipulación de Alimentos. *Agencia Nacional de Regulación Control y Vigilancia Sanitaria*. 2015, pp. 0-40. ISSN 0036-1445. DOI 10.1137/1036171.

ALARCÓN, M; et al. Portación de Staphylococcus aureus enterotoxigénico tipo A, en frotis nasofaríngeos en manipuladores de alimentos. *Revista Médica Chile* [en línea], 2017, pp. 1559-1564. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872017001201559.

ALVAREZ, V; et al. Manual de Técnicas en Microbiología Clínica. Madrid: *Asociación Española de Farmacéuticos Analistas*. 1988.

ARANDA, J; et al. Evaluación de parámetros durante la Extrusión de una mezcla de harinas de Tarwi (*lupinus mutabilis*) y Arroz (*oryza sativa*) para la producción de un Snack. S.l.: Universidad Nacional del Santa. 2018.

BARBOSA, G. Descripción de las condiciones higiénico sanitarias de la venta callejera de alimentos del Parque Nacional- Bogotá [en línea]. Pontificia Universidad Javeriana, 2012. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/12016/BarbosaMunozGinaTatiana2012.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

BARRETO, M; et al. Salmonella enterica: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. *Infectología al Día* [en línea], 2015, pp. 547-557. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v33n5/art10.pdf>.

CALDERÓN, G; et al. Infectología Resistencia Antimicrobiana: Microorganismos Más Resistentes Y Antibióticos. *Revista médica de Costa Rica y Centroamérica LXXIII* [en línea], 2016, no. 621, pp. 757-763. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revmedcoscen/rmc-2016/rmc164c.pdf>.

CAMPUZANO, S; et al. Determinación de la calidad microbiológica y sanitaria de alimentos preparados vendidos en la vía pública de. *NOVA* [en línea], 2015, pp. 81-92. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v13n23/v13n23a08.pdf>.

CANATA, M; et al. Caracterización molecular de factores de virulencia de aislados *Escherichia coli* obtenidas de heces de niños con gastroenteritis del Hospital Central de Instituto de Previsión Social en el 2012. *Pediatría (Asunción)* [en línea], 2016, vol. 43, no. 1, pp. 12-16. ISSN 1683-9803. Disponible en: <https://www.revistaspp.org/index.php/pediatria/article/view/2/2>.

CHAVARRÍAS, M. *El pH de los alimentos y la seguridad alimentaria. EROSKI consumer*, pp. 40-43.

DIGESA. Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. [en línea], 2003, pp. 1-24. Disponible en: http://www.digesa.minsa.gob.pe/norma_consulta/Proy_RM615-2003.pdf.

EL COMERCIO. 47 % de alimentos de la calle incumple normas, según Secretaría de Salud | El Comercio. [en línea]. 2017. Disponible en: <https://www.elcomercio.com/tendencias/alimentos-calle-contaminacion-enfermedades-secretariadesalud.html>.

GAMARRA, F. Probiótico elaborado en base a las semillas de *Lupinus mutabilis* sweet (chocho o tarwi). *Acta Médica Peruan.*, 2008.

GIL, M. *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. *Revista Chilena de Infectología*, (2000), vol. 17, no. 2, pp. 145-152. ISSN 07161018. DOI 10.4067/s0716-10182000000200010.

GOBIERNO AUTÓNOMO DESCENTRALIZADO DE RIOBAMBA. Ceviche de chochos. [en línea]. 2020. Disponible en: <https://riobamba.com.ec/es-es/chimborazo/riobamba/recetas/ceviche-chochos-ab12a14ea>.

GUTIÉRREZ, S. Identificación Microbiana. 2008.

HOFFMAN, H; et al. Descripción de *Enterobacter ludwigii* sp. una nueva especie de *Enterobacter* de relevancia clínica. *ELSEVIER* (2005) pp. 206-212.

IBARRA, L; et al. *Análisis Gastronómico del Ceviche de Chocho en la Ciudad de Riobamba.* (Trabajo de Titulación) Universidad de Guayaquil. Ecuador. 2017.

LABORATORIO BRITANIA. Verde Brillante Bilis 2% Caldo Uso. 2013.

LABORATORIO BRITANIA S.A. Agua Peptonada. 2018.

LABORATORIOS BRITANIA S.A. Kligler Hierro Agar. *Laboratorios Britania*, 2001a, pp. 1.

LABORATORIOS BRITANIA S.A. Sabouraud Glucosado Caldo. 2001b.

LABORATORIOS BRITANIA S.A. Recuento en Placa Agar. 2010.

LABORATORIOS BRITANIA S.A. Salmonella shigella agar. 2011.

LABORATORIOS BRITANIA S.A. E.M.B (con eosina y azul de metileno). *Laboratorios Britania*. 2015.

LABORATORIOS BRITANIA S.A. Manitol Salado Agar. 2015.

LÓPEZ, J; et al. Pneumoniae: ¿la nueva «superbacteria»? Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia. *IATRELA*, 2010, vol. 23, pp. 157-165.

LOZANO, J; et al. Enfermedades transmitidas por los alimentos: una mirada puntual para el personal de salud. 2016. vol. 37, no. 3, pp. 95-104.

MILOSLAV, K; et al. El género *Micrococcus*. *Los procariotas* , (2017), pp. 961-971.

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA DEL ECUADOR. *Reglamento Para El Control Sanitario De Alimentos Que Se Expenden En La Vía Pública* [en línea]. 2013. s.n. ISBN 9788578110796. Disponible en: <https://www.controlsanitario.gob.ec/wp->

content/uploads/downloads/2016/12/A-14381-Control-de-alimentos-que-se-expenden-en-vía-pública.pdf.

MSP. Enfermedades transmitidas por agua y alimentos. 2018. no. 2, pp. 1-6.

NAVA, A; et al. Klebsiella oxytoca: El futuro de la biorremediación. *Materia, Ciencia y Nanociencia* [en línea], 2019, vol. 1, no. 2, pp. 9-14. Disponible en: <https://www.uv.mx/veracruz/microna/files/2019/07/ART02.pdf>.

OMS. Enfermedades de transmisión alimentaria. 2016.

OMS. Inocuidad de los alimentos. 2020a.

OMS. Resistencia a los antimicrobianos. 2020b.

OPS, O. Peligros Biológicos, Inocuidad de Alimentos, Control Sanitario. 2018.

ORTEGA, E; et al. Characterization properties of lupin (*Lupinus mutabilis*) seeds grown in the Colombian Andean region. 2010. vol. 59, no. 1, pp. 111-118. DOI 10.02.10.

ORTEGA, L. Clasificación de Medios de Cultivo. 2012.

ORTEGA, M; et al. Preparación de Medios de Cultivo. *Universidad Tecnológica Nacional* [en línea], 2009. Disponible en: https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practicoIII.pdf.

PÉREZ, C. *Expendio de alimentos en la vía pública de la comuna de recoleta.* 2005.

PUIG, Y; et al. Resistencia antimicrobiana en Salmonella y E. coli aisladas de alimentos: revisión de la literatura. *Panorama Cuba y Salud* [en línea], 2011, vol. 6, no. 1, pp. 30-38. ISSN 0124-1265. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/4773/477348944006.pdf>.

RODRIGUEZ, A. *Evaluación in-vitro de la actividad microbiana de los alcaloides de agua de cocción del proceso de desamargado del chocho (Lupinus mutabilis sweet).* (Trabajo de titulación) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. 2009.

RODRÍGUEZ, P; et al. Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Medica y Quirúrgica* [en línea], 2018, pp. 166-167. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf>.

ROSALES MARTÍNEZ, I. *Determinación de parásitos intestinales en ensaladas crudas preparadas en varios hospitales de la ciudad de Guatemala* [en línea]. 2011. Disponible en: <https://biblioteca-farmacia.usac.edu.gt/Tesis/QB975.pdf>.

SÁNCHEZ BARRADO, M. L. Aplicación del código de barras de ADN.

SANMARTÍN, L; et al. *Evaluación De La Calidad Microbiológica Del Chocho Desamargado Para Consumo En La Ciudad De Cuenca.* (Trabajo de Titulación). Universidad de Cuenca. 2014.

VÁZQUEZ, S; et al. Importancia de los coliformes en los alimentos. [en línea], 2013. Disponible en: https://montevideo.gub.uy/sites/default/files/importancia_de_los_coliformes_en_los_alimentos.pdf.

VILLACRÉS, E; et al. Usos Alternativos del Chocho. *Recetario-usos alternativos del chocho.* 2006. vol. 1, no. 333, pp. 1-19.

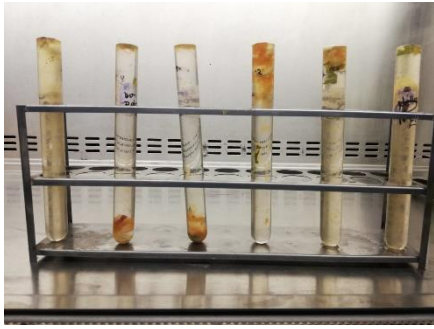
VIZCARRONDO, M; et al. Identificación microbiana. *Identificacion Microbiana* [en línea], 2008, vol. 11, pp. 1-12. Disponible en: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_12_identificacion.pdf.

YANETH GIOVANETTI, M; et al. Perfil de resistencia bacteriana en hospitales y clínicas en el departamento del Cesar (Colombia). *Medicina y laboratorio* [en línea], 2017, vol. 23, no. 7, pp. 387-398. ISSN 0123-2576. Disponible en: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/05/883698/resistencia-bacteriana.pdf>.

ANEXOS

ANEXO A: EVIDENCIAS FOTOGRÁFICAS DEL ESTUDIO

	
Puesto de expendio de ceviches de chochos	Puesto de expendio de ceviches de chochos
	
Muestra de ceviche de chochos	Preparación de la muestra para toma de pH
	
Medición de pH	Preparación de medios de cultivo y diluciones
	
Homogenización de las muestras	Diluciones de las muestras



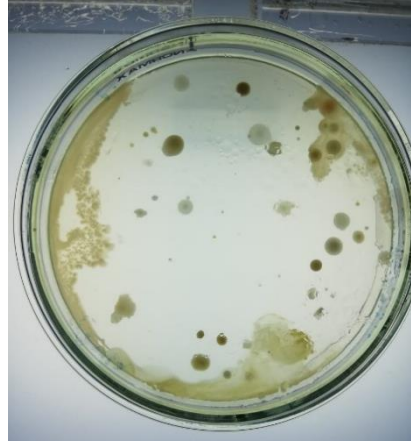
Determinación de parásitos por flotación



Preparación de diluciones para vertido en placa



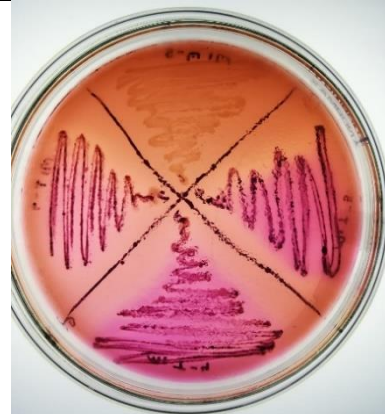
Preparación de la solución de yodo -
enriquecimiento de Salmonella



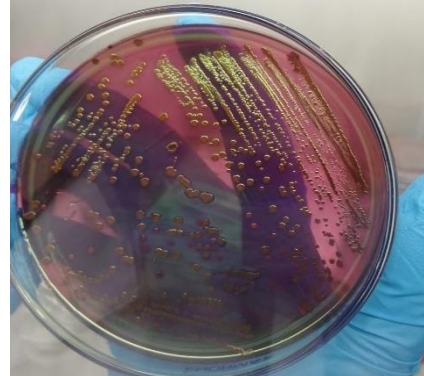
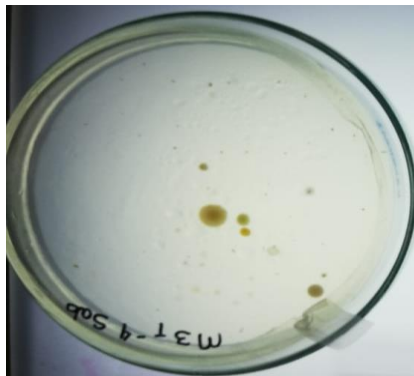
Crecimiento de aerobios mesófilos en


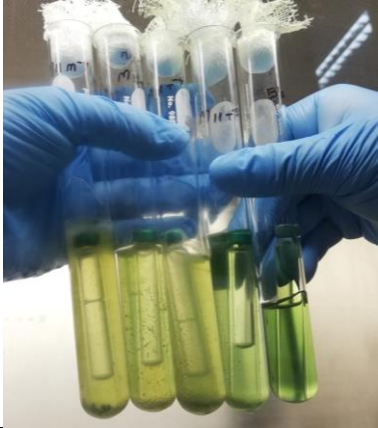


Crecimiento bacteriano en agar SS



Crecimiento bacteriano en agar EMB



<p>Crecimiento de levaduras en agar saboraud</p>	<p>Escherichia coli en agar EMB</p>
	
<p>Identificación mediante pruebas bioquímicas</p>	<p>4. Coliformes totales en caldo verde bilis brillante</p>

ANEXO B: CERTIFICADO DE CUMPLIMIENTO DE NORMATIVA



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

**DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y RECURSOS DEL APRENDIZAJE
UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL**

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 23 / 11 / 2021

INFORMACIÓN DEL AUTORA (S)
Nombres – Apellidos: <i>Viviana Rocío Hernández Donoso</i>
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: <i>Ciencias</i>
Carrera: <i>Bioquímica y Farmacia</i>
Título a optar: <i>Bioquímica Farmacéutica</i>
f. Analista de Biblioteca responsable: <i>Ing. Leonardo Medina Ñuste MSc.</i>

**LEONARDO
FABIO MEDINA
NUSTE**

Firmado digitalmente
por LEONARDO FABIO
MEDINA NUSTE
Fecha: 2021.11.23
11:17:35 -05'00'



1834-DBRA-UTP-2021