

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

**Determinación de *Escherichia coli* en ensaladas
a base de lechuga preparadas en restaurantes de comida rápida.**

Informe de Tesis

Presentado por:

Aracely Rodríguez de León

Para optar al título de

Química Farmacéutica

Guatemala, Enero del 2005

INDICE

1. RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCION.....	3
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Generalidades.....	4
2.2 Clasificación de cepas de E. coli.....	4
2.3 Enfermedades transmitidas por los alimentos en el caso de las hortalizas.....	8
2.4 Agua, un riesgo de contaminación microbiológica en hortalizas.....	11
2.5 Medios de cultivo y pruebas de comprobación.....	13
2.6 Prevención de enfermedades transmitidas por alimentos.....	16
2.7 Buenas Prácticas de Manufactura de alimentos.....	17
3. JUSTIFICACION.....	19
4. OBJETIVOS.....	20
5. HIPOTESIS.....	21
6. MATERIALES Y METODOS.....	22
7. RESULTADOS.....	28
8. DISCUSION DE RESULTADOS.....	31
9. CONCLUSIONES.....	35
10. RECOMENDACIONES.....	36
11. REFERENCIAS	37
12. ANEXOS.....	40

1. RESUMEN

En este estudio se analizaron ensaladas provenientes de restaurantes de comida rápida de la ciudad de Guatemala con el objetivo de establecer la presencia de *E. coli* en las mismas.

La importancia de este estudio se debe a que los alimentos como las hortalizas favorecen el crecimiento de microorganismos patógenos debido a la contaminación accidental de agua, suelo o actividades humanas no higiénicas, pudiendo afectar la salud de quienes las consumen.

Para la realización de este estudio se analizaron 42 ensaladas procedentes de diferentes restaurantes de comida rápida (una ensalada por restaurante) escogidos al azar. A cada ensalada se le analizaron individualmente los siguientes ingredientes: lechuga, pepino, zanahoria y tomate, haciendo un total de 168 análisis.

Se utilizó la técnica de vertido en placa utilizando como medio Agar Bilis Rojo Violeta (VRB) y utilizando como control positivo una cepa de *E. coli* y como control negativo una cepa de *Proteus vulgaris*. Si después de la incubación la muestra presentaba colonias sospechosas de *E. coli* se comprobaba mediante el kit de Bactident *E. coli*.

De los ingredientes analizados, el 2.38% de las muestras de pepino, el 7.14% de las muestras de zanahoria y el 11.9% de las muestras de tomate fueron confirmadas como *E. coli* positivas. Se detectó *E. coli* en siete ensaladas (16.66%) de las 42 ensaladas a base de lechuga analizadas. Se logró identificar también muestras contaminadas con *Klebsiella ssp.*, *Enterobacter ssp.* y *Pseudomona ssp.* La lechuga, el pepino y la zanahoria mostraron en general recuentos de coliformes elevados.

El tipo de contaminación que se encontró en las ensaladas se da cuando los procedimientos de sanitización no son efectivos, fallando tanto en la aplicación como en la dosificación de los químicos utilizados para desinfectar el producto. A esto se le agrega que si la carga de la materia prima es demasiado grande, el procedimiento de

sanitización no llega a ser suficiente para eliminar por completo la población microbiana. Es importante la correcta manipulación de alimentos, asegurando que el personal se encuentre capacitado para realizar sus funciones siguiendo las normas de Buenas Prácticas de Manufactura, que incluyen cuidar diariamente del aseo personal, buen lavado de manos y uñas, pelo corto, buena limpieza de áreas y utensilios, sanitización de equipos y alimentos, etc.

Se concluye con base en este estudio, que la hipótesis que se había planteado no concuerda con los resultados obtenidos, ya que se esperaba que ninguna muestra de ensalada a base de lechuga estuviera contaminada con *E. coli* y se recomienda a los restaurantes de comida rápida que realicen monitoreos sistemáticos para analizar la comida que se vende en los mismos.

2. INTRODUCCION

En las ciudades grandes debido a las actividades individuales y distancias que se recorren diariamente, las personas tienen cada vez menos tiempo disponible, y el caso de su alimentación no se exceptúa de este problema, es por ello que la población económicamente activa recurre a los restaurantes de comida rápida con más frecuencia. Las ensaladas a base de lechuga son algunos de los alimentos que ofrecen algunos de estos restaurantes.

Algunas características de este tipo de alimento tienen una participación fundamental en la incidencia de las enfermedades gastrointestinales, participación cuya magnitud depende de la preparación, almacenamiento y conservación.

Los siguientes factores se asocian a la mayoría de enfermedades de origen alimentario:

- Preparar los alimentos con gran antelación al consumo.
- Dejar los alimentos preparados demasiado tiempo, a temperaturas que permitan la proliferación de microorganismos.
- Contaminación cruzada entre alimentos crudos y cocidos.
- Manipulación de alimentos por personas infectadas o manos sin lavar.
- Mal lavado de los alimentos (1, 2).

Son muchas las bacterias que provocan procesos diarreicos por el consumo de alimentos contaminados. Estas tienen la capacidad de producir toxinas y/o invadir la mucosa intestinal. Entre ellas se encuentra *E. coli*.

Las vías de transmisión más comunes para *E. coli* son el agua, los productos cárnicos y lácteos, así como frutas, verduras y hortalizas mal lavadas, o bien, lavadas con agua contaminada (3).

Dado que en Guatemala, no hay estudios específicos respecto a este tema, se hace necesario hacer una evaluación de la situación real de la calidad de estos alimentos, es por ello que el presente trabajo tiene como finalidad identificar la presencia o ausencia de esta bacteria en muestras de ensaladas a base de lechuga despachadas en restaurantes de comida rápida localizados en la ciudad capital.

3. ANTECEDENTES

3.1 Generalidades

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, no formador de esporas que está presente en el intestino de los animales y del hombre, así como también en suelos. Fue inicialmente descrito por Theodor Escherich en 1885 con el nombre de *Bacterium coli*, tras aislarlo a partir de muestras fecales procedentes de niños con enteritis. *E. coli* es considerado como un miembro fundamental de la flora facultativa normal del intestino y juega un papel importante en el mantenimiento de su fisiología, ya que tiene la útil función en el cuerpo humano de suprimir el crecimiento de peligrosas bacterias y contribuir a la síntesis de un apreciable volumen de vitaminas.

E. coli se ha convertido en la actualidad, en uno de los tipos de bacteria enteropatógena de mayor preocupación en la industria alimenticia, debido a que se le ha catalogado como uno de los principales agentes causales de epidemias por contaminación de alimentos, provocando en el humano, severos trastornos gastrointestinales, principalmente en niños y ancianos (4).

El hábitat principal de *E. coli* es el intestino de los animales de sangre caliente y es esparcida por medio de sus defecaciones (5).

Este tipo de microorganismo tiene la capacidad de producir dos tipos de toxinas diferentes, una termolábil (similar a la producida por *V. cholerae*) y una termoestable, de la cual existen dos tipos, a y b. La capacidad de producir cualquiera de estos tipos de toxinas se encuentran en información genética transmitida por medio de plásmidos (6).

3.2. Clasificación de cepas de *E. coli*:

Inicialmente, las cepas de *E. coli* causantes de enfermedades gastrointestinales en los seres humanos fueron denominadas como enteropatógenas. Más recientemente, estos microorganismos se han agrupado en categorías basándose en los síndromes clínicos con los que han sido asociados y en las características de patogenicidad, principalmente en sus mecanismos de colonización y en los tipos de toxinas que producen (14).

Las cepas enteropatógenas de *E. coli* en los seres humanos se han clasificado en las siguientes categorías:

- *E. coli* enteropatógenos clásicos (ECEP).
- *E. coli* verotoxigénicos (ECVT)
- *E. coli* enterohemorrágicos (ECEH)
- *E. coli* enteroinvasivos (ECEI) (14).

3.2.1 *E. coli* enteropatógenos clásicos (ECEP):

Durante la década de los años 40 y 50 en Europa y en Estados Unidos, se identificaron una serie de serotipos de *E. coli* aislados a partir de casos de diarrea infantil. Inicialmente se denominaron como enteropatógenos en 1955.

Estas cepas producían diarrea acuosa en niños debido a su habilidad para colonizar las células epiteliales del intestino delgado (14).

Ciertos autores observaron que algunas cepas de ECEP, también relacionados con la diarrea humana, eran capaces de adherirse in vitro a las células de la línea celular Hep-2, con lo que fueron denominados *E. coli* enteroadherentes. Estas cepas se pegan a las vellosidades intestinales impidiendo los mecanismos de absorción y secreción (14, 23).

Por otro lado, también se ha observado que ciertas cepas de *E. coli* mostraban in vitro un tipo específico de adherencia a las células epiteliales de la mucosa intestinal. Este efecto se caracteriza por la destrucción de las microvellosidades y por una adherencia destructiva a la membrana de las células epiteliales. Produce una toxina que es termoestable y su mecanismo de acción consiste en activar a la guanilato ciclasa de la mucosa intestinal. Las cepas que presentaron estas características fueron denominadas como *E. coli* “attaching and effacing” (14, 22).

3.2.2. *E. coli* enterotoxigénicos (ECET):

La ECET es considerada como la más importante causa de la “diarrea del viajero” pero, naturalmente no es la única y al mismo tiempo no se la encuentra sólo en esa situación (22).

En los países desarrollados no es frecuente aislar ECET de los casos esporádicos de diarrea, aunque, ocasionalmente, son los responsables de brotes de diarrea en hospitales infantiles (14).

Estas cepas colonizan el epitelio intestinal produciendo una diarrea acuosa. Poseen dos factores de virulencia para causar la infección: la capacidad para sintetizar enterotoxinas y adhesinas específicas para colonizar el epitelio intestinal. La enterotoxina que produce es termolábil y origina la activación de la adenilato ciclasa de la mucosa (14, 22).

Hasta el momento actual se han identificado dos grupos de ECET:

- El primero está formado por dos enterotoxinas termolábiles (LT-1 y LT-2) a 60°C durante 30 minutos.
- El segundo grupo está constituido por enterotoxinas termoestables (STa y STb, o también ST-1 y ST-2) a 100°C por 15 minutos (14).

Ambos grupos se sintetizan dentro del lumen del intestino delgado y producen un aumento de la secreción de fluidos sin dañar las células epiteliales (14).

Los ECET poseen mecanismos de adhesión que les permiten adherirse y colonizar la superficie de la mucosa del intestino delgado, soportando el peristaltismo intestinal. La capacidad adherente de estos microorganismos está asociada a filamentos proteicos denominados adhesinas o a factores de colonización. Estos filamentos pueden ser estructuras rígidas, denominadas fimbrias, o flexibles, denominadas fibrillas.

Una característica importante de los ECET es que la mayoría de ellos pertenecen a un número reducido de serotipos O:K:H que no son encontrados con frecuencia entre los *E. coli* que no son enterotoxigénicos (14).

3.2.3 *E. coli* verotoxigénicos (ECVT)

Su descubrimiento se produjo al observar que ciertas cepas de *E. coli* producían un efecto citopático irreversible en las células de la línea celular Vero, en contraste con el efecto reversible que producían las toxinas LT. Estas observaciones llevaron a especular que esta toxina termolábil, denominada verotoxina (VT), podría contribuir con su acción en las enfermedades diarreicas. Posteriormente, se demostró la actividad enterotoxigénica de la VT (14).

Un avance muy importante se realizó en Canadá y en Estados Unidos en los años 80, cuando se relacionó la infección con VTEC con dos enfermedades de causa hasta el momento desconocida, la colitis hemorrágica (CH) y el síndrome urémico hemolítico (SUH). El serotipo O157:H7 fue el que se asoció a estos síndromes (14).

Actualmente se sabe que ECVT es capaz de sintetizar tres tipos de verotoxinas: VT1, VT2 y VT2v. Estas tres verotoxinas están relacionadas funcionalmente, estructuralmente e inmunológicamente con la toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* tipo 1. Por esta razón también han sido denominadas por algunos autores como “Shiga like toxins” SLT1, SLT2 y SLT2v (14).

Algunas de las complicaciones de la infección por *E. coli* productora de toxina Shiga son falla renal, disminución de plaquetas y anemia. Afecta a todas las edades, sin embargo, la mayor tasa de incidencia se registra en menores de 5 años (24).

3.2.4 *E. coli* enterohemorrágicos (ECEH):

Estas cepas se identificaron en 1982 en Estados Unidos, donde ocasionaron brotes en varios Estados. Desde entonces se han descrito epidemias en diversos países del mundo.

El cuadro diarreico se presenta con deposiciones acuosas desde leves hasta profusas y sanguinolentas, sin leucocitos en las heces, lo cual establece la diferencia con la shigelosis y la disentería causada por *E. coli* enteroinvasivo. En algunos casos se presentan síndromes hemolítico-urémico y de púrpura trombocitopénica trombótica que requieren atención en servicios especializados (25).

El agente etiológico principal es *E. coli* O157:H7, aunque intervienen otros como O26:H11, O111:H8 y O104:H21 (26).

Se han descrito brotes en Asia, Sudáfrica, Australia, Europa, y en Las Américas (Estados Unidos, Canadá, Países del Cono Sur de Sudamérica, así como casos aislados en otras partes de Latinoamérica). En Costa Rica, en febrero-marzo de 1996, el Hospital Nacional de niños informó de cuatro casos de síndrome hemolítico urémico, en menores de dos años de edad con antecedentes de ingestión de carne de pollo, hamburguesas y tortas de carne. Se aisló *E. coli* O157:H7. Los pacientes no tenían vinculación entre sí y residían en comunidades alejadas unas de otras. El CDC estima

que en Estados Unidos se presenta cada año de 10,000 a 20,000 casos de diarreas por este agente (26, 27).

El ganado vacuno constituye el reservorio principal de ECEH. Los humanos pueden también servir como reservorio para la transmisión persona a persona, sobre todo en establecimientos con alto grado de hacinamiento. El modo de transmisión puede darse por alimentos contaminados, principalmente por carne de res poco cocida. También puede transmitirse por leche cruda, carne molida que no tiene una adecuada manipulación y que se ingiere sin tener buen grado de cocción. Se han vinculado brotes también por el agua sin desinfección. Más recientemente han sido detectados más casos en los que los alimentos implicados eran frutas, hortalizas, zumos, yogur, etc (14, 26).

3.2.5 *E. coli* enteroinvasivo (ECEI):

Los serotipos pertenecientes a este grupo causan una diarrea similar a la causada por *Shigella dysenteriae*. Consiste en una diarrea febril inflamatoria, con leucocitos y glóbulos de pus, lo cual la diferencia de una diarrea por cólera o por la causada por *E. coli* enterotóxica. Los ECEI tienen la capacidad de invadir las células epiteliales del colon, proliferar y causar necrosis (inflamación y ulceración de la mucosa) del tejido del colon y del tejido epitelial, lo que da como resultado final una diarrea sanguinolenta con fiebre (14, 23).

3.3 Enfermedades transmitidas por los alimentos en el caso de hortalizas

Durante las últimas décadas, diferentes investigaciones científicas han demostrado que una dieta rica en frutas y hortalizas ofrece una protección contra muchas formas de cáncer y reduce la ocurrencia de enfermedades coronarias. Esto, junto con el poco tiempo con que cuenta gran parte de la población para cocinar en días laborales sus alimentos, ha incrementado el consumo de ensaladas en restaurantes de comida rápida.

Sin embargo, se ha informado de una serie de casos en los cuales los productos frescos son el vehículo de transmisión de enfermedades, producidas por diferentes microorganismos (7).

La lechuga, repollo, apio y otros vegetales que generalmente se consumen crudos han sido asociados con brotes epidémicos de diarrea. La contaminación microbiológica de estos alimentos toma mayor importancia al considerar que el tiempo de supervivencia de los microorganismos patógenos puede ser prolongado, semanas o meses, particularmente cuando los microorganismos están en las áreas del vegetal más húmedas y protegidas de la desecación y de los rayos directos del sol, como ocurre en la lechuga, repollo, zanahoria y rábano (8).

Diversos estudios de campo y laboratorio, han mostrado que los patógenos inoculados en la tierra de cultivo o en las aguas de irrigación de vegetales pueden sobrevivir hasta por dos meses, período suficiente para que alcancen en forma viable al consumidor (9).

Se ha detectado un aumento significativo en la cantidad de brotes de enfermedades transmitidas en los alimentos frescos. En el siguiente cuadro se ilustran algunos casos relevantes de especial interés para este estudio (10).

Cuadro No. 3.3.1

CASOS DE MICROORGANISMOS PATOGENOS ASOCIADOS CON FRUTAS Y VEGETALES FRESCOS				
MICROORGANISMO	FECHA	PRODUCTO	PAÍS	OBSERVACIONES
<i>E. coli</i>	1993	Zanahorias	U.S.A.	168 casos
<i>E. coli</i>	1995	Lechuga	U.S.A.	Agua de riego
<i>E. coli</i>	1995	Lechuga iceberg	U.S.A.	Contaminación cruzada de carne
<i>E. coli</i>	1996	Lechuga	U.S.A.	Por manipuleo
<i>E. coli</i>	1996	Rábanos	Japón	Mayor brote del mundo. 6,000 casos, tres niños muertos.
<i>E. coli</i>	1997	Zumos de manzana	U.S.A.	-----

En América Latina, las diarreas por lo general son provocadas por el consumo de alimentos contaminados por diferentes microorganismos, llegando a ser causa de muerte en muchos casos (10).

Cuadro 3.3.2. Tasa de morbilidad debido a diarreas en algunos países de la Región.

PAÍS	% POR CADA 100,000 HABITANTES
Costa Rica	0.27
Panamá	0.66
Belice	0.86
Salvador	4.00
Guatemala	7.06
Nicaragua	9.82

En la temporada de 1995-1996, en América Latina el 2% de las enfermedades causadas por alimentos corresponden a enfermedades asociadas con frutas y vegetales frescos (10).

Este es un problema que afecta no sólo a los países en desarrollo. En 1996 en el Reino Unido, el 3% de los casos informados fue provocado por enfermedades asociadas con el consumo de frutas y vegetales frescos. En 1985, en Francia, un muestreo en establecimientos comerciales que distribuían zanahorias, demostró que el 7% de las zanahorias contenían *Yersinia enterocolítica*. En Estados Unidos se registraron 6.5 millones de casos cada año afectados por las diarreas, la muerte llegó a 9,000 casos (11).

E. coli O157:H7 ha demostrado tener la capacidad de sobrevivir y crecer en vegetales para ensalada almacenados a 12°C y a 21°C por más de 14 días siendo su mayor tiempo de supervivencia a temperaturas de refrigeración (entre 0°C y 4°C) que a temperatura ambiente (3).

3.3.1 Crecimiento de *E. coli* en hortalizas:

Hasta la fecha, resultados de investigaciones publicadas sobre el destino de *E. coli* introducido a hortalizas como modelo de la contaminación accidental de agua, suelo, o actividades humanas no higiénicas, se ha concentrado ante todo en el análisis de riesgo de los cultivos documentados como fuentes de las epidemias. Una vez introducido a la lechuga, u otras hortalizas y frutas, como pepino, melón, sandía, alfalfa y rábano, existe la alta probabilidad de la sobrevivencia y el crecimiento, dado condiciones de temperatura permisivas (12).

Estas condiciones de temperatura permisivas no son raras en la cadena de distribución convencional y de manejo en el servicio de alimentos y puede existir mayor posibilidad en operaciones de tamaño pequeño y en lugares de venta directa al consumidor (12).

3.4 Agua, un riesgo de contaminación microbiológica en hortalizas

El agua es un elemento esencial en la producción y el manejo de hortalizas y se utiliza tanto en operaciones de campo como de planta.

El agua puede ser un portador de gran número de agentes patógenos de la salud humana incluyendo las cadenas patógenicas *E. coli*, *Salmonella ssp.*, *Vibrio cholerae*, *Shigella ssp.*, etc. En una encuesta sobre brotes de enfermedades producidas por el agua en los Estados Unidos durante 1991-1992, 34 brotes fueron asociados con el agua potable, en los cuales cerca de 17,464 personas resultaron enfermas (13).

La primera epidemia por contaminación del agua con *E. coli* se reportó en Missouri en 1989, en donde más de 240 personas se infectaron, 32 fueron hospitalizadas y 4 murieron (3).

Otras investigaciones realizadas en este país entre 1990-1993 detectaron dos brotes de infección de *Salmonella*, que dieron lugar a por lo menos 300 casos en cuatro Estados; se achacó el problema al consumo de tomates frescos que procedían de instalaciones de empaqueo en donde la contaminación parecía generarse en un lavado con agua. En 1995, hubo un brote de infección por *E. coli* en hojas de lechuga, que

afectó a por lo menos 29 personas y se le atribuyó la contaminación al agua de riego utilizada en el campo (13).

Cuando el agua entra en contacto con las frutas y hortalizas frescas, la posibilidad de contaminación por esta fuente, depende de su calidad y procedencia. El agua puede ser motivo de preocupación en dos aspectos:

- Primero, como una fuente inherente de contaminación (por sí misma)
- Segundo, como un vehículo para desplegar contaminación patogénica de un artículo a muchos otros (13).

Al conocer el potencial, comprobado, del agua de ser un vehículo para los microorganismos patógenos, los productores, los procesadores y comercializadores de frutas y vegetales deben analizar cuidadosamente las prácticas y procesos que requieren de agua y buscar la manera de minimizar la posibilidad de contaminación proveniente de esta herramienta (13).

La posibilidad de contaminación, depende de factores como las características físicas de los cultivos de las hortalizas, la cantidad de agua que entre en contacto con el producto, la frecuencia del uso del agua y el momento en que esta se utilice (13).

Algunas consideraciones con el agua utilizada en labores agrícolas, que permiten minimizar los riesgos de contaminación, son:

- Identificar la fuente y distribución del agua que se usa y ser conscientes de la posibilidad de que constituya una fuente de microorganismos patógenos.
- Pozos en buenas condiciones y con constante mantenimiento.
- Revisión de las prácticas y condiciones existentes para detectar posibles fuentes de contaminación.
- Conciencia acerca del uso del terreno en la actualidad y en el pasado.
- Considerar prácticas que ayuden a proteger la calidad del agua.
- Determinar la calidad y el uso del agua de riego (13).

La calidad del agua utilizada en el procesamiento de frutas y hortalizas debe estar de acuerdo con el uso que se pretenda hacer de la misma. El contacto entre el agua y el producto durante las actividades de procesamiento es generalmente extenso. Si bien el agua es un medio útil para reducir la posibilidad de contaminación, también puede causarla de forma directa o indirecta (13).

Se ha demostrado que la frecuente contaminación del suelo por repetidas aplicaciones de agua contaminada o heces de animales, contrarresta los factores ambientales adversos y permite que los agentes patógenos permanezcan viables en la tierra por dos meses o más, especialmente en áreas húmedas y sombreadas. Esto puede explicar, la contaminación fecal durante la estación lluviosa en aquellas hortalizas cuya parte comestible está en contacto directo con el terreno, ya que parece que las salpicaduras de tierra al caer la lluvia, no juegan un papel importante en el transporte de los agentes contaminantes a las hortalizas, debido a que las bacterias y parásitos depositados en el suelo, principalmente vía excreción fecal, son inmovilizados y fijados en un sitio específico (7).

3.5 Medios de cultivo y pruebas de comprobación

3.5.1 Agar con bilis y rojo violeta (Bacto-Violet Red Bile Agar)

Agar selectivo para demostración y para numeración de bacterias coliformes, inclusive *E. coli*, en agua, leche, helados, carnes y alimentos en general.

El agar con bilis y rojo violeta se recomienda para el recuento directo en placa de bacterias coliformes en el agua, leche, productos lácteos y en general, para cualquier producto alimenticio. Por su formulación, corresponde a las recomendaciones de la American Public Health Association, a las de la Federación Internacional de Lechería, a las del instituto Alemán de Tecnología de Alimentos y Envasado y a las de EUROGLACE (15).

El trabajo original realizado por los Laboratorios Difco sobre la creación de un medio selectivo para el cálculo cuantitativo del número de organismos coliformes viables en alimentos, se emprendió en 1932 en cooperación con M.H. McCrady, que el aquel tiempo pertenecía al comité sobre los métodos estándar de análisis de la leche de la Asociación Americana de Salud Pública. La fórmula adoptada se sometió a pruebas exhaustivas en los Laboratorios Disco y también la emplearon otros extensamente en la determinación de la presencia y cantidad de organismos coliformes en alimentos (15).

Fabian y Hook emplearon el agar con bilis y rojo violeta para establecer el recuento de *Escherichia-Aerobacter*, en un estudio realizado para hallar las condiciones

sanitarias de los helados que se sirven en las máquinas automáticas. Millar y Pricket publicaron una nota sobre el empleo de este medio en un caso práctico acerca de la recontaminación de la leche. El recuento del agar con bilis y rojo violeta se concluyó 24 horas después de la colocación en placa. Esto constituye un ahorro considerable de tiempo en comparación con el procedimiento de confirmación con Bilis con verde brillante que necesita un tiempo mínimo de 48 horas (15).

COLONIAS	MICROORGANISMO
Rojas, con halo de precipitación rojizo; de 1-2 mm. de diámetro	Enterobacterias lactosa-positivas: Coliformes, <i>E. coli</i>
Colonias como punta de alfiler	Enterococos; eventualmente, <i>Klebsiella</i>
Incoloras	Enterobacterias lactosa-negativas

El agar con bilis y rojo violeta es un medio para cajas de petri. Se recomienda que se utilice de 15 a 20 ml. del medio. Después de verter el medio en la placa, se deja que se solidifique. Se incuban las cajas a 37°C por un período de 18-24 horas y al término de este período se examinan con luz transmitida. Debido a la capacidad de los organismos del grupo coliforme para fermentar la lactosa, forman colonias de color rojo amoratado bajo la superficie, las cuales son de 1-2 mm. de diámetro y suelen estar rodeadas de una zona rojiza de bilis precipitada. No se deberán incubar las placas por más de 24 horas, porque los organismos cuyo crecimiento se haya detenido, pueden desarrollarse y hacer confuso el recuento. Los mejores resultados se obtienen si las placas no se han sembrado con demasiada profusión, debiéndose diluir el inóculo de modo que no se desarrollen más de 150 colonias por placa (15).

3.5.2 Caldo-Peptona de Caseína-Peptona de harina de Soja (Caldo Casoy) **Medio de cultivo universal, exento de sustancia inhibidora y de indicadores, concebido para su utilización en un amplio espectro de aplicaciones.**

Por su rica y abundante base nutritiva, este medio de cultivo es adecuado para el crecimiento de microorganismos exigentes. También se recomienda para emplearlo en el método de dilución en tubo (16).

3.5.3 Agua de Peptona Tamponada pH 7.2

Para enriquecimiento previo, no selectivo, de bacterias y especialmente de enterobacterias patógenas a partir de alimentos y otros materiales.

Por su composición este medio de cultivo corresponde a las recomendaciones de la International Organization for Standardization y del Deutsches Institut für Normung.

El enriquecimiento previo en este medio de cultivo permite obtener rendimientos más elevados de enterobacterias patógenas, especialmente si se trata de gérmenes dañados subletalmente (16).

3.5.4 Prueba para la identificación y confirmación de *E. coli* (Bactident® *E. coli*)

La actividad de la β -D-Glucuronidasa es una señal específica de *E. coli*, como enterobacteria. El 94% de las cepas de *E. coli* poseen la enzima. La actividad Triptofanasa (por ejemplo, la habilidad para formar indol a partir del triptofano) está presente en el 99% de las cepas de *E. coli*. La detección de ambas enzimas es una prueba irrefutable de presencia de *E. coli* (16).

La formación de indol esta indicada, si la suspensión bacteriana se torna roja con la adición de reactivo de KOVAC's (16).

3.5.4.1 Modo de Acción:

La prueba de Bactident *E. coli* contiene tiras cuyas zonas reactoras están impregnadas con 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronido (MUG). La β -D-glucuronidasa transforma este sustrato en 4-metilumbeliferona la cual fluoresce con luz azul cuando es excitada con luz de longitud de onda UV (cerca de 366 nm.) y esto indica que la enzima esta presente (16).

3.5.4.2 Composición de la prueba:

50 tiras, 50 cubetas reactoras; una bandeja para esperar la reacción; un gotero conteniendo reactivo de KOVAC's.

3.6. Prevención de enfermedades transmitidas por alimentos

Los alimentos elaborados y los lácteos están entre los primeros productos involucrados en denuncias de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA). Le siguen, en menor proporción, frutas y verduras, agua o bebidas y más atrás en la lista figuran aves y derivados y carnes y embutidos.

Prácticamente todos los alimentos poseen las condiciones necesarias para el desarrollo, multiplicación y supervivencia de microorganismos causantes de las llamadas Enfermedades Transmitidas por Alimentos, como se conoce a todo conjunto de signos y síntomas (agudos o crónicos) que se producen debido a la ingesta de productos, sus ingredientes, agua y otro tipo de bebidas en los que se encuentren agentes biológicos o químicos, en cantidad o concentración suficientes como para alterar la salud de quienes los consumen (28).

Existen dos categorías de ETA: las intoxicaciones alimentarias, causadas por las toxinas que producen los microorganismos; y las infecciones alimentarias, causadas por el crecimiento de los microorganismos en el cuerpo humano, después de haber ingerido alimentos contaminados (28).

Consejos que deben seguirse para prevenir las ETAs son los siguientes:

- Lavarse las manos frecuentemente empleando agua caliente y detergente, especialmente antes de comenzar a manipular los alimentos y luego de tocar alimentos crudos como carnes rojas y blancas, pescados, mariscos crudos y huevos.
- Lavar muy bien las frutas, vegetales y hortalizas con abundante agua potable.
- Lavarse bien las manos luego de usar servicios sanitarios.
- Colocar adecuadamente los productos en la heladera. Los productos lácteos deben ir en los estantes superiores, las carnes en el inferior y las frutas, vegetales y hortalizas en el compartimiento específico para estas.
- Cuidar que no existan derrames de jugos de carnes y si los hay, que no contaminen los otros productos.
- Recalentar los alimentos a su correcta temperatura (70°C). Esta temperatura destruye las bacterias responsables de ETAs.
- Comprar sólo leche, productos lácteos y jugos que se encuentren pasteurizados.

- Usar agua potable, ya sea embotellada o que haya sido tratada con cloro o algún otro desinfectante. No se debe utilizar por ningún motivo aguas del desagüe, agua negra, o que tiene basura ni para lavar alimentos ni para regar cultivos de frutas, vegetales u hortalizas.
- Implementar y llevar a cabo programas preventivos de contaminación pre-cosecha y la higiene post-cosecha en frutas, vegetales y hortalizas.
- Manejo de estiércol y control sobre el proceso de abono en los cultivos.
- Contar con pozos de agua en buenas condiciones y en constante mantenimiento (29).

3.7. Buenas Practicas de Manufactura de alimentos

Las Buenas Prácticas de Manufactura son regulaciones publicadas por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) para proveer los criterios de conformidad con el Acta Federal sobre alimentos, drogas y cosméticos (FD&C ACT), requiriendo que todos los alimentos de consumo humano estén libres de toda adulteración.

3.7.1 Vestuario

- Se debe dejar la ropa y los zapatos de calle en el vestuario.
- No utilizar ropa de calle en el trabajo, ni se debe salir con la ropa del trabajo a la calle.
- Cuidar muy bien la ropa de trabajo y revisar que las botas utilizadas se encuentren siempre limpias.
- Utilizar calzado adecuado, cofia y guantes en caso de ser necesario (30).

3.7.2 Higiene Personal

- Cuidar diariamente el aseo personal.
- Mantener las uñas cortas.
- Usar el pelo recogido bajo la cofia.
- Dejar reloj, anillos, pendientes o cualquier otro elemento que pueda tener contacto con algún producto y/o equipo.

- Lavarse las manos al ingresar al sector de trabajo, después de utilizar los servicios sanitarios y después de tocar los elementos ajenos al trabajo que se está realizando.
- Las manos deben lavarse con agua caliente y jabón desinfectante, utilizando un cepillo para uñas y secándose con toallas descartables o secadores de manos automáticos (30).

3.7.3 Estado de Salud

- Evitar el contacto con alimentos si se tiene alguna afección de la piel, heridas, resfríos, diarrea o intoxicaciones.
- En caso de tener pequeñas heridas, cubrir las mismas con vendajes y envoltura impermeable.
- Evitar toser o estornudar sobre los alimentos o equipos de trabajo.

3.7.4 Responsabilidad

- Realizar cada tarea de acuerdo a las instrucciones recibidas.
- Leer con cuidado y atención las señales y carteles indicadores.
- Mantener los utensilios de trabajo limpios.
- Arrojar los residuos en el cesto correspondiente.
- Respetar los NO del sector: NO fumar, NO beber, NO comer, NO silbar (30).

3.7.5 Instalaciones

Para facilitar las tareas de limpieza se recomienda:

- Pisos impermeables y lavables.
- Paredes claras, lisas y sin grietas.
- Rincones redondeados (30).

3.7.6 Atención con el producto

Se debe evitar la contaminación cruzada siguiendo los siguientes consejos:

- Almacenar en lugares separados al producto y a la materia prima.
- Evitar circular desde un sector sucio a un sector limpio (30).

4. JUSTIFICACION

Debido al auge de la globalización y a la falta de tiempo en las personas económicamente activas, en los últimos años se ha incrementado el consumo de alimentos en los restaurantes de comida rápida. Tomando en consideración que alimentos como las hortalizas favorecen el crecimiento de microorganismos patógenos debido a contaminación accidental de agua, suelo, o actividades humanas no higiénicas y teniendo en cuenta que los cuadros diarreicos agudos originados por enfermedades transmitidas por los alimentos se relacionan íntimamente con la disponibilidad de alimentos y agua de calidad para la población, es importante evaluar la ausencia de *E. coli* en ensaladas a base de lechuga que se adquieren en restaurantes de comida rápida del Departamento de Guatemala.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Proporcionar información en el área de tecnología en alimentos y bromatológica del Químico Farmacéutico, sobre la importancia e interpretación del análisis microbiológico de muestras alimenticias.

5.2. Objetivos Específicos

- 5.2.1. Establecer la presencia de *E. coli* en ensaladas a base de lechuga comercializada en restaurantes de comida rápida.
- 5.2.2. Determinar si existe alguna relación entre una muestra con alto contenido de coliformes totales y *E. coli* presente.
- 5.2.3. Confirmar la presencia de *E. coli* utilizando la técnica de Bactident® *E. coli*.

5. HIPOTESIS

Ninguna muestra de las ensaladas a base de lechuga comercializadas en restaurantes de comida rápida está contaminada con *E. coli*.

6. MATERIALES Y METODOS

6.2. Universo de Trabajo

Ensaladas a base de lechuga comercializadas en restaurantes de comida rápida. Se identificaron cinco empresas importantes distribuidoras de ensaladas, con un total de 73 restaurantes de comida rápida localizados en el perímetro de la ciudad capital.

7.2. Muestra

Se analizaron 42 ensaladas procedentes de diferentes restaurantes de comida rápida (una ensalada por restaurante) de la ciudad capital, escogidos al azar, según el diseño de la investigación, el cual se describe más adelante. De las 42 ensaladas se analizaron individualmente los siguientes ingredientes: lechuga, zanahoria, pepino y tomate, haciendo un total de 168 análisis.

7.3. Medios

7.3.1 Recursos Humanos:

Tesista: Br. Aracely Rodríguez De León.

Asesor: Lic. Estuardo Serrano Vives.

Co-asesor: Licda. María Luisa de López.

Personal de la sección de Microbiología del Laboratorio Industrial San Cristóbal

7.3.2. Recursos Institucionales

- Departamento de Farmacia Industrial de la Escuela de Química Farmacéutica, USAC.
- Sección de Microbiología del Laboratorio Industrial San Cristóbal.

7.3.3. Recursos Materiales:

7.3.3.1 Equipo:

- Refrigeradora
- Mechero Bunsen
- Asas de nicromo

- Autoclave
- Estufa
- Balanza semianalítica
- Motor para licuadora
- Contador Québec
- Incubadora bacteriológica

7.3.3.2 Cristalería y varios:

- Cajas de Petrí estériles.
- Erlenmeyers de 500 y 1,000 ml.
- Tubos de ensayo grandes y pequeños con tapón de rosca
- Frascos estériles con capacidad mínima de 150 ml.
- Probetas
- Pipetas serológicas de 10 ml., 5 ml., y 1 ml.
- Licuadoras pequeñas estériles
- Cuchillas para licuadora estériles.
- Gradillas para tubos grandes y pequeños
- Tijeras y pinzas estériles.
- Vernier.

7.3.3.3. Reactivos y Medios de Cultivo

- Etanol absoluto
- Agua peptonada tamponada
- Agar Bilis Rojo Violeta
- Caldo Casoy.
- Kit de Bactident® *E. coli*
- Trypticase Soya Agar
- Papa-Dextrosa-Agar
- Reactivo de Kovac's para la prueba de indol.
- Cloruro de amonio
- Formaldehído

7.3.3.4 Controles:

- Cepa ATCC de *Escherichia coli* ATCC No. 8739 (Control Positivo)
- Cepa de *Proteus vulgaris* (Control Negativo)

7.4. Procedimiento:

- 7.4.1** Todas las muestras se compararon contra los controles positivo (*Escherichia coli* ATCC No. 8739) y negativo (*Proteus vulgaris*) cultivados paralelamente bajo las mismas condiciones. Las muestras fueron trabajadas de forma aséptica en el área de Microbiología de Laboratorio Industrial San Cristóbal, utilizando un gabinete de seguridad. El área se desinfectó diariamente según los procedimientos estándares de operación de limpieza de área de microbiología (rotando diferentes antisépticos para evitar la resistencia de los microorganismos, p. ejemplo: alcohol, cloruro de amonio, formaldehído.). Se utilizó mascarilla, cofia guantes y uniforme de microbiología el cual fue previamente esterilizado en autoclave.
- 7.4.2** Se tomó 10 gramos de muestra (lechuga, zanahoria, pepino y tomate.) con ayuda de instrumentos estériles y se licuó en una base para licuadora pequeña estéril con 90 ml de agua peptonada tamponada (dilución 10:100)
- 7.4.3** De la mezcla anterior, se tomó 10 ml medidos con pipeta serológica estéril y se depositó en un tubo de ensayo estéril que contenga 5 ml de Caldo Casoy (dilución 10:15), el cual fue preparado disolviendo 30 gramos por litro y esterilizando en autoclave a 121°C y 15-20 libras de presión. La reacción final del medio da un pH de 7.3 ± 0.1 .
- 7.4.4** Se incubó por 6 horas a 37°C, para lograr un buen crecimiento bacteriano. (a).
- 7.4.5** Se agregó 1 ml. de (a) sobre la caja petri, debidamente rotulada. (b)
- 7.4.6** A (b) se agregaron 15 ml. de Agar con Bilis y Rojo Violeta (Violet Red Bile Agar) y se mezcló para uniformar su contenido. Al emplear este medio selectivo, se obtienen los mejores resultados si no se somete a esterilización en autoclave, porque los organismos que no hayan muerto con la ebullición necesaria para disolver el medio, no formarán colonias durante el período de incubación de 24 horas. Después de la ebullición para disolver el medio por completo, esté esta listo para emplearlo.
- 7.4.7** Se incubó a 37°C por 24 horas.

- 7.4.8** A las 24 horas se realizó un conteo de los coliformes totales, con ayuda de un contador Québec, informando este resultado en unidades formadoras de colonia por gramo de muestra (ufc/g.)
- 7.4.9** Se buscó y se realizó un conteo de colonias rojas, con halo de precipitación rojizo, que midieran de 1-2 mm. de diámetro.
- 7.4.10** Se removieron las colonias sospechosas de *E. coli* del medio de cultivo con ayuda de un asa de nicromo estéril o bien hisopo estéril, y se suspendió en la cubeta reactiva del kit de Bactident *E. coli*, la cual contenía 200 μ l de agua estéril.
- 7.4.11** Se colocó la tira en la suspensión. Se procedió a incubar de 30-120 minutos a 37°C y luego se evaluó con lámpara UV.
- 7.4.12** Subsecuentemente, se añadió una gota de reactivo de KOVAC's a la suspensión y se esperó que reaccionara de 1-2 minutos.
- 7.4.13** Interpretación de resultados: si la suspensión bacteriana desplegaba una luz azul fluorescente con luz UV y mostraba coloración roja después de la adición del reactivo de KOVAC's la prueba fue positiva para *E. coli*.

7.5 Control de Calidad

7.5.1 Ambientes:

Para asegurar que el ambiente de trabajo es el adecuado, se desinfectó el área de microbiología rotando los antisépticos alcohol, cloruro de amonio y formaldehído. Se limpiaron pisos, paredes y mesas de trabajo, las cuales cumplen con las exigencias de las Buenas Prácticas de Manufactura Vigentes. Una vez por semana se controló la efectividad de la desinfección exponiendo cajas con agar nutritivo y con agar papa durante 60 minutos para luego incubarlas a 37°C por 48 horas.

7.5.2 Equipo

Se efectuaron lecturas diarias en las temperaturas de la incubadora y el refrigerador para asegurar las condiciones constantes de trabajo.

7.5.3 Medios de Cultivo y Reactivos

Todas las pruebas con medios de cultivo se acompañaron de un control positivo y de un control negativo, las cuales se mantuvieron viables dentro de tubos con tapón de algodón que contenían agar nutritivo sin ningún aditivo, y se resiembran cada dos meses para mantenerlas en óptimas condiciones.

7.6. Diseño estadístico de la investigación

7.6.1. Tamaño de Muestra:

Este estudio se cataloga como de tipo descriptivo y estima la proporción de ensaladas contaminadas con *E. coli* con un intervalo de confianza del 95%. Para calcular la cantidad de ensaladas a analizar se utilizó la siguiente fórmula:

Población Finita:

$$n = \frac{N \delta^2}{\frac{(N-1)\Delta^2}{NC^2} + \delta^2} =$$

En donde:

N = Número total de restaurantes de comida rápida que distribuyen ensaladas en el perímetro de la ciudad capital. = 73.

δ^2 = Varianza = 0.25.

Δ = Límite de error en la estimación = 10% (0.10)

NC = Nivel de confianza = 1.96

Por lo tanto:

$$n = \frac{73 (0.25)}{\frac{(73-1)(0.10)^2}{(1.96)^2} + 0.25} = 41.72 \approx 42 \text{ restaurantes de comida rápida escogidos al azar. (una muestra por restaurante).}$$

A cada muestra de ensalada se le analizó por separado los siguientes ingredientes: lechuga, zanahoria, pepino y tomate, haciendo un total de 168 análisis.

7.6.2 Muestreo

Las ensaladas se compraron directamente por la tesista en cada restaurante, en su mismo empaque (bandeja) y se trabajaron preferiblemente el mismo día de la compra. Si no fue posible realizar el análisis el mismo día, las ensaladas se compraron por la noche y se guardaron en la refrigeradora a una temperatura de 5⁰C para ser analizadas por la mañana.

El análisis de datos de los resultados obtenidos se realizó en forma de porcentajes.

8. RESULTADOS

Para evaluar la presencia de *E. coli* en las ensaladas a base de lechuga vendidas en restaurantes de comida rápida se analizaron un total de 42 ensaladas, provenientes de 42 restaurantes de comida rápida de la ciudad de Guatemala. De cada ensalada se tomaron muestras de los siguientes ingredientes en la misma proporción: lechuga, pepino, zanahoria y tomate, haciendo un total de 168 muestras.

De un total de 42 ensaladas, a 7 (16.66%), se les confirmó la presencia de *E. coli*. De las 168 muestras analizadas, nueve (5.35%) fueron confirmadas como *E. coli* positivas, además se logró identificar *Klebsiella ssp* en 21 muestras (12.50%), *Enterobacter ssp* en 12 muestras (7.14%) y *Pseudomonas ssp*, 26 muestras (15.48%) (Tabla No. 4).

Tabla No. 1. Presencia de *E. coli* en el total de las ensaladas analizadas.

TOTAL DE ENSALADAS A BASE DE LECHUGA	<i>E. coli</i> POSITIVAS	PORCENTAJE	<i>E. coli</i> NEGATIVAS	PORCENTAJE
42 Ensaladas	7	16.66%	35	83.34%

Tabla No. 2. Presencia de *E. coli* en el total de muestras analizadas.

TIPO DE MUESTRA	TOTAL DE MUESTRAS	<i>E. coli</i> POSITIVAS	PORCENTAJE
Lechuga	42	0	0.00%
Pepino	42	1	2.38%
Zanahoria	42	3	7.14%
Tomate	42	5	11.9%
Total	168	9	5.35%

Tabla No.3. Comparación de resultados *E. coli* positivos entre los ingredientes analizados en las ensaladas.

TIPO DE MUESTRA	No. DE MUESTRAS <i>E. coli</i> POSITIVAS	PORCENTAJE
Lechuga	0	0.00%
Pepino	1	11.11%
Zanahoria	3	33.33%
Tomate	5	55.55%
Total	9	100.0%

En la tabla No. 3 se presentan los ingredientes *E. coli* positivos, la cual muestra que el tomate fue el ingrediente con mayor porcentaje de contaminación, y la lechuga no presentó contaminación con *E. coli*.

Tabla No.4. Presencia de otros microorganismos encontrados en las muestras analizadas.

Microorganismo	No. de Muestras Contaminadas	Porcentaje
<i>Klebsiella ssp.</i>	21 muestras	12.50%
<i>Enterobacter ssp.</i>	12 muestras	7.14%
<i>Pseudomona ssp.</i>	26 muestras	15.48%

De los ingredientes analizados, hubo muestras de lechuga, pepino y zanahoria con recuento de coliformes elevados (ver tablas No. 1 a la 3 de anexos), los cuales se encuentran por encima del límite permitido por la FDA para este tipo de alimentos, que es de 400 ufc/gramo. El tomate presentó menor recuento de coliformes pero fue el ingrediente que mas contaminación mostró con *E. coli* (ver tabla No. 4 de anexos) (36).

Como se puede observar en las tablas No. 1 a la 4 de anexos, para el seguimiento microbiológico de las muestras se realizó el recuento de coliformes, y la identificación y cuantificación de *E. coli* para relacionar dichos resultados obtenidos, con el objetivo de establecer si las muestras con recuento alto de coliformes estarían mayormente predisuestas a presentar *E. coli* como indicador de contaminación fecal. En este estudio no se encontró ninguna relación entre una muestra con alto contenido de coliformes y mayor predisposición a presentar *E. coli*.

Se observó que la técnica de Bactident *E. coli* para confirmar la presencia de *E. coli* es una técnica rápida, confiable y sencilla de gran utilidad en un laboratorio de microbiología.

9. DISCUSION DE RESULTADOS

Como se indicó con anterioridad, de las 168 muestras cultivadas sobre el Agar Bilis Rojo Violeta (VRB), nueve resultaron positivas para la prueba de *E. coli*, que corresponde a siete ensaladas contaminadas de un total de 42 ensaladas analizadas.

Existe la creencia popular de que la lechuga es la fuente de mayor contaminación en una ensalada, sin embargo en este estudio no se logró identificar ninguna muestra contaminada con *E. coli*, pero sí se obtuvieron muestras de lechuga con recuentos elevados de coliformes. El grupo de bacterias coliformes ha sido siempre el principal indicador de calidad de aguas y alimentos; el número de coliformes en una muestra se usa como criterio de contaminación y por lo tanto, de calidad sanitaria de la misma. Interesa la determinación de coliformes fecales que representan la fracción de coliformes presentes sobre todo en intestinos que pueden proporcionar importante información sobre la fuente y el tipo de contaminación presente. Un alimento con un alto contenido de coliformes puede provocar en la población, sobre todo en la más susceptible (niños, embarazadas y adultos mayores) enfermedades gastrointestinales, que podrían incluso causar la muerte (31).

Algunas muestras de zanahoria y pepino mostraron también un recuento elevado de coliformes, y se identificó en una muestra de pepino y tres muestras de zanahoria *E. coli*. Cuando este microorganismo posee rasgos colonizadores, enterotóxicos, citotóxicos o de virulencia invasiva, se convierte en una de las principales causas de diarrea acuosa, inflamatoria o hemática, en ocasiones asociada a la aparición del síndrome hemolítico-urémico. Si las barreras anatómicas están alteradas, puede extenderse hacia las estructuras adyacentes o invadir el torrente circulatorio. *E. coli* es una causa importante de bacteremia (32).

El tomate fue el ingrediente que obtuvo los recuentos de coliformes más bajos, sin embargo fue el que tuvo una mayor contaminación con *E. coli*, según se puede observar en las tablas No. 2 y 3.

En este estudio no se encontró ninguna relación entre una muestra con alto contenido de coliformes y mayor predisposición a presentar *E. coli*, ya que la lechuga presentó recuentos de coliformes elevados y ninguna muestra se identificó como *E. coli* positiva, y por el contrario el tomate, como se mencionó anteriormente, presentó recuentos de coliformes bajos y si se detectaron cinco muestras con *E. coli*. La mayoría de muestras con recuento de coliformes elevados no necesariamente presenta *E. coli*, sino que otro tipo de coliformes como *Klebsiella ssp.* (21 muestras) y *Enterobacter ssp.* (12 muestras). Este tipo de contaminación en los alimentos, al igual que con la *E. coli*, está asociada a cuadros de diarrea acuosa peligrosa sobre todo en población susceptible (31).

El hábitat normal de los coliformes fecales (*Escherichia*, *Enterobacter* y *Klebsiella*), es el intestino del hombre y los animales de sangre caliente. La Organización Panamericana de la Salud (OPS), señala entre las fuentes comunes de contaminación por *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Escherichia* a los alimentos, sobre todo hortalizas y verduras que hayan sido regadas con aguas contaminadas y aun cuando la contaminación original puede ser leve, las bacterias se multiplican hasta alcanzar niveles infecciosos durante el almacenamiento (18).

Algunos estudios realizados en diferentes países indican que la utilización de aguas no tratadas para la irrigación de hortalizas, es la práctica que más influye en la reducción de la calidad sanitaria de estos alimentos, debido a la susceptibilidad a presentar recuentos de coliformes elevados, o bien presencia de *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, o *Klebsiella*. Sin embargo, también se sugiere que el uso de aguas sin tratamiento no es el único factor responsable de la contaminación de las hortalizas, frutas y verdura (33).

Se ha demostrado que la frecuente contaminación del suelo por repetidas aplicaciones de agua contaminada o heces de animales, contrarresta los factores ambientales adversos y permite que los agentes patógenos permanezcan viables en la tierra por dos meses o más, especialmente es áreas húmedas y sombreadas (7).

Por otro lado, es necesario analizar las prácticas de manejo poscosecha, ya que diversos estudios señalan que los índices de contaminación fecal de los productos hortícolas son mayores en las áreas de mercado que en las de cultivo, sugiriendo que solo el 48% de la *E. coli* presente en estos alimentos, proviene de los coliformes fecales del agua de irrigación. Como se detalló en los resultados y como puede observarse en las tablas No. 1 a la 4 de anexos, los niveles de coliformes en algunas muestras sobrepasan los límites permitidos por la FDA para este tipo de alimentos. Es por eso la importancia que se le da a la desinfección de las frutas y hortalizas en el momento de la preparación. Debe ser importante también la correcta manipulación de los alimentos, asegurando que el personal se encuentre capacitado para realizar sus funciones siguiendo las normas de Buenas Prácticas de Manufactura, que incluyen cuidar diariamente el aseo personal, buen lavado de manos y uñas, pelo corto, buena limpieza de áreas y utensilios, sanitización de equipos y alimentos, etc. (34).

Se logró identificar contaminación con *Pseudomona ssp.* en 26 muestras. Aunque la *Pseudomona ssp.* no pertenece al grupo de los coliformes ni se encontraba en el medio ideal para su crecimiento, sí se pudo observar que un buen número de muestras (26 de 168) mostró contaminación con dicha bacteria. Para la identificación de esta bacteria primero se realizó el test de oxidasa a las colonias sospechosas. Si el test daba positivo, se procedía a aislar la bacteria en Agar F para *Pseudomonas* (base). Las *Pseudomonas* se encuentran principalmente en suelos y aguas contaminadas, por lo que es común encontrarla también en alimentos que hayan sido regados o lavados con agua contaminada por esta bacteria (7).

El tipo de contaminación que se encontró en las ensaladas se da cuando los procedimientos de sanitización no son efectivos, fallando tanto en la aplicación como en la dosificación de los químicos utilizados para desinfectar el producto. A esto se le agrega que si la carga bacteriana de la materia prima es demasiado grande, el procedimiento de sanitización no llega a ser suficiente para eliminar por completo la población microbiana (35).

Un buen desinfectante para alimentos debe poder destruir o inactivar, dentro de un tiempo prudente, las clases y cantidad de microorganismos patógenos presentes. Además el análisis para determinar la concentración de desinfectante en el agua debe ser preciso, sencillo y rápido (apropiado para ser aplicado en el campo, restaurante o laboratorio). También debe poder mantener una concentración residual adecuada en el sistema de distribución de agua para evitar la recontaminación o que los microorganismos se reproduzcan y por último debe de ser seguro y de fácil manipulación y aplicación. El cuadro No. 1 de anexos detalla la eficacia de los principales desinfectantes utilizados para alimentos (35).

La hipótesis de esta investigación no concuerda con los resultados obtenidos, ya que se esperaba que ninguna muestra analizada mostrara contaminación con *E. coli*. Desde el punto de vista de la salud es una gran desventaja haber encontrado contaminación con *E. coli*, ya que aumenta la posibilidad de encontrar *E. coli* patógena causante de infecciones graves en el hombre (4).

10. CONCLUSIONES

- 10.1 De 42 ensaladas a base de lechuga analizadas, en el 16.66% se identificó *E. coli*.
- 10.2 De los cuatro ingredientes analizados individualmente para cada ensalada, el tomate fue el que presentó la más alta contaminación con *E. coli* (11.9%) y la lechuga no presentó contaminación con dicha bacteria (0.0%)
- 10.3 La lechuga, el pepino y la zanahoria fueron los ingredientes que presentaron mayor cantidad de muestras con recuentos de coliformes mayores que los permitidos por la FDA (de 40 a 96,000 ufc/gramo)
- 10.4 El recuento elevado de coliformes en las muestras no guardó relación con la presencia de *E. coli* en el presente estudio.
- 10.5 Coliformes distintos a *E. coli* como *Klebsiella ssp.* y *Enterobacter ssp.* fueron identificados en un total de 33 de las muestras de pepino, lechuga, zanahoria y tomate analizadas.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Los restaurantes de comida rápida deben de implementar y aplicar en todo momento las Buenas Prácticas de Manufactura, para lo cual deben de capacitar constantemente a su personal.
- 11.2 Se recomienda realizar más investigaciones para evaluar el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura en restaurantes.
- 11.3 Es recomendable llevar a cabo estudios que investiguen la calidad microbiológica del agua que es utilizada para el riego de verduras, frutas y hortalizas, ya que la contaminación puede provenir de la misma.
- 11.4 Se recomienda desinfectar los alimentos que se consumen sin cocer con una solución de hipoclorito de sodio al 6% por un mínimo de 15 minutos.
- 11.5 Se recomienda refrigerar los alimentos previamente preparados y evitar dejarlos a temperatura ambiente, recalentar adecuadamente los mismos y evitar la contaminación cruzada entre alimentos crudos y cocidos. La manipulación de los alimentos debe llevarse a cabo sólo por personas sanas y con las manos limpias.
- 11.6 Utilizar siempre cepas ATCC como controles de calidad, para asegurar resultados confiables en las investigaciones.
- 11.7 Recomendar a los restaurantes de comida rápida, realizar monitoreos sistemáticos y periódicos de la calidad microbiológica de los alimentos que sirven en los mismos, en base a este estudio.

12. REFERENCIAS

1. World Health Organization. Food and Nutrition Programme, Food Safety unit. Contaminated food: a major cause of diarrhoeae and associated malnutrition among infants and young children. Washington: WHO, 1993, 3:1-4.
2. Organización Mundial de la Salud. Foro Mundial de la Salud, revista internacional de desarrollo sanitario. U.S.A.: OMS; 1991; 12:35-40.
3. Nelly Beatriz Castañeda Rosales. Identificación de Escherichia coli O 157:H7 en verduras y frutas congeladas para exportación. 2000; 5:7.
4. FENA P. Escherichia coli serotype O157:H7. Novel vehicles of infection and emergente of phenotypic variants. Synopsis, US Food and Drug Administration, US FDA. Washington, DC; USA. Doc. Tec. No. 1, 1996, 1:1-9.
5. Miller J. Food Safety. Segunda edición. USA:Eagan, 1992. 107:140.
6. Cruz JR. Simposio sobre enfermedades diarreicas, aspectos microbiológicos de las enfermedades diarreicas. RevColMedGuat., 1986. 37:14-22.
7. Geldrieck E & R. Fecal contamination of fruits and vegetables during cultivation and processing for market; U.S.A., 34:184-195.
8. Shuval H, A. Adien, B. Faltal. Wastewater irrigation in developing countries. World Bank Technical Paper Number 51. Washington, D.C., U.S.A., 322 pag.
9. Feahmen R., D. Bradley, H. Garelick & D Mara. Sanitation disease: health aspects of excreta and wastewater management. Nueva York, USA, 1983. 501 pag.
10. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA). Guía para reducir al mínimo el riesgo microbiológico en los alimentos, en el caso de frutas y vegetales frescos, 1998, 59 pag.
11. <http://www.mercanet.c.n.p.go.cr/calidad/normas>
12. Abdul-Raouf, L.R, Beuchat and M.S. Amman. Survival and growth of *Escherichia coli* en salad vegetables. Appl.Environmicrobiol, 1993. 59:1999-2006.
13. Ackman, D; Marks, S. Swimming-associated haemorrhagic colitis due to Escherichia coli O157:H7 infection: evidence of prolonged contamination of a fresh water lake. Epidemiology and infection, 1997, 119:1-8.

14. Brinton M, Miller K, Litsky W. Industrial Microbiology. Estados Unidos de América, Harrison, 1976, 411:296-298.
15. DIFCO. Manual de Bacteriología, traducción ampliada al español de la novena edición del inglés. 1990. 60:62.
16. MERCK. Manual de preparados para Microbiología, 1992, 24:119-120.
17. Dalia Estela Menchú Rosal. Evaluación de la calidad microbiológica de los alimentos vendidos en la vía pública, en áreas de venta callejera del Departamento de Guatemala, consideradas como de riesgo por el Departamento de Registro y Control de Alimentos del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala. 1996, 3:10.
18. Organización Panamericana de la Salud, División de Control de Enfermedades Transmisibles, Programa de Salud Pública Veterinaria. Guía técnica para el estudio "Evaluación del riesgo microbiológico de los alimentos vendidos en la vía pública en ciudades de América Latina". Washington: OPS; 1994.
19. Vigilancia Epidemiológica de ETA: actividades regionales. Boil Sant Panam, 1991; 11:86-91.
20. Mossel D, Moreno B. Microbiología de los alimentos. Zaragoza, España: Acribia, 1987. 351:10-28.
21. Jawetz E, et. al. Microbiología Médica. 13 ed. México: El Manual Moderno, 1990. 617 p.
22. Dr. Gastón Duffau T. Síndrome Diarreico Agudo y prolongado en niños, trastornos nutricionales asociados. Universidad de Chile, Facultad de Medicina, Departamento de Pediatría y Cirugía Infantil, Campus Norte; 2001.
23. <http://www.lafacu.com/apuntes/medicina/diarre-agu/default.htm>
24. Blanco J, Blanco M, Alonso MP, Blanco JE, Garabal JI. Serogroups of *E. coli* strains producing cytotoxic necrotizing factors. Fems Microbiol Lett, 1994. 96:155-160.
25. Abram S. Beneneson. American Public Health Association. Control of Communicable of Diseases Manual. 16ava. Edición, 1995.
26. Siegler RL. Hemolytic Uremic Syndrome in Children. Curr Opin Pediatr, 1995. 7(2): 159-163.
27. CDC. Preventing Foodborne Ines: *Escherichia coli* O157:H7. 1996.

28. OPS/OMS. La enfermedad, sus características epidemiológicas, así como las medidas de prevención y control de casos epidémicos. 1999.
29. Artículo de la División para el Estudio de las Epidemias por Enfermedades Infecciosas y su Vigilancia (IDEAS) del Departamento de Salud de Texas.
30. Dirección de Promoción de la Calidad Alimentaria. "Buenas Prácticas de Manufactura de Alimentos". Buenos Aires, Argentina, 2000.
31. Álvarez Morales, J.R. Calidad del agua para riego. AGUA. 1996. 12:8-9.
32. El Manual Merck de Diagnóstico y Terapéutica. 9ª. Edición, Océano/Centrum, 1994.
33. Bryan F. Diseases transmitted by food contaminated by wastewater. J. Food Prot., 1977. 4D:45-56.
34. Castro M.L. & Flores A. Evaluación de riesgos para la salud por el uso de las aguas residuales en agricultura: aspectos microbiológicos. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria (CEPIS). Lima, Perú, 1999. 32 p.
35. FDA. Guía para reducir al mínimo el riesgo microbiano en los alimentos, en caso de frutas y hortalizas. Curso regional sobre aseguramiento de calidad e inocuidad de frutas y vegetales. Limón, Costa Rica. 1999, 59 p.
36. Bureau of Foods. Bacteriological Analytical Manual. Food And Drug Administration. Published by Association of Oficial Analytical Chemists. Arlington, U.S.A., 1998.

ANEXOS

**FICHA UTILIZADA PARA LA RECOLECCION DE RESULTADOS POR
RESTAURANTE.**

Restaurante No. ____	Lechuga		Zanahoria		Pepino		Tomate	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Colonias sospechosas de <i>E. coli</i> en el cultivo de Agar con bilis y rojo violeta								
Número de colonias de Coliformes Totales								
Número de colonias sospechosas de <i>E. coli</i>								
Resultado de determinación de <i>E. coli</i> con la prueba de Bactident <i>E. coli</i> .								
Fecha de Muestreo y hora:				Fecha de Análisis y hora:				

Cuadro No. 1. Eficacia de los principales desinfectantes utilizados en la industria de alimentos.

Microorganismos	Cloro	Ozono	Yodo	Hipoclorito	Cloraminas
Bacterias	Muy bueno	Excelente	Muy Bueno	Muy Bueno	Escasa
Virus	Bueno	Excelente	Bueno	Regular	Muy escasa
Protozoarios	Regular	Muy Bueno	Bueno	Regular	Muy escasa
Helmintos	Regular	Excelente	Poca información	Regular	Poca información

Estos datos se aplican siempre y cuando los desinfectantes sean aplicados correctamente y en dosis adecuadas, según la carga de contaminación de la materia prima (35).

Tabla No. 1. Resultados microbiológicos correspondientes a las muestras de lechuga de ensaladas preparadas.

No. de Muestra	Descripción	Recuento de Coliformes (UFC/gramo)	Presencia de <i>E. coli</i>	UFC/gramo <i>E. coli</i>
1	Lechuga, Restaurante No. 1	Menor de 3	Negativo	0
2	Lechuga, Restaurante No. 2	Menor de 3	Negativo	0
3	Lechuga, Restaurante No. 3	Menor de 3	Negativo	0
4	Lechuga, Restaurante No. 4	280	Negativo	0
5	Lechuga, Restaurante No. 5	Menor de 3	Negativo	0
6	Lechuga, Restaurante No. 6	40	Negativo	0
7	Lechuga, Restaurante No. 7	Menor de 3	Negativo	0
8	Lechuga, Restaurante No. 8	Menor de 3	Negativo	0
9	Lechuga, Restaurante No. 9	40	Negativo	0
10	Lechuga, Restaurante No. 10	400	Negativo	0
11	Lechuga, Restaurante No. 11	Menor de 3	Negativo	0
12	Lechuga, Restaurante No. 12	5,200	Negativo	0
13	Lechuga, Restaurante No. 13	600	Negativo	0
14	Lechuga, Restaurante No. 14	2,600	Negativo	0

15	Lechuga, Restaurante No. 15	2,400	Negativo	0
16	Lechuga, Restaurante No. 16	Menor de 3	Negativo	0
17	Lechuga, Restaurante No. 17	480	Negativo	0
18	Lechuga, Restaurante No. 18	120	Negativo	0
19	Lechuga, Restaurante No. 19	Menor de 3	Negativo	0
20	Lechuga, Restaurante No. 20	Menor de 3	Negativo	0
21	Lechuga, Restaurante No. 21	Menor de 3	Negativo	0
22	Lechuga, Restaurante No. 22	Menor de 3	Negativo	0
23	Lechuga, Restaurante No. 23	400	Negativo	0
24	Lechuga, Restaurante No. 24	1,000	Negativo	0
25	Lechuga, Restaurante No. 25	2,240	Negativo	0
26	Lechuga, Restaurante No. 26	360	Negativo	0
27	Lechuga, Restaurante No. 27	48,640	Negativo	0
28	Lechuga, Restaurante No. 28	1,200	Negativo	0
29	Lechuga, Restaurante No. 29	2,600	Negativo	0
30	Lechuga, Restaurante No. 30	Menor de 3	Negativo	0
31	Lechuga,	41,600	Negativo	0

	Restaurante No. 31			
32	Lechuga, Restaurante No. 32	96,000	Negativo	0
33	Lechuga, Restaurante No. 33	5,600	Negativo	0
34	Lechuga, Restaurante No. 34	240	Negativo	0
35	Lechuga, Restaurante No. 35	2,800	Negativo	0
36	Lechuga, Restaurante No. 36	280	Negativo	0
37	Lechuga, Restaurante No. 37	200	Negativo	0
38	Lechuga, Restaurante No. 38	320	Negativo	0
39	Lechuga, Restaurante No. 39	400	Negativo	0
40	Lechuga, Restaurante No. 40	560	Negativo	0
41	Lechuga, Restaurante No. 41	1,000	Negativo	0
42	Lechuga, Restaurante No. 42	720	Negativo	0

Tabla No. 2. Resultados microbiológicos correspondientes a las muestras de pepino de ensaladas preparadas.

No. de Muestra	Descripción	Recuento de Coliformes (UFC/gramo)	Presencia de <i>E. coli</i>	UFC/gramo <i>E. coli</i>
1	Pepino, Restaurante No. 1	Menor de 3	Negativo	0
2	Pepino, Restaurante No. 2	Menor de 3	Negativo	0
3	Pepino, Restaurante No. 3	Menor de 3	Negativo	0
4	Pepino, Restaurante No. 4	280	Negativo	0
5	Pepino, Restaurante No. 5	Menor de 3	Negativo	0
6	Pepino, Restaurante No. 6	1,280	Negativo	0
7	Pepino, Restaurante No. 7	Menor de 3	Negativo	0
8	Pepino, Restaurante No. 8	Menor de 3	Negativo	0
9	Pepino, Restaurante No. 9	6,000	Negativo	0
10	Pepino, Restaurante No. 10	7,400	Negativo	0
11	Pepino, Restaurante No. 11	Menor de 3	Negativo	0
12	Pepino, Restaurante No. 12	2,520	Negativo	0
13	Pepino, Restaurante No. 13	280	Negativo	0
14	Pepino, Restaurante No. 14	600	Negativo	0

15	Pepino, Restaurante No. 15	Menor de 3	Negativo	0
16	Pepino, Restaurante No. 16	1,000	Negativo	0
17	Pepino, Restaurante No. 17	Menor de 3	Negativo	0
18	Pepino, Restaurante No. 18	41,600	Negativo	0
19	Pepino, Restaurante No. 19	Menor de 3	Negativo	0
20	Pepino, Restaurante No. 20	40	Negativo	0
21	Pepino, Restaurante No. 21	Menor de 3	Negativo	0
22	Pepino, Restaurante No. 22	Menor de 3	Negativo	0
23	Pepino, Restaurante No. 23	360	Negativo	0
24	Pepino, Restaurante No. 24	920	Negativo	0
25	Pepino, Restaurante No. 25	3,000	Negativo	0
26	Pepino, Restaurante No. 26	320	Negativo	0
27	Pepino, Restaurante No. 27	3,440	Positivo	40
28	Pepino, Restaurante No. 28	6,400	Negativo	0
29	Pepino, Restaurante No. 29	1,200	Negativo	0
30	Pepino, Restaurante No. 30	Menor de 3	Negativo	0
31	Pepino,	35,200	Negativo	0

	Restaurante No. 31			
32	Pepino, Restaurante No. 32	96,000	Negativo	0
33	Pepino, Restaurante No. 33	96,000	Negativo	0
34	Pepino, Restaurante No. 34	200	Negativo	0
35	Pepino, Restaurante No. 35	2,400	Negativo	0
36	Pepino, Restaurante No. 36	200	Negativo	0
37	Pepino, Restaurante No. 37	160	Negativo	0
38	Pepino, Restaurante No. 38	Menor de 3	Negativo	0
39	Pepino, Restaurante No. 39	440	Negativo	0
40	Pepino, Restaurante No. 40	480	Negativo	0
41	Pepino, Restaurante No. 41	840	Negativo	0
42	Pepino, Restaurante No. 42	400	Negativo	0

Tabla No. 3. Resultados microbiológicos correspondientes a las muestras de zanahoria de ensaladas preparadas.

No. de Muestra	Descripción	Recuento de Coliformes (UFC/gramo)	Presencia de <i>E. coli</i>	UFC/gramo <i>E. coli</i>
1	Zanahoria, Restaurante No. 1	Menor de 3	Negativo	0
2	Zanahoria, Restaurante No. 2	Menor de 3	Negativo	0
3	Zanahoria, Restaurante No. 3	Menor de 3	Negativo	0
4	Zanahoria, Restaurante No. 4	40	Negativo	0
5	Zanahoria, Restaurante No. 5	360	Negativo	0
6	Zanahoria, Restaurante No. 6	80	Negativo	0
7	Zanahoria, Restaurante No. 7	Menor de 3	Negativo	0
8	Zanahoria, Restaurante No. 8	Menor de 3	Negativo	0
9	Zanahoria, Restaurante No. 9	Menor de 3	Negativo	0
10	Zanahoria, Restaurante No. 10	5,400	Positiva	600
11	Zanahoria, Restaurante No. 11	Menor de 3	Negativo	0
12	Zanahoria, Restaurante No. 12	9,280	Negativo	0
13	Zanahoria, Restaurante No. 13	4,160	Negativo	0
14	Zanahoria, Restaurante No. 14	8,400	Negativo	0

15	Zanahoria, Restaurante No. 15	Menor de 3	Negativo	0
16	Zanahoria, Restaurante No. 16	80	Negativo	0
17	Zanahoria, Restaurante No. 17	600	Positivo	480
18	Zanahoria, Restaurante No. 18	2,600	Negativo	0
19	Zanahoria, Restaurante No. 19	Menor de 3	Negativo	0
20	Zanahoria, Restaurante No. 20	40	Negativo	0
21	Zanahoria, Restaurante No. 21	Menor de 3	Negativo	0
22	Zanahoria, Restaurante No. 22	Menor de 3	Negativo	0
23	Zanahoria, Restaurante No. 23	320	Negativo	0
24	Zanahoria, Restaurante No. 24	3,000	Negativo	0
25	Zanahoria, Restaurante No. 25	440	Negativo	0
26	Zanahoria, Restaurante No. 26	400	Negativo	0
27	Zanahoria, Restaurante No. 27	160	Negativo	0
28	Zanahoria, Restaurante No. 28	3,000	Positivo	200
29	Zanahoria, Restaurante No. 29	52,480	Negativo	0
30	Zanahoria, Restaurante No. 30	Menor de 3	Negativo	0
31	Zanahoria,	3,000	Negativo	0

	Restaurante No. 31			
32	Zanahoria, Restaurante No. 32	29,440	Negativo	0
33	Zanahoria, Restaurante No. 33	1,400	Negativo	0
34	Zanahoria, Restaurante No. 34	Menor de 3	Negativo	0
35	Zanahoria, Restaurante No. 35	57,600	Negativo	0
36	Zanahoria, Restaurante No. 36	280	Negativo	0
37	Zanahoria, Restaurante No. 37	Menor de 3	Negativo	0
38	Zanahoria, Restaurante No. 38	Menor de 3	Negativo	0
39	Zanahoria, Restaurante No. 39	80	Negativo	0
40	Zanahoria, Restaurante No. 40	400	Negativo	0
41	Zanahoria, Restaurante No. 41	720	Negativo	0
42	Zanahoria, Restaurante No. 42	480	Negativo	0

Tabla No. 4. Resultados microbiológicos correspondientes a las muestras de tomate de ensaladas preparadas.

No. de Muestra	Descripción	Recuento de Coliformes (UFC/gramo)	Presencia de <i>E. coli</i>	UFC/gramo <i>E. coli</i>
1	Tomate, Restaurante No. 1	Menor de 3	Negativo	0
2	Tomate, Restaurante No. 2	Menor de 3	Negativo	0
3	Tomate, Restaurante No. 3	Menor de 3	Negativo	0
4	Tomate, Restaurante No. 4	Menor de 3	Negativo	0
5	Tomate, Restaurante No. 5	40	Negativo	0
6	Tomate, Restaurante No. 6	240	Negativo	0
7	Tomate, Restaurante No. 7	Menor de 3	Negativo	0
8	Tomate, Restaurante No. 8	40	Negativo	0
9	Tomate, Restaurante No. 9	120	Negativo	0
10	Tomate, Restaurante No. 10	600	Positiva	80
11	Tomate, Restaurante No. 11	Menor de 3	Negativo	0
12	Tomate, Restaurante No. 12	40	Positivo	40
13	Tomate, Restaurante No. 13	560	Positiva	280
14	Tomate, Restaurante No. 14	3,400	Negativo	0

15	Tomate, Restaurante No. 15	Menor de 3	Negativo	0
16	Tomate, Restaurante No. 16	Menor de 3	Negativo	0
17	Tomate, Restaurante No. 17	Menor de 3	Negativo	0
18	Tomate, Restaurante No. 18	Menor de 3	Negativo	0
19	Tomate, Restaurante No. 19	Menor de 3	Negativo	0
20	Tomate, Restaurante No. 20	Menor de 3	Negativo	0
21	Tomate, Restaurante No. 21	Menor de 3	Negativo	0
22	Tomate, Restaurante No. 22	80	Negativo	0
23	Tomate, Restaurante No. 23	520	Negativo	0
24	Tomate, Restaurante No. 24	1,320	Positiva	200
25	Tomate, Restaurante No. 25	2,600	Negativo	0
26	Tomate, Restaurante No. 26	560	Negativo	0
27	Tomate, Restaurante No. 27	2,080	Negativo	0
28	Tomate, Restaurante No. 28	1,920	Positivo	600
29	Tomate, Restaurante No. 29	15,360	Negativo	0
30	Tomate, Restaurante No. 30	Menor de 3	Negativo	0
31	Tomate,	1,920	Negativo	0

	Restaurante No. 31			
32	Tomate, Restaurante No. 32	28,800	Negativo	0
33	Tomate, Restaurante No. 33	3,000	Negativo	0
34	Tomate, Restaurante No. 34	Menor de 3	Negativo	0
35	Tomate, Restaurante No. 35	Menor de 3	Negativo	0
36	Tomate, Restaurante No. 36	40	Negativo	0
37	Tomate, Restaurante No. 37	Menor de 3	Negativo	0
38	Tomate, Restaurante No. 38	Menor de 3	Negativo	0
39	Tomate, Restaurante No. 39	Menor de 3	Negativo	0
40	Tomate, Restaurante No. 40	1,000	Negativo	0
41	Tomate, Restaurante No. 41	1,200	Negativo	0
42	Tomate, Restaurante No. 42	240	Negativo	0