



## **DEPARTAMENTO DE POSGRADOS**

**“Determinar la presencia de enterobacterias en pollo no refrigerado, que se expende en el Mercado 27 de Febrero de la ciudad de Cuenca”**

**TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MAGÍSTER EN  
GESTIÓN DE LA CALIDAD Y SEGURIDAD ALIMENTARIA**

**AUTOR: José Lino Reinoso Coronel**

**DIRECTORA: MSc. María Fernanda Rosales Medina.**

**CUENCA – ECUADOR**

**2016**

## **DEDICATORIA**

Dedico el presente trabajo a mi esposa Betty, quien ha sido mi soporte durante todos los días que compartimos en familia; a mis hijos Steve José y Lina Isabella, por haberme cedido gran parte del tiempo que debería dedicar a ellos.

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, por brindarme la vida y fortaleza para seguir adelante.

A la Universidad del Azuay, en todos sus Directivos, a los profesionales de los laboratorios de microbiología y, a todos los Docentes de la Maestría. Muy en especial a la MSc. María Fernanda Rosales Medina, por haber sido mi guía en cada paso, durante el desarrollo de la presente tesis Investigativa.

## RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo, el determinar la presencia de enterobacterias en pollo no refrigerado, que se expende en el mercado 27 de Febrero de la ciudad de Cuenca. La metodología que se utilizó, consistió en tomar 60 muestras de pollo en dicho mercado; con las que se trabajó en los laboratorios de la Universidad del Azuay, con pruebas bioquímicas, para lo que se utilizó el kit Microgen GN-ID A + B.

Luego de las pruebas bioquímicas, se obtuvo como resultado que, todas las muestras se encuentran contaminadas con algún tipo de bacteria, perteneciente a la familia de las enterobacterias.

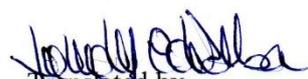
*Escherichia coli*, representa el 67%; seguida de *Escherichia coli inactiva*, con el 13%; *Serratia liquefaciens*, con el 7%; *Burkholdería pseudomallei*, con el 5%; *Aeromona hidróphila*, *Salmonella* serotipo *choleraesuis* y *Citrobacter braakii* con el 2%; y finalmente, *Salmonella grupo II* y *Serratia odorífera* con el 1%.

**Palabras clave:** *Enterobacterias, Escherichia coli, Seguridad, Pollo, Mercado.*

## ABSTRACT

This paper aims to determine the occurrence of *Enterobacteriaceae* in raw chicken meat sold at the 27 de Febrero market in the city of Cuenca. The methodology used consisted of collecting 60 samples of chicken meat in the market; with which we worked in the laboratories of Universidad del Azuay using biochemical tests such as the Microgen GN-ID A + B kit. After biochemical tests are applied, the results evidenced that all samples are contaminated with some type of bacteria belonging to the *Enterobacteriaceae* family. *Escherichia coli* represents 67%; followed by inactive *Escherichia coli* 13%; *Serratia liquefaciens* 7%; *Burkholderia pseudomallei* 5%; *Aeromonas hydrophila* serotype choleraesuis *Salmonella* and *Citrobacter braakii* 2%; and finally, *Salmonella* group II and *Serratia odoriferous* 1%.

**Keywords:** *Enterobacteriaceae*, *Escherichia Coli*, Security, Chicken Meat, Market.



Translated by,  
Lic. Lourdes Crespo

## INDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTO .....	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
INDICE DE CONTENIDO .....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	vii
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVO GENERAL.....	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
CAPITULO I.....	9
MATERIALES Y METODOS.....	9
1.1. MUESTREO: .....	9
1.2. Metodología de Análisis.....	9
1.2.1 Aislamiento de Enterobacterias.....	9
1.2.1.1. Agar BPLS (Agar-Verde brillante-Rojo de fenol- lactosa - sacarosa).....	9
1.2.1.2. Agar VRB (Agar-Violeta cristal - Rojo neutro- bilis) .....	10
1.3. Pruebas bioquímicas .....	11
1.4. Fundamento técnico de microgen gn id.....	12
CAPITULO II.....	14
RESULTADOS. ....	14
CAPITULO III.....	17
DISCUSIÓN.....	17
CONCLUSIONES.....	20
RECOMENDACIONES.....	21
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
ANEXOS .....	27

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Miembros clínicamente importantes de la familia enterobacteriaceae comúnmente causantes de infecciones ( Tärnberg María 2012).....	3
Tabla 2. Resumen de resultados obtenidos en la identificación de enterobacterias en pollo no refrigerado que vende en el mercado 27 de Febrero de Cuenca, con base al método Microgen GN-ID A+B, obtenidos en el software MID. ....	14
Tabla 3. Frecuencia de enterobacterias identificadas con el uso del kit Microgen gna. A+B.....	16

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Figura 1. Diagrama para análisis de enterobacterias en pollo no refrigerado del mercado 27 de Febrero. ....	10
Figura 2. Frecuencia porcentual de enterobacterias identificadas con el uso del kit Microgen gna. A+B .....	16

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Producción de pollos broiler en Ecuador (Fuente: Conave) .....	27
Anexo 2. Sistema de transporte de pollos faenados a los mercados de Cuenca y manipulación al interior del mercado 27 de Febrero. ....	28
Anexo 3 Casos de intoxicación alimentaria hasta el año 2014 para la Provincia del Azuay. (Fuente. MSPE 2015) .....	29
Anexo 4. Proceso desde la adquisición de las muestras hasta la identificación de las enterobacterias. ....	31
Anexo 5. Pruebas bioquímicas con el uso del kit Microgen GN-ID A+B.....	34
Anexo 6. Fundamento del sistema Microgen GN-ID.....	39

Reinoso Coronel José Lino

Trabajo de graduación

MSc. María Fernanda Rosales Medina

Noviembre del 2015

**“Determinar la presencia de enterobacterias en pollo no refrigerado, que se expende en el Mercado 27 de Febrero de la ciudad de Cuenca”**

## **INTRODUCCIÓN**

Ecuador es gran consumidor de carne en general, así lo publicó la revista Lideres el 15 de marzo del 2015: “Ecuador tiene la suficiente cantidad de carne para satisfacer el consumo de sus habitantes. Cada año se procesan alrededor de 220.000 toneladas métricas, que se obtienen del millón de reses faenadas en camales formales.

Seis provincias de la costa concentran la mayor cantidad de población de ganado de carne. Manabí lidera el top de la producción; el 40% del total de sus reses va para el procesamiento de carne. Esta provincia junto con Loja, Pichincha, Azuay, Chimborazo, Tungurahua, Cotopaxi y Carchi, son las que más consumen carne.

En lo relacionado al consumo de pollo en los hogares ecuatorianos, se ha quintuplicado en los últimos 25 años, según la Corporación Nacional de Avicultores del Ecuador (conave); ésta sostiene que, mientras en 1990 cada persona consumía 7 kg al año, en el 2013 este indicador ya se ubicó en 35 kg al año.

Así mismo, conave señala el crecimiento de la producción de pollo en toneladas métricas para los años 2010 al 2013: 467.419 tm. para el 2010; 489.730 tm. para el 2011; 495.447 tm. para el 2012; 510.310 tm. para el 2013. (Anexo 1). No se cuenta con datos del 2015, pero se puede interpretar que la demanda es creciente en cada año, quizás por preferencia frente a las carnes rojas, o por el precio más asequible que la carne de res.

La población ecuatoriana en general y la cuencana en particular, se encuentra en un proceso de involucramiento paulatino en la demanda de alimentos cuya inocuidad esté más garantizada, como es el caso de los supermercados; tal vez

debido a las condiciones socioeconómicas, o a las tradiciones de consumo, siendo indudablemente los mercados populares la opción más asequible para la adquisición de dichos alimentos.

Al ser el pollo un producto alimenticio al alcance de todas las clases sociales, tiene lógicamente gran demanda en la ciudad de Cuenca; este se lo comercializa mayoritariamente en los mercados populares de la ciudad.

Su expendio no se lo hace en condiciones de salubridad adecuadas, ya que los encontramos ubicados sobre cualquier meson o contenedor, lo que no garantiza la inocuidad de este producto. Igualmente, los pollos llegan al mercado en camiones abiertos, lo que incrementa la posibilidad de contaminación (Anexo 2).

De acuerdo con los datos proporcionados por el Sistema de Vigilancia Epidemiológico del Ecuador, perteneciente al Ministerio de Salud Pública, según el anuario publicado hasta el año 2014, se presentan 181 casos de intoxicación alimentaria en la provincia del azuay para el año 2014; este dato demuestra que ha habido una reducción significativa, frente a los 477 casos en promedio de los 4 años anteriores; pero que sin embargo no deja de ser preocupante para los organismos de salud pública.

Las enfermedades Diarreicas se han contabilizado en 3659 para el año 2014. según la OMS y, apunta a varias causas como responsables de esta enfermedad, la microbiológica, representada por E. coli, es muy significativa en la contribución de la enfermedad.

Así mismo, los casos y tasas de intoxicación alimentaria y enfermedades diarreicas en la provincia del Azuay son altos (Anexo 3). Conociendo que los cárnicos, debido a su composición son un medio ideal de cultivo para el crecimiento de muchos organismos, gracias a su alta humedad, compuestos de diversos grados de complejidad, abundante suministro de minerales y carbohidratos fermentables (glucógeno) de un pH favorable para la mayoría de los microorganismos entéricos.

Los alimentos de origen animal, pueden estar contaminados con microorganismos, por diversas causas: los manipuladores que pueden llevar microorganismos patógeno durante los procesos de fabricación, embalaje y comercialización; la cocción incorrecta, mala refrigeración o almacenamiento, puede conducir a enfermedades transmitidas por la carne. Los patógenos alimentarios son los principales causantes de enfermedad y muerte en países en

desarrollo, que cuesta miles de millones de dólares en la atención médica, costos médicos y sociales (Fratmico et al., 2005).

### Enterobacterias

La familia Enterobacteriaceae comprende un grupo extenso de bacterias gramnegativas no formadoras de esporas, casi todas son anaerobias facultativas. Son microorganismos ubicuitarios, lo que significa que es inevitable que puedan entrar en la cadena alimentaria. Algunas especies son responsables de toxiinfecciones (*salmonela*, *Yersinia*, *Escherichia coli*, *Serratia*, etc.).

Pueden causar diferentes tipos de infecciones; las infecciones de las vías urinarias son los más comunes, seguidos de la neumonía, infecciones de la herida e infecciones de la sangre y del sistema nervioso central. Algunos géneros son causas comunes de las infecciones intestinales como la enteritis y diarrea. También constituyen una parte esencial de las infecciones nosocomiales, especialmente relacionada con el catéter en el tracto urinario, con neumonía asociada. (Farmer III, J., Boatwright, K.D. & Janda, J.M 2007).

Tabla 1. Miembros clínicamente importantes de la familia enterobacteriaceae comúnmente causantes de infecciones ( Tärnberg M

Genero	Especies clínicamente importantes	Tipo común de infección
Citrobacter	<i>C. freundii</i>	Neumonía, meningitis, septicemia, infecciones de heridas
Enterobacter	<i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i>	Neumonía, septicemia, infecciones de heridas
Escherichia	<i>E. coli</i>	Infecciones urinarias, diarrea, septicemia, meningitis neonatal, infecciones endovascular.
Klebsiella	<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i>	Infecciones urinarias, neumonía, septicemia
Morganella	<i>M. morganii</i>	Infecciones urinarias, septicemia
Plesiomonas	<i>P. shigelloides</i>	Diarrea, septicemia
Proteo	<i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i>	Infecciones urinarias
Salmonella	<i>S. enteritica</i>	Diarrea, la fiebre tifoidea, la septicemia, infecciones del tracto urinario, osteomyelitis
Serratia	<i>S. marcescens</i> , <i>S. liquefaciens</i>	Infecciones urinarias, neumonía, infecciones de la herida,
Shigella	<i>S. sonnei</i> , <i>S. flexneri</i>	Septicemia diarrea, disentería
Yersinia	<i>Y. pestis</i> , <i>Y. enterocolitica</i>	la peste, la enteritis, diarrea, septicemia

Fuente: ( Tärnberg María 2012)

### ***Escherichia coli***

Dentro de los patógenos bacterianos de mayor importancia se encuentra *Escherichia coli*, causante de la colibacilosis aviar y de cuantiosas pérdidas económicas a nivel mundial (Baltzley y Rehberg, 2006).

La colibacilosis es un síndrome complejo caracterizado por lesiones multiorgánicas, tales como aerosaculitis asociada a pericarditis, perihepatitis y peritonitis, que resulta en alta morbilidad y mortalidad (Jansen et al, 2003).

Hay varias cepas productoras de toxinas de *E. coli* que causan diarrea, pero la mayoría de estas bacterias causan la aparición de las infecciones urinarias (Donnenberg, M.S. 2005), especialmente entre las mujeres y las adolescentes. Otros tipos de infecciones que pueden implicar *E. coli* son: meningitis, septicemia, neumonía, infecciones intra-abdominales y ginecológicas.

Como integrante de la flora normal del hombre y de muchos animales, se lo considera un germen indicador de contaminación fecal cuando está presente en el ambiente, agua y alimentos, junto con otros similares agrupados bajo la denominación de "bacterias coliformes".

Las dos causas más comunes de enfermedades diarreicas en países en desarrollo son los *rotavirus* y *Escherichia coli*. Las enfermedades diarreicas pueden también transmitirse de persona a persona, en particular en condiciones de higiene personal deficiente. Los alimentos elaborados o almacenados en condiciones antihigiénicas son otra causa principal de diarrea. (OMS).

### ***Salmonella***

La infección debida a serovariedades no tíficas de *Salmonella spp.* representa un problema de salud pública a nivel mundial, que se ha agudizado con la apertura económica y la globalización, debido a que el consumo de carne de pollo, huevos y subproductos se ha incrementado en todo el mundo, existe sustancialmente un mayor riesgo de infección. Se ha demostrado en la literatura (Betancor et al., 2010) que casi todas las canales de aves pueden estar infectadas; el número de microorganismos puede ser bajo en un principio y aumentar como resultado del manejo.

### ***Salmonella enterica* serotipo choleraesuis**

Entre los más de 2.000 serotipos, *Salmonella enterica serotipo choleraesuis* muestra la mayor predilección para causar infecciones sistémicas en seres humanos. La complicación más temida de serotipo choleraesuis en adultos es el desarrollo de aneurisma micótico, que antes era casi uniformemente fatal. Los avances en las técnicas de diagnóstico, la atención quirúrgica y terapia antimicrobiana han mejorado en gran medida la supervivencia de estos pacientes. Sin embargo, la reciente aparición de serotipo choleraesuis que es resistente a la ampicilina, cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol y, en particular, los antibióticos de fluoroquinolona ha despertado preocupación por el uso de estos agentes para el tratamiento de la infección sistémica causada por este organismo.

En vista de las graves consecuencias de la situación, la cadena de transmisión y el mecanismo de la resistencia deben ser estudiados cuidadosamente para reducir la propagación de la infección y la amenaza para la salud humana. Hasta la fecha, no hay vacunas disponibles para prevenir infecciones serotipo choleraesuis en los seres humanos.

### ***Salmonella group II***

*Salmonella enterica* subespecie *salamae*. A diferencia de la cosmopolita y aislada con mayor frecuencia *S. enterica*, la subespecie *salamae* generalmente tiene una distribución más restringida y no está asociada frecuentemente con virulencia en humanos o animales. Aunque aislada principalmente de aves de corral, un pequeño número de *S. enterica* subespecie *salamae* serovar *Sofia* están aislados de otros nichos incluyendo los seres humanos. (Chandry PS, 2012)

Esta nueva subespecie fue previamente *Salmonella* grupo 2. El microbio se asocia típicamente con los animales de sangre fría, pero puede ser un patógeno de vez en cuando en el hombre y otros animales. Es una bacteria en forma de vara Gram negativa que se asocia con la enfermedad gastrointestinal llamada salmonelosis, caracterizada por cólicos y diarrea. Las varillas son rectas y por lo general móviles. Se produce gas, cuando la fermentación de azúcares, y sulfuro de hidrógeno se encuentra con frecuencia. El crecimiento se produce de manera óptima a 35-37 C.

### ***Serratia odorifera***

En 1978, *Serratia odorifera* fue descrito como una nueva especie del genero *Serratia*. Los hábitats de *S. odorifera* en la naturaleza son relativamente desconocidos, aunque de vez en cuando un aislado caso se ha recuperado en las plantas. Rara vez ha sido *S. odorifera* aislado a partir de muestras clínicas, sin embargo, se lo ha identificado como el causa de la enfermedad. (Chmel Herman 2012)

Se trata de gérmenes oportunistas, móviles y que fermentan la lactosa con lentitud o no la fermentan. *Serratia marcescens* es la principal relacionada con las enfermedades humanas. Se han comunicado raros casos de enfermedades debidas a *Serratia liquefaciens*, *Serratia raubidaea* y *Serratia odorifera*. Entre las infecciones nosocomiales *Serratia* provoca aproximadamente el 4% de las bacteriemias y las infecciones del tracto respiratorio inferior y el 2% de las infecciones de las vías urinarias, heridas quirúrgicas y piel. El tratamiento antibiótico de las infecciones por *Serratia* es complicado por la frecuencia elevada de resistencia a múltiples fármacos. (Puerta, García,A. na)

Las especies de *Serratia* se encuentran en el suelo, en las plantas y en el agua. En la población sana, a diferencia de *Enterobacter* y *Klebsiellas*, sólo se observan ocasionalmente en el tracto gastrointestinal o en las vías aéreas superiores.

### ***Serratia liquefaciens***

*S. liquefaciens* es una causa poco frecuente pero cada vez más reconocido de la sepsis relacionada con la transfusión y se asocia con una alta tasa de mortalidad (Roth, V. R. et al 2000). Recientemente, dos brotes de *S. liquefaciens* infecciones del torrente sanguíneo en una unidad de cuidados intensivos y en un centro de hemodiálisis se han descrito; sin embargo, las fuentes ambientales de *S. liquefaciens* sigue siendo poco clara. *S. liquefaciens* asomó tras la administración de una infusión de vitamina C por un médico naturópata, que se asoció con un desbordamiento del lavabo contaminada y pobres prácticas de higiene.

### ***Aeromona hidróphila***

El género *Aeromonas* se ha reconocido desde 1891 como agente etiológico de enfermedades de varias especies de peces y ocasionalmente de mamíferos, reptiles, anfibios y pájaros. Recientemente algunas de las especies han emergido

como un problema de salud pública para la población humana provocando infecciones intestinales y extra-intestinales que incluyen bacteriemia. Tomando en consideración que en algunos países estos microorganismos se encuentran entre las principales causas de diarrea, es oportuno dar a conocer la importancia de estos microorganismos (Castro E. Graciela 2002).

Se caracteriza por la presencia de sangre visible en las heces, es una diarrea mucopiosanguinolenta acompañada de pujos y tenesmos, en ocasiones presentan prolapso rectal, fiebre elevada, gran anorexia, pérdida de peso rápida y daño mucosal producido por bacterias invasoras. En su fase inicial las bacterias pueden producir toxinas que actúan como enterotoxinas produciendo una diarrea secretora que puede deshidratar al paciente en pocas horas.

### ***Citrobacter braakii***

*Citrobacter*, son bacilos gram-negativos que puede causar infecciones oportunistas en huéspedes inmunocomprometidos. La identificación de *C. braakii* se confirmó mediante el Vitek 2 GNB tarjetas (BioMérieux Vitek, Hazelwood, Missouri, EE.UU.), (entendiéndose que este método es similar al que se ha empleado en el presente trabajo investigativo). Y el kit API miniaturizado 50 CHE (BioMérieux, La Balme les Grottes, Francia).

Rara vez están implicados en la piel o infecciones de tejidos blandos. *Citrobacter braakii* se refiere a los genomaspecies del complejo *freundii Citrobacter*. No existen estudios detallados de las infecciones causadas por las especies genéticas específicas de nueva formación.

Se describe un caso de peritonitis aguda causada por un inusual organismo gram-negativa que se produjo en un paciente en diálisis peritoneal automatizada (DPA) en una unidad de nefrología. Un hombre de 62 años de edad que había estado en tratamiento APD hace casi 2 años fue admitido en nuestra unidad de nefrología para el dolor abdominal, fiebre, y el dializado peritoneal nublado. (Reina Valdés A. 2003). El paciente fue cambiado de APD [peritoneal marea nocturna diálisis (NTPD)] para la DP continua ambulatoria (4 intercambios diarios) y el tratamiento antibiótico empírico con cefotaxima 500 mg / bolsa por vía intraperitoneal (IP) más tobramicina 0,6 mg / kg IP una vez al día se inició (el paciente había sido anúrico durante casi un año). Después de un mes a partir del final del tratamiento antibiótico, el WBCC y la cultura peritoneal fueron negativos y su condición clínica fue muy buena.

### ***Burkholderia pseudomallei***

*Burkholderia pseudomallei* es una gram -negativa, bipolar, aerobia, móvil, habita el suelo en forma de barra. No forma esporas y es saprófita. La bacteria puede infectar a los animales y los seres humanos a través del contacto directo, la inhalación, ingestión o heridas abiertas. Una de las cosas desagradables sobre esta bacteria es que el período de incubación de las infecciones puede ser desde un par de días a la par de años. Esto ocasiona en la gente que pueden estar infectados sin saberlo. La bacteria también puede llegar a sobrevivir fuera de un organismo huésped.

*Burkholderia pseudomallei* causa la melioidosis (enfermedad de Whitmore en los seres humanos) (Institut national de la santé na). Melioidosis normalmente infecta los pulmones y provoca abscesos. La bronquitis y la neumonía son resultados comunes de la bacteria. Esta bacteria es particularmente peligrosa, sin embargo, ya que puede tomar varias rutas diferentes una vez que infecta, puede presentarse de muchas maneras diferentes. Mientras los abscesos en el pulmón junto con la bronquitis o neumonía son los más comunes, también puede causar enfermedad de la sangre, enfermedad renal, enfermedades del corazón, y más. Por todo esto, *Burkholderia* se ha ganado el apodo de *pseudomallei* (el gran imitador).

#### **Objetivo General**

- Determinar la presencia de enterobacterias en pollo no refrigerado, que se expende en el mercado 27 de febrero de la ciudad de Cuenca.

#### **Objetivos Específicos**

- Determinar la presencia de enterobacterias que podrían estar presentes en la carne de pollo que se expende en el mercado 27 de Febrero.
- Identificar los géneros de enterobacterias de mayor incidencia, presentes en la carne de pollo.
- Recomendar las acciones preventivas a partir de los resultados, a las autoridades correspondientes para la toma de medidas sanitarias que se enfoquen en implementar buenas prácticas de manipulación del pollo en los mercados y, preservar la buena salud de la ciudadanía cuencana.

## CAPITULO I

### MATERIALES Y METODOS

#### 1.1. muestreo:

En el mercado 27 de Febrero, existen aproximadamente 9 puestos que venden pollo, de lunes a viernes, se tomaron 60 muestras de carne de pollo aleatoriamente entre todos los puestos. Las muestras se tomaron en un lapso de 10 semanas.

Estas muestras se colocaron en fundas estériles Ziploc y fueron llevadas en una caja refrigerada al laboratorio de microbiología de la Universidad del Azuay.

Se indica todo el proceso en fotografías. (Anexo 4)

#### 1.2. Metodología de Análisis

##### 1.2.1 Aislamiento de Enterobacterias

El aislamiento de las Enterobacterias de las muestras de carne de pollo, se realizó en dos medios de cultivo:

##### 1.2.1.1. Agar BPLS (Agar-Verde brillante-Rojo de fenol- lactosa - sacarosa)

El Agar verde brillante, es un medio de cultivo selectivo para el aislamiento de salmonella, excepto *S. typhy*, a partir de materiales patogénicos, heces, orina, alimentos, etc.

El Agar BPLS, actúa según el mismo principio que el Agar BPL (en el cual, medio de cultivo contiene lactosa, cuya degradación a ácido se reconoce por el viraje a amarillo del Rojo de fenol, que actúa como indicador de pH. En ambiente alcalino presenta color rojo intenso); No obstante, su base nutritiva, más rica y abundante permite un mejor crecimiento de *Salmonella*. El crecimiento simultáneo de gérmenes acompañantes, también es más intenso, se inhibe notablemente por el contenido más elevado de verde brillante. Puesto que las *Salmonellas* no pueden degradar ni la lactosa, ni la sacarosa, el contenido de sacarosa permite, al contrario que el Agar BPL, el reconocimiento de la flora acompañante: lactosa- positiva débil, o lactosa negativa pero sacarosa- positiva.

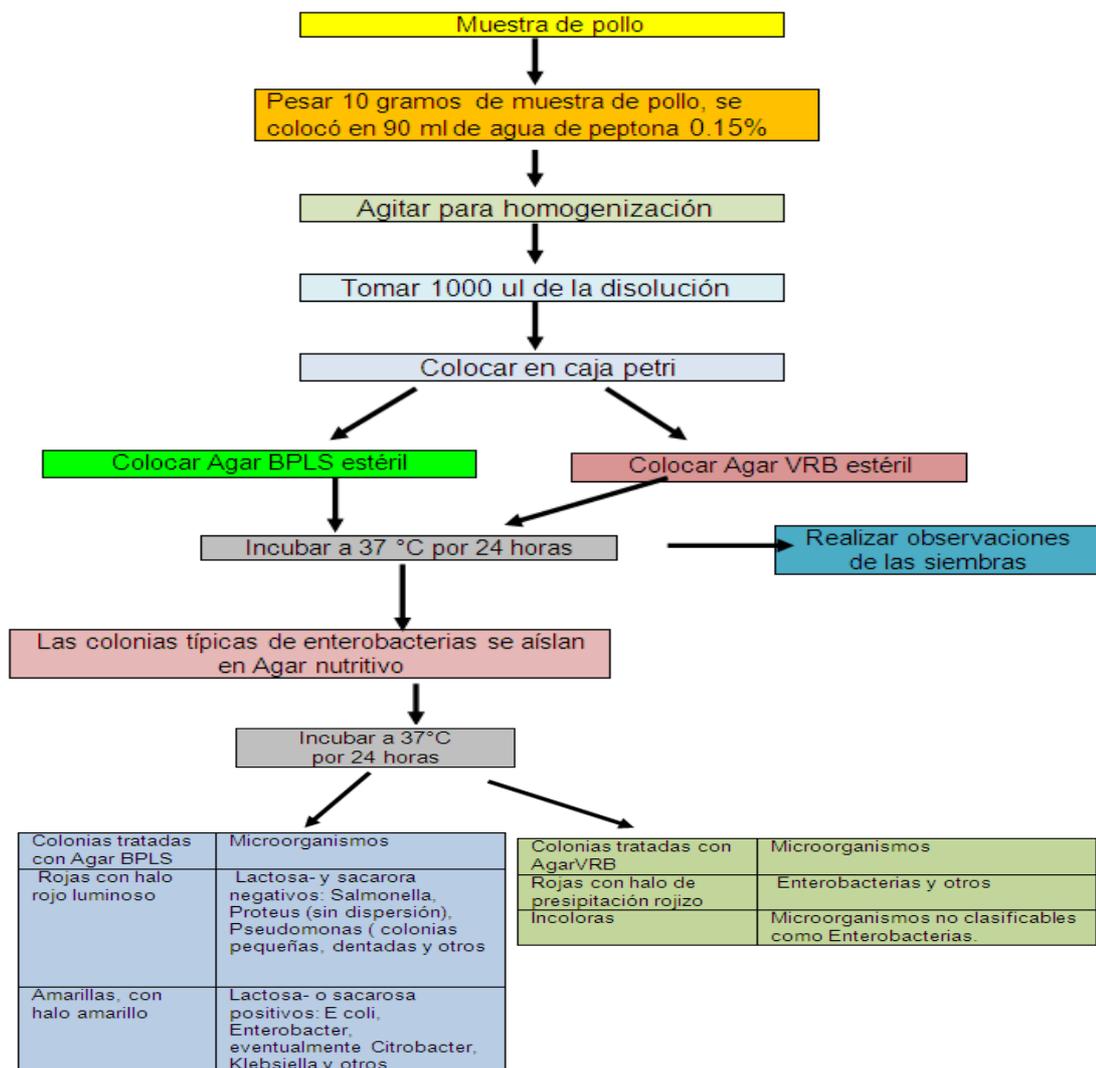
### 1.2.1.2. Agar VRB (Agar-Violeta cristal - Rojo neutro- bilis)

El Agar Violeta cristal, es selectivo para la demostración y numeración de bacterias coliformes, inclusive *E. coli*, según Davis, en agua, leche, helados, carne y otros alimentos.

Por su formulación, este medio de cultivo corresponde a las recomendaciones de la American Public Health Association (1984-1985), a las de la Federación Internacional de productos lácteos (FIL-IDF), 1985; a las del Instituto Alemán para la tecnología de los alimentos y envasado (1974) y a las de la EUROGLACE (KLOSE 1968 a, b).

Se describe a continuación el proceso de análisis con estos medios de cultivo

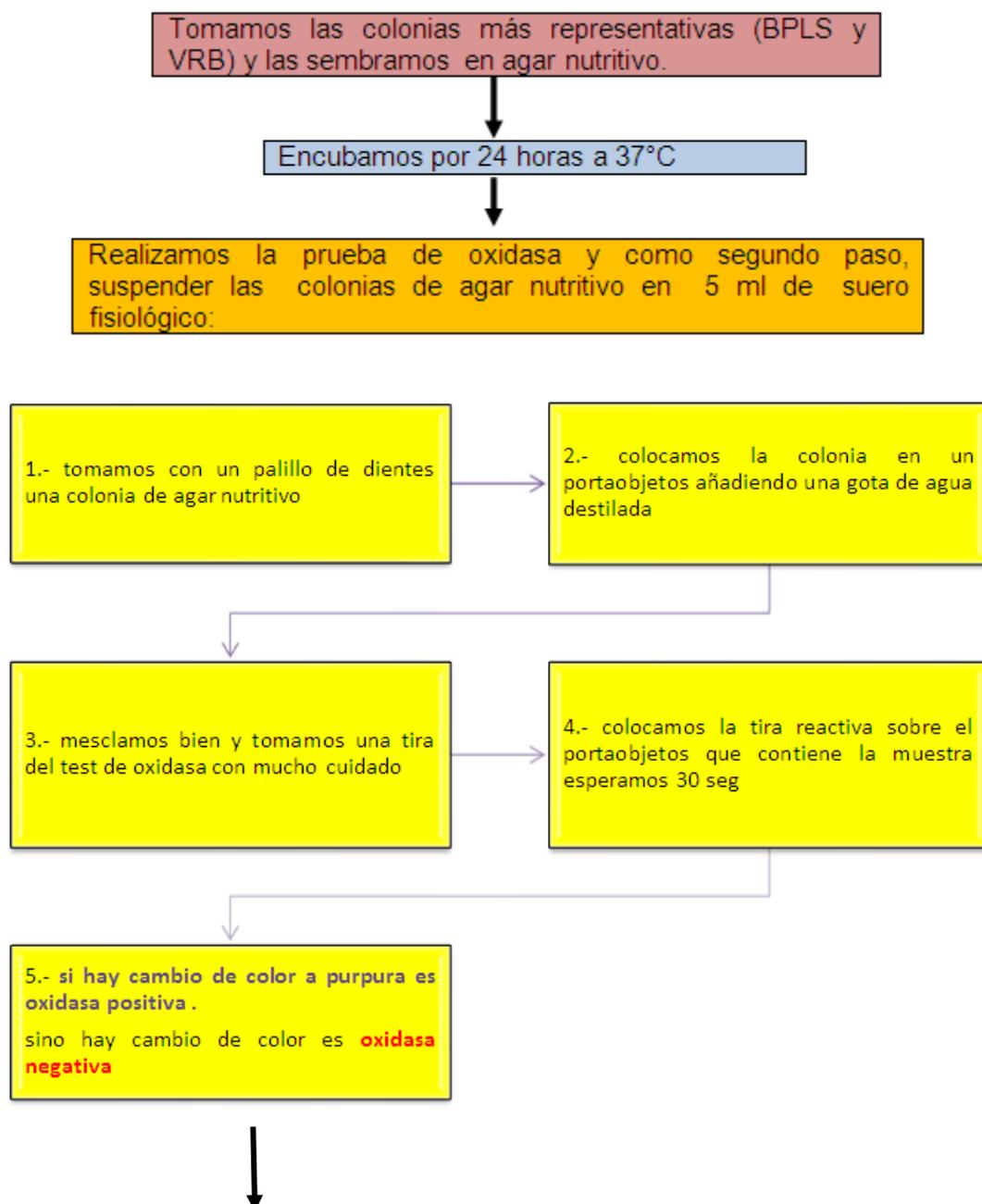
Figura 1. Diagrama para análisis de enterobacterias en pollo no refrigerado del mercado 27 de Febrero.

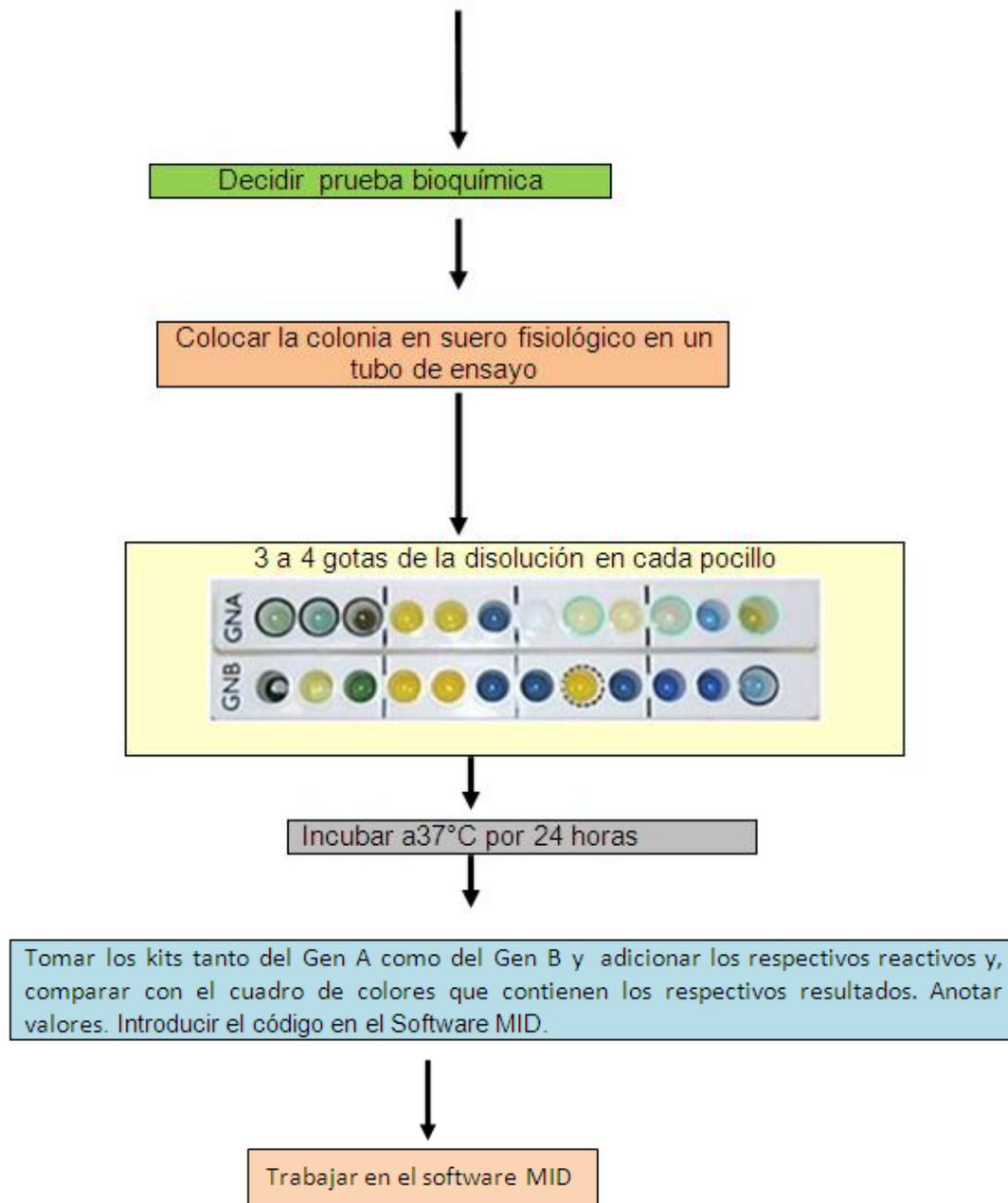


### 1.3. Pruebas bioquímicas

Para la identificación de las enterobacterias aisladas de las muestras de pollo se realizaron pruebas bioquímicas, utilizando el kit de pruebas miniaturizadas de la marca Microgen GN A+B.Products (Inglaterra) (Anexo 5); cuyo fundamento se manifiesta en (Anexo 6)

Figura 2. Diagrama para el procedimiento de pruebas bioquímicas de acuerdo al instructivo del Kit utilizado.





#### 1.4. Fundamento técnico de microgen gn id

El sistema Microgen GN-ID comprende dos tiras de micropocillos por separado (GN A y GN B). Cada tira contiene 12 substratos bioquímicos estandarizados que han sido seleccionados en función de un análisis informático muy extenso (1) de las bases de datos publicadas para la identificación de la familia *Enterobacteriaceae* y los microorganismos Gram. Negativos oxidasa positivos y negativos no exigentes más comunes (2,3,4,5). Los substratos deshidratados en cada pocillo se reconstituyen con una suspensión salina del organismo a identificar. Si los substratos son metabolizados por el organismo, se observará un cambio de color durante la incubación o después de la adición de reactivos específicos (ver la Tabla

de Referencia de los Substratos). La permutación de los substratos metabolizados se puede interpretar usando el Software Microgen Identification (MID-60) para identificar el organismo analizado.

Las tiras de GN A han sido diseñadas para la identificación de fermentadores de glucosa oxidasa negativos, nitrato positivas que incluyen los géneros más comunes de la familia *Enterobacteriaceae*.

Las tiras GN A y GN B se utilizarán conjuntamente obteniendo un sistema con 24 substratos para identificar bacilos Gram. Negativos no-exigentes (oxidasa negativos y positivos) además de todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae* (28 géneros) –ver tabla de datos. Las tiras de GN B han sido diseñadas para ser usadas conjuntamente con las tiras GN A y no de modo individual.

Ver paso a paso el procedimiento en anexo 6.

## CAPITULO II

## RESULTADOS

Concluido todo el proceso descrito anteriormente para determinar enterobacterias presentes en el pollo no refrigerado que se expende en el mercado 27 de Febrero, se ha obtenido los resultados para 60 muestras, cuyo compendio se muestra en el siguiente diagrama:

Tabla 2. Resumen de resultados obtenidos en la identificación de enterobacterias en pollo no refrigerado que vende en el mercado 27 de Febrero de Cuenca, con base al método Microgen GN-ID A+B, obtenidos en el software MID.

NÚMERO DE MUESTRA	CÓDIGO	BACTERIA IDENTIFICADA	OXIDASA	PORCENTAJE DE PROBABILIDAD	COMENTARIOS DE LA IDENTIFICACIÓN
1	67600764	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	99.9 %	Excelente identificación de <i>E.coli</i>
2	570207735	<i>B. pseudomallei</i>	OXIDASA +	< 0.01 %	Para identificación a nivel de especie, se requiere pruebas adicionales
3	57700664	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	66.93 %	Inaceptable identificación de <i>E. coli</i>
4	67600764	<i>E.coli</i>	OXIDASA -	99.9 %	Excelente identificación de <i>E.coli</i>
5	57604664	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	91.53 %	Aceptable identificación de <i>E. coli</i>
5	66704764	<i>E. coli</i>	OXIDASA-	99.38 %	Aceptable identificación de <i>E. coli</i>
6	47610765	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	99.69 %	Aceptable identificación de <i>E. coli</i>
7	67600765	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	99.6 %	Aceptable identificación de <i>E. coli</i>
8	47600664	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	91.82 %	Aceptable identificación de <i>E. coli</i>
9	77200772	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	99.11 %	Aceptable identificación de <i>E. coli</i>
10	67600664	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	99.6 %	Excelente identificación de <i>E. coli</i>
11	74600762	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	98.07 %	Aceptable identificación de <i>E. coli</i>
12	67600661	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	99.64 %	Aceptable identificación de <i>E. coli</i>
13	46600464	<i>E. coli-inactiva</i>	OXIDASA -	60.95 %	Dudosa identificación de <i>E. coli-inactiva</i>
14	67640774	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	99.93 %	Aceptable identificación de <i>E. coli</i>
15	67600665	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	99.94 %	Aceptable identificación de <i>E. coli</i>
15 +	67644766	<i>S. liquefaciens</i>	OXIDASA -	95.8 %	Aceptable identificación de <i>Serratia liquefaciens</i>
16	67600664	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	99.6 %	Excelente identificación de <i>E. coli</i>
17	67601775	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	99.99 %	Aceptable identificación de <i>E. coli</i>
18	47610765	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	99.69 %	Aceptable identificación de <i>E. coli</i>
19	67600664	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	99.6 %	Excelente identificación de <i>E. coli</i>
20	67200664	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	91.64 %	Aceptable identificación de <i>E. coli</i>
21	77260364	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	81.86 %	Aceptable identificación de <i>E. coli</i>
22	67644777	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	60.76 %	Inaceptable identificación de <i>E. coli</i>
23	67600765	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	99.6 %	Aceptable identificación de <i>E. coli</i>
24	67600775	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	99.99 %	Aceptable identificación de <i>E. coli</i>
25	76220714	<i>E. coli-inactiva</i>	OXIDASA -	98.41 %	Aceptable identificación de <i>E. coli-inactiva</i>
26	67600666	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	98.73 %	Muy buena identificación de <i>E. coli</i>
27	76200734	<i>E. coli-inactiva</i>	OXIDASA -	81.44 %	Aceptable identificación de <i>E. coli-inactiva</i>
28	67644665	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	99.92 %	Aceptable identificación de <i>E. coli</i>
28	66240662	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	58.78 %	Inaceptable identificación de <i>E. coli</i>
29	47200774	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	82.32 %	Aceptable identificación de <i>E. coli</i>
30	77220752	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	86.47 %	Aceptable identificación de <i>E. coli</i>
30	67240060	<i>E. coli-inactiva</i>	OXIDASA -	75.34 %	Inaceptable identificación de <i>E. coli-inactiva</i>
31	67260764	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	79 %	Inaceptable identificación de <i>E. coli</i>
32	77263626	<i>Salmonella grupo II</i>	OXIDASA -	75.7 %	Inaceptable identificación de <i>Salmonella grupo II</i>

33	47600766	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	99.68 %	Aceptable identificación de <i>E. coli</i>
34	77306064	<i>E. coli-inactiva</i>	OXIDASA -	50.51 %	Inaceptable identificación de <i>E. coli-inactiva</i>
35	77606764	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	88.68 %	Aceptable identificación de <i>E. coli</i>
36	67220665	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	95.35 %	Aceptable identificación de <i>E. coli</i>
37	77700764	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	99.15 %	Aceptable identificación de <i>E. coli</i>
38	576004366	<i>A. hidróphila</i>	OXIDASA -	92.06 %	Aceptable identificación de <i>Aeromonas hidrophila</i>
39	77667454	<i>S. liquefaciens</i>	OXIDASA -	67.61 %	Inaceptable identificación de <i>Serratia liquefaciens</i>
40	77300734	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	64.85 %	Inaceptable identificación de <i>E. coli-inactiva</i>
41	74206724	<i>E. coli-inactiva</i>	OXIDASA -	96.48 %	Aceptable identificación de <i>E. coli-inactiva</i>
42	77766444	<i>S. liquefaciens</i>	OXIDASA -	93.59 %	Aceptable identificación de <i>Serratia liquefaciens</i>
43	561223734	<i>B. pseudomallei</i>	Oxidasa +	< 0.01 %	Muy buena identificación a nivel de genero
44	77240600	<i>S. serotypo choleraesuis</i>	OXIDASA -	94.24 %	Aceptable identificación de <i>Salmonella serotipo choleraesuis</i>
45	77300304	<i>E. coli-inactiva</i>	OXIDASA -	98.78 %	Aceptable identificación de <i>E. coli-inactiva</i>
46	76260736	<i>S. liquefaciens</i>	OXIDASA -	65.66 %	Inaceptable identificación de <i>Serratia liquefaciens</i>
47	67600764	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	99.9 %	Excelente identificación de <i>E. coli</i>
48	76300772	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	93.22 %	Aceptable identificación de <i>E. coli</i>
49	76300732	<i>E. coli-inactiva</i>	OXIDASA -	80.53 %	Aceptable identificación de <i>E. coli-inactiva</i>
50	77360724	<i>C. braakii</i>	OXIDASA -	55.59 %	Inaceptable identificación de <i>Citrobacter braakii</i>
51	77540706	<i>S. liquefaciens</i>	OXIDASA -	99.1 %	Aceptable identificación de <i>Serratia liquefaciens</i>
52	567000777	<i>B. pseudomallei</i>	Oxidasa +	99.64%	Aceptable identificación de <i>Burkholderia pseudomallei</i>
53	66327764	<i>S. odorifera biogp1</i>	OXIDASA -	94.75 %	Aceptable identificación de <i>Serratia odorifera biogp 1</i>
54	77200727	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	97.7 %	Aceptable identificación de <i>E. coli</i>
55	66224046	<i>E. coli-inactiva</i>	OXIDASA -	94.55 %	Aceptable identificación de <i>E. coli-inactiva</i>
56	66600734	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	84.1 %	Aceptable identificación de <i>E. coli</i>
57	77200717	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	80.82 %	Aceptable identificación de <i>E. coli</i>
58	67220664	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	91.38 %	Aceptable identificación de <i>E. coli</i>
59	67600766	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	93.11 %	Muy buena identificación de <i>E. coli</i>
60	77200664	<i>E. coli</i>	OXIDASA -	91.47 %	Muy buena identificación de <i>E. coli</i>

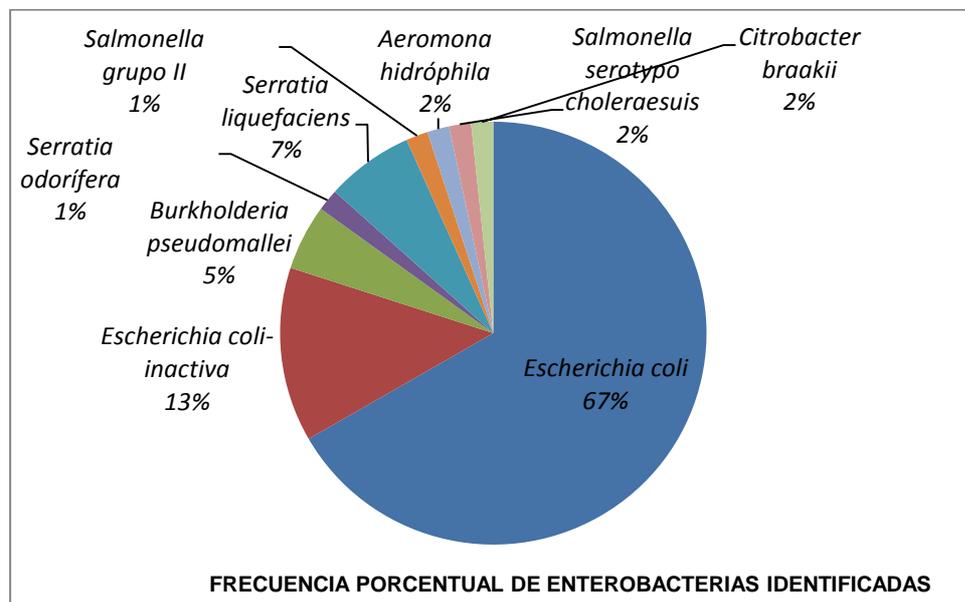
Fuente: (Autor 2015)

Tabla 3. Frecuencia de enterobacterias identificadas con el uso del kit Microgen gna. A+B

BACTERIA IDENTIFICADA	FRECUENCIA
<i>Escherichia coli</i>	40
<i>Escherichia coli-inactiva</i>	8
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	3
<i>Serratia odorífera</i>	1
<i>Serratia liquefaciens</i>	4
<i>Salmonella grupo II</i>	1
<i>Aeromona hidróphila</i>	1
<i>Salmonella serotipo choleraesuis</i>	1
<i>Citrobacter braakii</i>	1

Fuente: (Autor 2015)

Figura 2. Frecuencia porcentual de enterobacterias identificadas con el uso del kit Microgen gna. A+B



Fuente: (Autor 2015). Se observa que *Escherichia coli* es la bacteria de mayor incidencia, con el 67%; seguida de *Escherichia coli inactiva*, con el 13%; a continuación *Serratia liquefaciens*, con el 7%; *Burkholdería pseudomallei*, con el 5%; *Aeromona hidróphila*, *Salmonella* serotipo *choleraesuis* y *Citrobacter braakii* con el 2%; y finalmente, *Salmonella grupo II* y *Serratia odorífera* con el 1%.

### CAPITULO III

#### DISCUSIÓN

En la ciudad de Cuenca, es difícil conocer la procedencia del pollo que se expende en los mercados populares. Lo que se puede apreciar por todas las personas que visitan los mercados, es que llega en gavetas, transportadas en camionetas descubiertas, sujetos naturalmente a contaminación y, que podrían constituirse en fuente de transmisión de algún tipo de enfermedad alimentaria al consumidor final (Diario La Tarde, 2013). Si a esto se suma las condiciones insalubres del expendio al detalle, que ocurre en el interior del mercado, es de suponer que las probabilidades del crecimiento de microorganismos transmisores de ETAS, aumenta notablemente. (Anexo 2)

Por la forma de expendio del pollo en el mercado popular, el desarrollo de microorganismos es inminente. El tiempo de exposición del producto al medio ambiente, es uno de los factores principales para el desarrollo de bacterias. *Escherichia coli*, constituye un valor muy significativo para deducir que la falta de aseo personal de quienes manipulan el pollo, es seguramente la fuente principal de contaminación con esta bacteria.

En el 2015, el Departamento de Agricultura de Estados Unidos, sostiene que la carne en general y la de pollo en particular contienen una elevada carga microbiana de manera inevitable y natural, independientemente de su calidad; esto es debido a que durante las operaciones de desplumado y evisceración en los mataderos y salas de despiece, es inevitable un cierto grado de contaminación microbiana, incluida la de origen fecal o intestinal. Por esta razón, ha emitido una alerta sanitaria por un brote de Salmonella que ha dejado más de 300 enfermos en 18 estados.

Estamos hablando de este brote en los Estados Unidos, donde las buenas prácticas de manipulación del pollo faenado se las aplica durante todo el proceso. Si consideramos en particular el lugar del presente estudio, donde las muestras analizadas, han dado positivo para algún género de bacteria, entonces es indiscutible que todos los factores señalados anteriormente, se conjugan para que el pollo que se expende en dicho mercado, no tenga la inocuidad que garantice la buena salud del consumidor final.

El Departamento de Agricultura de Estados Unidos, también sostiene que entre la flora microbiana de la carne de pollo es presumible encontrar patógenos intestinales como la *Salmonella* o *Campylobacter* (éste último incluso más frecuente). En otras palabras nadie puede garantizar que, al vender un pollo, éste venga libre de *Salmonella* o de otros patógenos.

Si bien la presencia de *salmonella* encontrada en el pollo del presente estudio, es alrededor del 5%, estas muestras, si no tienen un proceso de cocción que sobrepase los 70 °C, podría causar enfermedad gastrointestinal al consumidor.

En un estudio realizado en el estado Zulia de Venezuela: Análisis microbiológico de canales de pollo en los mataderos, Se detectó la presencia de *Salmonella Spp* en el 60% de las canales envasadas, de un total de 90 muestras. (Molero Gladis, 2012) En el presente estudio, se detectaron 2 muestras portadoras de esta bacteria, de un total de 60 muestras. Quizás, las diferencias de temperatura, ocasionen que la presencia de *salmonella* en el estado Zulia, sea muy considerable ya que puede llegar hasta los 40 °C, en plena costa noroccidental, mientras que Cuenca se tiene un promedio de 15 °C. Hay que acotar sin embargo, que muchos puestos de expendio de pollo en el mercado 27 de Febrero, no han vendido su producto hasta el atardecer inclusive, donde la temperatura sube considerablemente.

En una investigación sobre la calidad de la carne de pollo que se vende en un mercado Croata, se ha realizado análisis bacteriológico en 66 muestras de carne fresca de pollo al por menor; las pruebas bacteriológicas indican el hallazgo de *Salmonella spp.* (10,60%), enterobacterias (34,84%) (Kožačinski Lidija, et al).

Con un número de muestras similares al presente trabajo investigativo; se observa igualmente que enterobacterias comprende un alto porcentaje de presencia en la carne de pollo al detalle en dicho mercado, a igual que lo encontrado en el mercado 27 de Febrero de Cuenca.

De la totalidad de las muestras analizadas con la utilización del Kit Microgen gna, en más del 80 %, se identifica plenamente la presencia de las enterobacterias señaladas, según el informe que brinda el software, bajo las denominaciones de excelente identificación, muy buena identificación y aceptable identificación; por otro lado, menos del 20% de las muestras, presentan valores inferiores al 80 % de probabilidad de que sea la bacteria que registra el software. Esto puede deberse a la manipulación del producto en el mercado, también, al encontrarse las bacterias

en el suelo, en el agua (que probablemente usen para el desplume y limpieza artesanal), se mezclen entre ellas y, causen confusión al momento de realizar las lecturas.

Dos géneros no frecuentes en la carne de pollo, se han logrado identificar con la utilización del kit de pruebas bioquímicas Microgen gna. A+B. y se lo relaciona con casos que se han dado en otros países.

En México, las bacterias más frecuentemente involucradas en las diarreas son: *Salmonella*, *Shigella*, algunos serotipos de *Escherichia coli* y *Campylobacter jejuni*. El avance en las técnicas de aislamiento e identificación bacteriana ha permitido agregar a esta lista otros agentes, entre los que destacan el género *Aeromonas*, el cual ha adquirido importancia clínica al ser también capaz de producir infecciones de heridas e incluso infecciones respiratorias. (Castro Graciela, et al 2002).

En el presente estudio una muestra dio positivo para este género, con el 92% de aceptación para su identificación, no está categorizada entre las más comunes causantes de infecciones, pero puede en algún momento llegar a serlo, si su incidencia es creciente.

*Burkholderia pseudomallei* recientemente ha ganado importancia como un patógeno emergente en la India; presenta diversas manifestaciones clínicas como neumonía, septicemia, artritis, abscesos, etc. Los casos se han registrado en el sudeste de Asia, principalmente de Tailandia, Malasia, Vietnam, etc. En la India, el caso de un paciente de 65 años de edad, de sexo masculino se presentó con fiebre de un mes atrás, la tos durante igual período, hinchazón en ambos tobillos de 7 días. *B. pseudomallei* fue aislado de secreciones endotraqueales, herida en la pierna. El paciente fue tratado con éxito con imipenem y doxiciclina. (US National Institutes of Health 2011).

En el presente estudio, tres muestras dieron positivo para esta bacteria; los síntomas podrían llegar a confundirse con enfermedades gripales, lo que complicaría naturalmente el tratamiento, es necesario, en el futuro, aislar y estudiar más a fondo el comportamiento de esta bacteria

## CONCLUSIONES

- 1 El pollo es uno de los alimentos de mayor demanda como fuente de proteínas para toda la sociedad ecuatoriana, azuaya y cuencana en particular. El pollo que se expende en los supermercados y que siempre está refrigerado, naturalmente es más caro que el que se expende en los mercados populares como el 27 de febrero y, sobre todo la oferta no es como para la ciudad de Cuenca, por lo que los consumidores tienen que obligadamente adquirirlo en estos últimos lugares descritos.
- 2 Al estar expuesto el pollo al ambiente por largos período de tiempo, es muy susceptible al desarrollo de microorganismos, puesto que la temperatura promedio de la ciudad favorece al desarrollo de los mismos.
- 3 La falta de higiene del personal que se encarga del expendio, contribuye grandemente para la contaminación cruzada del pollo con los microorganismos.
- 4 La falta de control por parte de las autoridades competentes, para que se de cumplimiento con las buenas prácticas de manipulación del pollo, contribuyen igualmente al desarrollo de microorganismos patógenos.
- 6 El objetivo principal de esta investigación ha sido el determinar la presencia de enterobacterias en pollo no refrigerado, que se expende en el mercado 27 de Febrero de la ciudad de Cuenca. Objetivo que que ha sido demostrado en un 100%.

## RECOMENDACIONES

- 1 Se necesita con el carácter de urgente, que las autoridades, a las que les corresponda, exijan el uso obligatorio de refrigeradores para el expendio de pollo en el mercado motivo de estudio y, en todos los mercados populares de la ciudad de Cuenca.
- 2 Se recomienda socializar con todos y cada uno de los vendedores de pollo de los mercados populares de la ciudad, las buenas prácticas de manipulación del producto, para evitar contaminaciones directas, contaminación cruzada, conocer la importancia de la fluctuación de la temperatura en el manejo de los alimentos, el uso de ropa adecuada para el expendio, etc.
- 3 Realizar seguimiento periódico, con la finalidad de verificar el cumplimiento de las normativas de seguridad. Así mismo brindarles capacitaciones periódicas para optimizar los resultados de seguridad.
- 4 Mientras se realiza la transición, lo cual puede ser paulatino, es necesario que el manejo de los puestos de expendio se los enseñe a mantenerlos limpios y desinfectados, para evitar contaminaciones.
- 5 Todo vendedor de pollo debería contar a parte de la autorización municipal, con el respectivo carnet que otorga el Ministerio de Salud Pública.
- 6 Crear un Plan de Seguridad Alimentaria Municipal, con la implementación al menos de un laboratorio de bromatología en la ciudad, para realizar los análisis pertinentes, de manera frecuente.
- 7 Es necesario también llegar a todos los consumidores de pollo de mercado popular, con conocimientos básicos de seguridad alimentaria, para que sepan cuando aceptar o cuando rechazar el producto que van a comprar y, los rangos de temperatura para la cocción y almacenaje .
- 8 Se ha demostrado plenamente la presencia de enterobacterias en la carne de pollo que se expende en el mercado 27 de Febrero de la ciudad de Cuenca; encontrándose algunas poco comunes en este producto alimenticio, por lo que queda abierta la puerta, para que en el futuro se investigue a profundidad, sobre la presencia de estas bacterias, que podrían constituirse en causa de enfermedades para la población.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguado García, J.M, Lumbreras Bermejo, C: *Infecciones por enterobacterias*. Hospital 12 de Octubre. Madrid. Medicine 1998
2. Almirante Gragera, B: *Enfermedades infecciosas. Infecciones por enterobacterias. Revisiones y actualizaciones 2002*
3. Antunes, P., C. Reu, J.C. Sousa, L. Peixe and N. Pestana. *Incidence of Salmonella poultry and their susceptibility to microbial agent*. 2003
4. Baltzley T, Rehberg T. 2006. *Characterization of aviar pathogenic E. coli in a layer production facility*. Agtech Products Inc. Waukesha, Wisconsin. PDF.2006
5. Betancor, L. y otros 14 autores, Prevalence of Salmonella enterica in Poultry and Eggs in Uruguay during an Epidemic Due to Salmonella enterica Serovar Enteritidis, J. Clin. Microbio. 48(7): 2413-2423 (2010).
6. Bhandare, S.G., A.T. Sherikary, A.M. Paturkar, V.S. Waskar and R.J. Zende. *A comparison of microbial contamination on sheep/goat carcasses in a modern Indian abattoir and traditional meat shops*. 2007
7. Bishop Warren, P. *Pediatría Practice Gastroenterology*. New York 2010
8. Boulton FE, Chapman ST & Walsh TH. *Fatal reaction to transfusion of red-cell concentrate contaminated with Serratia liquefaciens*. Transfus Med 1998
9. *Burkholderia pseudomallei*. *Quarterly Microbiology Bulletin of the Division of Microbiology & Infectious Diseases, Pathcentre, Western Australia*. Vol. 2.1.
10. Castro E. Graciela, et al. *El género Aeromonas. ¿Un patógeno importante en Mexico?. Microbiología clínica*. 2002
11. Chandry PS, Gladman S, Moore SC, Seemann T, Crandall KA, et al. *Correction: A Genomic Island in Salmonella enterica ssp. salamae*. 2012
12. Cheng-Hsun Chiu et al. *Salmonella enterica Serotype Choleraesuis: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Disease, and Treatme*. 2004

13. Chmel Herman. American. Society for Microbiology. *Journal of clinical microbiology*. *Serratia odorifera* Biogroup 1 Causing an Invasive Human Infection . 1998
14. Corporación Nacional de Avicultores del Ecuador. CONAVE. [www.conave.org/upload/.../Estadisticas%20avicolas](http://www.conave.org/upload/.../Estadisticas%20avicolas). consulta: 16 sep/2015
15. Días C, Francisco Javier. et al. *Microbiología de las Infecciones Humanas*. Editorial CIB. Quebecor.World, Bogotá.SA. 2007
16. Diario la Tarde. Transporte-de-pollos-faenados-necesita-ser-controlado.3 abr.2015 [www.latarde.com.ec/](http://www.latarde.com.ec/). consulta: 7 noviembre /2015
17. Donnenberg, M.S. *Enterobacteriaceae*. In *Principles and practice of infectious diseases*. Mandell, G.L., Bennett, J.E. & Dolin, R., editors. London. Elsevier, Churchill, Livingstone. 2005
18. E. Merck. Manual de Medios de Cultivo. Darmstadt Alemania.1994
19. Ewing WH. Edwards and Ewing's. *Identification of Enterobacteriaceae*. 4Edition, Elsevier, 1985.
20. Farmer III, J., Boatwright, K.D. & Janda, J.M. *Enterobacteriaceae: introduction and identification*. In *Manual of clinical microbiology*. Murray, P., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L. & Pfaller, M.A., editors. Washington DC. 2007
21. Félix Martín. *Las bacterias patógenas del pollo, un claro peligro potencial en la cocina*. <http://www.restauracioncolectiva.com/es/>. Consultado 14-11-2015
22. Forbes. Sahm & Weissfeld. *Diagnóstico Microbiológico*. 12<sup>ava</sup> edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 2009
23. Fratmico, P.M., A.K. Bhunia and J.L. Smith. *Foodborne Pathogens in Microbiology and Molecular Biology*, Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, UK.2005
24. Frazier, W.C. and D.C.W. Westhoff. *Food Microbiology*. 4th Edn., McGraw-Hill International

25. Global Salm-Surv. *Red de vigilancia de enfermedades transmitidas por los alimentos*. 2005 Nota de información de INFOSAN No. 6/2005 – WHO Global SalmSurv.
26. Gracey, J.F. *Meat Hygiene*. 8th Edn., The English long Book Sic. And Baillier, Tindall, London.1986
27. Hansen DS, Gottschau A, Kolmos HJ. *Epidemiology of Klebsiella bacteraemia: a case control study using Escherichia coli bacteraemia as control*.1998
28. Hedberg, C.W., W.C. Levine, K.E. White, R.H. Carlson, D.K. Winsor, D.N. Cameron, K.L. MacDonald and M.T. Osterholm. *An international foodborne outbreak of shigellosis associated with a commercial airline*. 1992
29. Indian J Med Res. *The world's first case of Serratia liquefaciens intravascular catheter-related suppurative thrombophlebitis and native valve endocarditis*. Clinical Microbiology and Infection.2014.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/>
30. Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM). *Portal de información de enfermedades raras y medicamentos huérfanos*. (na) [www.orpha.net/consor/consulta](http://www.orpha.net/consor/consulta): 9 dic/2015
31. Instituto Ecuatoriano de Normalización. *Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2687*. Quito, Ecuador.2013
32. Jansen T, Philipp HC, Voss M, Preisinger R, Wieler L. *Multiplex PCR is the first technique to allow the specific and sensitive detection of avian pathogenic Escherichia coli*. 2003
33. Jawetz, Melnick and Aldelberg. *Microbiología Médica*. 25<sup>ava</sup> edición. Impreso en Programas Educativos SA. Mexico. 2011
34. Kozačinski Lidija, Hadžiosmanović Mirza, Zdolec Nevijo. *Microbiological quality of poultry meat on the Croatian market*. 2006. <http://hrcak.srce.hr/5139>. Consulta: 14-11-2015
35. Madigan Michael T, Martinko John M, Parker Jack. *Biología de los microorganismos*. Southern Illinois University Carbondale 10 ma edición 2011

36. Mandel Douglas & Bennelt. *Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica*.  
7<sup>ma</sup> edición. Editorial Elseiver. Barcelona 2012
37. Mataix Verdú, José. *Nutrición y Alimentación Humana. II Situaciones fisiológicas y Patológicas*. 2<sup>da</sup> edición. Editorial Arboleda. Madrid 2009
38. Ministerio de Salud Pública. Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica. [www.salud.gob.ec/](http://www.salud.gob.ec/) Consulta: 19-09-2015
39. Molero, S Gladys. Tesis Doctoral: Análisis microbiológico de canales de pollo, en los mataderos del Estado Zulia de Venezuela. Córdova 2012.
40. Muray Patrick R, Rosenthal Kens, Pfaller Michael A. *Microbiología Médica* 6<sup>ta</sup> edición. Editorial Elsevier. Barcelona 2009
41. Neidhardt FC. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular Biology*. 2 edition. ASM Press, Washington, 1999.
42. Patogenos gram - qti control *Sistema de identificación bioquímica de bacterias*
43. Puerta, García , A y F. Mateos, Rodríguez F. *Unidad de Enfermedades Infecciosas*. Servicio de Medicina Interna. Complejo Hospitalario Universitario de Albacete. Albacete. España. (na)
44. Reina Valdés Armenteros. Pediatría. *Diarrea aguda con sangre Invasiva* (disentería). La Habana. CP 10400, Cuba. Departamento de Publicaciones Electrónicas. Coordinadora: 2003
- 45 Sociedad Española de Medicina Preventiva, *Salud Pública e Higiene*.  
*Estudio de Prevalencia de las Infecciones Nosocomiales en España, 2006*.
- 46 Tarnberg, M., Extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*:  
*aspects on detection, epidemiology and multi-drug resistance*. 2012
47. United States Department Agriculture.(USDA) *Food Safety and Inspection*

*Service (FSIS). Isolation and identification of Salmonella from Meat, Poultry, and Egg. 2008*

48. Valverde Romero, ED, et al: *Prevalence of clinical isolates of Escherichia coli and Klebsiella spp. producing multiple extended-spectrum beta-lactamases. 2007*

49. Vélez A. Hernán. Et al. *Fundamentos de Medicina. Enfermedades Infecciosas.*

6 ta edición. Editorial Quebecor Worl, Bogotá SA. 2003

## ANEXOS

## Anexo 1. Producción de pollos broiler en Ecuador (Fuente: Conave)



Fuente: (conave 2013)

Anexo 2. Sistema de transporte de pollos faenados a los mercados de Cuenca y manipulación al interior del mercado 27 de Febrero.



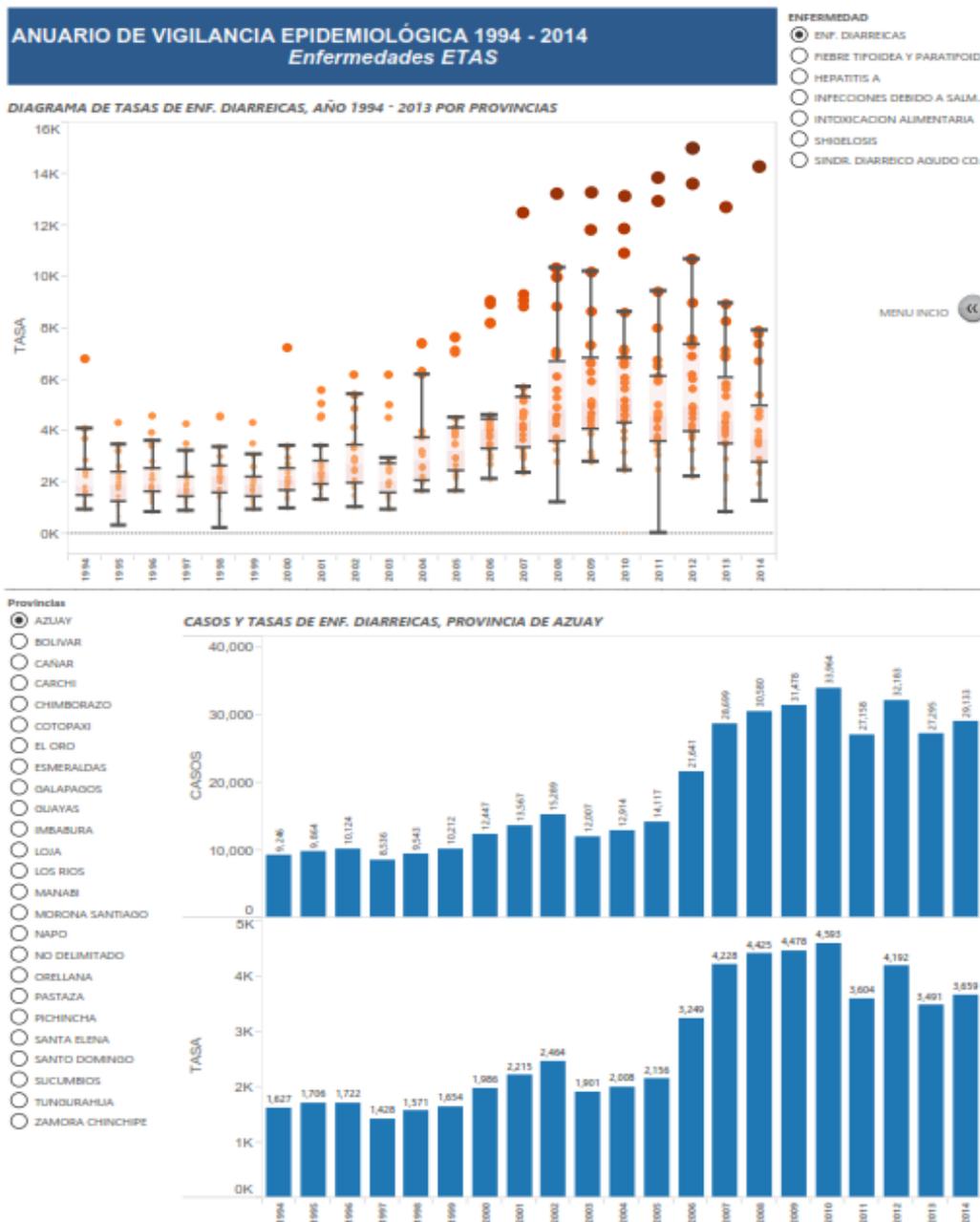
(Fuente: Autor 2015)

Anexo 3 Casos de intoxicación alimentaria hasta el año 2014 para la Provincia del Azuay.



(Fuente. MSPE 2015)

Casos de enfermedades diarreicas hasta el año 2014 para la Provincia del Azuay.



(Fuente. MSPE 2015)

Anexo 4. Proceso desde la adquisición de las muestras hasta la identificación de las enterobacterias.



Caja térmica para transporte de las muestras



Funda estéril utilizada para el transporte



Pesaje de 10 gr de cada muestra



Colocación de la muestra en agua de peptona

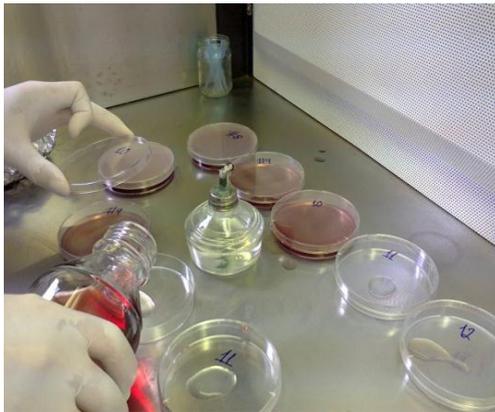


Fuente: (Autor 2015)

Se toma 1000 microlandadas de la disolución y se coloca en cajas petri estériles. Las muestras se trabajaran por duplicado, en ambiente estéril y en el interior de la campana del laboratorio.

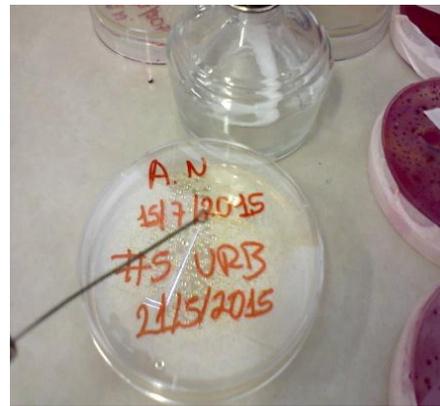
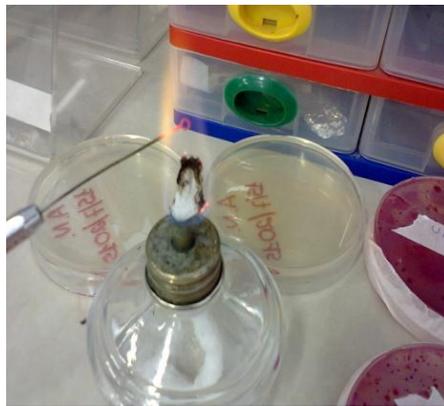
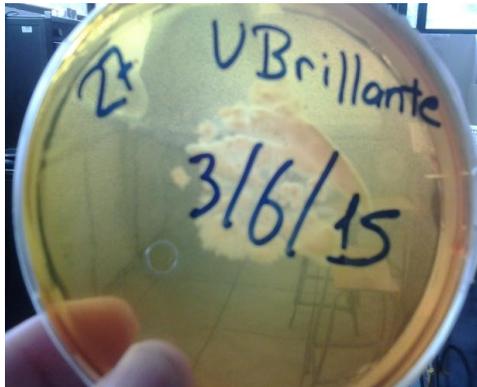


Agares empleados para el cultivo de las muestras



Siembra de la disolución en cajas petri, se coloca agar VRB Y agar verde brillante, en ambiente estéril; se espera a que solidifiquen y se incuba por 24 horas a 37°C.

Resultados obtenidos a las 24 horas de incubación. Presencia de colonias de bacterias



Las colonias típicas de enterobacterias se aíslan en agar nutritivo y se incuban a 37 °C por 24 horas.



Se realiza la prueba de oxidasa, si hay cambio de color a purpura es oxidasa positiva Si no hay cambio de color es oxidasa negativa.

Anexo 5. Pruebas bioquímicas con el uso del kit Microgen GN-ID A+B

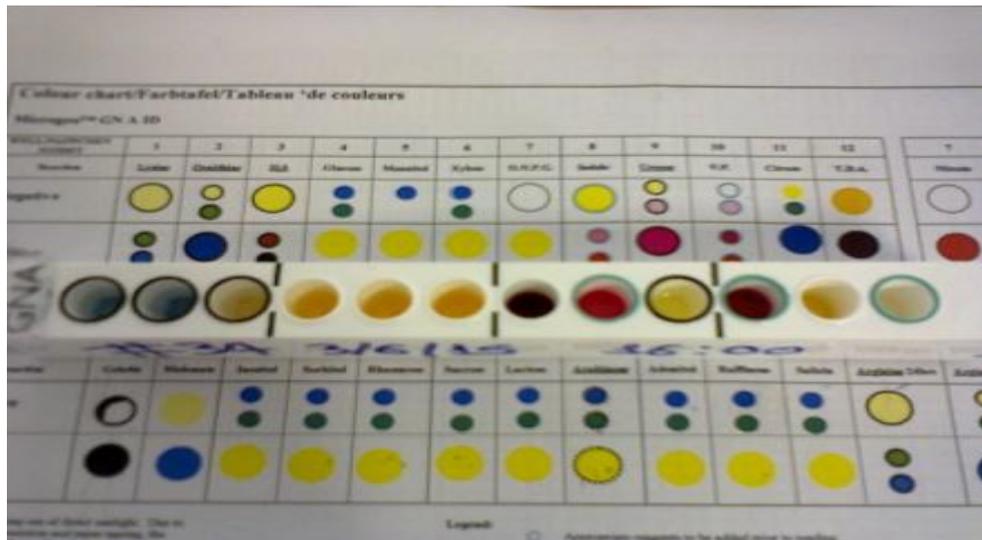


Se realiza las pruebas bioquímicas de identificación.



Trabajo de pruebas bioquímicas en el laboratorio

Fuente: (Autor 2015)



Se compara con la tabla de colores adjunta en el kit para la identificación del código

Fuente: ( Sistema microgen gn id 2015)

### MICROGEN GN-ID A+B PANEL REPORT FORM

Lab. No.

Specimen Type: Lab No 60

Date: 5-23/9/2015 - 24/9/2015



**MICROGEN  
BIOPRODUCTS**

Well Number	GN A wells												GN B wells														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24			
Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P.	Citrate	TDA	Gelatine	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
Result	-	+		+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions				7			7			2			0			0			6			6			4		

Profile No: 77200664      Final Identification: E. coli

WF6125/01/12

25/9/15

24h mas (-)

### MICROGEN GN-ID A+B PANEL REPORT FORM

Lab. No.

Specimen Type: Lab No 59

Date:



**MICROGEN  
BIOPRODUCTS**

Well Number	GN A wells												GN B wells														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24			
Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P.	Citrate	TDA	Gelatine	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
Result	-	+		+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions				6			7			6			0			0			7			6			6		

Profile No: 67600766      Final Identification: E. coli

WF6125/01/12

24h mas (+)

93.11

Se anota los ocho dígitos, según los resultados hayan dado positivo o negativo, en cada reacción

Fuente: (Sistema microgen gn id 2015)

**Microgen ID****Microgen GNA+ B Oxidase Negative****Specimen Details**

**Lab Ref.:** LABN28  
**Name:** Carne de pollo  
**Specimen Type:** Enterobacteria  
**Source (ward/location):** Mercado 27 de febrer

**Date:** 23/07/2015**Results Entry****Octal Code:** 67644665

+ LYS	Lysine Decarboxylase	+ ORN	Ornithine Decarboxylase	- H2S	H2S Production
+ GLU	Acid from Glucose	+ MAN	Acid from Mannitol	+ XYL	Acid from Xylose
+ ONP	ONPG	+ IND	Indole	- UR	Urea Hydrolysis
+ VP	Voges Proskauer	- CIT	Citrate Utilization	- TDA	Tryptophan Deaminase
+ GEL	Gelatin Liquefaction	- MAL	Malonate Utilization	- INO	Acid from Inositol
+ SOR	Acid from Sorbitol	+ RHA	Acid from Rhamnose	- SUC	Acid from Sucrose
+ LAC	Acid from Lactose	+ ARA	Acid from Arabinose	- ADO	Acid from Adonitol
+ RAF	Acid from Raffinose	- SAL	Acid from Salicin	+ ARG	Arginine Dihydrolase

**Identification Analysis**

	<i>E.coli</i>	<i>E.coli-inactive</i>	<i>S.liquefaciens</i>	<i>S.odorifera biogp 2</i>	<i>C.brakii</i>
<b>Select ID Choice</b>	Yes	No	No	No	No
<b>Probability</b>	1/95.465.336	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000
<b>Percent Probability</b>	99,92%	0,06%	0,02%	<0,01%	<0,01%
<b>Likelihood</b>	<0,01%	<0,01%	<0,01%	<0,01%	<0,01%
<b>Human Isolate</b>	Yes	Yes	Yes	Yes	No
<b>Tests against</b>					
<b>Test 1</b>	VP (0,1%)	VP (0,1%)	ARG (0,1%)	ORN (0,1%)	LYS (0,1%)
<b>Test 2</b>	GEL (0,1%)	GEL (0,1%)	IND (1%)	INO (99,9%)	VP (0,1%)
<b>Test 3</b>	ARG (17%)	ARG (3%)	SUC (98%)	ARG (0,1%)	GEL (0,1%)
<b>Additional Tests</b>	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<b>DNase (25C)</b>	0,1%	0,1%	85%	99,9%	0,1%
<b>Motility (37C)</b>	95%	5%	95%	99,9%	87%
<b>Acid from Cellobiose</b>	2%	2%	5%	99,9%	73%
<b>KCN Inhibition</b>	3%	1%	90%	19%	99,9%
<b>Additional Comments</b>		21	47		
	21	Previously the Alkalscens Dispar (ADO) Group			
	47	Previously Enterobacter liquefaciens. Int. J. Syst. Bacteriol. (1973) 23 : 217-225			

**Identification Comments**

Acceptable Identification of *Escherichia coli*  
 The strain is not typical (multiple tests are against), although it is highly separated from other suggested identification choices  
 ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.

Se introduce el código al software MID, y este automáticamente indica de qué bacteria se trata, en caso de coincidir con parámetros preestablecidos.

**Microgen ID****Microgen GNA+ B Oxidase Negative****Specimen Details**

**Lab Ref.:** LABN42  
**Name:** Carne de pollo  
**Specimen Type:** Enterobacteria  
**Source (ward/location):** Mercado 27 de febrer

**Date:** 27/07/2015**Results Entry****Octal Code:** 77766444

+ LYS	Lysine Decarboxylase	+ ORN	Ornithine Decarboxylase	+ H2S	H2S Production
+ GLU	Acid from Glucose	+ MAN	Acid from Mannitol	+ XYL	Acid from Xylose
+ ONP	ONPG	+ IND	Indole	+ UR	Urea Hydrolysis
+ VP	Voges Proskauer	+ CIT	Citrate Utilization	- TDA	Tryptophan Deaminase
+ GEL	Gelatin Liquefaction	+ MAL	Malonate Utilization	- INO	Acid from Inositol
+ SOR	Acid from Sorbitol	- RHA	Acid from Rhamnose	- SUC	Acid from Sucrose
+ LAC	Acid from Lactose	- ARA	Acid from Arabinose	- ADO	Acid from Adonitol
+ RAF	Acid from Raffinose	- SAL	Acid from Salicin	- ARG	Arginine Dihydrolase

**Identification Analysis**

	<i>S.liquefaciens</i>	<i>S.marcescens</i>	<i>Salmonella Group IIIb</i>	<i>E.agglomerans complex</i>	<i>Salmonella Group IIIa</i>
<b>Select ID Choice</b>	Yes	No	No	No	No
<b>Probability</b>	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000	< 1/100,000,000
<b>Percent Probability</b>	93,59%	5,88%	0,31%	0,18%	0,03%
<b>Likelihood</b>	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
<b>Human Isolate</b>	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<b>Tests against</b>					
<b>Test 1</b>	H2S (0,1%)	H2S (0,1%)	UR (0,1%)	LYS (0,1%)	UR (0,1%)
<b>Test 2</b>	IND (1%)	IND (1%)	VP (0,1%)	ORN (0,1%)	VP (0,1%)
<b>Test 3</b>	MAL (2%)	SUC (99%)	GEL (0,1%)	H2S (0,1%)	GEL (0,1%)
<b>Additional Tests</b>	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
<b>DNase (25C)</b>	85%	98%	2%	0,1%	2%
<b>Acid from Cellobiose</b>	5%	5%	1%	55%	1%
<b>Acid from Melibiose</b>	75%	0,1%	95%	50%	95%
<b>Esculin Hydrolysis</b>	97%	95%	1%	60%	1%
<b>Methyl Red</b>	93%	20%	99,9%	50%	99,9%
<b>Additional Comments</b>	47		46		46

46 *Salmonella* cannot be fully identified using biochemistry alone. Perform Polyvalent 'O' and 'H' slide agglutination to confirm, and serotype  
47 Previously *Enterobacter liquefaciens*. Int. J. Syst. Bacteriol. (1973) 23 : 217-225

**Identification Comments**

Acceptable Identification of *Serratia liquefaciens*  
The strain is not typical (multiple tests are against), although it is well separated from other suggested identification choices  
ADDITIONAL TESTS MAY IMPROVE THE IDENTIFICATION.

Un segundo ejemplo de los resultados obtenidos desde el software MID

Fuente: (Software del sistema microgen gn id 2015)

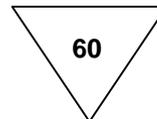
Anexo 6. Fundamento del sistema Microgen GN-ID



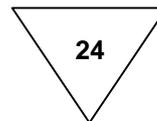
## Microgen™ GN-ID Identificación

### Instrucciones de Uso

**REF** MID-64 A Panel



**REF** MID-65 B Panel



## MICROGEN GN ID

Guía  
Rápida

	GN A	GN A+B	GN A+B
<b>OXIDASA</b>	NEGATIVA	NEGATIVA	<b>POSITIVA</b> 1 colonia en 5ml salina Añadir 1 gota de suero de caballo estéril /ml salina si se sospecha de <b>Actinobacillus</b> o <b>Pasteurella spp.</b>
<b>INÓCULO</b> en 3ml	1 colonia salina	1 colonia en 5ml salina	3-4 gotas (100µl) por pocillo
<b>INOCULACIÓN</b> (100µl) por	3-4 gotas pocillo	3-4 gotas (100µl) por pocillo Pocillo 1, 2, y 3 más	3-4 gotas (100µl) por pocillo
<b>REVESTIMIENTO</b>	Pocillo 1 – Lisina Pocillo 2 – Ornitina Pocillo 3 – H <sub>2</sub> S	<b>Pocillo 20 – Arabinosa</b> Pocillo 24 – Arginina	<b>Pocillo 1, 2, y 3 más</b> Pocillo 24 – Arginina
<b>TIEMPO DE</b>	18 - 24 horas	18 - 24 horas	48 horas
<b>TEMPERATURA</b> 35 - 37°C	35 - 37°C		35 - 37°C (25°C para <b>Ps. fluorescens</b> )
<b>LECTURA INICIAL</b>	Pocillo 8: Indol - Añadir 2 gotas del reactivo Kovac's. Leer en 2mins.	Igual que para GN A	Igual que para GN A
<b>ADICIÓN</b>	Pocillo 10: VP – Añadir 1 gota del reactivo VPI y 1 gota del reactivo VPII . Leer tras 15-30mins  Pocillo 12: TDA – Añadir 1 gota del reactivo TDA y leer inmediatamente.	Gelatina: Interpretar a las 24 horas  Pocillo 24: Arginina - Amarillo = Negativo Verde/Azul = Positivo	Gelatina – interpretar a las 48 horas  Pocillo 24: Arginina - Amarillo = Negativo Azul = Positivo
<b>LECTURA (Opción Micro Software)</b>			

**Nota: Un círculo Negro alrededor del extremo superior del pocillo indica que el pocillo requiere la adición de aceite mineral antes de la incubación.**

**Un círculo verde alrededor del extremo superior del pocillo indica que el pocillo requiere la adición de reactivos después de la incubación.**

**U  
S  
O**

El sistema Microgen GN-ID utiliza 12 (GN A) o 24 (GN A+B) substratos bioquímicos estandarizados en pocillos para identificar la familia *Enterobacteriaceae* y otros bacilos no-exigentes Gram. negativos (oxidasa negativos y positivos). El kit se ha diseñado solo para uso profesional.

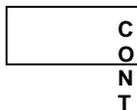
#### **PRINCIPIO DEL TEST**

El sistema Microgen GN-ID comprende dos tiras de micropocillos por separado (GN A y GN B). Cada tira contiene 12 substratos bioquímicos estandarizados que han sido seleccionados en función de un análisis informático muy extenso (1) de las bases de datos publicadas para la identificación de la familia *Enterobacteriaceae* y los microorganismos Gram. negativos oxidasa positivos y negativos no- exigentes más comunes (2,3,4,5). Los substratos deshidratados en cada pocillo se reconstituyen con una suspensión salina del organismo a identificar. Si los substratos son metabolizados por el organismo, se observará un cambio de color durante la incubación o después de la adición de reactivos específicos (ver la Tabla de Referencia de los Substratos). La permutación de los substratos metabolizados se puede interpretar usando el Software Microgen Identification (MID-60) para identificar el organismo analizado.

Las tiras de GN A han sido diseñadas para la identificación de fermentadores de glucosa oxidasa negativos, nitrato positivas que incluyen los géneros más comunes de la familia *Enterobacteriaceae*.

Las tiras GN A y GN B se utilizarán conjuntamente obteniendo un sistema con 24 substratos para identificar bacilos Gram. negativos no-exigentes (oxidasa negativos y positivos) además de todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae* (28 géneros) –ver tabla de datos.

Las tiras de GN B han sido diseñadas para ser usadas conjuntamente con las tiras GN A y no de modo individual.

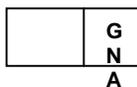


#### **PRESENTACIÓN DEL KIT**

MID-64

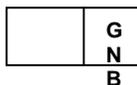
Panel GN-ID A

60 A Test Tiras



Tiras de micropocillos que contienen 12 bioquímicos para la identificación de organismos GN A – ver tabla de datos

Marco soporte para las tiras  
Hoja de resultados  
Instrucciones de Uso



MID-65

Panel GN-ID B

24 B Test Tiras

Tiras de micropocillos que contienen 12 bioquímicos para usar conjuntamente con las tiras GN A para la identificación de los organismos GN B – ver tabla de datos

## Instrucciones de Uso

### Requerimientos adicionales:

- a) Software Microgen Identification (MID-60) – Proporciona la identificación basándose en la probabilidad, el % de probabilidad y el parecido con un análisis de la calidad de la diferenciación. Puede encontrar una definición completa de estos términos en el manual de ayuda del Software.
  - b) Tiras Oxidasa (6)
  - c) Aceite Mineral
  - d) Reactivos VP I y VP II (7)
  - e) Reactivos Nitrato A&B (8)
  - f) Reactivo TDA (9)
  - g) Reactivo Kovac's (10)
  - h) Carta de color para leer los resultados – tamaño A4 disponible en su distribuidor bajo pedido.
  - i) Solución salina estéril 0.85%
  - j) Pipetas estériles y asas bacteriológicas
  - k) Incubador, sin ventilador (35-37°C)
  - l) Medio de movilidad
  - m) Suero de caballo estéril (si se sospecha de la presencia de *Actinobacillus spp.* o *Pasteurella spp.*)
  - n) Bunsen.
- (Los Items b-g se pueden comprar en varios proveedores, incluyendo Microgen Bioproducts Ltd. Alternativamente, el usuario puede hacer sus propias formulaciones)

### CONSEJOS Y PRECAUCIONES

#### Seguridad:

1. Los reactivos proporcionados en este kit son para análisis *in vitro*
2. Se deben tomar las precauciones apropiadas cuando se manipulen o eliminen potenciales patógenos. Después de su uso, eliminar todo el material contaminado en un autoclave, por incineración o inmersión en un desinfectante apropiado como el hipocloruro sódico a concentración final del 3% durante 30 minutos. El residuo líquido ácido se debe neutralizar antes del tratamiento.

#### Procedimiento:

1. El sistema Microgen GN-ID se debe usar siguiendo las instrucciones del kit.
2. Las tiras del test **no** se deben incubar en una estufa CO<sub>2</sub>
3. Debido a su superior demanda en requerimientos nutricionales, *Actinobacillus spp.* y *Pasteurella spp.* requieren la adición de algún tipo de enriquecimiento en el inóculo. Se recomienda la adición de 1 gota de suero de caballo inactivado estéril por mL de solución salina estéril cuando se prepara el inóculo.
4. Si se sospecha de la presencia de *Pseudomonas fluorescens*, las tiras A & B se deben incubar a
  - 2
  - 5
  - °
  - C
  - .
5. La incorrecta incubación, llenado inadecuado de los pocillos, o densidad inadecuada del inóculo pueden derivar en falsos resultados.

### CONSERVACIÓN Y VIDA ÚTIL

Las tiras GN A y GN B son estables si se mantienen sin abrir a 2-8°C hasta la fecha de caducidad indicada. Los sobres abiertos y parcialmente usados se pueden conservar durante 14 días a 2-8°C comprobando que el sobre se sella de nuevo y que contiene la sustancia desecante.

**ESPECIMENES**

Siempre se debe usar un cultivo puro del organismo aislado tras 18-24 horas de incubación. Se debe hacer un test oxidasa del organismo aislado antes de la inoculación de la tira.

**PROCEDIMIENTO - INOCULACIÓN E INCUBACIONES**

1. Hacer un test oxidasa del organismo aislado. Los organismos oxidasa positivos solo se pueden identificar inoculando tanto las tiras del GN A como GN B.
2. Emulsificar una única colonia obtenida de un cultivo de 18-24 horas en 3 mL de solución salina estéril 0.85% para la tira GN A. Si se van a inocular ambas tiras, GN A y GN B, la colonia se debe emulsificar en 3-5mL de solución salina estéril 0.85%. Mezclar bien.
3. Quitar la lamina adhesiva que sella los pocillos cuidadosamente. **NO tirar la tira adhesiva, que a posteriori se volverá a necesitar.**
4. Usando una pipeta pasteur estéril, añadir 3-4 gotas (aproximadamente 100µL) de la suspensión bacteriana a cada pocillo de la tira(s).
5. Para comprobar la pureza del inóculo, transferir 1 gota de la suspensión bacteriana a una placa de medio no-selectivo. Incubar la placa aeróbicamente a 35-37°C durante 18-24 horas.
6. Después de la inoculación, revestir los pocillos 1,2 y 3 (numerar la tira GN A empezando por el final de la etiqueta) y pocillos 20 y 24 (tira GN B – el pocillo 13 es al final de la etiqueta) con 3-4 gotas de aceite mineral. **(NO añadir aceite en el pocillo 20 si el organismo aislado es oxidasa positivo).** Estos pocillos están marcados con un círculo Negro alrededor para facilitar su identificación.
7. Sellar la parte superior de la tira(s) con la cinta adhesiva que se había retirado antes e incubar a 35-37°C. **Asegurarse que los “agujeros” de la cinta adhesiva están sobre los pocillos 7, 11 y 12 en la tira GN A strip y sobre el pocillo 14 en la tira GN B.**
8. Las tiras GN A y GN B se leerán después de 18-24 horas de incubación para las *Enterobacteriaceae*, y tras 48 horas para los aislados oxidasa positivos.

**PROCEDIMIENTO – LECTURA Y ADICIÓN DE****REACTIVOS Tira GN A**

1. Quitar la cinta adhesiva y anotar todas las reacciones positivas con la ayuda de la carta de color (incluida). Anotar los resultados en la hoja de resultados proporcionada.
2. Añadir los reactivos apropiados a los siguientes micropocillos:
  - a) Añadir 2 gotas de reactivo Kovac's al pocillo 8. Leer y anotar los resultados después de 60 segundos. Formación de color rojo indica un resultado positivo.
  - b) Añadir 1 gota del reactivo VP I y 1 gota del reactivo VP II al pocillo 10 y leer y anotar los resultados tras 15-30 minutos. La formación de un color rosa / rojo indica un resultado positivo.
  - c) Añadir 1 gota del reactivo TDA al pocillo 12 y leer después de 60 segundos. La formación de un color rojo cereza indica un resultado positivo.
3. Hacer el test de reducción de nitrato al pocillo 7 después de leer y anotar el resultado del test ONPG. Añadir 1 gota del reactivo Nitrato A y una gota del reactivo Nitrato B al pocillo y leer después de 60 segundos. El desarrollo de color rojo indica que el nitrato ha sido reducido a nitrito. Si el pocillo 7 se mantiene amarillo o incoloro después de la adición de los reactivos nitrato, añadir una pequeña cantidad de polvo de zinc. Esto indicará si el nitrato ha sido completamente reducido a nitrógeno gas. Ej. Después de la adición del Nitrato A + B:
  - Rojo = Positivo
  - Incoloro / amarillo = Negativo

Después de la adición de polvo de zinc: Incoloro / amarillo = Positivo

Rojo = Negativo
4. Anotar estos resultados adicionales en la hoja de resultados proporcionada.

**Tira  
GN B**

1. Quitar la cinta adhesiva y anotar todas las reacciones positivas con la ayuda de la carta de color.

Anotar los resultados en la hoja de resultados proporcionada.

2. Leer los pocillos específicos según se indica:

a) El pocillo de gelatina (13) se debe leer tras 18-24 horas para *Enterobacteriaceae* y tras 48 horas para los aislados oxidasa positivos. Si se observan partículas negras a través del pocillo es indicativo de un resultado positivo de licuefacción de la gelatina.

b) El pocillo de la arginina se interpreta diferente tras 24 y 48 horas de incubación:  
24 horas (*Enterobacteriaceae*)  
Amarillo = Negativo  
Verde/Azul = Positivo

48 horas (Organismos Oxidasa positivos) Amarillo / verde =  
Negativo  
Azul = Positivo

**IDENTIFICACIÓN**

En la hoja de resultados de Microgen GN-ID A+B, los sustratos se han organizado en tripletes (sets de 3 reacciones) y se ha asignado un valor numérico a cada sustrato (1, 2 o 4). La suma de las reacciones positivas para cada triplete da lugar a un único dígito, el Perfil numérico, que se utilizará para determinar la identidad del organismo aislado. El Perfil numérico se introduce en el Software Microgen Identification System (MID-60), que genera un informe de los cinco microorganismos más parecidos en una base de datos selectiva.

El software proporciona una identificación basada en probabilidad, en % de probabilidad y en el parecido con un análisis de la calidad de la diferenciación. La definición completa de estos términos y la explicación de su utilidad e interpretación la encontrará en el manual de ayuda proporcionado con el software.

re.

Nota: Para organismos oxidasa positivos (miscelánea de bacilos Gram. negativos):

- Considerar las reacciones débiles como negativos
- Los resultados para la oxidasa, la reducción de nitrato y la movilidad se deben incluir para dar lugar a un Perfil numérico de 9 dígitos

**Ejemplo de Hoja de Resultados**

MICROGEN GN-ID A+B PANEL REPORT FORM		GN A wells												GN B wells														
Lab. No. <u>3341</u>		Specimen Type: <u>CHEESE SANDWICH</u>												Date: <u>28<sup>TH</sup> JANUARY 2002</u>														
Well Number	Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P.	Citrate	TDA	Gelatine	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine	
Reaction				++	-		++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	+	-	-	-	-	-	
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	
Sum of Positive Reactions				6			7			6			0			0			7		6			0				
Profile No: <u>67600760</u>	Final Identification: <u>E. coli</u>																											

WF6125/01/12

El Sistema Microgen GN-ID que utiliza 12 (GN A) o 24 (GN A+B) substratos bioquímicos estandarizados en pocillos para identificar la familia *Enterobacteriaceae* y otros bacilos no-exigentes Gram. Negativos (oxidasa negativa y positiva).

**Colour chart/Farbtafel/Tableau 'de couleurs**

**Microgen™ GN A ID**

WELL/NAPFCHEN /GODET	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	7	
Reaction	Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	O.N.P.G.	Indole	Urease	V.P.	Citrate	T.D.A.	Nitrate	
Negative														
Positive														

**Microgen™ GN B ID**

WELL/NAPFCHEN /GODET	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	12	
Reaction	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine 24hrs	Arginine 48hrs	
Negative														
Positive														

CAUTION: Keep out of direct sunlight. Due to laminate discolouration and paper ageing, the colours on this chart will change.

These colours are provided as general guide to the range of test colours.

**Legend:**

- Appropriate reagents to be added prior to reading.
- Overlaid with sterile mineral oil.
- Not overlaid with oil for oxidase positive organism.



Microgen Bioproducts Limited, 1 Admiralty Way, Camberley Surrey GU15 3DT UK



Tabla de referencia de los substratos

Pocillo	Reacción	Descripción	Positiva	Negativa
1	Lisina	La Lisina decarboxilasa – al azul de Bromotimol pasa de a verde/azul, indicando la producción de la amina cadaverina.	Verde / Azul	Amarillo
2	Ornitina	La Ornitina decarboxilasa – el azul de Bromotimol se mantiene azul indicando la producción de la amina putrescina.	Azul	Amarillo / Verde
3	H <sub>2</sub> S	Producción de H <sub>2</sub> S – el Tiosulfato se reduce a H <sub>2</sub> S que reacciona con las sales de hierro produciendo un precipitado negro.	Marrón/ Negro	Color paja
4	Glucosa	Fermentación – el azul de Bromotimol cambia de azul a amarillo como resultado de la producción de ácido a partir de la fermentación de carbohidratos.	Amarillo	Azul / Verde
5	Manitol			
6	Xilosa			
7	ONPG	Hidrólisis – la hidrólisis de la ONPG por la B-galactosidasa da lugar a la producción de amarillo de orto-nitrofenol.	Amarillo	Incoloro
8	Indol	El indol se produce a partir de triptófano y da lugar a un complejo rosa / rojo cuando se añade el reactivo de Kovac's.	Rosa / Rojo	Incoloro
9	Ureasa	La hidrólisis de la urea da lugar a la formación de amoníaco que provoca un incremento de pH que hace virar el rojo de fenol de amarillo a rosa / rojo.	Rosa muy profundo	De color paja a rosa salmón pálido
10	VP	La producción de acetoina a partir de glucosa se detecta por la formación de un complejo rosa / rojo después de la adición de alfa naftol y creatina en presencia de KOH.	Rosa profundo / Rojo	Incoloro a rosa pálido
11	Citrato	La utilización de citrato (solo como fuente de carbono) da lugar a un incremento de pH que proporciona un cambio de color del azul de bromotimol de verde a azul.	Azul	Amarillo/ Verde pálido
12	TDA	El ácido Indolpirúvico se produce a partir de triptófano por la triptófano deaminasa dando un color rojo cereza cuando se añaden los iones de hierro. Los microorganismos indolo positivos pueden dar coloración marrón – en caso de resultado negativo.	Rojo cereza	Color paja
13	Gelatina	Los enzimas proteolíticos licuan la gelatina dando lugar a partículas negras que quedarán dispersadas por el pocillo.	Negro	Incoloro
14	Malonato	Cuando el malonato sódico es la única fuente de carbono se inhibe la conversión del ácido succínico a ácido fumárico. Un microorganismo incapaz de usar ese substrato da lugar a la acumulación de ácido succínico y el microorganismo no crece. Una reacción positiva es resultado de la utilización de malonato sódico a la vez que el sulfato de amonio se utiliza como fuente de nitrógeno dando lugar a hidróxido sódico que aumentará la alcalinidad dando color azul.	Azul	Verde
15	Inositol	Fermentación – el azul de Bromotimol cambia de azul a amarillo como resultado de la producción de ácido por la fermentación de carbohidratos.	Amarillo	Azul
16	Sorbitol			
17	Ramnosa			
18	Sucrosa			
19	Lactosa			
20	Arabinosa			
21	Adonitol			
22	Rafinosa			
23	Salicina			
24	Arginina	La Arginina para a ornitina, amoníaco y CO <sub>2</sub> por la acción de la arginina dihidrolasa dando lugar a un incremento del pH y a un cambio de color del azul de bromotimol de verde a azul. A las 48 horas las reacciones verdes son negativas.	Verde/ Azul azul	Amarillo Amarillo / Verde

Fuente: (Sistema microgen gn id 2015)

