



EDITORIAL
UNIÓN CIENTÍFICA

IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS

GLEBE
e-ISSN:3103-1234

VOL 1(2) 2025
SEPTIEMBRE - DICIEMBRE 2025

IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS

DARWIN ALBERTO NÚÑEZ TORRES

EDISON RIVELIÑO RAMÓN CURAY

FRANZ PATRICIO VERDEZOTO MENDOZA

JOSÉ LUIS ALTUNA VÁSQUEZ



EDITORIAL
UNIÓN CIENTÍFICA

AUTORES INVESTIGADORES

Darwin Alberto Núñez Torres 

Universidad Estatal de Bolívar - Ecuador.

Edison Rivelino Ramón Curay 

Universidad Estatal de Bolívar - Ecuador.

Franz Patricio Verdezoto Mendoza 

Universidad Estatal de Bolívar - Ecuador.

José Luis Altuna Vásquez 

Universidad Estatal de Bolívar - Ecuador.

Copyright, 2025

Editorial Unión Científica

Autores:

Darwin Alberto Núñez Torres 

Edison Rivieliño Ramón Curay 

Franz Patricio Verdezoto Mendoza 

José Luis Altuna Vásquez 

Título

Identificación de microorganismos patógenos en productos hortofrutícolas

ISBN

978-9942-7391-5-5

ISBN: 978-9942-7391-5-5



1ra Edición (On-line)

Darwin Alberto Núñez Torres; Edison Rivieliño Ramón Curay; Franz Patricio Verdezoto Mendoza; José Luis Altuna Vásquez.

Estrategias de fortalecimiento en cooperativas para una gestión competitiva y sostenible

Editorial: Editorial Unión Científica EUC, Ambato - Ecuador 2025

ISBN: 978-9942-7391-5-5

Serie: Glebe

E-ISSN: 3103-1234

Área: Biotecnología

Páginas: 101



Licencia Creative Commons BY-NC-SA (Atribución/Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual) 4.0 Internacional.

Título: Identificación de microorganismos patógenos en productos hortofrutícolas

Institución que respalda: Universidad Estatal de Bolívar Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente.

Grupo de investigación: Grupo agropecuario de proteínas bioactivas y péptidos, Agroprobiopep. GI-02-2017, RCU-010-2022-138.

Dominios, RCU-003-2025-036: Bio aprovechamiento agropecuario, recursos naturales y desarrollo biotecnológico.

Línea de investigación e innovación, RCU-003-2025-036: Biotecnología vegetal, animal, de los alimentos y ambiental.

Sub-línea de investigación e innovación, RCU-003-2025-036: Desarrollo y evaluación de alimentos funcionales.

Campo amplio: Ingeniería, industria y construcción, 07-a.

Campo específico: Industria y producción, 2-7a.

Campo detallado: Procesamiento de alimentos, 1-27a.

Proyecto de investigación: Identificación de microorganismos patógenos mediante la técnica m-pcr (reacción en cadena de la polimerasa) en agua de consumo humano y productos hortofrutícolas de los mercados de guaranda. PIV-3-2023, RCU-011-2024-152.

Proceso de revisión: *double blind*.

ISBN: 978-9942-7391-5-5

DOI: <https://doi.org/10.63804/libroseuc.4>

Primera versión disponible en línea: Septiembre de 2025.

EDITOR DE SECCIÓN

Daniel Arias Toro, PhD.
Universidad Técnica de Babahoyo. Ecuador
dariast@utb.edu.ec

COMITÉ CIENTÍFICO

Cristian Vacacela Gómez, PhD.
INFN-Laboratori Nazionali di Frascati, Frascati, Italia
cristianisaac.vacacelagomez@fis.unical.it

Óscar Alí Corona Salazar, PhD.
Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra. Campus Santiago. República Dominicana.
oa.corona@ce.pucmm.edu.do

Miguel Israel Bennasar García, PhD.
Instituto Superior de Formación Docente Salomé Ureña. República Dominicana
miguel.bennasar@isfodosu.edu.do

Helen Goitia Semeco, PhD.
Universidad Nacional de La Plata. Argentina
hgoitia@gmail.com

Diana Carolina Coello Fiallos, PhD.
Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Ecuador
diana.coello@esPOCH.edu.ec

Ruth Mariela Álvarez Escalona, PhD.
Universidad Experimental del Táchira. Venezuela
rmaalvarez@unet.edu.ve

María Raquel González Legendre, MSc.
CEO Ciencia por la verdad. Ecuador
contacto@cienciaporlaverdad.com

Esquilo Pericles Morán Olmedo, MSc.
Arquitecto. Maestría en Ciencias de Arquitectura

Septiembre 2025 – Editorial Unión Científica, EUC

Copyright © Editorial Unión Científica, EUC

Copyright del texto © 2025 de Autores

<https://libros.editorialunioncientifica.com>

IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS



EDITORIAL
UNIÓN CIENTÍFICA

Las obras publicadas por la Editorial Unión Científica han sido sometidas a un proceso de evaluación externa mediante arbitraje por pares bajo la modalidad de doble ciego, conforme a los estándares internacionales de revisión científica.

La Editorial Unión Científica se adhiere a principios éticos de publicación y revisión basados en las directrices del Committee on Publication Ethics (COPE).

IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	19
METODOLOGÍA	42
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
IMPLICACIONES	74
CONCLUSIONES	75
RECOMENDACIONES	76
BIBLIOGRAFÍA	78
ANEXOS	85
BIOGRAFÍA DE LOS AUTORES	97

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. TAXONOMÍA DEL BRÓCOLI (<i>BRASSICA OLERACEA</i> VAR. <i>ITALICA</i>) -----	21
TABLA 2. TABLA NUTRICIONAL DEL BRÓCOLI (<i>BRASSICA OLERACEA</i> VAR. <i>ITALICA</i>) -----	22
TABLA 3. TAXONOMÍA DE LA LECHUGA (<i>LACTUCA SATIVA</i>) -----	23
TABLA 4. TABLA NUTRICIONAL DE LA LECHUGA (<i>LACTUCA SATIVA</i>) -----	24
TABLA 5. TAXONOMÍA DE LA UVA (<i>VITIS VINÍFERA</i>) -----	24
TABLA 6. TABLA NUTRICIONAL DE LA UVA (<i>VITIS VINÍFERA</i>) -----	25
TABLA 7. TAXONOMÍA DE LA MORA (<i>RUBUS GLAUCUS</i>) -----	26
TABLA 8. TABLA NUTRICIONAL DE LA MORA (<i>RUBUS GLAUCUS</i>) -----	27
TABLA 9. PROVINCIAS DE PROCEDENCIA DE LOS PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS -----	29
TABLA 10. LÍMITES DE CONTAMINACIÓN DE BACTERIA SEGÚN LA NORMATIVA NTE INEN 1334-1 -	31
TABLA 11. TAXONOMÍA DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> (<i>BACTERIUM COLI COMMUNE</i>) -----	32
TABLA 12. TAXONOMÍA DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> -----	32
TABLA 13. TAXONOMÍA DE LA <i>SALMONELLA</i> (<i>SALMONELLA SPP.</i>) -----	33
TABLA 14. UTILIDAD DE CADA UNA DE LAS PRUEBAS. -----	38
TABLA 15. LOCALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN -----	42
TABLA 16. SITUACIÓN GEOGRÁFICA Y CLIMÁTICA -----	43
TABLA 17. FACTORES DE ESTUDIO Y SUS RESPECTIVOS NIVELES. -----	44
TABLA 18. TRATAMIENTOS -----	44
TABLA 19. CARACTERÍSTICAS DEL DISEÑO FACTORIAL $A \times B$ -----	45
TABLA 20. MODELO DE ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA -----	46
TABLA 21. CODIFICACIÓN, IDENTIFICACIÓN REGISTRO DE LAS MUESTRAS Y ORIGEN. -----	47
TABLA 22. IDENTIFICACIÓN DE CADA TOMA DE MUESTRAS EN EL MERCADO A. -----	48
TABLA 23. IDENTIFICACIÓN DE CADA TOMA DE MUESTRAS EN EL MERCADO B. -----	48
TABLA 24. IDENTIFICACIÓN DE CADA TOMA DE MUESTRAS EN EL MERCADO C -----	48
TABLA 25. IDENTIFICACIÓN DE CADA TOMA DE MUESTRAS EN EL MERCADO D. -----	48

TABLA 26. IDENTIFICACIÓN DE CADA TOMA DE MUESTRAS DEL MERCADO E.	48
TABLA 27. IDENTIFICACIÓN DE CADA TOMA DE MUESTRAS DEL MERCADO F.	49
TABLA 28. CEBADORES ESPECÍFICOS UTILIZADOS EN ESTA INVESTIGACIÓN.	53
TABLA 29. CONDICIONES PARA EL PROCESO DE PCR PARA LISTERIA MONOCYTOGENES, ESCHERICHIA COLI Y SALMONELLA SPP.	53
TABLA 30. REACTIVOS DEL TAE PARA PCR, EN LISTERIA MONOCYTOGENES, ESCHERICHIA COLI, SALMONELLA SPP	54
TABLA 31. RESULTADOS DE LA TOMA DE MUESTRAS DE LOS MERCADOS DEL CANTÓN GUARANDA	55
TABLA 32. VALORES OBTENIDOS MEDIANTE RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS EN LISTERIA MONOCYTOGENES.	57
TABLA 33. VALORES OBTENIDOS MEDIANTE RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i>.	59
TABLA 34. VALORES OBTENIDOS MEDIANTE RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE SALMONELLA SPP.	60
TABLA 35. RESULTADOS DE POSITIVOS PARA PCR DE LISTERIA MONOCYTOGENES	61
TABLA 36. RESULTADOS DE POSITIVOS PARA PCR DE ESCHERICHIA COLI	62
TABLA 37. RESULTADOS DE POSITIVOS PARA PCR DE SALMONELLA SPP.	63
TABLA 38. CONCENTRACIÓN DE ADN MEDIANTE ESPECTROFOTÓMETRO NANODROP PARA LISTERIA MONOCYTOGENES	64
TABLA 39. CONCENTRACIÓN DE ADN MEDIANTE ESPECTROFOTÓMETRO NANODROP PARA ESCHERICHIA COLI.	64
TABLA 40. CONCENTRACIÓN DE ADN MEDIANTE ESPECTROFOTÓMETRO NANODROP PARA SALMONELLA.	65
TABLA 41. CONCENTRACIONES PREPARADAS.	66
TABLA 42. CONCENTRACIONES DE ADN PARA EL ANÁLISIS DE ANOVA.	66
TABLA 43. ANÁLISIS DE VARIANZA MEDIANTE UN ANOVA MULTIFACTORIAL	71
TABLA 44. ANÁLISIS DE MEDIAS MEDIANTE UN ANOVA MULTIFACTORIAL.	72

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. BRÓCOLI (<i>BRASSICA OLERACEA</i> VAR. ITALICA).-----	22
FIGURA 2. LECHUGA (<i>LACTUCA SATIVA</i>). -----	23
FIGURA 3. MUESTRAS DE UVA (<i>VITIS VINÍFERA</i>). -----	25
FIGURA 4. MORA (<i>RUBUS GLAUCUS</i>). -----	26
FIGURA 5. MAPA DE GUARANDA CON SUS RESPECTIVAS ZONAS DE MUESTREO. -----	34
FIGURA 6. UBICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN TOMADO DE GOOGLE MAPS (2025).-----	42
FIGURA 7. RESULTADOS DE ELECTROFORESIS DESPUÉS DE REALIZAR PCR CON LOS AISLADOS DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> .-----	67
FIGURA 8. RESULTADOS DE ELECTROFORESIS DESPUÉS DE REALIZAR PCR CON LOS AISLADOS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> . -----	68
FIGURA 9. RESULTADOS DE ELECTROFORESIS DESPUÉS DE REALIZAR PCR CON LOS AISLADOS DE <i>SALMONELLA SPP.</i> -----	69
FIGURA 10. SENSIBILIDAD DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> . -----	70
FIGURA 11. SENSIBILIDAD EN <i>ESCHERICHIA COLI</i> . -----	70
FIGURA 12. SENSIBILIDAD EN <i>SALMONELLA SPP.</i> -----	71
FIGURA 13. ANÁLISIS DE MEDIAS CON 95% DE FISHER LSD.-----	73

PRÓLOGO

Uno de los principios fundamentales de la salud pública global es la seguridad alimentaria. La demanda de alimentos frescos, fácilmente accesibles y ricos en nutrientes está en aumento en los países modernos, lo que hace aún más importante garantizar que estos productos estén libres de contaminantes que puedan poner en peligro la salud de los consumidores. En este sentido, investigar los microorganismos nocivos presentes en alimentos de consumo masivo, como frutas y verduras, no es solo una tarea científica, sino un compromiso con el bienestar de toda la sociedad.

En respuesta a esta problemática, el libro *“Identificación de microorganismos patógenos en productos hortofrutícolas”* destaca por su rigor y relevancia. Basado en una técnica experimental y en un minucioso análisis de muestras recolectadas en mercados locales del cantón Guaranda, en Ecuador, los autores presentan un estudio de notable importancia técnica y social. La investigación demuestra con claridad los peligros para la salud pública al documentar, con evidencia microbiológica y molecular, la presencia de patógenos como *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* en productos hortofrutícolas.

Además de señalar las fallas en la cadena de producción y distribución de alimentos frescos, este trabajo muestra la urgente necesidad de implementar mejores prácticas de manejo poscosecha, higiene y vigilancia microbiológica. Sus páginas integran conocimientos en salud pública, biotecnología y microbiología con una perspectiva territorial que reconoce la diversidad de los entornos rurales y urbanos en el núcleo andino del Ecuador.

Esta obra será un recurso para los lectores que buscan reflexionar, analizar y tomar decisiones en contextos académicos y profesionales. Constituye una contribución significativa para la industria agroalimentaria, autoridades sanitarias, instituciones académicas y, especialmente, para quienes entienden que la seguridad alimentaria es una responsabilidad compartida y un derecho inalienable.

Es un placer para mí, como editor, presentar este libro, que refleja el esfuerzo, compromiso y visión científica de sus autores. Espero que este trabajo estimule nuevas investigaciones, oriente las políticas públicas nacionales y locales y, lo más importante, contribuya a la creación de sistemas alimentarios más seguros, sostenibles y justos.

*Ing. Carlos Luis Vásquez Freytez, PhD.
Editor en jefe.
Editorial Unión Científica, EUC.*

RESUMEN

La creciente demanda de productos hortícolas frescos ha incrementado las preocupaciones sobre la presencia de bacterias dañinas que ponen en riesgo la inocuidad alimentaria. En Ecuador, especialmente en el cantón Guaranda, la calidad microbiológica de las frutas y verduras comercializadas no es controlada de manera eficaz. Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), causadas por bacterias como *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*, representan una grave amenaza para la salud pública, especialmente en grupos vulnerables. En este contexto, el presente estudio empleó métodos microbiológicos y moleculares para detectar la presencia de estos patógenos en productos hortícolas de consumo frecuente. Para el estudio se recolectaron muestras de lechuga (*Lactuca sativa*), brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*), moras (*Rubus glaucus*) y uvas (*Vitis vinifera*) en seis mercados del cantón Guaranda. Se emplearon procedimientos microbiológicos, ensayos bioquímicos y PCR convencional. Se utilizó un diseño factorial A×B con tres niveles de dilución y tres tipos de patógenos, y el análisis estadístico se realizó mediante ANOVA multifactorial. En las muestras analizadas se detectaron diferentes concentraciones de cepas de *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* y *E. coli*. La presencia de estos patógenos fue confirmada mediante la técnica de PCR tradicional. Los resultados del ANOVA mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tipos de microorganismos y los niveles de dilución, lo que sugiere que los niveles de contaminación varían según el producto y el mercado de origen. Se encontró que algunas frutas y hortalizas analizadas no cumplen con los límites microbiológicos establecidos por la normativa ecuatoriana NTE INEN 1334-1. La prevalencia de microorganismos nocivos en productos hortícolas refleja deficiencias en los procedimientos de higiene poscosecha y en la cadena de distribución. Para reducir la incidencia de ETAs, se recomienda la aplicación de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y la implementación de programas de monitoreo continuo. Estos resultados muestran la necesidad de mejorar los sistemas de vigilancia microbiológica de los alimentos frescos en Guaranda. La identificación molecular de patógenos puede servir como base para la toma de decisiones en políticas públicas orientadas a la protección de la salud del consumidor.

Palabras Clave: agricultura; alimentos; análisis microbiológico; enfermedades transmitidas por alimentos; seguridad alimentaria.

ABSTRACT

The growing demand for fresh horticultural products has increased concerns about the presence of harmful bacteria that jeopardize food safety. In Ecuador, particularly in the Guaranda canton, the microbiological quality of marketed fruits and vegetables is not effectively controlled. Foodborne illnesses (FBIs), caused by bacteria such as *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*, pose a serious threat to public health, especially among vulnerable groups. In this context, the present study employed microbiological and molecular methods to detect the presence of these pathogens in commonly consumed horticultural products. Samples of lettuce (*Lactuca sativa*), broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*), blackberries (*Rubus glaucus*), and grapes (*Vitis vinifera*) were collected from six markets in the Guaranda canton. Microbiological procedures, biochemical assays, and conventional PCR were applied. A factorial A×B design was used, with three dilution levels and three types of pathogens, and statistical analysis was carried out using multifactorial ANOVA. Different concentrations of *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, and *E. coli* strains were detected in the analyzed samples. The presence of these pathogens was confirmed using conventional PCR techniques. The ANOVA results showed statistically significant differences between microorganism types and dilution levels, suggesting that contamination levels vary depending on the product and the market of origin. Some of the analyzed fruits and vegetables were found to exceed the microbiological limits established by Ecuadorian regulation NTE INEN 1334-1. The prevalence of harmful microorganisms in horticultural products reflects deficiencies in post-harvest hygiene procedures and in the distribution chain. To reduce the incidence of FBIs, the implementation of Good Manufacturing Practices (GMP) and continuous monitoring programs is recommended. These findings highlight the need to improve microbiological surveillance systems for fresh food in Guaranda. The molecular identification of pathogens can serve as a foundation for public policy decision-making aimed at protecting consumer health.

Keywords: agriculture; food; microbiological analysis; foodborne illnesses; food safety.

INTRODUCCIÓN

En el mundo, las enfermedades relacionadas por una inadecuada poscosecha, generan una contaminación cruzada dentro de las redes de distribución que van directas al consumidor. La FAO es una organización que promueve una seguridad alimentaria y consumo sostenible, donde hace relevancia que un escaso tratamiento en la calidad tanto de las frutas como de las hortalizas conlleva a enfermedades de afección directa a la salud de la población [1].

Este trabajo se basa en la necesidad de obtener información respecto a las condiciones en las cuales se venden ciertas frutas de consumo generalizado en los mercados del cantón Guaranda, considerando muestras de cada uno de los seis establecimientos para la identificación de patógenos.

Se tomó como principales frutas a examinar aquellas que son más comercializadas en Guaranda, que incluyeron uva (*Vitis vinifera*) y mora (*Rubus glaucus*); en hortalizas lechuga (*Lactuca sativa*) y brócoli (*Brassica oleracea var. Itálica*). Los patógenos a evaluar fueron *Escherichia coli*, *Listeria* y *Salmonella* mediante análisis microbiológicos.

Dentro de Ecuador existen 180 hectáreas de cultivos, donde se tienen siembras tanto en invernadero como al aire libre, siendo Tungurahua la provincia más relevante debido a que genera el 60% de toda la producción en el país. En varios mercados a nivel nacional, se han identificado problemas relacionados con la poscosecha tanto en frutas como hortalizas, causando una limitación en la oferta de productos de calidad. En especial, la falta de control en la etapa de poscosecha de frutales sumado a un trabajo manual sin manuales de buenas prácticas y en ciertas ocasiones sin tomar en cuenta medidas de su conservación, generan que los frutos lleguen a los mercados en mal estado [2].

En base a esto, han aparecido diversos estudios en frutales donde se ha propuesto distintas alternativas como son el almacenamiento, embalaje, índice de la madurez para una buena conservación de productos en la poscosecha, todo ello, reducen la pérdida de agua y con esto permite un control respiratorio para retrasar el envejecimiento de todos los productos, lo cual redundará en su calidad y su respectivo valor nutritivo [3], [4].

Las enfermedades causadas por la transmisión alimentaria se producen mediante una contaminación por parte de los alimentos, generalmente se puede encontrar en las etapas de recolección, distribución y expendio de los productos. Se estima que diversas enfermedades son provocadas por la consumición de estos alimentos que están infectados por virus y gérmenes

[5], [6].

Las enfermedades causadas por la transmisión alimentaria tienen una diversa variedad, desde diarrea hasta en algunos casos cáncer, donde la mayor parte empiezan con problemas gastrointestinales como también la producción de sistemas neurológicos, inmunológicos y ginecológicos. Estas enfermedades que llegan a causar diarrea son consideradas como una complicación relevante en distintas partes del mundo, aunque esta incidencia se da más sobre países con bajos y medianos ingresos y más que todo en los menos de 5 años [7].

El consumo de frutas en la actualidad debe tener una calidad esencial tanto por salud como por tranquilidad en la población, en este caso del cantón Guaranda, la posibilidad de patógenos como *Escherichia coli* (*E. coli*), *Listeria* y *Salmonella* en las frutas de consumición masiva manifiesta una amenaza hacia los consumidores [8].

Por medio de un estudio desarrollado en Ecuador por parte del Ministerio de Salud Pública menciona que, las ETAS (Enfermedades Transmitidas por Alimentos) provocan varios dolores y corresponden a un inconveniente hacia la salud de las personas en el mundo, en 2019 en sectores del Ecuador aparecieron enfermedades que se transmitieron mediante el agua y productos alimenticios, observándose casos con un decremento del 54 % en relación con el 2020. Además, en este año se registraron 5.890 casos por intoxicaciones alimentarias bacterianas [9].

En los últimos años se registra un total de 20 brotes de las enfermedades transmitidas por un mal manejo en las frutas, en la provincia de Bolívar, se ha reportado que un 17 % de la población padece de enfermedades gastrointestinales; además se ha descubierto que la Salmonelosis es una enfermedad presente a nivel mundial, a nivel del país y a nivel local, esta enfermedad peligrosa puede adquirirse debido a la falta de higiene en la cocina. La salmonella, una bacteria presente en alimentos como huevos, carnes, frutas y verduras crudas, puede provocar una infección gastrointestinal grave [9].

Dentro de los síntomas provocados por la salmonelosis se incluyen dolores estomacales, diarrea, fiebre y náuseas. Esta enfermedad es especialmente peligrosa en niños, adultos mayores, también puede ser mortal en personas con sistemas inmunes débiles. Estos brotes de enfermedad se dan por una contaminación de microorganismos o bacterias infecciosas como: *Escherichia coli*, *Listeria* y *Salmonella* [10].

Para minimizar este problema, es necesario desarrollar técnicas que puedan identificar varios patógenos para producir fruta apta para el consumo de las personas, donde se tome en consideración el uso de técnicas de cultivo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en medios especiales para identificar con más precisión los patógenos que se encuentren en frutas y hortalizas [11].

Con lo antes mencionado, el presente trabajo tiene el objetivo detectar, a través de métodos microbiológicos y moleculares, la presencia y ausencia de *Escherichia coli*, *Listeria* y *Salmonella* en muestras de lechuga (*Lactuca sativa*), brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*), moras (*Rubus*

glaucus) y uvas (*Vitis vinifera*) recolectadas en seis mercados del cantón Guaranda, provincia Bolívar Ecuador.

Hortalizas analizadas

Brócoli (*Brassica oleracea var. italica*).

El brócoli se originó en el Mediterráneo, por parte de la unión natural entre plantas de la familia *Brassica*, realizada al norte de Italia (siglo VI a.C.); en el Imperio Romano se consideraba al brócoli como un producto alimenticio muy importante por destacar con sus características buenas para la salud [12] a highly valued Brassica vegetable, is renowned for its rich content of bioactive substances, including glucosinolates, phenolic compounds, vitamins, and essential minerals. Glucosinolates (GSLs). En Estados Unidos se introdujo por primera vez a causa de inmigrantes del sur de Italia, donde se volvió popular, por las características beneficiosas que tiene hacia el bienestar de las personas y por aquello se lo considera como un producto esencial para la alimentación sana moderna [13].

De acuerdo con lo establecido con la investigación realizada en la Tabla 1 se muestra la taxonomía del brócoli donde consta su reino, división, clase, orden, familia, especie, subespecie y su género.

Tabla 1. Taxonomía del Brócoli (*Brassica oleracea var. italica*)

Taxonomía	
Reino	Plantae
División	Angiospermas, magnoliophita
Clase	Dicotyledon Magnoliopsida
Orden	Crucíferas (<i>Brassicales</i>)
Familia	Cruciferae (<i>Brassicaceae</i>)
Género	<i>Brassica</i> (<i>Brassica</i>)
Especie	Repollo (<i>B. oleracea</i>)
Subespecie	Coliflor

Es una planta herbácea con un tallo robusto, el cual sostiene una inflorescencia comestible de 10 a 20 cm de diámetro, con un peso promedio de 300 a 500 gramos. Sus hojas grandes y verdes miden entre 20 y 40 cm de longitud, la planta llega a tener un alto desde 50 hasta 90 cm. El sistema radicular es superficial, extendiéndose lateralmente en el suelo hasta unos 30 a 40 cm de profundidad [14].

La Tabla 2 indica el valor nutricional del brócoli por cada 100gr de porción.

Tabla 2. Tabla nutricional del Brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*)

Compuestos	Cantidad por 100 gr de porción
Calorías	34 calorías (142 kJ)
Carbohidratos	6,6 g
Agua	89,3 g
Grasas	3,1 (omega 3 y omega 6)
Fibra	2,6 g
Azúcar	1,7 g
Proteínas	2,8 g
Vitamina A	623 IU
Vitamina C	89,2 mg
Vitamina K	102 µg
Folatos	63 µg
Potasio	316 mg
Hierro	0,7 mg
Calcio	47 mg
Magnesio	21 mg

En la Figura 1 se muestra una imagen de esta hortaliza.



Figura 1. Brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*).

Lechuga (*Lactuca sativa*).

La lechuga (*Lactuca sativa*) es considerada una planta anual, la cual tiene origen en el sur de Europa, tuvo su expansión hacia todo el resto del continente durante la época romana y se utilizaba para la medicina en lugares como Roma, Egipto y más. En la actualidad se consume en diversas partes del mundo y se considera como la verdura con hoja más extendida, debido a que tiene un alto valor nutritivo en vitamina C, sales minerales para un rápida absorción y hierro [15].

En la Tabla 3 se muestra la taxonomía de la lechuga donde consta cada una de sus especificaciones [16].

Tabla 3. Taxonomía de la Lechuga (*Lactuca sativa*)

Taxonomía	
Reino	Plantae
División	Macrophylophita
Subdivisión	Magnoliophytina
Clase	Paenopsida
Orden	Asterales
Género	Lactuca
Tribu	Lactuceae
Especie	Sativa
Nombre científico	<i>Lactuca sativa</i>

La lechuga presenta una raíz pivotante corta, con pequeñas ramificaciones. El tallo es corto y cilíndrico, sin ramificación hasta que la planta pasa su estado óptimo de cosecha. Las hojas tienen forma y borde distintos según de la variedad, el color puede ser entre verde, rojizo, púrpura o morado. Sus flores se encuentran agrupadas dispuestos en racimos, los cuales están comprendidos mediante 10 – 25 floretes y contienen un receptáculo plano que tiene [17]. En la figura 2 se muestra una imagen.



Figura 2. Lechuga (*Lactuca sativa*).

En la Tabla 4 se indica el valor nutricional de la lechuga por cada 100gr de porción.

Tabla 4. Tabla Nutricional de la Lechuga (*Lactuca sativa*)

Compuestos	Cantidad por 100gr de porción
Agua	94 g
Calorías	18 kcal
Proteínas	1,3 g
Grasas	0,2 g
Hidratos de carbono	1,4 g
Fibra	1,5 g
Potasio	264 mg
Calcio	35 mg
Fosforo	26 mg
Magnesio	16 mg
Vitamina A	970 mcg
Ácido fólico	21 mg
Vitamina C	8 mg
Vitamina E	0,06 mg
Potasio	197 mg

Frutas estudiadas

Uva (*Vitis vinífera*).

La vid o uva se originó en Asia y comenzó a cultivarse durante el Neolítico, extendiéndose luego por Europa. Hoy en día, Europa es el principal productor. Los griegos y romanos avanzaron la viticultura y extendieron su cultivo a lo largo de sus territorios. Posteriormente, los españoles introdujeron la vid en América del Norte. Hay varias especies de uva, siendo la más cultivada la *Vitis vinífera*, originaria del Mediterráneo [18].

En la Tabla 5 se muestra la taxonomía de la uva donde consta cada una de sus características.

Tabla 5. Taxonomía de la Uva (*Vitis vinífera*)

Taxonomía	
División	Espermatofitas
Subdivisión	Angiospermas
Clase	Dicotiledoneas
Subclase	Archiclamideas
Orden	Rhamnales
Familia	Vitáceas
Género	Vitis

La uva es considerada como una fruta carnosa que crece en largos racimos formados por numerosos granos alargados o redondos, estos racimos suelen tener un diámetro promedio de 1,6 cm y con un peso entre 200 – 350 gr. Su pulpa es jugosa y dulce, el color de su piel es diferente según la variedad, puede ser verdoso, amarillento, rojizo o púrpura [19]. En la figura 3 se muestra una imagen.



Figura 3. Muestras de uva (*Vitis vinífera*).

En la Tabla 6 se muestra el valor nutricional de la uva por cada 100gr de porción.

Tabla 6. Tabla nutricional de la Uva (*Vitis vinífera*)

Compuestos	Cantidad por 100gr de porción
Agua	82,4 g
Energía	69 kcal
Proteínas	0,6 g
Hidratos de Carbono	16,1 g
Lípidos	0,28 g
Fibras Totales	0,9 g
Vitamina A	3 ug
Vitamina E	0,63 mg
Vitamina B1	0,05 mg
Vitamina B2	0,03 mg
Vitamina B6	0,07mg
Vitamina C	4 mg
Calcio	17 mg
Hierro	0,4 mg
Fósforo	22 mg
Magnesio	10 mg
Zinc	0,1 mg
Selenio	1 ug
Sodio	2 mg
Potasio	250 mg

Nota. Tomado de Fundación Española de la Nutrición [20].

Mora (Rubus glaucus).

Es conocida como la mora de castilla y es de unos de los frutos que tienen mayor potencial agronómico en sectores del Ecuador, tiene una amplia distribución en las provincias de Bolívar, Tungurahua y Carchi, en las cuales se estima que son de las mayores productoras dentro del país [21].

En la Tabla 7 se muestra la taxonomía de la mora donde consta su reino, división, clase, orden, familia, especie, subespecie y su género.

Tabla 7. Taxonomía de la Mora (Rubus glaucus)

Taxonomía	
Reino	Vegetal
División	Antofita
Clase	Dicotiledónea
Subclase	Arquiclamídea
Orden	Rosales
Familia	Rosácea
Género	Rubus
Especie	Glaucus
Nombre científico	Rubus glaucus Benth
Nombre Vulgar	Mora

La mora es un fruto que pertenece al género Rubus y es similar al orden de los rosales, se considerada como una planta perenne y arbustiva, la cual tiene tallos rastreros o semi erguidos que forman macollas. Sus inflorescencias aparecen en racimos terminales con entre 15 y 22 flores, aunque también pueden encontrarse en las axilas de las hojas [22], [23]. En la Figura 4 se muestra una imagen de este fruto.



Figura 4. Mora (Rubus glaucus).

En la Tabla 8 se muestra el valor nutricional por cada 100gr de porción.

Tabla 8. Tabla nutricional de la Mora (*Rubus glaucus*)

Compuestos	Cantidad por 100gr de porción
Calorías	43
Grasas totales	0,5 gr
Sodio	1 mg
Potasio	162 mg
Carbohidratos	10 g
Azúcares	4,9 g
Proteínas	1,4 g
Vitamina C	21mg
Hierro	0,6 mg
Magnesio	20 mg
Calcio	29 mg

Nota. Tomado de Cardona y Bolaños-Benavides [24].

Importancia del consumo de la uva (*Vitis vinífera*).

El consumo de uvas y sus productos derivados tiene relación en cuanto al cuidado de algunas enfermedades como son las cardiovasculares, cáncer y el Alzheimer. Estos beneficios se deben a dos componentes principales: los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), se ubican en las semillas y contribuyen en el cuidado de enfermedades cardiocirculatorio y compuestos fenólicos, los cuales contienen un gran potencial antioxidante y una capacidad para prevenir la oxidación de sustratos biológicos [25].

La uva se destaca por su alta producción en muchos países con la presencia de varios metabolitos secundarios permitiendo su aplicación en campos como la salud y la tecnología alimentaria. Entre sus metabolitos se incluyen compuestos fenólicos, ácidos orgánicos, azúcares y vitaminas. En las semillas y el hollejo se encuentran derivados fenólicos, como los flavonoides, destacando el resveratrol, que puede extraerse mediante diversos métodos. Estos compuestos pueden verse afectados por factores externos durante el crecimiento de la planta, por lo que es necesario un seguimiento riguroso, ya que cualquier daño en la baya puede modificar su composición y disminuir la presencia de dichos compuestos [26].

Importancia del consumo de la mora (*Rubus glaucus*).

Es una fruta con alta relevancia tanto en la salud como en la agroindustria. Desde un punto

de vista nutricional y nutracéutico, la mora es rica en compuestos fenólicos, fibras, vitaminas, y minerales esenciales, lo que le otorga propiedades antioxidantes significativas. Estos antioxidantes ayudan con la neutralización de los radicales libres en el cuerpo, ayudando en la prevención de enfermedades crónicas, cardiovasculares y algunos tipos de cáncer [27].

Además, la mora es valorada por su alto contenido de polifenoles, ácido benzoico, flavonoides, y antocianinas, componentes que son reconocidos por su capacidad de ayudar en el mejoramiento de la salud mental y física. La actividad antioxidante de la mora, derivada de compuestos como el ácido málico y las antocianinas, es especialmente alta en variedades cultivadas en zonas tropicales debido a las condiciones ambientales que estimulan la producción de estos compuestos. Esto hace que la mora sea un alimento beneficioso para la dieta y un recurso importante para industrias de alimentos, farmacéutica y cosmética [23].

Importancia del consumo de la lechuga (*Lactuca sativa*).

Es un alimento ampliamente valorado por los beneficios que ofrece a la salud debido a su alto contenido de agua (cerca al 94 %) y su bajo aporte calórico, es rica en vitaminas A, B (B1, B2, B3), C, y E, además de minerales esenciales como fósforo, calcio, potasio y hierro. Estos nutrientes le otorgan propiedades diuréticas, ayudan a prevenir anemias y mejoran la circulación sanguínea, lo que beneficia la salud cardiovascular. También se destaca por su capacidad para facilitar el sueño debido a la presencia de lactucarium, un compuesto que se utiliza como un calmante para el sistema nervioso [28].

La lechuga ofrece múltiples beneficios a nivel físico y terapéutico. Se destaca por su alto contenido de vitaminas y sus propiedades anestésicas, útiles para aliviar neuralgias como la ciática. Las lechugas más amargas y pigmentadas son las que contienen más nutrientes y antioxidantes [29].

Importancia del consumo del brócoli (*Brassica oleracea var. Itálica*).

Es un alimento esencial en la dieta, reconocido por sus beneficios para la salud gracias a su alta concentración de compuestos bioactivos, como los glucosinolatos (GLS) y los isotiocianatos (ITC). Estos compuestos tienen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, lo que ayuda con la prevención de enfermedades crónicas como el cáncer, neurodegenerativas y afecciones cardiovasculares [30].

El brócoli destaca por su principal fuente de vitaminas (C, E, K), minerales, flavonoides y carotenoides, estudios han demostrado que su consumo regular ayuda en la reducción de los niveles de colesterol y marcadores inflamatorios, lo que ayuda en el mejoramiento de la salud cardiovascular y a combatir la obesidad, una condición ligada a la inflamación crónica de bajo

grado [31].

El brócoli también tiene un impacto positivo en la salud intestinal y en la regulación de la glucosa, lo que lo convierte en un aliado contra enfermedades metabólicas como la diabetes. Incorporar brócoli en la alimentación diaria fortalece el sistema inmune y protege el organismo contra el daño oxidativo [32].

Procedencia de los productos hortofrutícolas en el cantón Guaranda

En la Tabla 9 se muestra la procedencia de la materia prima analizada, se ha mantenido el anonimato del nombre de los establecimientos para no causar afectación a los productores y vendedores.

Tabla 9. Provincias de procedencia de los productos hortofrutícolas

Mercados	Provincias de distribución
Mercado A	La distribución se da principalmente de la provincia de Tungurahua y de las parroquias aledañas del cantón como: San Lorenzo, San Simón y Santiago, y partes de Caluma, Montalvo, Echandía en frutas de la costa. (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2020).
Mercado B	Estas verduras y frutas son conseguidas del Mercado A y el Mercado C (vía a las cochas)
Mercado C	Este mercado es el más grande en el cantón Guaranda, donde aquí se recolecta frutas y hortalizas de todas partes del Ecuador, tanto Costa como Sierra en especial de la provincia de Tungurahua, y de pequeñas parroquia rurales del cantón Guaranda como: San Lorenzo, San Simón, Santiago, Santa Fe, Simiatug, Chillogallo, Tililac, Talalac, San Bartolo, se debe de tomar en cuenta que en Tungurahua las frutas y hortalizas son en grandes cantidades de distribución pero también no se sabe con qué exactitud tiene el control de distribución o puestos que comercialicen de una región exacta (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2020).
Mercado D	De los Mercados más grande de distribución del cantón como Mercado C y Mercado A
Mercado E	En los mercados de la parroquia Salinas en hortalizas y frutas, principalmente la mora el 80% son de las familias misma parroquia. (Tour Salinerito, 2024)
Mercado F	La mayoría de los productos hortofrutícolas provienen de comunidades aledañas a esta parroquia. (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2020)

Nota. Esta información fue obtenida del Ministerio de Agricultura y Ganadería [33].

Contaminación en las hortofrutícolas

La contaminación en los alimentos puede ocurrir de manera accidental, lo que representa un riesgo potencial para la salud de quien lo consume. Existen diversos tipos de contaminantes alimentarios, los cuales se clasifican según su origen en biológicos, físicos o químicos [34], [35].

- **Contaminantes físicos:** se trata de objetos extraños distintos del propio alimento que accidentalmente entran en contacto con los alimentos; suelen verse a simple vista y pueden ser: cristales, huesos, espinas, plástico, conchas, entre otros, la ingesta de dichos contaminantes supone un riesgo importante para los consumidores, ya que pueden sufrir asfixia, cortes.
- **Contaminantes químicos:** se refiere a productos químicos como agentes de limpieza, insecticidas o plaguicidas, metales pesados, desinfectantes. Estos pueden afectar a los alimentos durante el procesamiento o accidentes en cualquier etapa de la cadena alimenticia.
- **Contaminantes biológicos:** es aquella que ocurre por organismos vivos: microorganismos (moho, virus, bacterias), en parásitos (gorgojos, gusanos), en roedores (ratas, ratones), en insectos (hormigas, moscas, cucarachas), en pájaros (gaviotas, palomas, gorriones).

Contaminación Biológica.

La contaminación biológica se da por el contacto con seres vivos tanto microscópicos como macroscópicos. En comparación con otro tipo de riesgos, la contaminación biológica tiene ciertas características especiales, puesto que cuando estos contaminan los alimentos, tienen la oportunidad de crecer en ellos. Especial riesgo supone aquellos microorganismos patógenos, los cuales se consideran una fuente de contaminación perjudicial para la salud de los consumidores puesto que no modifican significativamente los alimentos [36].

Las bacterias son organismos unicelulares que presentan una amplia diversidad morfológica y estructural, se caracterizan por poseer una organización celular más simple en comparación con los organismos superiores. La presencia de una microbiota bacteriana normal es importante para el mantenimiento de la salud, ya que participa en procesos como la digestión, síntesis de vitaminas y la regulación del sistema inmunológico. Sin embargo, también existen bacterias patógenas, las cuales representan una de las principales causas de enfermedades en humanos [37].

Los virus son pequeñas entidades infecciosas que sólo pueden reproducirse en las células de otros organismos y son altamente infecciosas. Debido a su alta capacidad infecciosa, representan un riesgo significativo para la salud pública, especialmente cuando contaminan los alimentos [38].

Los hongos son considerados microorganismos eucariotas que presentan un mayor nivel de complejidad biológica en comparación con las bacterias, debido a su organización celular más desarrollada y su capacidad para formar estructuras multicelulares especializadas. A diferencia de las bacterias, que son procariontes y poseen una organización celular más simple, los hongos presentan orgánulos membranosos y un núcleo definido, lo que los ubica en un nivel superior de diferenciación biológica [39].

Patógenos.

Los microorganismos patógenos como *E. coli*, *Listeria* y *Salmonella* representan un riesgo significativo para la seguridad alimentaria en frutas y hortalizas. Es importante implementar unas buenas prácticas de manejo, desde el cultivo hasta la manipulación y el procesamiento, para reducir la contaminación y proteger la salud pública. La Normativa NTE INEN 1334-1, establece los límites de contaminación de las frutas y hortalizas, en la Tabla 10 se muestra un resumen de esta regulación [40].

Tabla 10. Límites de contaminación de bacteria según la Normativa NTE INEN 1334-1

Bacteria	Limites
<i>E.coli</i>	No debe de haber presencia de <i>E.coli</i> en Frutas y Hortalizas frescas, en general NULA, ya que si hay contaminación de esta bacteria es por contaminación fecal.
<i>Listeria</i>	No debe de haber presencia de <i>Listeria</i> en Frutas y Hortalizas frescas, ya que esta bacteria causa enfermedades graves en la salud.
<i>Salmonella</i>	No debe de haber presencia de <i>Salmonella spp</i> en Frutas y Hortalizas frescas, ya que es un indicador de contaminación significativa y riesgosa para la salud.

Nota. Descripción tomada de la normativa NTE INEN 1334-1 [40].

Patógenos de interés

Escherichia Coli (Bacterium Coli Commune).

Escherichia coli (E.coli) se considera como una bacteria Gramnegativa la cual se encuentra comúnmente en los intestinos tanto de humanos como de animales. En la fruta, la contaminación por *E.coli* generalmente ocurre a través del contacto con agua, suelo o superficies contaminadas durante la producción, manipulación o almacenamiento [41].

Esto puede ocurrir, por ejemplo, si se vierte agua contaminada sobre la fruta, si entra en contacto con excrementos de animales o si una persona infectada la toca. Aunque *E.coli* es inofensiva y tiene un papel importante con respecto a la digestión, algunas cepas tienden a ser patógenas y provocan enfermedades, provocando enfermedades gastrointestinales graves como diarrea, dolor abdominal y vómitos y, en casos graves, pueden causar hemólisis [42], [43].

Taxonomía de Escherichia Coli (Bacterium coli commune).

En este trabajo se evaluaron tres tipos de microorganismo, en la Tabla 11 se indica la taxonomía de *E. coli* desde su dominio, especie, familia, clase, filo, hasta su género.

Tabla 11. Taxonomía de *Escherichia coli* (*Bacterium coli commune*)

Taxonomía	
Dominio	Bacteria
Reino	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Clase	Gammaproteobacteria
Género	Escherichia
Especie	Escherichia coli
Filo	Pseudomonadota

***Listeria* (*Listeria monocytogenes*).**

La *Listeria monocytogenes* es considerada una bacteria Gram positiva que está presente en el suelo, el agua y algunos alimentos como las frutas. A diferencia de muchas otras bacterias, *Listeria monocytogenes* puede incluso crecer en temperaturas de refrigeración, convirtiéndola en una preocupación particular en términos de seguridad alimentaria, las frutas contaminadas con *Listeria monocytogenes* se representa como un riesgo para la salud pública al consumirla sin el procesamiento y desinfección adecuados [44].

Las personas con sistemas inmunitarios debilitados, mujeres embarazadas, recién nacidos y los ancianos son especialmente susceptibles a la listeriosis [45]. En la Tabla 12 se muestra la taxonomía de *Listeria* desde su dominio, especie, familia, clase, filo, hasta su género.

Tabla 12. Taxonomía de *Listeria monocytogenes*

Taxonomía	
Dominio	Bacteria
Genero	Listeria
Familia	Listeriaceae
Orden	Bacillales
Clase	Bacilli
Filo	Firmicutes

***Salmonella* (*Salmonella Typhimurium*).**

La *Salmonella* se considera una bacteria dentro del género Gramnegativas que incluye muchas especies, las cuales pueden provocar enfermedades gastrointestinales tanto en humanos como en animales, la contaminación de frutas con *Salmonella* puede ocurrir durante la producción,

manipulación, transporte y almacenamiento de alimentos, especialmente cuando entran en contacto con agua, suelo o desechos animales contaminados [46].

Ingerir fruta contaminada con salmonella puede provocar enfermedades como la salmonelosis, que se caracteriza por síntomas como fiebre, diarrea, vómitos y dolor abdominal, donde la mayoría de las personas se pueden recuperar sin un tratamiento especial, pero en algunos casos la infección puede ser grave [47].

En la Tabla 13 se muestra la taxonomía de la *Salmonella* desde su dominio, especie, familia, clase, filo, hasta su género.

Tabla 13. Taxonomía de la *Salmonella* (*Salmonella spp*).

Taxonomía	
Dominio	Bacteria
Genero	Salmonella
Familia	Enterobacteriaceae
Orden	Enterobacterales
Clase	Gammaproteobacteria
Filo	Proteobacteria

Técnicas de muestreo que se utilizan para la recolección frutas y hortalizas.

El muestreo se realizó para obtener una representación adecuada de la calidad, seguridad y condición de los productos disponibles para la venta. En bibliografía se ha demostrado que este tipo de muestreo tiene el 90% de confiabilidad para la recolección de datos con una cobertura de gran impacto. En este estudio se empleó la normativa NTE INEN 1750 [48].

Mapeo

La georreferenciación implica relacionar datos espaciales o geográficos con un sistema de coordenadas, como la latitud o la longitud, para determinar ubicaciones en la superficie de la Tierra, esto permite visualizar, analizar y comprender la información en un contexto espacial, la georreferenciación se utiliza en diferentes campos, incluida la cartografía, gestión de recursos naturales, planificación urbana, agricultura de precisión y navegación GPS [49]. Utilizando sistemas de información geográfica (SIG) u otras herramientas cartográficas, este proceso permite visualizar y comprender los datos en relación con su ubicación geográfica, lo cual es importante para una amplia gama de aplicaciones, desde la navegación GPS hasta la gestión de recursos y la planificación natural y urbana [50].

Guaranda es una ciudad ubicada en la provincia de Bolívar, en el centro de Ecuador. La ciudad alberga aproximadamente 70.000 habitantes y se caracteriza por una arquitectura colonial bien

conservada, calles adoquinadas y edificios históricos como la Catedral de Guaranda y el Palacio Municipal. El clima de Guaranda es templado durante todo el año, con temperaturas promedio que oscilan entre 12 °C y 20 °C, siendo agosto el más seco y diciembre el más lluvioso, la economía de la ciudad se basa principalmente en la agricultura, ganadería y el comercio, además, es conocida por sus productos lácteos, textiles y artesanías [51]. En la Figura 8 se muestra una imagen del Cantón Guaranda.

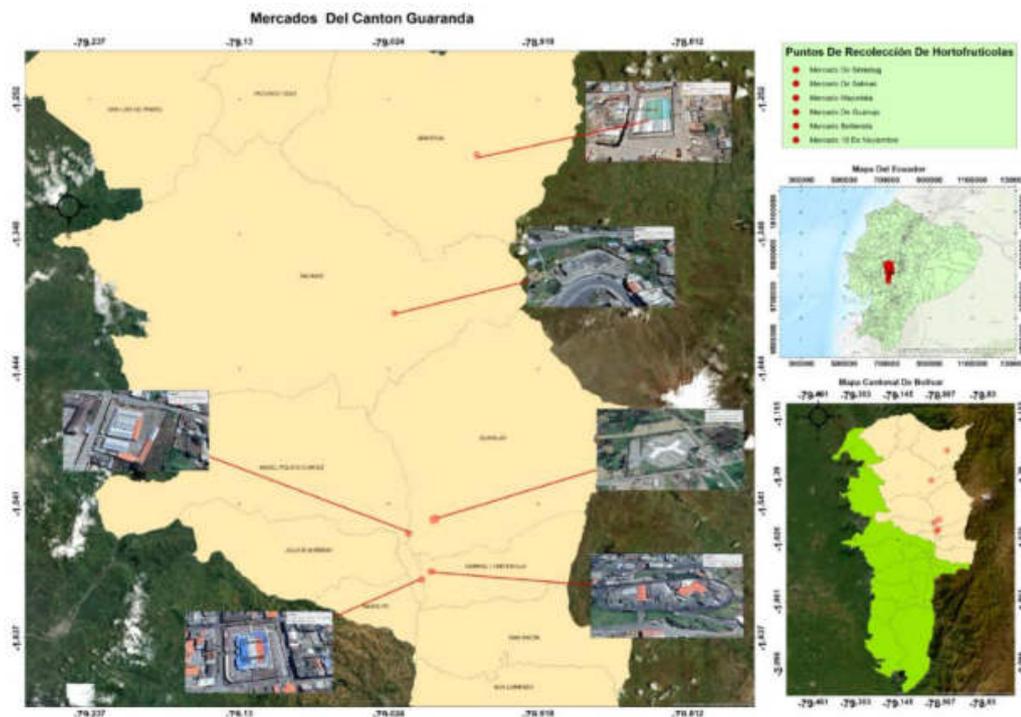


Figura 5. Mapa de Guaranda con sus respectivas zonas de muestreo.

Tipo de Cultivo.

Los procedimientos de cultivo de microorganismos permiten la detección, aislamiento y multiplicación controlada de microorganismos, inclusive aquellos de interés patógeno presentes en alimentos y agua. Estos métodos son importantes para la verificación microbiológica, ya que posibilitan la caracterización específica de los agentes contaminantes. Cuando un cultivo contiene una única especie microbiana, se denomina cultivo puro o axénico; en cambio, cuando en el mismo medio se desarrollan múltiples especies, se identifica como un cultivo mixto [52].

Cultivo puro o axénico

Está relacionado con la obtención de una sola especie microbiana el cual es proveniente de una sola célula la cual se obtiene en un laboratorio de forma artificial teniendo las debidas precauciones asépticas al momento de manejar el correspondiente procedimiento.

Cultivo mixto.

Se desarrollan y existen diferentes especies de microorganismos que parten desde una forma conjunta.

Técnica de cultivo por placa

Técnica por estría en superficie.

Esta técnica es de una manera directa donde se deposita el contenido por medio de micropipetas la cantidad requerida para el análisis y con un asa se extiende.

Técnica por estriado.

Es un método fundamental en microbiología utilizado para aislar y cultivar microorganismos a partir de una mezcla de especies. Esta técnica permite obtener colonias individuales de bacterias en un medio sólido, facilitando su identificación y estudio [53].

Siembra en tubos por picadura.

Es empleada para inocular medios de cultivo en tubos de ensayo, permitiendo el crecimiento de microorganismos en un medio semisólido. Esta técnica es especialmente útil para estudiar la motilidad de las bacterias y para realizar pruebas bioquímicas [53].

Siembra en tubos por estría simple.

Se realiza en un tubo con un medio agar sólido (Citrato) y se desliza el asa en la superficie de manera que se hagan en forma de surcos o estrías.

Agares de Identificación

Tipos de agar.

Agar EMB (Eosin de Azul de metileno).

El agar EMB es un medio de cultivo selectivo y diferencial utilizado principalmente para la identificación de gramnegativas especialmente del género *Escherichia* y *Enterobacter*. Contiene eosina y azul de metileno como colorantes, que inhiben el crecimiento de bacterias grampositivas y permiten la diferenciación de las gramnegativas, este cultivo se utiliza en agua, alimentos y heces, se realiza bajo condiciones específicas en envase su incubación en una

temperatura adecuada de 35 °C durante un periodo específico de 24-48 horas lo que permite el crecimiento de colonias identificando a la bacteria de interés mediante un color metálico brillante [54].

ALOA (Agar Luria-Bertani con Oligoelementos y Ácidos Orgánicos).

Este agar es un tipo de medio de cultivo selectivo, utilizado principalmente para el aislamiento y la identificación de *Listeria spp*, una bacteria patógena que puede causar listeriosis, una enfermedad grave en humanos y animales. Este agar es específicamente para *Listeria* grampositiva, se utiliza para alimentos, agua y otros productos donde se sospecha crecimiento de *Listeria spp*, la preparación para este medio se realiza según sus indicaciones del fabricante, la incubación adecuada a los 35 °C, durante un periodo de 24 – 48 horas para permitir el crecimiento de colonias y tener la confirmación de esta, su color característico es azulado o turquesa [55].

XLD (Xilosa-Lisina-Desoxicolato).

El agar XLD se define como un medio de cultivo selectivo, utilizado principalmente para aislamiento y la identificación de bacterias del género *Salmonella* y *Shigella*, específicamente utilizado en muestras de alimentos, agua y heces, se toma encuentra que esta bacteria es una gramnegativa. Las condiciones de sembrado e identificación vienen especificadas desde el fabricante, este agar tiene algo en particular no se emplea autoclave, solamente se diluye y se dispensa, se coloca la muestra contaminada y su incubación adecuada a los 35 °C, durante un periodo de 24–48 horas para permitir el crecimiento de colonias y tener la confirmación de esta, su color característico es negro [56].

Citrato de Simmons

Es un medio sólido utilizado como prueba bioquímica de identificación de microorganismos, especialmente de bacilos gramnegativos (*Escherichia coli* y *Salmonella*). Esta prueba evalúa la capacidad del microorganismo para utilizar el citrato como única fuente de carbono y el amonio como única fuente de nitrógeno. La incubación del medio se realiza a una temperatura de 35–37 °C durante 24 horas. En su estado original, el medio presenta un color verde debido al indicador de pH (azul de bromotimol). Un resultado negativo se manifiesta cuando el medio mantiene su color verde, lo cual indica que el citrato no ha sido metabolizado. Por el contrario, un cambio de color a azul indica una alcalinización del medio, producto de la utilización del citrato y la producción de compuestos básicos, lo cual corresponde a un resultado positivo [52].

MR VP (Methyl Red-Voges-Proskauer)

El medio MR VP normalmente utilizado para realizar las pruebas bioquímicas para identificar microorganismos gramnegativos de la familia *Enterobacteriaceae*, como *Escherichia coli* y *Salmonella*. Aquí se evalúa la capacidad del microorganismo para utilizar el citrato como única fuente de carbono y el amonio como única fuente de nitrógeno. La incubación del medio se realiza a una temperatura de 35–37 °C durante 24 horas. En su estado original, el medio presenta un color verde debido al indicador de pH (azul de bromotimol). Un resultado negativo se manifiesta cuando el medio mantiene su color verde, lo cual indica que el citrato no ha sido metabolizado. Por el contrario, un cambio de color a azul indica una alcalinización del medio, producto de la utilización del citrato y la producción de compuestos básicos, lo cual corresponde a un resultado positivo [57].

PRUEBA DE METHYL RED (MR)

Después de la incubación se añade de 2 a 4 gotas de rojo de metilo al medio, se interpreta de la siguiente manera:

- **Rojo:** Un resultado positivo indica que la bacteria ha fermentado la glucosa produciendo ácidos, lo que baja el pH del medio ($\text{pH} < 4,4$).
- **Amarillo:** Un resultado negativo indica que no se han producido suficientes ácidos ($\text{pH} > 6,2$).

PRUEBA DE VOGES-PROSKAUER (VP)

Posteriormente de la incubación se añade 15 gotas de α -naftol y 5 gotas de solución de KOH (Hidrato de potasio), se agüita de una manera sutil y se deja reposar unos minutos, se interpreta:

- **Rojo:** Un resultado positivo indica la producción de acetilmetilcarbinol, lo que sugiere que la bacteria realiza fermentación, pero produce productos menos ácidos.
- **Amarillo o sin cambio:** Un resultado negativo indica que no se ha producido acetilmetilcarbinol.

Agua Peptonada.

El agua peptonada es un medio de cultivo utilizado en microbiología para el crecimiento de microorganismos, utilizado en cultivos para bacterias y hongos en diversas aplicaciones micológicas. Se requiere que el medio esté esterilizado por autoclave a 121 °C durante 15 a 20 minutos, con el fin de eliminar cualquier posible contaminante. Posteriormente, se procede a la incubación a una temperatura entre 30 y 37 °C, dependiendo del microorganismo objetivo. En la mayoría de los casos, el período de incubación recomendado es de 24 horas, aunque este

puede variar según los requerimientos específicos del ensayo microbiológico [58].

Pruebas Bioquímicas

Procedimiento de laboratorio utilizado para determinar las propiedades químicas y fisiológicas de organismos vivos, especialmente microorganismos como bacterias, hongos y otros patógenos. Estas pruebas pueden analizar las reacciones químicas que ocurren dentro de las células y detectar la presencia o actividad de enzimas, metabolitos o compuestos específicos, son la base de la microbiología, la medicina, la biotecnología y otros campos relacionados, en la Tabla 14 se muestra un resumen de los usos [59].

Tabla 14. Utilidad de cada una de las pruebas.

Pruebas	Utilidad
CATALASA	Detecta la producción de la enzima catalasa, que descompone el peróxido de hidrógeno
OXIDASA	Detecta la presencia de citocromo u oxidasa
CITRATO	Evalúa la capacidad de utilizar citrato como única fuente de carbono.
INDOL	Determina la capacidad de producir indol a partir de triptófano.
ROJO METILO	Determina la capacidad de fermentar glucosa y producir ácidos.
VOGES PROSKAUER	Detecta la producción de acetilmetilcarbinol a partir de glucosa.

OXIDASA.

Esta prueba se utiliza para detectar la presencia de enzimas oxidasas, la reacción de la oxidasa se debe a la presencia del sistema citocromo oxidasa, los citocromos son enzimas que forman parte de la cadena de transporte de electrones en la respiración aeróbica, transfiriendo electrones al oxígeno para formar agua, en general, el sistema citocromo oxidasa se encuentra sólo en organismos aeróbicos, algunos anaerobios facultativos y excepcionalmente algunos microaerófilos (*Vibrio fetus*), pero no en anaerobios estrictamente [60].

Sin actividad oxidasa, asimismo, la presencia de oxidasa se asocia con la producción de catalasa, ya que degrada el peróxido de hidrógeno, que se produce durante la reducción del oxígeno y cuya acumulación es tóxica, las pruebas de oxidasa se utilizan principalmente para los siguientes fines [61]: Identificación de todas las especies de *Neisseria* (+) y distinguimos *Pseudomonas* de los miembros oxidasa negativos de la familia *Enterobacteriaceae*. Es menos tóxico y mucho más sensible que el correspondiente compuesto dimetilo (reactivos de Gordon y Macleod), es de costo elevado, este reactivo tiñe las colonias oxidasa positivas con un color lavanda que cambia gradualmente de a un color negro violeta intenso.

CATALASA.

La catalasa es una enzima que acelera la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. La prueba se utiliza para comprobar la presencia de la enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen el citocromo oxidasa [62]. La principal excepción son los estreptococos (*Streptococcus*). Originariamente, esta prueba era utilizada para diferenciar entre los siguientes géneros: *Streptococcus* (catalasa -) de *Micrococcus* (catalasa +) y/o *Staphylococcus* (catalasa +). *Bacillus* (+) de *Clostridium* (-). *Lysteria monocytogenes* (+) y/o *Corynebacterium* (+, con las excepciones de las especies *C. pyogenes* y *C. haemolyticum*, ambas -) de *Erysipelothrix* (-).

Citrato de Simmons

Es un medio de cultivo utilizado para identificar la capacidad de ciertas bacterias, especialmente del género *Enterobacteriaceae*, para utilizar el citrato como única fuente de carbono. En este medio, se inocula la bacteria y se incuba a 35-37 °C durante 24-48 horas. Si la bacteria puede metabolizar el citrato, se producirá un cambio en el pH, lo que resulta en un cambio de color del medio, que pasa de verde a azul. Bacterias como *Salmonella* y *Enterobacter* son ejemplos de organismos que pueden dar un resultado positivo en esta prueba [63].

INDOL.

Mediante esta prueba se detecta la liberación de indol en un cultivo bacteriano, donde dicha liberación se debe a la degradación del aminoácido triptófano mediante el enzima triptófano.

ROJO DE METILO.

El rojo de metilo es un indicador de pH. (Fórmula: $C_{15}H_{15}N_3O_2$). Actúa entre pH 4,2 y 6,3 variando desde rojo (pH 4,2) a amarillo (pH 6,3). Por lo tanto, permite determinar la formación de ácidos que se producen durante la fermentación de un carbohidrato.

VOGES PROSKAUER.

Permite determinar visualmente si el microorganismo fermenta la glucosa por la vía butanodiólica. Si es así, se forma un producto intermedio (acetona) que forma un complejo de color rojizo con el α -naftol. Se usa en la identificación a nivel de especie de bacilos entéricos gramnegativo [64].

Esta prueba se utiliza para detectar la presencia de enzimas oxidadas, la reacción de la oxidasa se debe a la presencia del sistema citocromo oxidasa, los citocromos son enzimas que forman parte de la cadena de transporte de electrones en la respiración aeróbica, transfiriendo electrones al oxígeno para formar agua, en general, el sistema citocromo oxidasa se encuentra

sólo en organismos aeróbicos, algunos anaerobios facultativos y excepcionalmente algunos microaerófilos (*Vibrio fetus*), pero no en anaerobios estrictamente. Asimismo, la presencia de oxidasa se asocia con la producción de catalasa, ya que degrada el peróxido de hidrógeno, que se produce durante la reducción del oxígeno y cuya acumulación es tóxica [65].

En ausencia de actividad oxidasa, es poco probable la producción de catalasa, ya que ambas enzimas están asociadas a rutas metabólicas dependientes del oxígeno. La presencia de oxidasa se correlaciona frecuentemente con la producción de catalasa, dado que esta **última** degrada el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), un subproducto tóxico generado durante la reducción del oxígeno en la respiración aeróbica. La acumulación de peróxido de hidrógeno puede ser letal para la célula si no se elimina adecuadamente [66].

La prueba de oxidasa permite identificar todas las especies del género *Neisseria*, que son oxidasa positivas, y resulta útil para diferenciar *Pseudomonas* de los miembros oxidasa negativos de la familia *Enterobacteriaceae*. Para esta prueba se emplea un reactivo específico que, si bien es menos tóxico y más sensible que el compuesto dimetilo utilizado en los reactivos de Gordon y Macleod, presenta un mayor costo, lo cual puede limitar su uso en ciertos laboratorios [67].

Pruebas moleculares

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) Convencional

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la técnica más utilizada en biología molecular. Fue desarrollada por Kary Mullis en 1985, por la cual le valió el premio Nobel de química en 1993. La PCR es una técnica utilizada para reproducir de forma rápida y selectiva fragmentos específicos de ADN o ARN. La unidad fundamental de longitud del ADN se define por un par de bases nitrogenadas unidas mediante puentes de hidrógeno. Estas bases se aparean de forma específica: adenina (A) con timina (T) mediante dos enlaces de hidrógeno, y guanina (G) con citosina (C) mediante tres enlaces [68].

Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs)

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) se definen como la ingestión de alimentos o agua que contengan agentes contaminantes o etiológicos: biológicos, químicos o físicos, en cantidades suficientes, que afecten la salud del ser humano a nivel individual o colectivo. La manifestación más común de las enfermedades transmitidas por alimentos es el desarrollo de síntomas gastrointestinales (náuseas, vómitos, calambres abdominales y diarrea), sin embargo, estas enfermedades también pueden causar síntomas neurológicos, ginecológicos, inmunológicos y de otro tipo [69].

La diarrea es el síntoma agudo más frecuente de las enfermedades de transmisión alimentaria,

se estima que cada año las enfermedades diarreicas de transmisión alimentaria o hídrica se cobran la vida de 2,2 millones de personas, en su mayoría niños [70].

BPM en los mercados

Las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), fueron desarrolladas por el Codex Alimentarius con el objetivo de proteger al cliente, dando a conocer que es un conjunto de principios básicos destinados a garantizar que los productos se los obtengan en condiciones sanitarias suficientes y se reduzcan los riesgos derivados de su producción y distribución. Existen varias pautas para BPM que orientan la gestión de la actividad relacionada con la producción de alimentos con el objetivo de garantizar condiciones favorables para su producción segura [71].

Las BPM son importantes en los mercados de Ecuador, ya que garantizan la inocuidad y calidad de los productos, lo que es un requisito para la salud pública y la confianza del consumidor. Además, su implementación ayuda a las empresas a cumplir con normativas locales e internacionales, mejorando su competitividad en el mercado. A través de las BPM, se fomenta y establece un mercado seguro, que se guía por los mismos Principios de Higiene de los Alimentos y proporciona garantías hacia los consumidores [72].

METODOLOGÍA

Ubicación de la investigación

Esta investigación se realizó en las instalaciones de los laboratorios de investigación de la Universidad del Estado Bolívar, sector Laguacoto II. En la Figura 14 se indica la ubicación de las instalaciones.



Figura 6. Ubicación de la investigación Tomado de Google Maps (2025).

Este trabajo se llevó a cabo en la Universidad Estatal de Bolívar, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Carrera de Agroindustrias, instalaciones del Departamento de Investigación Laguacoto II. En la Tabla 15 se muestran más detalles de la localización.

Tabla 15. Localización de la investigación

Ubicación	Localidad
Provincia	Bolívar
Cantón	Guaranda
Sector	Laguacoto II
Parroquia	San Sebastián
Dirección	Laguacoto II km ½ km vía Guaranda-San Simón
Establecimiento	Universidad Estatal de Bolívar
Unidad de producción	Complejo agroindustrial

Situación geográfica y climática.

En la Tabla 16 se indican las condiciones climáticas de la localización de la investigación.

Tabla 16. Situación geográfica y climática

Parámetro	Valor
Altura	2.622 msnm
Latitud	01°36'15"S
Longitud	78°59'54"W
Temperatura mínima	7°C
Temperatura media anual	14,4°C
Temperatura máxima	21°C
Humedad Relativa promedio	75 %
Precipitación media anual	980 mm
Heliofanía promedio	900/horas/luz/año

Nota. Información obtenida de la estación Meteorológica Laguacoto II, UEB.

Las muestras para este trabajo se obtuvieron de los diferentes mercados de Guaranda. Entre ellos se tiene al Mercado A, el Mercado B, Mercado C, Mercado D, Mercado E y el Mercado F.

Se recolectó una muestra de frutas (mora y uva) y hortalizas (lechuga y brocoli), de los 5 mercados que se encuentran en el cantón Guaranda de la provincia de Bolívar. En total, se obtuvieron 24 muestras destinadas al análisis microbiológico, las cuales fueron seleccionadas de forma previa según criterios establecidos para garantizar la representatividad del estudio.

Reactivos para extracción de ADN.

- Kit de extracción (Invitrogen)

Reactivos para PCR

- GoTaq® Green Master Mix, 2X (Promega, 0000543067, USA).
- Primers Forward y Reverse (Invitrogen, 90489462).
- Nuclease-Free Water (Promega, 0000334315, USA).

Factores de Estudio.

De acuerdo con las particularidades de la investigación propuesta se seleccionaron los siguientes factores los cuales se definen en la Tabla 17.

Tabla 17. Factores de estudio y sus respectivos niveles.

Factor	Código	Nivel
Dilución	A	a_1 : 10
		a_2 : 20
		a_3 : 30
Patógenos	B	b_1 : E. coli O157:H7
		b_2 : Listeria monocytogenes
		b_3 : Salmonella spp

Factor A: Diluciones. Factor B: Patógenos.

Tratamientos.

Los tratamientos corresponden a las diferentes condiciones derivadas del estudio se detallan en la Tabla 18.

Tabla 18. Tratamientos

Tratamiento	Niveles		
	Código	Dilución	Patógeno
T1	a_1b_1	10	E.coli
T2	a_1b_2	10	Listeria
T3	a_1b_3	10	Salmonella
T4	a_2b_1	20	E.coli
T5	a_2b_2	20	Listeria
T6	a_2b_3	20	Salmonella
T7	a_3b_1	30	E.coli
T8	a_3b_2	30	Listeria
T9	a_3b_3	30	Salmonella

Características del experimento.

En la Tabla 19 se indica el diseño factorial empleado para el estudio.

Tabla 19. Características del diseño factorial AxB

Atributos del Diseño Factorial	
Número de factores experimentales	2
Número de niveles factor A	3
Número de niveles factor B	3
Número de réplicas	2
Unidades experimentales	18
Respuestas experimentales	1

Tipo de diseño experimental

Se empleó un Diseño A x B (2 x 2) con dos réplicas. Así mismo se aplicó un ANOVA para establecer las diferencias entre los tratamientos el cual se indica en la Ecuación 1:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \text{ Ec. 1}$$

Donde:

μ = Efecto medio global.

α_i = Efecto incremental sobre la media causado por el nivel i del factor A.

β_j = Efecto incremental sobre la media causado por el nivel j del factor B

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Efecto incremental sobre la media causado por la interacción del nivel i del factor A y el nivel j del factor B.

ε_{ijk} = El término del error.

En la Tabla 20 se muestra los detalles del modelo ANOVA.

Tabla 20. Modelo de Análisis de varianza ANOVA

F. de Viabilidad	S. Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medio	F_0	Valor - P
Efecto A	$SC_A = \sum_{i=1}^a \frac{Y_{i.}^2}{bn} - \frac{Y_{...}^2}{N}$	$a - 1$	$CM_A = \frac{SC_A}{a - 1}$	$\frac{CM_A}{CM_E}$	$P(F > F_0)$
Efecto B	$SC_B = \sum_{j=1}^b \frac{Y_{.j}^2}{an} - \frac{Y_{...}^2}{N}$	$b - 1$	$CM_B = \frac{SC_B}{b - 1}$	$\frac{CM_B}{CM_E}$	$P(F > F_0)$
Efecto AB	$SC_{AB} = i = 1aj = 1b \frac{Y_{ij.}^2}{n} - \frac{Y_{...}^2}{N} - SC_A - SC_B$	$(a - 1)(b - 1)$	$CM_{AB} = \frac{SC_{AB}}{(a - 1)(b - 1)}$	$\frac{CM_{AB}}{CM_E}$	
Error	$SC_E = SC_T - SC_A - SC_B - SC_{AB}$	$ab(n - 1)$	$CM_E = \frac{SC_E}{ab(n - 1)}$		
Total	$SC_T = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n Y_{ijk}^2 - \frac{Y_{...}^2}{N}$	$abn - 1$			

Variables de respuesta.

Concentración de bacterias.

Para evaluar el estado que se encontraban las frutas y hortalizas que se distribuyen en los mercados del cantón Guaranda se verificó la presencia o ausencia de bacterias *E. Coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* Se tomó como referencia la normativa NTE INEN 1334-1 [40].

Recolección de Muestras.

Las muestras de Frutas y Hortalizas se obtuvieron de los 6 mercados del cantón Guaranda, entre ellos: Mercado A, Mercado B, Mercado C, Mercado D, Mercado E y Mercado F. Las muestras fueron colocadas en un cooler con hielo, luego fueron trasladarlas al laboratorio para su análisis.

Codificación e identificación de las muestras.

Las 24 muestras entre frutas y hortalizas analizadas se codificaron para poder identificarlas con

la fecha que se realizó el cultivo, el mercado se identificó por medio de orden de los puntos de recolección, desde M1 y las réplicas hasta M1-3.

Registro de las muestras.

Una vez recolectadas las muestras en los mercados seleccionados, se procedió a su registro y acondicionamiento, colocándolas en fundas plásticas tipo Ziploc, debidamente rotuladas conforme a lo establecido en la Normativa Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1750, titulada “Hortalizas y frutas frescas. Muestreo” [73]. Esta normativa proporciona las directrices para el correcto almacenamiento y transporte de muestras al laboratorio, garantizando la integridad y trazabilidad del material recolectado:

Rotulado. Las muestras que se van a despachar deben marcarse en forma legible, de modo que se evite adulteraciones, debiendo incluirse la información siguiente. De acuerdo con dicha norma, el informe de muestreo debe incluir, al menos, la siguiente información:

- a) Designación del producto, especie y variedad, incluyendo el grado de calidad.
- b) Nombre del vendedor o remitente.
- c) Lugar del muestreo.
- d) Fecha y hora del muestreo.
- e) Tamaño de la muestra para ensayos.
- f) Identificación de lote y de la muestra (Nota de despacho, identificación del vehículo y lugar de almacenamiento).
- g) Número del informe del muestreo.
- h) Nombre y firma de la persona que tomó la muestra rúbrica de las partes interesadas.
- i) Si es necesario, indicar la lista de ensayos que debe efectuarse.

El almacenamiento y transporte de la muestra para ensayos se efectuó en condiciones que impidan cualquier cambio en el producto [73]. En la Tabla 21 se muestra la codificación empleada.

Tabla 21. Codificación, identificación registro de las muestras y origen.

Código	Mercado	Lugar de procedencia	Hora
M_1	Mercado A.	C. Azuay y C. G-13	9:00 am
M_2	Mercado B.	Av. Espejo y Convención de 1884	10:00 am
M_3	Mercado C.	Vía a la laguna las Cochas	9:00 am
M_4	Mercado D.	Calle. Manuel de Echandía	13:40 pm
M_5	Mercado E.	Av. Saigai Kanry	10:30 am
M_6	Mercado F.	C.Gonzales Suarez	10:00 am

En las Tablas 22 a la 27 se muestra el orden de recolección de las muestras en los distintos

mercados del cantón.

Tabla 22. Identificación de cada toma de muestras en el Mercado A.

Código	Muestra
M1	Uva
M1-1	Brócoli
M1-2	Mora
M1-3	Lechuga

Tabla 23. Identificación de cada toma de muestras en el Mercado B.

Código	Muestra
M2	Uva
M2-1	Brócoli
M2-2	Mora
M2-3	Lechuga

Tabla 24. Identificación de cada toma de muestras en el Mercado C.

Código	Muestra
M3	Uva
M3-1	Brócoli
M3-2	Mora
M3-3	Lechuga

Tabla 25. Identificación de cada toma de muestras en el Mercado D.

Código	Muestra
M4	Uva
M4-1	Brócoli
M4-2	Mora
M4-3	Lechuga

Tabla 26. Identificación de cada toma de muestras del Mercado E.

Código	Muestra
M5	Uva
M5-1	Brócoli
M5-2	Mora
M5-3	Lechuga

Tabla 27. Identificación de cada toma de muestras del Mercado F.

Código	Muestra
M6	Uva
M6-1	Brócoli
M6-2	Mora
M6-3	Lechuga

Análisis microbiológico

Preparación de medios de cultivos.

Para la preparación de los medios de cultivos que se utilizaron en las siembras microbiológica, se emplea agares selectivos como ALOA (Agar Listeria Ottaviani & Agosti), EMB (Eosina Azul de Metileno) y XLD (Xilosa Lisina Desoxicolato), estos agares son específicos para cada bacteria en estudio, se siguió el procedimiento estandarizado para garantizar su correcto uso. Cada uno de estos medios posee propiedades fisicoquímicas particulares que permiten inhibir el crecimiento de microorganismos no deseados y facilitar la diferenciación de las colonias objetivo.

Durante la preparación de los medios de cultivo, en función del porcentaje de muestras a analizar, se realizó una estimación proporcional de la cantidad de medio necesaria. Con base en este cálculo, se procedió al pesaje del agar deshidratado, el cual se mezcló con agua destilada Tipo II. La mezcla fue sometida a una homogenización inicial manual, con el fin de distribuir uniformemente el medio en el solvente. Posteriormente, se colocó en un horno microondas para facilitar la disolución completa del agar y asegurar la rehidratación adecuada del medio, se evitó la formación de grumos que pudiese afectar la consistencia y efectividad del cultivo.

Una vez homogenizado los agares, se sometió a un auto clavado a 121 °C por dos horas, con el fin de garantizar la esterilidad del medio antes del uso y eliminar posibles microorganismos contaminantes. Este proceso solo se realizó para los agares ALOA y EMB.

Posteriormente, tras la esterilización de los medios se realizó el respectivo dispensado en las cajas Petri, bajo condiciones de bioseguridad, se dejó que este agar se gelifique, posteriormente se colocó la muestra por analizar.

Preparación de la Muestra.

Para la preparación de la muestra se realizó una correcta toma de muestras adecuada y representativa de las frutas y hortalizas, previamente recolectadas. Se pesó 25 gr de cada muestra y se colocaron en fundas Ziploc estériles debidamente rotuladas con la fecha en la que se procesó dicha muestra. Posteriormente se llevó a la cámara de bioseguridad y se les colocó 250 ml de cloruro de sodio estéril 0,85 %.

Después se agitó unos 20 segundos y se llevó al termo bloque a condiciones de 25 °C por 10 min. A continuación, se emplearon micropipetas para tomar 1000 µL de la mezcla obtenida, los cuales se distribuyeron en cajas Petri estériles, realizando una siembra directa. Este procedimiento se ejecutó por duplicado para cada bacteria de interés.

Una vez completada la siembra, se sellaron las cajas Petri y se rotularon con la fecha correspondiente. Las placas fueron incubadas a 35 °C durante 48 horas, para permitir el desarrollo microbiano necesario para la lectura e identificación de colonias bacterianas específicas según el medio de cultivo utilizado.

Aislamiento y purificación de colonias.

Antes de realizar el aislamiento de colonias, *E. coli*, *Listeria* y *Salmonella* se procedió a evaluar visualmente el crecimiento microbiano después de las 48 horas de incubación. Se seleccionaron las placas que presentaban características morfológicas distintivas del patógeno en estudio para llevar a cabo un subcultivo en medios frescos y selectivos, con el objetivo de obtener colonias puras y facilitar su posterior identificación. Estas nuevas placas fueron incubadas a 35 °C durante 24 horas, tras lo cual se procedió con la identificación morfológica, tintorial y bioquímica de las cepas aisladas.

Identificación bioquímica de microorganismos.

PRUEBA DE OXIDASA.

Para la determinación de la actividad oxidasa, se utilizaron tiras reactivas comerciales (tirillas de oxidasa). La prueba se aplicó directamente sobre las colonias con mayor crecimiento, previamente seleccionadas en los medios de cultivo. Se tomó una pequeña cantidad de la colonia con un hisopo estéril, y se aplicó sobre la tira reactiva. La lectura del resultado se realizó de inmediato, observando la aparición de una coloración azul o púrpura intensa dentro de los 30 segundos posteriores a la aplicación.

PRUEBA DE CATALASA.

Para la prueba de catalasa, se depositó una gota de peróxido de hidrógeno al 3% sobre un portaobjetos limpio y seco. Con un asa bacteriológica estéril, se tomó una pequeña cantidad de una colonia bacteriana y se la mezcló cuidadosamente con el reactivo. Esta prueba se basa en la capacidad de algunas bacterias para producir la enzima catalasa, la cual descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular. Esta reacción se evidencia por la formación inmediata de burbujas en el lugar de contacto ocasionadas por el desprendimiento de oxígeno. Por el contrario, la ausencia de burbujeo se asocia con un resultado negativo, característico de bacterias catalasa-negativas como algunos géneros del grupo *Streptococcus*.

PREPARACIÓN PARA LAS PRUEBAS IMVIC.

- **PRUEBA DE INDOL:** en un tubo de ensayo se colocó 5 ml de agua peptonada, con un asa estéril, se tomó una colonia, colocando en el medio, se agitó unos 10 segundos y se incuban a 37 °C por 24 horas.
- **PRUEBAS DE VOGES-PROSKAUER:** en un tubo de ensayo se colocan 5 ml de caldo de MR-VP (Rojo Metilo – Voges-Proskauer), con un asa esterilizada, se inoculó el medio con una colonia bacteriana previamente aislada. Una vez inoculado, el tubo fue incubado a 37 °C durante 24 horas. Esta prueba permite detectar la producción de acetona (acetilmetilcarbinol), un producto intermedio del metabolismo fermentativo de la glucosa por la vía butilenglicólica, característico de ciertas enterobacterias. Tras la incubación, se procede a la adición de los reactivos correspondientes (alfa-naftol y KOH) para la interpretación del resultado, la cual se basa en la formación de una coloración rosada a rojiza como indicativo de una reacción positiva.
- **PRUEBAS DE ROJO METILO:** en un tubo de ensayo se coloca 5 ml, se toma 5 ml de caldo de MR-VP, con un asa estéril se tomó una colonia bacteriana previamente aislada y se inoculó el medio. Posteriormente, el tubo fue incubado a 37 °C durante 24 horas. Esta prueba se emplea para detectar la producción de ácidos estables como productos finales de la fermentación de glucosa, lo cual se evidencia mediante la adición del reactivo Rojo de Metilo y el cambio de color del medio a rojo intenso, lo que indica un resultado positivo.
- **PRUEBA DE CITRATO:** se empleó medio Simmons ya preparado y gelificado en tubos inclinados. Con un asa bacteriológica estéril, se tomó una colonia y se realizó una siembra por estría sobre la superficie del medio, procurando no romper el agar. Luego de la inoculación, los tubos fueron incubados a 37 °C por 24 horas. El crecimiento bacteriano junto con el cambio de color del medio de verde a azul indica un resultado positivo. Con ello se verifica que el microorganismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono y el amonio como fuente de nitrógeno.

Lectura de las pruebas IMVIC.

- **PRUEBA DE INDOL:** transcurrido el tiempo de incubación respectivo, se añade 4 gotas de reactivo de Kovacs al tubo previamente inoculado con la cepa bacteriana en medio adecuado (generalmente caldo tripticasa o SIM). Después de unos minutos se reporta como positivo por la producción de indol mediante la formación de un anillo de color rojo en la superficie del medio. Un resultado negativo por la persistencia del color amarillo del reactivo.
- **PRUEBAS VOGERS-PROSKAUER:** Se añade 12 gotas de α -naftol y 4 gotas de KOH al 40 % y se agita por unos segundos. La aparición de una coloración rojo-rosada en la superficie del medio tras unos minutos indica un resultado positivo, evidenciando la producción de acetoin. En caso de ausencia de cambio de color o si se mantiene el color original del medio, el resultado se considera negativo.

Análisis molecular mediante reacción en cadena de la polimerasa, PCR.

Para el análisis molecular se aplicó la metodología de PCR convencional. A los aislados obtenidos a partir de muestras de frutas y hortalizas, correspondientes a los tres microorganismos en estudio, se les extrajo el ADN genómico utilizando el kit comercial Invitrogen™ Thermo Scientific™ Genomic DNA Mini Kit (K182001, USA), siguiendo rigurosamente las instrucciones del fabricante.

Para la reacción de amplificación se utilizó el método de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional, con el objetivo de identificar y detectar genes específicos correspondientes a *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* y *Escherichia coli*. La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 50 µL, compuesto por 45 µL de mezcla de reactivos y 5 µL de ADN genómico extraído de los aislados confirmados.

La mezcla de reacción contenía los siguientes componentes: primers Forward y Reverse (Invitrogen, 90489462), agua libre de nucleasas (*Nuclease-Free Water*, Promega, 0000334315, USA) y GoTaq® Green Máster Mix 2X (Promega, 0000543067, USA). Este último reactivo incluye en su formulación una mezcla maestra que contiene tampón de reacción en concentraciones óptimas, dNTPs, ADN polimerasa GoTaq, MgCl₂, y colorantes de carga azul y amarillo que permiten monitorear el avance durante la electroforesis.

Para cada reacción, se colocaron 45 µL de la mezcla preparada en un microtubo Eppendorf estéril, y se añadieron 5 µL del ADN extraído. Posteriormente, las muestras fueron colocadas en un termociclador Biometra TAdvanced, programado con los ciclos de amplificación específicos que se detallan en la Tabla 29.

Los resultados se analizaron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa (Agarose®, Fisher Bioreagents, BP160-100, USA) al 2 %, preparado con tampón 1X. A la mezcla se le añadieron 4 µL del colorante Nucleic Acid Dye (Diamond™), y se sometió a un voltaje de 135 V durante 30 minutos, se utilizó como referencia un marcador de peso molecular de 100 pb (INBIO HIGHWAY B.S.A., K0177).

La amplificación del ADN se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando cebadores diseñados para amplificar un fragmento del gen 16S ARNr. Las secuencias de los iniciadores utilizados fueron tomadas de estudios descritos en otros trabajos [74], y se detallan en la Tabla 28.

Tabla 28. Cebadores específicos utilizados en esta investigación.

Bacteria	Secuencia	Pares de bases bp	Referencias
Listeria monocytogenes	(R,5'-GCCGTCGATGATTT-GAACTTCATC-3') (F,5'- GAATGTAAACTTCGGCGCAAT-CAG-3')	388 bp	[75]
Escherichia coli con su serotipo O157:H7	(R,5'-GCTATTTCTGCGGATAAGAGA-3') (F,5'-CCAGGCAAAGAGTTTATGTTGA-3')	212 bp	[74]
Salmonella spp	invaA3R (R,5'-TCCATCAAATTAGCGGAGGC-3') inva3F (F,5'-AACGTGTTTCCGTCGTAAT-3')	244 bp	[76]

Tabla 29. Condiciones para el proceso de PCR para Listeria monocytogenes, Escherichia coli y Salmonella spp.

# de ciclos	T (°C) / T	T (°C) / T	T (°C) / T	Fases
	Listeria m.	Salmonella spp.	Escherichia coli	
1	95/2 min	95/5 min	95/2 min	Desnaturalización
	95/1 min	95/1 min	95/30 seg	Desnaturalización
30	53/45 seg	63/45 s	56/30 seg	Unión de iniciadores
	72/ 1 min	72/1 min	72/30 seg	Extensión
1	72/ 7 min	72/5 min	72/5 min	Extensión

Nota. Tomado de Meghdadi y Nassirabady (2019) [75].

Los resultados de la (PCR) fueron visualizados mediante electroforesis, en una concentración de agarosa del 2% en 100 ml de la solución del tampón TAE 1X (Tabla 30) calentándolo en un microondas evitando la ebullición para que no se desnaturalice el gel.

Tabla 30. Reactivos del TAE para PCR, en *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp*

Reactivos	Volumen uni.	<i>Listeria</i> N° de muestras	E – coli N° de muestras	<i>Salmonella spp.</i> N° de muestras
GoTaq® Green Master Mix, 2X	12.5 µL	9	4	4
Forwar primer, 10µM	0.25-2.5 µL			
River ,10µM	0.25 -2.5µL			
DNA Templade	1-5 µL			
Nuclease-Free Wáter	25 µL			
Volumen total		45,5/9 = 5,05 µL	45,5/4 = 11,37 µL	45,5/4 = 11,37 µL

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL, conformado por 45 µL de la mezcla y 5 µL de ADN. Las condiciones para utilizar en la prueba PCR se representa en la Tabla 29 para cada uno de los microorganismos de estudio.

La muestra que contenía el ADN bacteriano fue depositada en pozos del gel de agarosa junto con un marcador de peso molecular de 100 pb (INBIO HIGHWAY B.S.A., K0177), con el fin de estimar el tamaño de los fragmentos amplificados. Además, se incluyeron controles positivos para *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*.

El proceso de electroforesis se realizó a 135 voltios durante 30 minutos. Finalizada la corrida, el gel fue teñido sumergiéndolo en una solución de tampón TAE 1X que contenía 4 µL del colorante Nucleic Acid Dye (Diamond™) durante 25 minutos. Posteriormente, el gel fue visualizado utilizando un transiluminador de luz ultravioleta para la detección de los fragmentos de ADN.

Análisis de datos.

El procesamiento y análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó utilizando el software Statgraphics Centurion 19, el cual permitió realizar análisis descriptivos y pruebas de significancia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Muestra en los mercados del Cantón Guaranda

Los resultados del muestreo en los diferentes mercados del cantón Guaranda se resumen en la Tabla 31. Esta tabla incluye la identificación de cada mercado, su código asignado, y la dirección o lugar de procedencia donde se realizó la toma de muestras.

Tabla 31. Resultados de la toma de muestras de los mercados del Cantón Guaranda.

Código	Identificación del Mercado	Lugar de Procedencia
M1		
M1-1	A	Av Monseñor Candido Rada y Azuay
M1-2		
M1-3		
M2		
M2-1	B	Calle Espejo y Sucre
M2-2		
M2-3		
M3		
M3-1	C	Guaranda Vía a las Cochas
M3-2		
M3-3		
M4		
M4-1	D	Calles Manuel de Echandía y Simón Bolívar
M4-2		
M4-3		
M5		
M5-1	E	Vía Guaranda Salinas km 20
M5-2		
M5-3		
M6		
M6-1	F	Calle Ángel Polibio Chávez y José García
M6-2		
M6-3		

Resultados microbiológicos.

Las pruebas microbiológicas realizadas en las muestras de frutas y hortalizas recolectadas en distintos mercados del Cantón Guaranda, ejecutadas por duplicado, evidenciaron la presencia de contaminación en aproximadamente el 70 % de las placas analizadas. Esto sugiere una alta carga microbiana, lo que podría estar relacionado con prácticas deficientes de higiene en el manejo, transporte o almacenamiento de los productos hortofrutícolas comercializados en estos establecimientos.

Resultados bioquímicos.

Cuantificación de *Listeria monocytogenes* de las muestras de productos hortofrutícolas de los diferentes mercados del Cantón Guaranda.

Para identificar y cuantificar la presencia de *Listeria monocytogenes*, se aplicaron diversas pruebas bioquímicas, entre ellas el IMViC (Indol, Rojo de metilo, Voges-Proskauer y Citrato), así como las pruebas de catalasa y oxidasa. A continuación, se presenta la Tabla 32, donde se detallan los resultados diferenciados por código de muestra, indicando la presencia (+) o ausencia (–) de reacciones en cada una de las pruebas realizadas.

Tabla 32. Valores obtenidos mediante resultados de las pruebas bioquímicas en *Listeria monocytogenes*.

Pruebas Bioquímicas		PRUEBAS IMVIC											
Código	Bacteria	Catalasa		Oxidasa		Rojo de Metilo		Indol		Voges Poskauer		Citrato	
		R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
M1	Listeria	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
M1-1		+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
M1-2		+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
M1-3		+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
M2-2		+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
M2-3		+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
M3		+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
M3-1		+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
M3-2		+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
M3-3		-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
M4		+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
M4-1		+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
M4-2		+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
M4-3		+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
M5		+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
M5-1		+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
M5-2		+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M5-3		+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
M6		+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
M6-1		+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
M6-2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
M6-3	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	

La Tabla 32 evidencia que muestras como M1-3, M2-2, M2-3, M3-3, M4, M4-3, M5-1 y M6-2 presentaron resultados bioquímicos compatibles con *Listeria monocytogenes*, lo que sugiere su posible presencia en productos hortofrutícolas comercializados en estos mercados. La presencia reiterada de resultados positivos en pruebas como catalasa, rojo de metilo y oxidasa, junto con pruebas negativas en indol, citrato y Voges-Proskauer, refuerza la sospecha de contaminación por *Listeria*. Estos resultados señalan deficiencias en las condiciones higiénico-sanitarias en las muestras analizadas, lo cual representa un riesgo potencial para la salud pública, en especial si los productos son consumidos crudos.

Las muestras M1, M1-1, M1-2, M2, M2-1, M3, M3-1, M3-2, M4-1, M4-2, M5, M5-2, M5-3, M6, M6-1 y M6-3 no se detectaron la presencia de *Listeria*, indicando que estas cumplen con

los estándares establecidos. Además que el Instituto de Colaboración Interinstitucional para el Análisis de la Inocuidad Alimentaria (IFSAC) describe a este microorganismo perjudicial que se encuentra presente en los alimentos, capaz de causar listeriosis gastrointestinal tanto en humanos como en animales [77]. Wiśniewski y colaboradores destacan de igual forma que el patógeno, *L. monocytogenes*, tiene la capacidad de contaminar frutas y verduras en diversas fases, que abarcan desde su cultivo inicial hasta su procesamiento final [78]time of operation (a few–several minutes. Se ha establecido que *Listeria monocytogenes* es un microorganismo que se encuentra en zonas húmedas y frías que pueden soportar hasta 1° C por lo tanto es indispensable la higiene personal, la desinfección constante de zonas de almacenamiento y distribución [79].

En este contexto, los abortos a temprana edad pueden estar asociados a una mala alimentación y a la escasa desinfección de las frutas y hortalizas consumidas. Diversos estudios indican que en la población no se observan prácticas higiénicas adecuadas durante la preparación de estos alimentos, ya que, en muchos casos, no se realiza un proceso de desinfección apropiado. Esta situación favorece la presencia de microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes* [80].

Cuantificación de Escherichia coli de las muestras de productos hortofrutícolas de los diferentes mercados del cantón Guaranda.

La Tabla 33 presenta los resultados de las pruebas bioquímicas para la identificación de *Escherichia coli* en muestras recolectadas en distintos mercados del Cantón Guaranda.

Tabla 33. Valores obtenidos mediante resultados de las pruebas bioquímicas de *Escherichia coli*.

		Pruebas Bioquímicas						PRUEBAS IMVIC					
Código	Bacteria	Catalasa		Oxidasa		Rojo de metilo		Indol		Voges poskauer		Citrato	
		R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
M1	E. coli	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
M1-1		-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
M1-2		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M2		-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
M2-1		-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
M2-2		+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
M2-3		-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
M3-3		-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
M4-3		+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
M5-1		+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
M5-2		+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
M2-1		-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
M3		+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
M3-1		-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
M6-1		-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
M6-2		+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+

Los resultados evidencian la presencia de *Escherichia coli* en las muestras M2-1, M3 y M6-2, una señal de posibles deficiencias en la aplicación de las Buenas Prácticas de Higiene (BPH) y Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) en la manipulación y comercialización de frutas y hortalizas en dichos mercados. Por el contrario, las demás muestras (M1, M1-2, M1-3, M2, M2-2, M2-3, M3-1, M3-2, M3-3, M4, M4-1, M4-2, M4-3, M5, M5-1, M5-2, M5-3, M6, M6-1 y M6-3) no presentaron indicios de contaminación por *E. coli*, cumpliendo con los estándares microbiológicos establecidos para alimentos frescos.

La *E. coli* es predominantemente de origen intestinal su presencia en alimentos se da cuando los microorganismos se transfieren de una superficie o alimento contaminado a otro no contaminado o a través del contacto directo o de manera indirecta mediante la transferencia de contaminantes por superficies, utensilios o personas que manipulan los alimentos [81].

En este sentido, la transmisión puede ocurrir tanto por la ingesta de alimentos o agua contaminada como por el contacto con superficies insalubres. Igualmente, el Codex sobre sustancias químicas alimentarias, especifica que la principal fuente de exposición parece ser la ingesta de alimentos contaminados, mencionando ejemplos como carne molida cruda o mal cocida, leche sin pasteurizar y productos frescos. Esto sugiere que las prácticas de higiene alimentaria

y el manejo adecuado de los alimentos son determinantes para prevenir la propagación de estas infecciones [5].

Cuantificación de Salmonella spp de las muestras de productos Hortofrutícolas de los diferentes mercados del cantón Guaranda.

La Tabla 34 presenta los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas para identificar la presencia de *Salmonella spp.* en muestras hortofrutícolas recolectadas en diferentes mercados del cantón Guaranda.

Tabla 34. Valores obtenidos mediante resultados de las pruebas bioquímicas de Salmonella spp.

		Pruebas Bioquímicas						PRUEBAS IMVIC					
Código	Bacteria	Catalasa		Oxidasa		Rojo de metilo		Indol		Voges poskauer		Citrato	
		R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
M2	Salmonella	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
M2-1		-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
M2-3		-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
M3		+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
M3-1		+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
M3-2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
M3-3		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
M4		+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
M4-1		+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
M4-2		+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
M4-3		-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
M5		+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
M5-1		+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
M5-2		+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
M5-3		-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
M6		+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
M6-1		-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
M6-2		+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
M6-3	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	

En estos ensayos se encontró presencia de *Salmonella spp.* en las muestras M2-3, M3-1 y M6-2, lo que indica una escasa aplicación de medidas sanitarias y de control de calidad en la sección de frutas y hortalizas de los respectivos mercados. En contraste, las muestras M1, M1-1, M1-2, M1-3, M2, M2-1, M2-2, M3, M3-2, M3-3, M4, M4-1, M4-2, M4-3, M5, M5-1, M5-2, M5-3, M6, M6-1 y M6-3 no evidenció presencia de *Salmonella spp.*, lo que indica el cumplimiento

con los criterios microbiológicos establecidos por las normativas nacionales e internacionales.

La *Salmonella* es responsable de aproximadamente un tercio de las muertes asociadas a enfermedades transmitidas por alimentos. Sin embargo, este problema suele estar subestimado, ya que la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que entre el 60 % y el 80 % de los casos de salmonelosis no se notifican, lo que constituye un riesgo importante para la salud pública [82].

Un alimento contaminado con *Salmonella* puede provocar enfermedades que van desde cuadros clínicos leves hasta afecciones graves o incluso mortales. Este patógeno figura entre las diez enfermedades de notificación obligatoria en Ecuador, lo que exige el cumplimiento estricto de las normativas del Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN) y la aplicación de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) en las fases de producción, comercialización y distribución [83].

Resultados bioquímicos.

La Tabla 35 detalla los resultados positivos para la PCR de *Listeria monocytogenes*, evidenciados en muestras específicas de los mercados del cantón Guaranda.

Tabla 35. Resultados de positivos para PCR de *Listeria monocytogenes*

Código		Pruebas Bioquímicas						PRUEBAS IMVIC					
		Catalasa		Oxidasa		Rojo de metilo		Indol		Voges poskauer		Citrato	
		R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
M1-3	Listeria	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
M2-2		+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
M2-3		+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
M3-3		+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
M4		+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
M4-3		+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
M5-1		+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
M6-2		+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-

Para comprobar la existencia de la bacteria *Listeria monocytogenes*, en las pruebas bioquímicas se toma en cuenta que para la prueba de catalasa todas las repeticiones deben de salir positivas (+), en la prueba en OXIDASA las repeticiones deben de salir negativa (-), en la prueba del ROJO DE METILO sus resultados deben de ser positivas (+), para las pruebas INVIC, en la prueba Indol su resultado debe de ser positivo (+), en las pruebas de VOGES PROSKAUER los resultados en replicas negativas (-) y para las pruebas del CITRATO son negativas (-), no debe

de tener un cambio en su coloración.

Se encontró muestras positivas en los siguientes mercados y productos: Mercado A (M1-3, lechuga), Mercado B (M2-2, mora; M2-3, lechuga), Mercado C (M3-3, lechuga), Mercado D (M4, uva; M4-3, lechuga), Mercado E (M5-1, brócoli) y Mercado F (M6-2, mora).

Estos resultados señalan la presencia de *Listeria monocytogenes* en productos hortofrutícolas comercializados en los mercados evaluados, lo que pone de manifiesto la necesidad de implementar Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), validación de procesos y rotación de desinfectantes para minimizar el riesgo de establecimiento de nichos de contaminación en frutas y hortalizas [81], [84].

Por otra parte, para comprobar la existencia de la bacteria *Escherichia coli.*, en las pruebas bioquímicas se toma en cuenta que para la prueba de catalasa todas las repeticiones deben de salir positivas (+), en la prueba en OXIDASA las repeticiones deben de salir negativa (-), en la prueba del ROJO DE METILO sus resultados deben de ser positivas (+), para las pruebas INVIC, en la prueba Indol su resultado debe de ser positivo (+), en las pruebas de VOGES PROSKAUER los resultados en replicas negativas (-) y para las pruebas del CITRATO son negativas (-), no debe de tener un cambio en su coloración. En la Tabla 36 se muestran los resultados del análisis PCR para estos ensayos.

Tabla 36. Resultados de positivos para PCR de Escherichia coli

Código	Bacteria	Pruebas bioquímicas				Pruebas invic							
		Catalasa		Oxidasa		Indol		Rojo de metilo		Voges poskauer		Citrato	
		R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
M2-1	E. Coli	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
M3		+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
M6-2		+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-

Se encontró resultados positivos para este ensayo en muestras del Mercado B (código M2-1, brócoli), Mercado C(código M3, uva) y Mercado F (código M6-2, mora). De acuerdo con lo establecido, frutas y verduras que crecen cerca del suelo o tienen superficies irregulares que dificultan su limpieza presentan mayor riesgo de contaminación, razón por la cual es importante realizar las pruebas IMViC. Estas pruebas permiten diferenciar bacterias coliformes, como la *E. coli*, tomando como criterios positivos las pruebas de indol y rojo de metilo, y negativos las de Voges-Proskauer y citrato [85], [86].

Para comprobar la existencia de la bacteria *Salmonella spp.*, en las pruebas bioquímicas se toma en cuenta que para la prueba de catalasa todas las repeticiones deben ser positivas (+); en la prueba de oxidasa, las repeticiones deben ser negativas (-); en la prueba del rojo de metilo, los resultados deben ser positivos (+). Para las pruebas IMViC, en la prueba de indol, el resultado debe ser positivo (+); en la prueba de Voges-Proskauer, los resultados deben ser negativos (-);

y en la prueba del citrato, el resultado también debe ser negativo (–), sin cambios de coloración. En la Tabla 37 se muestran los resultados del análisis PCR para estos ensayos.

Tabla 37. Resultados de positivos para PCR de Salmonella spp.

Código	Bacterias	Pruebas bioquímicas						Pruebas imvic					
		Catalasa		Oxidasa		Rojo de metilo		Indol		Voges poskauer		Citrato	
		R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
M2-3	Salmonella	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
M3-1		+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
M6-2		+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-

Se encontró evidencia de contaminación en los mercados y sus respectivas frutas u hortalizas: Mercado B (código M2-3, lechuga), Mercado C(código M3-1, brócoli) y Mercado F (código M6-2, brócoli). Se ha documentado que las frutas y verduras frescas son los principales medios de transmisión de estas bacterias patógenas; sin embargo, a la luz de estos resultados, la identificación oportuna de las mismas aún no se implementa en la cadena de producción ni durante el tratamiento poscosecha de productos agrícolas seleccionados [87].

Medición del ADN por medio del nanodrop.

La medición del ADN se realiza principalmente a través de la espectrofotometría mediante correlación de la absorbancia y la concentración.

- **Espectrofotometría:** para cuantificar el ADN, se emplea un espectrofotómetro, siendo el Nanodrop un ejemplo común. Este instrumento mide la cantidad de luz ultravioleta (UV) que una muestra de ADN es capaz de absorber a una longitud de onda específica de 260 nm.
- **Concentración:** la concentración de ADN en una muestra se puede determinar directamente a partir de la cantidad de luz que absorbe. Para realizar este cálculo, se utilizan Ecuación 2, fundamentadas en la Ley de Beer-Lambert.

Ec. 2

Identificación de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* y *Escherichia coli* mediante Reacción de Cadena Polimerasa (PCR).

Tras confirmar la identidad de *Listeria*, *Escherichia coli*, y *Salmonella* mediante observaciones microscópicas y pruebas microbiológicas en medios selectivos, se procedió a aislar su ADN. Para esta extracción, se empleó el kit de Invitrogen 90489462, siguiendo estrictamente las

instrucciones del fabricante. Una vez extraído el ADN de cada microorganismo, se evaluó su pureza utilizando un espectrofotómetro Nanodrop One de THERMO SCIENTIFIC. En total, se utilizaron 14 aislamientos de *Listeria*, *Escherichia coli*, y *Salmonella*. Estas cepas se obtuvieron de muestras de los mercados ubicadas en el cantón Guaranda, tras ser identificadas mediante análisis microbiológicos selectivos.

La PCR se basa en la repetición secuencial de tres etapas fundamentales: desnaturalización, alineamiento y extensión. Durante la desnaturalización, se alcanzan temperaturas entre 94 y 98 °C para separar las hebras de ADN. Posteriormente, la temperatura se reduce para permitir que fragmentos cortos de ADN sintético, denominados cebadores, se unan a secuencias específicas del ADN blanco. Estos cebadores son diseñados de manera particular para cada microorganismo que se desea identificar, como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* y *Escherichia coli*. En la Tabla 38 a 40 se muestra la concentración de ADN extraído mediante Genomic DNA Mini kit k182001.

Tabla 38. Concentración de ADN mediante Espectrofotómetro Nanodrop para *Listeria monocytogenes*

Código	ng/ μ L
M1-3	47,2
M2-2	24,1
M2-3	28,2
M3-3	63,8
M4	92,8
M4-3	84,7
M5-1	99,4
M6-1	93,5

Tabla 39. Concentración de ADN mediante Espectrofotómetro Nanodrop para *Escherichia coli*.

Escherichia coli	Nanodrop
Código	ng/ μ L
M2-1	70,5
M3	81,9
M6-2	99,4

Tabla 40. Concentración de ADN mediante Espectrofotómetro Nanodrop para Salmonella.

Salmonella	Nanodrop
Código	ng/ μ L
M2-3	57,4
M3-2	72,7
M6-2	49,8

Las concentraciones de ADN obtenidas mostraron niveles de pureza dentro de los intervalos aconsejados. En particular, las relaciones de absorbancia 260/280 se ubicaron dentro del intervalo óptimo para ADN puro, establecido entre $\geq 1,6$ y $2,1$. La cantidad de ADN recuperado varió según la muestra, en función del contenido original de material genético; no obstante, las concentraciones obtenidas fueron adecuadas y suficientes para permitir el desarrollo de análisis moleculares posteriores [74].

De los 14 aislados en total de las bacterias de *Listeria*, *Escherichia coli*, y *Salmonella* que se extrajo ADN, se obtuvieron diversas concentraciones de material genético. En el caso de *Listeria*, la muestra M5-1 presentó la mayor concentración con $98,5$ ng/ μ L, mientras que la menor fue registrada en la muestra M2-2 con $24,1$ ng/ μ L. Para *Escherichia coli*, la muestra M6-2 mostró un valor de $99,4$ ng/ μ L, y la menor concentración se observó en M2-1 con $70,5$ ng/ μ L. En *Salmonella*, la concentración más alta se obtuvo en la muestra M3-2 con $72,7$ ng/ μ L, y la más baja en M2-3 con $57,4$ ng/ μ L.

Cálculos matemáticos de la Sensibilidad.

Para el cálculo dentro de ensayos de PCR convencional se considera el rango de concentración recomendado de ADN el cual oscila entre . En este estudio se seleccionaron tres niveles de concentración para evaluar el rendimiento del sistema: una concentración baja de 10 ng/ μ L, una concentración media de 20 ng/ μ L y una concentración alta de 30 ng/ μ L.

Estas concentraciones se prepararon a partir de una solución stock de ADN genómico a 100 ng/ μ L. Para obtener los volúmenes necesarios de dilución, se utilizó la Ecuación 3:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \quad \text{Ec. 3}$$

Donde:

C_1 : Concentración inicial de ADN.

V_1 : Volumen del stock requerido.

C_2 : Concentración final deseada.

V_2 : Volumen final.

En la Tabla 41 se muestran los valores de concentración de los diferentes microorganismos preparados a partir de la solución stock.

Tabla 41. Concentraciones preparadas.

Bacteria	ADN	10 ng/ μ L	20 ng/ μ L	30 ng/ μ L
Escherichia coli O157:H7	98,5	10,15	20,30	30,45
Listeria monocytogenes	99,4	10,06	20,12	30,18
Salmonella spp	72,7	13,76	27,51	41,27

Concentraciones del ADN para el ANOVA.

En la Tabla 42 se muestra los intervalos de dilución de cada una de las bacterias en estudio. En todos los casos, los tratamientos presentaron un valor de detección de 1, lo que significa que tiene un rango de sensibilidad adecuado para las concentraciones de 10, 20 y 30 .

Tabla 42. Concentraciones de ADN para el análisis de ANOVA.

Tratamientos	Dilución 10 ng/ μ L			Dilución 20 ng/ μ L			Dilución 30 ng/ μ L		
	E.coli	Listeria	Salmonella	E.coli	Listeria	Salmonella	E.coli	Listeria	Salmonella
T_1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T_2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T_3	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T_4	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T_5	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T_6	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T_7	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T_8	1	1	1	1	1	1	1	1	1
T_9	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Análisis molecular

Detección de Listeria monocytogenes mediante reacción de cadena de polimerasa (PCR).

El ADN que se extrajo de los cultivos puros de *Listeria monocytogenes* se sometió a análisis y a un proceso de amplificación. En la amplificación de *Listeria monocytogenes* se utilizó los cebadores de marca Invitrogen cuya secuencia fue de (R,5'-GCCGTCGATGATTTGAACTTCATC-3') y *Listeria* (F,5' GAATGTAACTTCGGCGCAATCAG-3') que examina el género de *Listeria* requerido para amplificar en fragmentos de aproximación de 388 bp.

De las 25 muestras recolectadas se realizó las pruebas bioquímicas en la cual muestras que 8

muestras dieron positivas a *Listeria monocytogenes*, entre ellas están M1-3, M2-2, M2-3, M3-3, M4, M4-3, M5-1 y M6-1 las mismas que fueron extraídas el ADN y analizadas por medio de PCR como se muestran en la Figura 7.

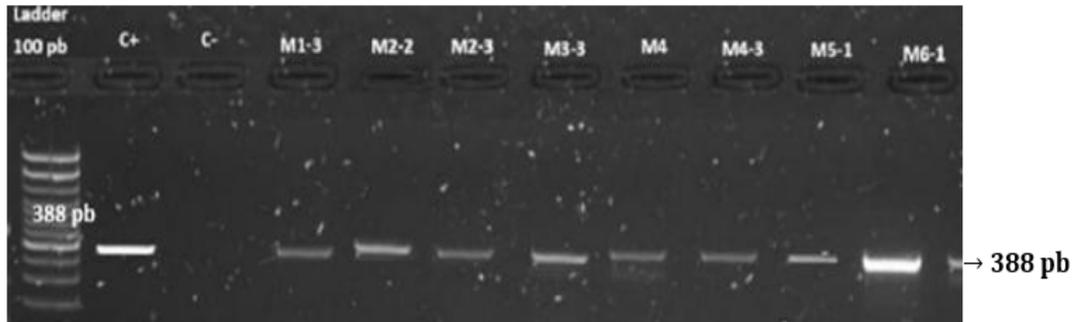


Figura 7. Resultados de electroforesis después de realizar PCR con los aislados de *Listeria monocytogenes*.

Las condiciones del termociclador para realizar este proceso fueron las siguientes: Un ciclo a 95 °C durante un tiempo de dos minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por un minuto, el anillamiento a 53 °C por un tiempo de 45 segundos, la extensión a 72 °C por un minuto y la extensión final a 72 °C por 7 minutos y para que se mantenga se bajó a 4 °C durante un tiempo de 7 minutos. Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa y documentados con un fotodocumentador bajo luz ultravioleta. Los resultados evidenciaron bandas específicas que confirmaron la presencia de *Listeria monocytogenes* en los aislados analizados. Se utilizaron controles positivos de *Listeria monocytogenes*, los cuales mostraron patrones de amplificación consistentes con los observados en las muestras analizadas.

Detección de Escherichia coli mediante reacción de cadena de polimerasa (PCR).

La amplificación se llevó a cabo utilizando cebadores de la marca Invitrogen diseñados para el serotipo O157:H7 de *Escherichia coli*. Las secuencias de estos cebadores fueron (R, 5'-GCTATTTCTGCGGATAAGAGA-3') y (F, 5'-CCAGGCAAAGAGTTTATGTTGA-3'), los cuales identifican el género *E. coli* y produjeron fragmentos de ADN de un tamaño aproximado de 212 pb.

De las 25 muestras recolectadas por duplicado, de las cuales tres de ella como se muestra en la Figura 8 M2-1, M3 y M6-2, mismas que fueron extraídas el ADN y analizadas mediante PCR.

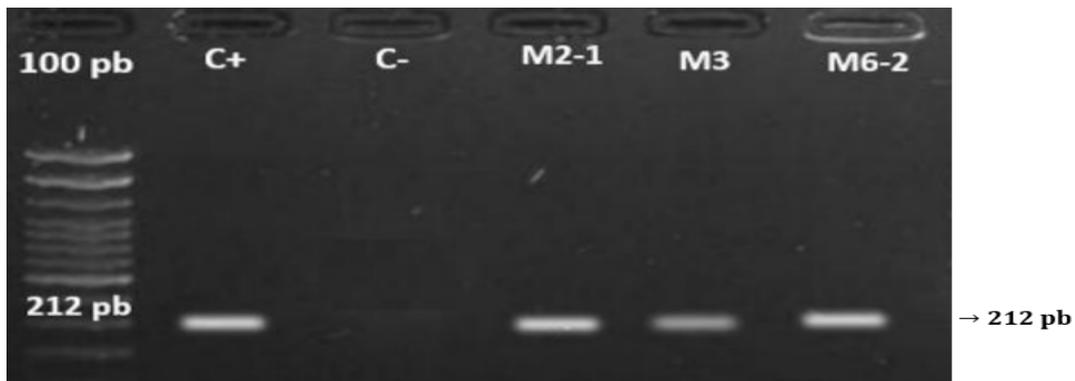


Figura 8. Resultados de electroforesis después de realizar PCR con los aislados de *Escherichia coli*.

Las condiciones en el termociclador para realizar el proceso fueron las siguientes: Un ciclo a 95°C durante un tiempo de dos minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, el anillamiento a 56°C por un tiempo de 30 segundos, la extensión a 72°C por 30 segundos y un ciclo final a 72°C por cinco minutos y para que se mantenga se bajó a 4 °C durante un tiempo indefinido.

Mediante el análisis PCR y la técnica de electroforesis tras observar en la foto documentador con luz ultravioleta los resultados de los aislados pertenecieron a la especie de *Escherichia coli* perteneciente al serotipo OH:157 en el cual se utilizó controles positivos de *Escherichia coli*.

Detección de Salmonella spp. mediante reacción de cadena de polimerasa (PCR).

Del ADN extraído de los aislados de *Salmonella spp.* fue analizado y amplificado mediante el método descrito en otros trabajos [74].

La amplificación del ADN se llevó a cabo utilizando los cebadores Invitrogen invaA3R (R,5'-TCCATCAAATTAGCGGAGGC-3') e inva3F (F,5'-AACGTGTTTCCGTCGTAAT-3'). Estos iniciadores están diseñados para reconocer secuencias genéticas específicas del género *Salmonella spp.*, produciendo fragmentos de ADN de un tamaño aproximado de 244 pb.

De las 25 muestras recolectadas por duplicado. Tres de ellas entre ella M2-3, M3-1 y M6-2 (Figura 9), mismas que fueron extraídas el ADN y analizadas mediante PCR.

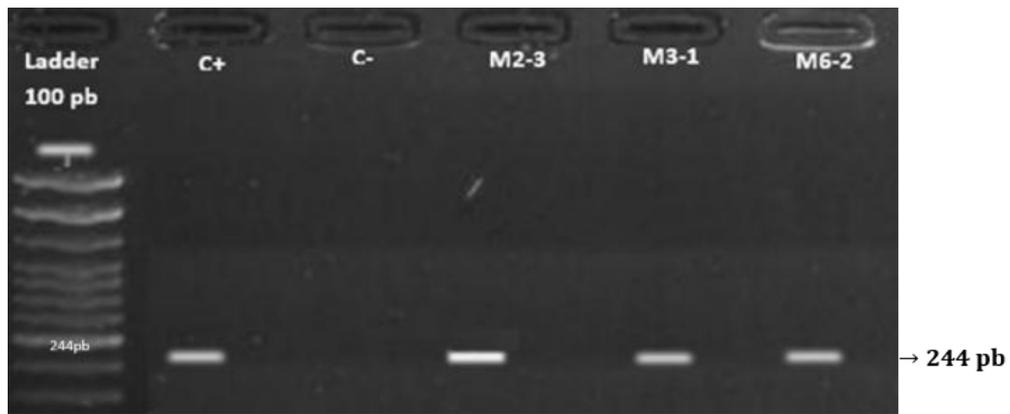


Figura 9. Resultados de electroforesis después de realizar PCR con los aislados de *Salmonella spp.*

Las condiciones en el termociclador para realizar el proceso fueron las siguientes: Un ciclo a 95 °C durante un tiempo de 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por un minuto, el anillamiento a 63 °C por un tiempo de 45 segundos, la extensión a 72 °C por un minuto y la extensión final a 72 °C por 5 minutos y para que se mantenga se bajó a 4 °C durante un tiempo indefinido.

Mediante el análisis PCR y la técnica de electroforesis tras observar en la foto documentador con luz ultravioleta los resultados de los aislados pertenecieron a la especie de *Salmonella spp* en el cual se utilizó controles positivos de *Salmonella spp*.

PCR en Sensibilidad de los patógenos en estudio.

La prueba de sensibilidad realizada para *Listeria monocytogenes* mostró una amplificación del fragmento del interés, lo cual indica que la PCR es suficientemente sensible para determinar concentraciones de ADN desde 10 a 30 ng/μL (Figura 10).

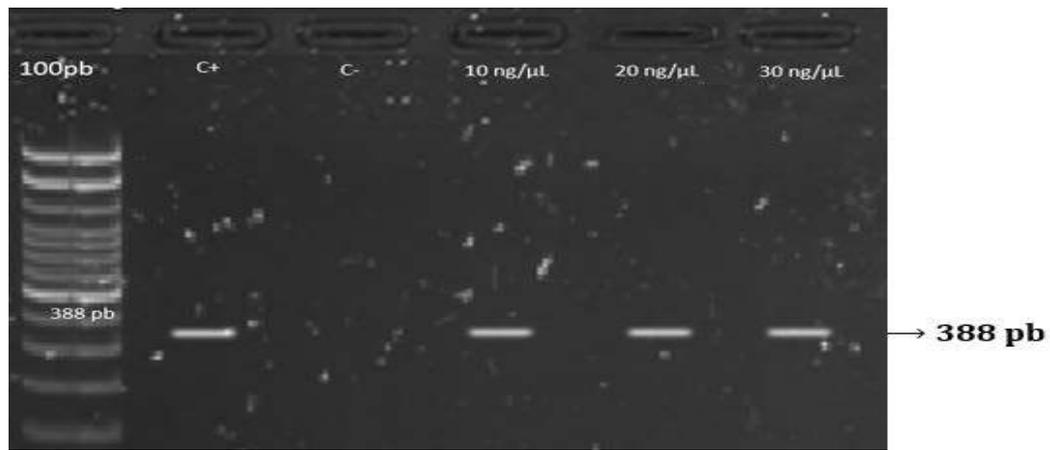


Figura 10. Sensibilidad de *Listeria monocytogenes*.

Bajo las condiciones experimentales, todas las bandas encontradas fueron específicas y únicas para el par de cebadores utilizados, lo que demuestra tanto la especificidad como la sensibilidad del método.

En el caso de la PCR para la sensibilidad en *Escherichia coli*, con diferentes concentraciones de ADN muestras que todas las bandas son claras en la posición de 212 pb, dando a conocer que, si se tiene una amplificación adecuada desde 10, 20 y 30 ng/μL (Figura 11).

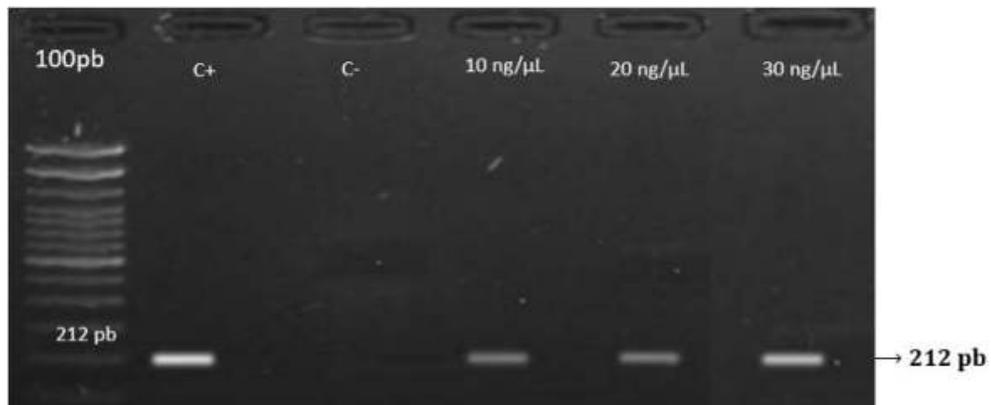


Figura 11. Sensibilidad en *Escherichia coli*.

Finalmente, para la sensibilidad para la *Salmonella spp*, se pudo observar que la amplificación fue visible desde los 10 ng/μL, con un leve aumento de intensidad a mayores concentraciones (Figura 12).

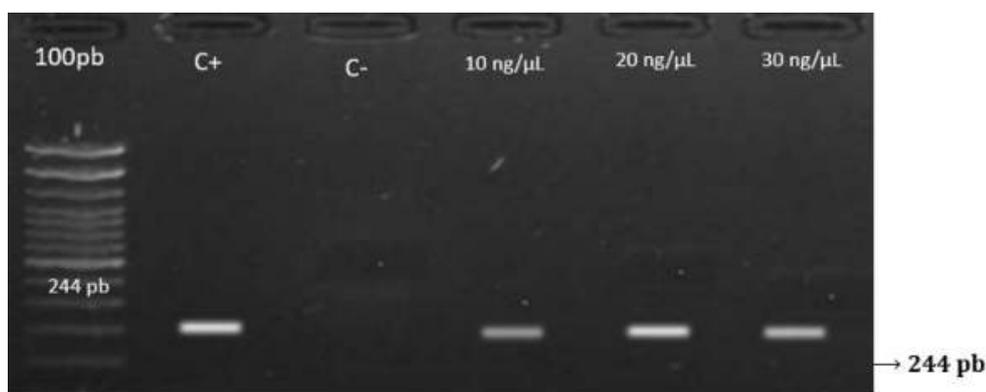


Figura 12. Sensibilidad en *Salmonella* spp.

ANOVA

En la Tabla 43 se presenta los resultados del análisis de varianza (ANOVA) multifactorial para determinar si existen efectos significativos individuales o en interacción entre los factores: tipo de bacteria y concentración de ADN. El análisis compara la variabilidad explicada por los factores con la variabilidad interna (residuos).

Tabla 43. Análisis de varianza mediante un ANOVA multifactorial

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P	Observación
Efectos Principales						
A: Tratamiento	0,0246914	2	0,0123457	1,00	0,3729	
B: Dilución	0,0246914	2	0,0123457	1,00	0,3729	SN
Interacciones						
AB	0,0493827	4	0,0123457	1,00	0,4133	
RESIDUOS	0,888889	72	0,0123457			
Total (Corregido)	0,987654	80				

Gl: grados de libertad.

Los valores de p obtenidos para los factores principales A (Tratamiento) y B (Dilución) fueron ambos de 0,3729, mientras que para la interacción AB fue de 0,4133. Estos valores son superiores al umbral comúnmente utilizado de 0,05, lo cual indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, las diluciones ni sus interacciones.

En la Tabla 44 se presentan los resultados del análisis de medias aritméticas que se obtuvieron del diseño experimental multifactorial, con la finalidad de comparar la respuesta de los factores evaluados para concentraciones de ADN y los microorganismos (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp), sobre la sensibilidad de detección mediante la técnica de

PCR.

Tabla 44. Análisis de medias mediante un ANOVA multifactorial.

Nivel	Casos	Media	Error Est.	Límite Inferior	Límite Superior
Media global	81	0,987654			
Tratamiento					
1	27	0,962963	0,0213833	0,920336	1,00559
2	27	1,0	0,0213833	0,957373	1,04263
3	27	1,0	0,0213833	0,957373	1,04263
Dilución					
10	27	0,962963	0,0213833	0,920336	1,00559
20	27	1,0	0,0213833	0,957373	1,04263
30	27	1,0	0,0213833	0,957373	1,04263
Tratamiento por Dilución					
E. Coli;10	9	0,888889	0,037037	0,815057	0,962721
E. Coli;20	9	1,0	0,037037	0,926168	1,07383
E. Coli;30	9	1,0	0,037037	0,926168	1,07383
Listeria;10	9	1,0	0,037037	0,926168	1,07383
Listeria;20	9	1,0	0,037037	0,926168	1,07383
Listeria;30	9	1,0	0,037037	0,926168	1,07383
Salmonella;10	9	1,0	0,037037	0,926168	1,07383
Salmonella;20	9	1,0	0,037037	0,926168	1,07383
Salmonella;30	9	1,0	0,037037	0,926168	1,07383

Nota. Datos obtenidos a partir del análisis mediante el software Statgraphics Centurion 19.

El análisis muestra el comportamiento de las medias por tratamiento y permite establecer si existen diferencias estadísticas significativas entre los niveles evaluados.

En la Figura 13 se muestra el análisis de comparación de medias de diferentes tratamientos evaluados, utilizando el método de Diferencia Mínima Significativa de Fisher con un intervalo de confianza del 95 %. Esto permite visualizar qué tratamientos presentan diferencias estadísticamente entre sí.

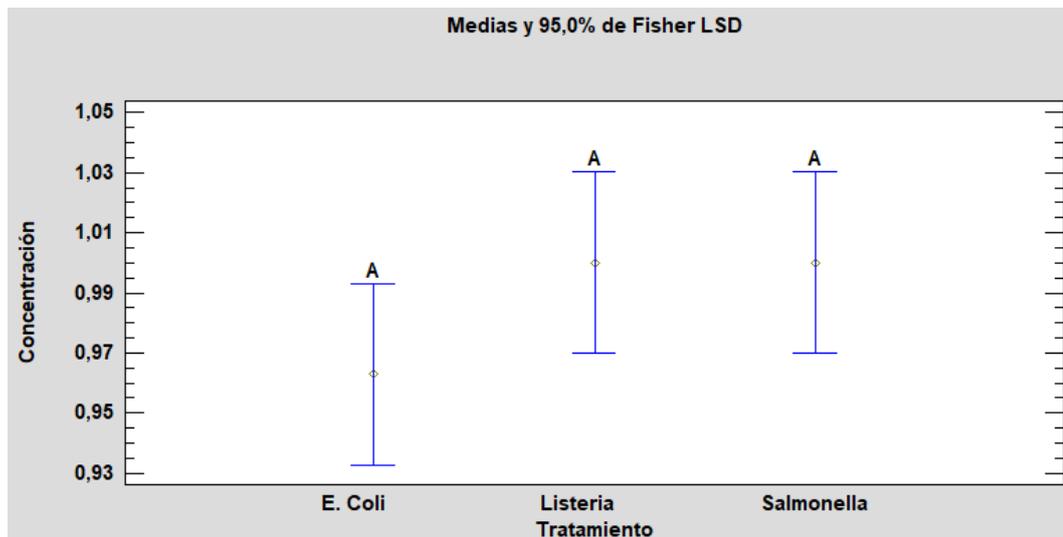


Figura 13. Análisis de medias con 95% de Fisher LSD.

En resumen, el análisis estadístico sugiere que la PCR detecta con una sensibilidad comparable las tres bacterias estudiadas, ya que no hay diferencias significativas en las concentraciones amplificadas.

IMPLICACIONES

Los resultados presentados en este estudio abren una serie de posibilidades y responsabilidades en el ámbito científico, técnico y social. La detección de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.* en productos hortofrutícolas de consumo directo plantea un escenario que requiere atención continua y multidisciplinaria.

Desde una perspectiva científica, es evidente la necesidad de ampliar la vigilancia microbiológica a otros productos agrícolas, estaciones del año y regiones geográficas del país. Para prevenir brotes epidemiológicos, el uso de técnicas moleculares como la PCR debe fortalecerse con tecnologías más rápidas y sensibles, como la secuenciación genética o la PCR en tiempo real. Estas tecnologías permitirán una caracterización más precisa de las cepas y una mejor evaluación de su resistencia a los antibióticos.

En el ámbito técnico-productivo, deben desarrollarse e implementarse protocolos estandarizados para el manejo poscosecha y las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA). Estos protocolos deben estar dirigidos a pequeños y medianos productores, así como a los vendedores de mercados locales. Las políticas públicas que respalden la capacitación continua y el fortalecimiento de los sistemas de control sanitario deben estar alineadas con estas medidas.

Este estudio destaca la conexión directa entre la cadena de producción y comercialización y la salud del consumidor a nivel social y comunitario. Se recomienda fortalecer los procesos de educación alimentaria en los mercados, las instituciones educativas y las comunidades locales con el fin de fomentar una cultura de inocuidad alimentaria que trascienda el cumplimiento legal y se traduzca en comportamientos sostenibles en la vida cotidiana.

Finalmente, para ofrecer respuestas contextualizadas y viables, las instituciones académicas y los centros de investigación deben generar más estudios aplicados y transdisciplinarios que integren el conocimiento científico con los saberes locales. En este sentido, el presente estudio sienta las bases para la construcción de sistemas alimentarios más sólidos, justos y saludables en Ecuador y en la región andina.

CONCLUSIONES

Se detectó una contaminación significativa por microorganismos patógenos en el 58 % de las muestras analizadas. Es relevante señalar que, de acuerdo con la norma NTE INEN 1334-1, la presencia de cualquier nivel de contaminación en frutas y hortalizas las hace no aptas para el consumo público, incluso si no todas las muestras resultaron contaminadas.

La identificación y confirmación de los tres patógenos en estudio se logró a través de la caracterización inocua de microorganismos mediante cultivos y pruebas bioquímicas. El análisis se centró en los cultivos duplicados con mayor contaminación y resultados positivos consistentes en las pruebas bioquímicas.

Los resultados mostraron una contaminación por *Listeria monocytogenes* en un tercio de las muestras, específicamente en M1-3, M2-2, M2-3, M3-3, M4, M4-3, M5-1 y M6-2. Tanto *Escherichia coli* como *Salmonella* se detectaron en las muestras M2-1, M3 y M6-2 para *E. coli*; M2-3, M3-1 y M6-2 para *Salmonella*.

Al evaluar la distribución por tipo de hortaliza, la lechuga fue la más contaminada con un 46 %, seguida por brócoli (23 %), uva (16 %) y mora (15 %), lo que indica que la lechuga representa el principal vehículo de riesgo en este estudio.

El método de PCR convencional mostró una sensibilidad adecuada para la detección de ADN patógeno.

Los resultados de los métodos de cultivo y las pruebas bioquímicas, especialmente en las muestras con crecimiento de apariencia sospechosa, fueron validados mediante la técnica de PCR convencional. Con este resultado se llegó a confirmar que la PCR convencional es una herramienta eficaz y sensible para la detección específica de los patógenos *Listeria monocytogenes*, *Escherichia O157:H7* y *Salmonella spp* que tenemos en estudio del desarrollo de la investigación.

RECOMENDACIONES

Se recomienda desarrollar e implementar programas de capacitación integral y obligatorio sobre BPM (Buenas Prácticas de Manufactura) y BPA (Buenas Prácticas Agrícolas), dirigido a los agricultores, consumidores, comerciantes, manipuladores de alimentos, y personal involucrado en la cadena de suministro de frutas y hortalizas en los mercados, a su vez a los transportistas, que abastecen a los mercados.

Los puestos de venta asociados a las muestras con mayor contaminación (como el Mercado F mostrado como M6, presentó contaminación por los tres patógenos) deben ser objeto de una intervención prioritaria. Se recomienda realizar una evaluación detallada de sus prácticas y condiciones para identificar y corregir las deficiencias, lo cual implicaría la adopción de procedimientos más estrictos como limpieza y desinfección, mejora de distribución de residuos, e implementación de barreras para prevenir la contaminación cruzada.

Para los consumidores se recomienda, que sus frutas y hortalizas antes de ser consumidas deben ser sometidas a un proceso de desinfección, siguiendo las directrices del Ministerio de Salud Pública y la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria.

Implementar la PCR como herramienta complementaria en los programas de monitoreo de la calidad microbiológica de frutas y hortalizas. La PCR permite una detección rápida, específica y confiable de patógenos alimentarios, incluso en concentraciones bajas.

Desarrollar protocolos de análisis integrado que combine de manera eficiente los métodos de cultivo, pruebas bioquímicas y la PCR para obtener información confiable sobre la presencia de patógenos en los alimentos expendidos en los mercados de Guaranda.

Disponibilidad de datos

A solicitud razonable, los autores del estudio proporcionarán los datos generados y analizados durante la realización de esta investigación. Esto incluye los resultados de PCR, informes de pruebas bioquímicas, matrices de resultados microbiológicos y concentraciones de ADN medidas por espectrofotometría. El material sensible que pudiera comprometer el anonimato de los sitios de muestreo o la confidencialidad de las fuentes ha sido gestionado conforme a los procedimientos institucionales y no será divulgado públicamente. Las personas interesadas pueden contactar a los autores a través de la Universidad Estatal de Bolívar para obtener más información.

Conflicto de interés

Los autores afirman que no existen conflictos de interés personales, académicos o financieros que hayan podido influir en la realización de esta investigación. Se siguieron las directrices éticas y normativas de la Universidad Estatal de Bolívar, y el estudio fue llevado a cabo de forma autónoma y sin apoyo externo directo. Todos los datos, análisis y resultados presentados son producto del trabajo académico imparcial de los autores.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. Possas and F. Pérez-Rodríguez, “New insights into cross-contamination of fresh-produce,” *Curr. Opin. Food Sci.*, vol. 49, p. 100954, Feb. 2023, doi: 10.1016/j.cofs.2022.100954.
- [2] M. D. Ruiz Medina and J. Ruales, “Post-Harvest Alternatives in Banana Cultivation,” *Agronomy*, vol. 14, no. 9, p. 2109, Sep. 2024, doi: 10.3390/agronomy14092109.
- [3] R. Alonso-Salinas, S. López-Miranda, A. J. Pérez-López, and J. R. Acosta-Motos, “Strategies to Delay Ethylene-Mediated Ripening in Climacteric Fruits: Implications for Shelf Life Extension and Postharvest Quality,” *Horticulturae*, vol. 10, no. 8, p. 840, Aug. 2024, doi: 10.3390/horticulturae10080840.
- [4] A. J. Reyes, H. E. Balaguera-López, and D. A. Castellanos, “Effect of temperature, 1-methylcyclopropene, and modified atmosphere packaging on the post-harvest behavior of lulo (*Solanum quitoense* Lam),” *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, vol. 329, p. 113012, Apr. 2024, doi: 10.1016/j.scienta.2024.113012.
- [5] M. O. Oduoye *et al.*, “Diseases Transmitted to Humans through Foodborne Microbes in the Global South,” in *Food Safety and Quality in the Global South*, Singapore: Springer Nature Singapore, 2024, pp. 561–597. doi: 10.1007/978-981-97-2428-4_18.
- [6] C. C. Adley and M. P. Ryan, “The Nature and Extent of Foodborne Disease,” in *Antimicrobial Food Packaging*, Elsevier, 2025, pp. 3–14. doi: 10.1016/B978-0-323-90747-7.00002-8.
- [7] T. Li *et al.*, “Global burden of enteric infections related foodborne diseases, 1990–2021: findings from the Global Burden of Disease Study 2021,” *Sci. One Heal.*, vol. 3, p. 100075, 2024, doi: 10.1016/j.soh.2024.100075.
- [8] A. M. Abdelshafy *et al.*, “Recent Advances in Detection and Control Strategies for Foodborne Bacteria in Raw and Ready-to-Eat Fruits and Vegetables,” *Food Front.*, vol. 6, no. 2, pp. 605–629, Mar. 2025, doi: 10.1002/fft2.541.
- [9] Prefectura de Manabí, “Política pública para la implementación de la agricultura agroecológica, como instrumento que contribuya a la aplicación de normas amigables con el ambiente, el productor, con su entorno familiar, social y económico,” Ecuador, 2022. [Online]. Available: <https://www.manabi.gob.ec/wp-content/uploads/2023/03/POLITICA-PUBLICA-AGRICULTURA-AGROECOLOGICA.pdf>
- [10] A. Zizza, A. Fallucca, M. Guido, V. Restivo, M. Roveta, and C. Trucchi, “Foodborne Infections and Salmonella: Current Primary Prevention Tools and Future Perspectives,” *Vaccines*, vol. 13, no. 1, p. 29, Dec. 2024, doi: 10.3390/vaccines13010029.
- [11] A. Mishra *et al.*, “Recent advances in multiplex aptasensor detection techniques for foodborne pathogens: A comprehensive review of novel approaches,” *Biosens. Bioelectron. X*, vol. 16, p. 100417, Feb. 2024, doi: 10.1016/j.biosx.2023.100417.
- [12] C. M. C. Andrés, J. M. Pérez de la Lastra, E. B. Munguira, C. A. Juan, and E. Pérez-Lebeña, “The Multifaceted Health Benefits of Broccoli—A Review of Glucosinolates, Phenolics and Antimicrobial Peptides,” *Molecules*, vol. 30, no. 11, p. 2262, May 2025, doi: 10.3390/molecules30112262.

- [13] L. Li, P. Ma, S. Nirasawa, and H. Liu, "Formation, immunomodulatory activities, and enhancement of glucosinolates and sulforaphane in broccoli sprouts: a review for maximizing the health benefits to human," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 64, no. 20, pp. 7118–7148, Aug. 2024, doi: 10.1080/10408398.2023.2181311.
- [14] F. Branca, G. L. Chiarenza, C. Cavallaro, H. Gu, Z. Zhao, and A. Tribulato, "Diversity of Sicilian broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) landraces and their distinctive bio-morphological, antioxidant, and genetic traits," *Genet. Resour. Crop Evol.*, vol. 65, no. 2, pp. 485–502, Feb. 2018, doi: 10.1007/s10722-017-0547-8.
- [15] T. Farooq, Z. U. Abadin, M. Umar, M. N. Aslam, A. Moosa, and M. T. Shakeel, "Lettuce," in *Viral Diseases of Field and Horticultural Crops*, Elsevier, 2024, pp. 529–535. doi: 10.1016/B978-0-323-90899-3.00069-0.
- [16] A. Kumar, Pringchinoramarak, S. Mishra, S. K. Ekka, R. Kujur, and J. Lakra, "A Review on the Nutritional Value of Some Leafy Vegetables used in India," *Asian J. Biol.*, vol. 20, no. 1, pp. 26–31, Feb. 2024, doi: 10.9734/ajob/2024/v20i1383.
- [17] R. Selvakumar, Y. A. Lyngdoh, T. Seth, and A. Watts, "Lettuce Genetic Resources and Their Utilisation in Improvement," 2025, pp. 1173–1194. doi: 10.1007/978-981-97-8949-8_36.
- [18] M. Beukers and M. Hondelink, "Grape (*Vitis vinifera*) use in the early modern Low Countries: a tentative combination of aDNA-analysis and historical sources," *Veg. Hist. Archaeobot.*, Mar. 2025, doi: 10.1007/s00334-025-01041-y.
- [19] G. Pambianchi and M. Gentilucci, "Hystory of viticulture in relation to climate change (from Neolithic to the fall of the Roman Empire)," *CATENA*, vol. 247, p. 108528, Dec. 2024, doi: 10.1016/j.catena.2024.108528.
- [20] FEN, "Uva Grape," *Fund. Española la Nutr.*, pp. 301–302, 2022, [Online]. Available: <https://www.fen.org.es/MercadoAlimentosFEN/pdfs/uva.pdf>
- [21] R. Cifuentes *et al.*, "Insights into the virome of the Andean blackberry (*Rubus glaucus*) in Ecuador," *Eur. J. Plant Pathol.*, May 2025, doi: 10.1007/s10658-025-03058-5.
- [22] Ó. Acosta-Montoya, F. Vaillant, S. Cozzano, C. Mertz, A. M. Pérez, and M. V. Castro, "Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schltdl.) during three edible maturity stages," *Food Chem.*, vol. 119, no. 4, pp. 1497–1501, Apr. 2010, doi: 10.1016/j.foodchem.2009.09.032.
- [23] A. Schmidt-Durán, M. Rodríguez-Monroy, and O. Acosta-Montoya, "La mora tropical de altura (*Rubus adenotrichus* Schltdl.) como potencial alimento funcional: una mirada a las investigaciones realizadas," *Rev. Tecnol. en Marcha*, Dec. 2023, doi: 10.18845/tm.v37i1.6654.
- [24] W. A. Cardona, *Manual de nutrición del cultivo de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth.) bajo un esquema de buenas prácticas en fertilización integrada*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia), 2019. doi: 10.21930/agrosavia.manual-18.
- [25] K. C. M. da Costa *et al.*, "Enhancing Vascular Health and Lowering Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats through Syrah Grape (*Vitis vinifera*) Pomace: The Role of Phenolic Compounds," *Nutrients*, vol. 16, no. 14, p. 2312, Jul. 2024, doi: 10.3390/nu16142312.

- [26] Y. El Rayess, N. Nehme, S. Azzi-Achkouty, and S. G. Julien, "Wine Phenolic Compounds: Chemistry, Functionality and Health Benefits," *Antioxidants*, vol. 13, no. 11, p. 1312, Oct. 2024, doi: 10.3390/antiox13111312.
- [27] K. Buczyński, M. Kapłan, and Z. Jarosz, "Review of the Report on the Nutritional and Health-Promoting Values of Species of the *Rubus* L. Genus," *Agriculture*, vol. 14, no. 8, p. 1324, Aug. 2024, doi: 10.3390/agriculture14081324.
- [28] M. K. Erdogan *et al.*, "Comparison of Anticancer, Antioxidant, Enzyme Inhibitory Effects and Phytochemical Contents Between Edible Lettuce (*Lactuca sativa*) and a New Wild Species (*Lactuca anatolica*)," *Chem. Biodivers.*, vol. 21, no. 9, Sep. 2024, doi: 10.1002/cbdv.202400552.
- [29] E. Jankaitytė *et al.*, "Seed Treatment with Cold Plasma Induces Changes in Physiological and Biochemical Parameters of Lettuce Cultivated in an Aeroponic System," *Agronomy*, vol. 15, no. 6, p. 1371, Jun. 2025, doi: 10.3390/agronomy15061371.
- [30] S. Baldelli, M. Lombardo, A. D'Amato, S. Karav, G. Tripodi, and G. Aiello, "Glucosinolates in Human Health: Metabolic Pathways, Bioavailability, and Potential in Chronic Disease Prevention," *Foods*, vol. 14, no. 6, p. 912, Mar. 2025, doi: 10.3390/foods14060912.
- [31] X. Liu *et al.*, "Prospective cohort study of broccoli consumption frequency and all-cause and cause-specific mortality risks," *Front. Nutr.*, vol. 10, Jan. 2024, doi: 10.3389/fnut.2023.1286658.
- [32] T. E. Alaba, "The Antioxidants and Anti-Inflammatories Benefit of Broccoli Sprouts, *Brassica oleracea* var. *italica*," 2024. [Online]. Available: <https://search.proquest.com/openview/8a92a986cc6e9b8d9062f5c1cfaea008/1?pq-origsite=gscholar%5C&cbl=18750%5C&diss=y>
- [33] Ministerio de Agricultura y Ganadería de Ecuador, "Productores de la provincia Bolívar reciben semillas de hortalizas," 2020. [Online]. Available: <https://www.agricultura.gob.ec/productores-de-la-provincia-bolivar-reciben-semillas-de-hortalizas/>
- [34] H. Yu, Y. Song, W. Lv, D. Liu, and H. Huang, "Food safety risk assessment and countermeasures in China based on risk matrix method," *Front. Sustain. Food Syst.*, vol. 8, Apr. 2024, doi: 10.3389/fsufs.2024.1351826.
- [35] E. Andrade, F. Andrade, G. Oliveira, and O. Freitas-Silva, "Critical monitoring and control factors for achieving food defense criteria," *Risk Anal.*, Apr. 2025, doi: 10.1111/risa.70025.
- [36] A. A. Akinsemolu and H. N. Onyeaka, "Microorganisms Associated with Food Spoilage and Foodborne Diseases," in *Food Safety and Quality in the Global South*, Singapore: Springer Nature Singapore, 2024, pp. 489–531. doi: 10.1007/978-981-97-2428-4_16.
- [37] J. Soni, S. Sinha, and R. Pandey, "Understanding bacterial pathogenicity: a closer look at the journey of harmful microbes," *Front. Microbiol.*, vol. 15, Feb. 2024, doi: 10.3389/fmicb.2024.1370818.
- [38] A. N. Olaimat *et al.*, "Common and Potential Emerging Foodborne Viruses: A Comprehensive Review," *Life*, vol. 14, no. 2, p. 190, Jan. 2024, doi: 10.3390/life14020190.
- [39] D. Liu, "Classification of medically important fungi," in *Molecular Medical Microbiology*, Elsevier, 2024, pp. 2763–2777. doi: 10.1016/B978-0-12-818619-0.00034-4.

- [40] Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN), “NTE INEN 1334-1:2011. Norma técnica ecuatoriana – Rotulado de productos alimenticios para consumo humano. Parte 1: Requisitos,” 2011. [Online]. Available: https://www.controlsanitario.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2014/07/ec.nte_.1334.1.2011.pdf
- [41] M. P. Fernandes, F. Rodrigues, V. F. Cardoso, F. S. Silva, and M. M. Fernandes, “Electrical stimulation of table grape berries as new alternative for postharvest *Escherichia coli* contamination management,” *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 226, p. 113537, Aug. 2025, doi: 10.1016/j.postharvbio.2025.113537.
- [42] S. M. Díaz *et al.*, “Microbiological hazard identification in river waters used for recreational activities,” *Environ. Res.*, vol. 247, p. 118161, Apr. 2024, doi: 10.1016/j.envres.2024.118161.
- [43] L. Gomes, A. A. Bordalo, and A. Machado, “Characterization of *Escherichia coli* Isolates in Recreational Waters: Implications for Public Health and One Health Approach,” *Water*, vol. 16, no. 18, p. 2695, Sep. 2024, doi: 10.3390/w16182695.
- [44] W. P. van der Vossen-Wijmenga, H. M. W. den Besten, and M. H. Zwietering, “Temperature status of domestic refrigerators and its effect on the risk of listeriosis from ready-to-eat (RTE) cooked meat products,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 413, p. 110516, Mar. 2024, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110516.
- [45] D. Averbuch *et al.*, “*Listeria monocytogenes* Infections in Hematopoietic Cell Transplantation Recipients: Clinical Manifestations and Risk Factors. A Multinational Retrospective Case-Control Study from the Infectious Diseases Working Party of the European Society for Blood and,” *Transplant. Cell. Ther.*, vol. 30, no. 7, pp. 712.e1-712.e12, Jul. 2024, doi: 10.1016/j.jtct.2024.04.008.
- [46] M. S. Farooq *et al.*, “Uncovering the Research Gaps to Alleviate the Negative Impacts of Climate Change on Food Security: A Review,” *Front. Plant Sci.*, vol. 13, Jul. 2022, doi: 10.3389/fpls.2022.927535.
- [47] B. Lamichhane *et al.*, “Salmonellosis: An Overview of Epidemiology, Pathogenesis, and Innovative Approaches to Mitigate the Antimicrobial Resistant Infections,” *Antibiotics*, vol. 13, no. 1, p. 76, Jan. 2024, doi: 10.3390/antibiotics13010076.
- [48] Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (AGROCALIDAD), “INT/B/09 – Instructivo para la recolección, envasado, etiquetado y transporte de muestras al laboratorio de Bromatología,” 2014. [Online]. Available: <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/hy9.pdf>
- [49] J. Rocha and P. Abrantes, Eds., *Geographic Information Systems and Science*. IntechOpen, 2019. doi: 10.5772/intechopen.75243.
- [50] L. Ulloa Meneses, F. Orozco Iguasnia, J. Orozco Iguasnia, and F. Carrera Calderón, “Sistema de información geográfica para la integración de información Geo referenciada de entidades públicas y privadas en la ciudad de Santo Domingo,” *Rev. Científica y Tecnológica UPSE*, vol. 4, no. 3, pp. 13–27, Dec. 2017, doi: 10.26423/rctu.v4i3.294.
- [51] Enciclopedia del Ecuador, “Guaranda,” 2014. [Online]. Available: <https://www.encyclopediadelecuador.com/guaranda/>
- [52] P. Parasuraman, S. Busi, and J.-K. Lee, “Standard Microbiological Techniques (Staining, Morphological and Cultural Characteristics, Biochemical Properties, and Serotyping) in the Detection of ESKAPE Pathogens,” in *ESKAPE Pathogens*, Singapore: Springer

- Nature Singapore, 2024, pp. 119–155. doi: 10.1007/978-981-99-8799-3_4.
- [53] L. Caycedo Lozano, L. C. Corrales Ramírez, and D. M. Trujillo Suárez, “Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química,” *Nova*, vol. 19, no. 36, pp. 49–94, Sep. 2021, doi: 10.22490/24629448.5293.
- [54] H. Khodadadi, E. Eghtedarnejad, A. Ahmadi, A. Khodadadi, and N. Shamsdin, “Evaluation of usage of readily accessible Enterobacteriaceae differential and selective media for identifying *Candida auris*,” *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 111, no. 1, p. 116589, Jan. 2025, doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2024.116589.
- [55] A. R. Datta and L. S. Burall, “Detection of *Listeria monocytogenes* in Food and Environment,” in *Diagnosis of Pathogenic Microorganisms Causing Infectious Diseases*, Boca Raton: CRC Press, 2024, pp. 67–95. doi: 10.1201/9780429001192-5.
- [56] L. A. Neyaz *et al.*, “A comprehensive review on the current status of culture media for routine standardized isolation of *Salmonella* and *Shigella* spp. from contaminated food,” *J. Umm Al-Qura Univ. Appl. Sci.*, Nov. 2024, doi: 10.1007/s43994-024-00205-2.
- [57] A. Hafezi and Z. Khamar, “The Method and Analysis of Some Biochemical Tests Commonly Used for Microbial Identification: A Review,” *Compr. Heal. Biomed. Stud.*, vol. 3, no. 2, Oct. 2024, doi: 10.5812/chbs-160199.
- [58] C. Jones, P. Romagnoli, and G. Trynka, “Blood Sample collection and PBMC isolation JAGUAR.v4 v1,” Jun. 01, 2023, *Pearson Educación, S. A.* doi: 10.17504/protocols.io.e6nvwx4zlmk/v1.
- [59] G. J. Tortora, B. R. Funke, and C. L. Case, *Microbiology: An Introduction*, 13th ed. Hoboken, NJ: Pearson, 2018.
- [60] A. Tomkova, E. Cizmar, D. Jancura, and M. Fabian, “High stability of the radical at the catalytic center of cytochrome c oxidase,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 764, p. 110271, Feb. 2025, doi: 10.1016/j.abb.2024.110271.
- [61] Q. Xie *et al.*, “Characteristics of *Neisseria meningitidis* isolated from patients with urogenital infection in a region of China,” *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, vol. 24, no. 1, p. 43, Jul. 2025, doi: 10.1186/s12941-025-00810-x.
- [62] F. Li, L. Xin, J. Wang, and W. Chen, “Platinum nanoparticles-based electrochemical H₂O₂ sensor for rapid antibiotic susceptibility testing,” *Talanta*, vol. 281, p. 126835, Jan. 2025, doi: 10.1016/j.talanta.2024.126835.
- [63] Nissa Maulia Bestari *et al.*, “Detection *Salmonella* sp. from swab clooca of broiler chicken at Keputran market, Surabaya Indonesia,” *Open Access Res. J. Biol. Pharm.*, vol. 13, no. 1, pp. 021–029, Feb. 2025, doi: 10.53022/oarjbp.2025.13.1.0016.
- [64] A. D. Paradh, “Gram-negative spoilage bacteria in brewing,” in *Brewing Microbiology*, Elsevier, 2025, pp. 139–153. doi: 10.1016/B978-0-323-99606-8.00007-9.
- [65] N. Mrnjavac *et al.*, “The radical impact of oxygen on prokaryotic evolution—enzyme inhibition first, uninhibited essential biosyntheses second, aerobic respiration third,” *FEBS Lett.*, vol. 598, no. 14, pp. 1692–1714, Jul. 2024, doi: 10.1002/1873-3468.14906.
- [66] S. Povea-Cabello, M. Brischigliaro, and E. Fernández-Vizarra, “Emerging mechanisms in the redox regulation of mitochondrial cytochrome c oxidase assembly and function,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 52, no. 2, pp. 873–885, Apr. 2024, doi: 10.1042/BST20231183.

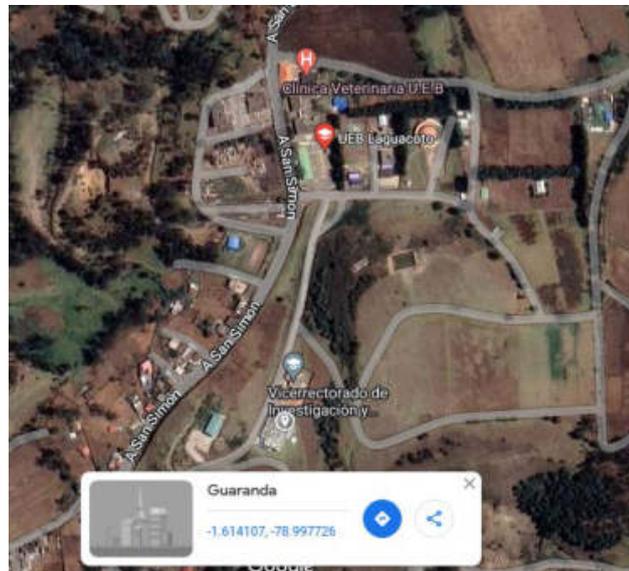
- [67] Y. A. J. Alabdali, D. A. Azeez, M. G. Munahi, and Z. I. Kuwait, "Molecular Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates with Mutant *gyrA* Gene and Development of a New Ciprofloxacin Derivative for Antimicrobial Therapy," *Mol. Biotechnol.*, vol. 67, no. 2, pp. 649–660, Feb. 2025, doi: 10.1007/s12033-024-01076-y.
- [68] S. H. Sathyanarayana and L. M. Wainman, "Laboratory approaches in molecular pathology: the polymerase chain reaction," in *Diagnostic Molecular Pathology*, Elsevier, 2024, pp. 13–25. doi: 10.1016/B978-0-12-822824-1.00041-9.
- [69] A. Afshari, R. Rezaee, and G. Shakeri, "Foodborne pathogens and their association with well-known enteric infections and emerging non-communicable disorders," *CABI Rev.*, Mar. 2024, doi: 10.1079/cabireviews.2024.0009.
- [70] C. Thystrup *et al.*, "Etiology-specific incidence and mortality of diarrheal diseases in the African region: a systematic review and meta-analysis," *BMC Public Health*, vol. 24, no. 1, p. 1864, Jul. 2024, doi: 10.1186/s12889-024-19334-8.
- [71] C. A. F. de Oliveira, A. G. da Cruz, P. Tavolaro, and C. H. Corassin, "Food Safety: Good Manufacturing Practices, Sanitation Standard Operating Procedures, Hazard Analysis, and Critical Control Point," in *Antimicrobial Food Packaging*, Elsevier, 2025, pp. 163–173. doi: 10.1016/B978-0-323-90747-7.00011-9.
- [72] L. Rincon-Ballesteros, G. Lannelongue, and J. González-Benito, "Cross-Continental insights: Comparing food safety management systems in Europe and Latin America," *Food Control*, vol. 164, p. 110552, Oct. 2024, doi: 10.1016/j.foodcont.2024.110552.
- [73] NTE, "INEN 1750_ Muestreo de Hortalizas y Frutas Frescas en Ecuador.pdf," 1994, *INEN, Quito*.
- [74] Darwin Núñez, "Recognition of Pathogenic Bacteria in Drinking Water Through PCR Analysis," *J. Inf. Syst. Eng. Manag.*, vol. 10, no. 51s, pp. 795–808, May 2025, doi: 10.52783/jisem.v10i51s.10468.
- [75] H. Meghdadi, A. D. Khosravi, A. F. Sheikh, A. Alami, and N. Nassirabady, "Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* from environmental and clinical sources by culture and PCR-RFLP methods," *Iran. J. Microbiol.*, vol. 11, no. 1, pp. 7–12, Feb. 2019, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30996825>
- [76] I. González-López *et al.*, "Prevalence and Genomic Diversity of *Salmonella enterica* Recovered from River Water in a Major Agricultural Region in Northwestern Mexico," *Microorganisms*, vol. 10, no. 6, p. 1214, Jun. 2022, doi: 10.3390/microorganisms10061214.
- [77] Interagency Food Safety Analytics Collaboration (IFSAC), "Foodborne Illness Source Attribution Estimates for 2020 for *Salmonella*, *Escherichia coli* O157, and *Listeria monocytogenes* Using Multi-Year Outbreak Surveillance Data, United States," 2022. [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/foodsafety/ifsac/pdf/P19-2020-report-TriAgency-508.pdf>
- [78] P. Wiśniewski, W. Chajęcka-Wierzchowska, and A. Zadernowska, "Impact of High-Pressure Processing (HPP) on *Listeria monocytogenes*—An Overview of Challenges and Responses," *Foods*, vol. 13, no. 1, p. 14, Dec. 2023, doi: 10.3390/foods13010014.
- [79] A. M. E. Sulieman, I. M. Abu Zeid, E. M. Abdalla, and A. Ed-Dra, "New Discoveries in Toxins from Gram-Positive Bacteria, *Listeria monocytogenes*," in *Microbial Toxins in Food Systems: Causes, Mechanisms, Complications, and Metabolism*, Cham: Springer Nature Switzerland, 2024, pp. 303–318. doi: 10.1007/978-3-031-62839-9_23.

- [80] C. Carracedo Ghione *et al.*, “Abortos tempranos y su relación con la listeria monocitogenes y el citomegalovirus: reporte de un caso,” *Rev. Fac. Cienc. Med. Cordoba*, vol. 80, 2023, [Online]. Available: <https://revistas.unc.edu.ar/index.php/med/article/view/42776>
- [81] L. N. Haber Garcia *et al.*, “Cross-contamination and antimicrobial resistance in diarrheagenic *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. from a mixed bovine and swine slaughterhouse,” *Food Control*, vol. 176, p. 111406, Oct. 2025, doi: 10.1016/j.foodcont.2025.111406.
- [82] R. I. Cortés-Higareda, M., Bautista-Baños, S., Ventura-Aguilar, “Bacterias patógenas de los alimentos agrícolas frescos y mínimamente procesados. Estado actual en el control del género salmonella,” *Rev. Chil. Nutr.*, vol. 5, no. 7, pp. 1–76, 2021, [Online]. Available: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81367929003>
- [83] G. N. Charão *et al.*, “Level of compliance with good manufacturing practices and microbiological profile of mixed fresh sausages,” *Ciência Anim. Bras.*, vol. 25, 2024, doi: 10.1590/1809-6891v25e-76582e.
- [84] E. Ohman, S. Kilgore, J. Waite-Cusic, and J. Kovacevic, “Efficacy of cleaning and sanitizing procedures to reduce *Listeria monocitogenes* on food contact surfaces commonly found in fresh produce operations,” *Food Microbiol.*, vol. 118, p. 104421, Apr. 2024, doi: 10.1016/j.fm.2023.104421.
- [85] U.S. Food and Drug Administration (FDA), “Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins,” 2024, *U.S. Department of Health and Human Services*. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/media/83271/download>
- [86] F. E. Sparaciari, C. Firth, E. A. Karlsson, and P. F. Horwood, “Zoonotic disease risk at traditional food markets,” *J. Virol.*, Jul. 2025, doi: 10.1128/jvi.00718-25.
- [87] J. A. Vázquez-Boland *et al.*, “*Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 14, no. 3, pp. 584–640, Jul. 2001, doi: 10.1128/CMR.14.3.584-640.2001.

ANEXOS

Anexo 1.

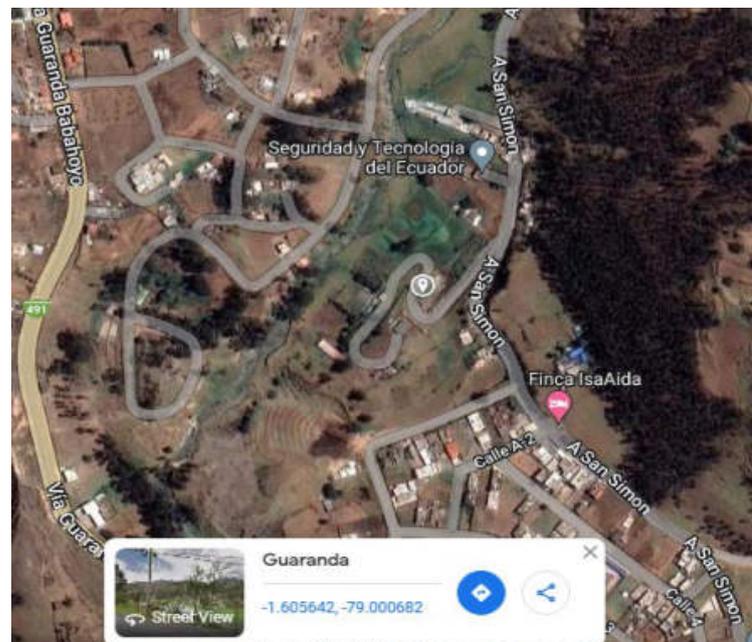
Mapa y coordenadas del laboratorio general de la UEB



Nota. Tomado de la ubicación mediante “Google Maps”

Anexo 2.

Mapas y coordenadas del laboratorio general de la UEB



Nota. Tomado de la ubicación mediante “Google Maps”

Anexo 3.

Recolección de muestras

Mercado A



Mercado B



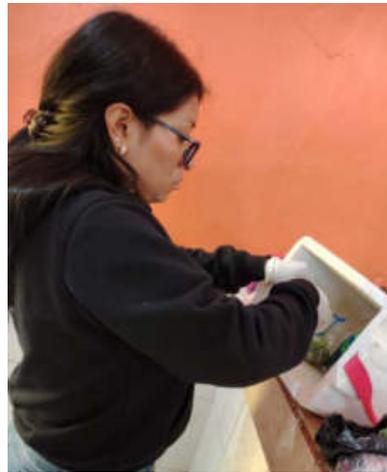
Mercado C



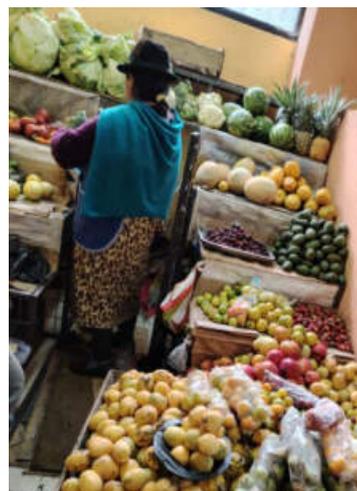
Mercado D



Mercado E.



Mercado F



Anexo 4.

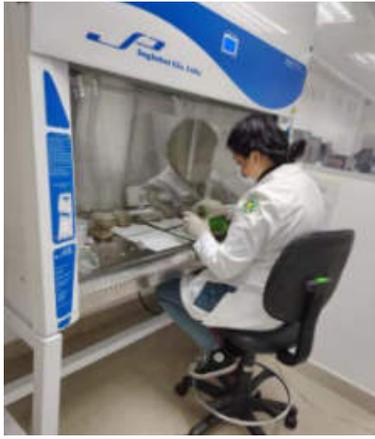
Análisis microbiológicos

Preparación de medios de cultivo selectivos



Siembra Directa





Lectura de muestras



E.coli



Listeria



Salmonella

Pruebas bioquímicas CATALASA



OXIDASA



PRUEBAS IMVIC
ROJO DE METILO



INDOL

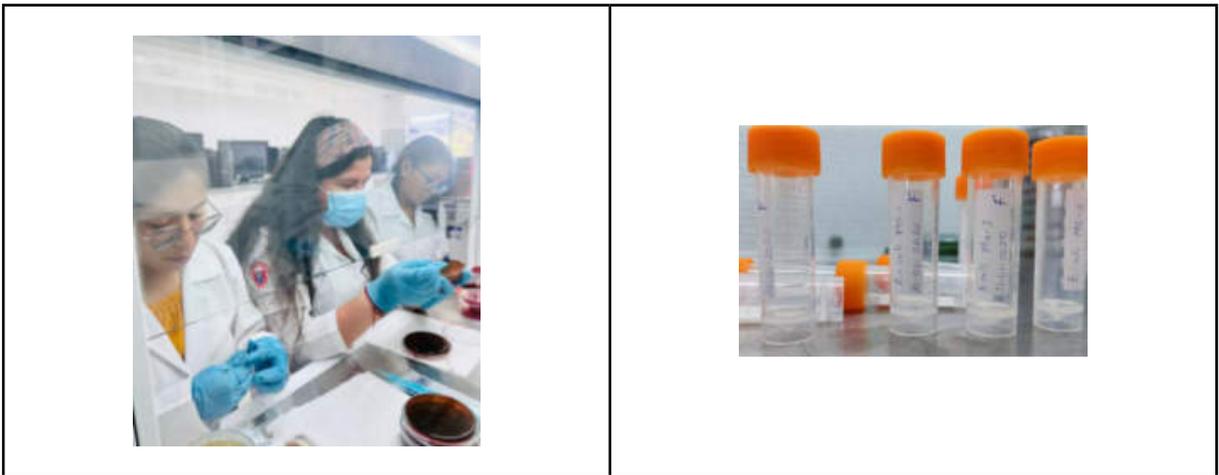


CITRATO

Anexo 5.

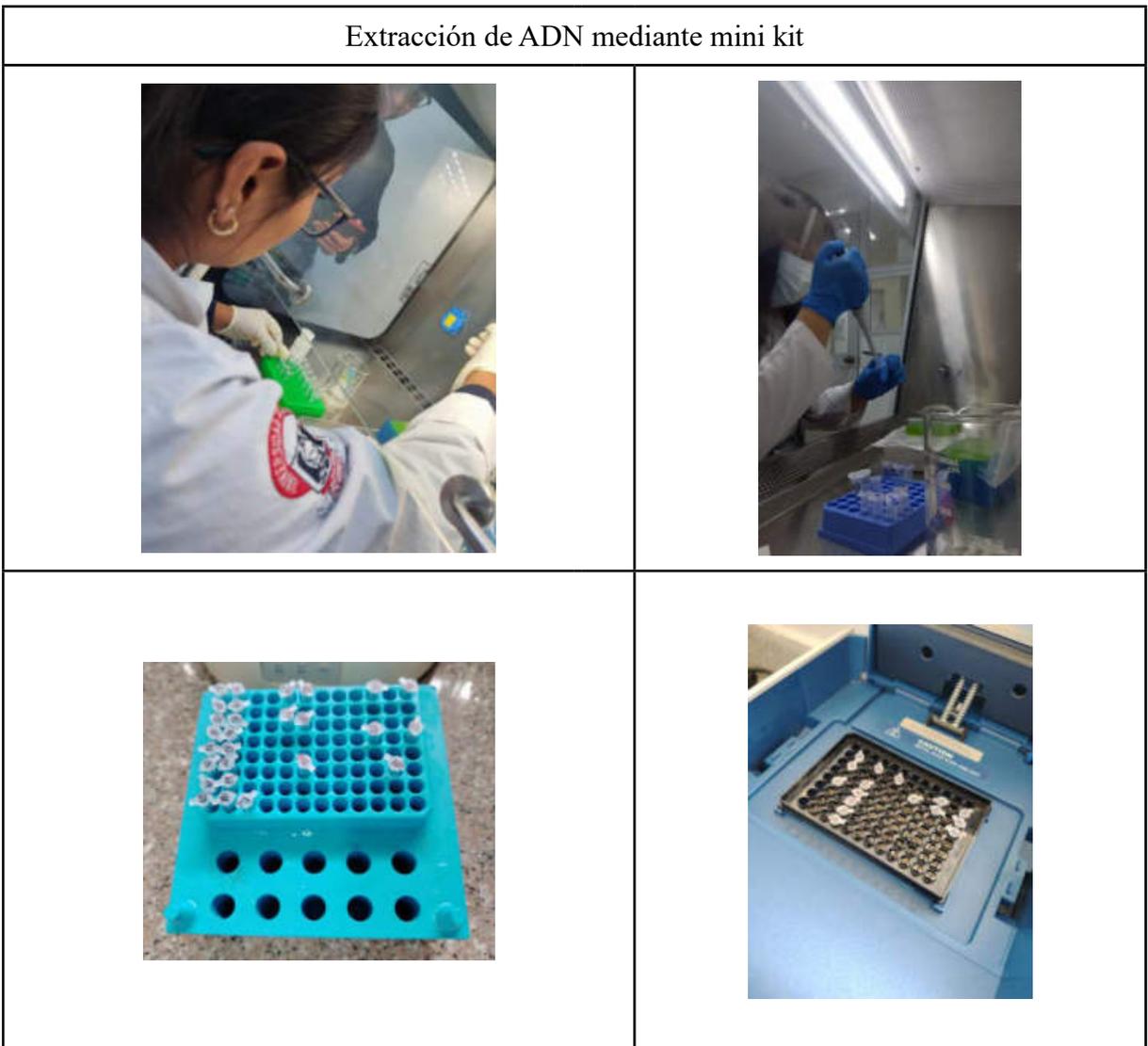
Purificación de cepas

Purificación de cepas	
	



Anexo 6.

Extracción de ADN mediante mini kit y electroforesis





Lectura de ADN en Nanodrop



Amplificación de ADN extraído



Termociclador



El termociclador que se utilizó en este estudio de marca Applied Biosystems, un producto de Thermo Fisher Scientific. Específicamente, se trata del modelo Veriti 96-Well Thermal Cycler, un termociclador utilizado para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

BIOGRAFÍA DE LOS AUTORES

DARWIN ALBERTO NÚÑEZ TORRES

Darwin Alberto Núñez Torres es profesor en la Universidad Estatal de Bolívar, Ecuador, especializado en biología molecular, biotecnología y análisis de alimentos. Ha participado en investigaciones sobre la detección de patógenos en agua potable mediante PCR y la extracción de aceites esenciales de cáscara de naranja. Además, ha explorado el desarrollo de barras de chocolate y la deshidratación de variedades de ají para obtener polvo.

Darwin Alberto Núñez Torres is a professor at Universidad Estatal de Bolívar, Ecuador, specializing in molecular biology, biotechnology, and food analysis. He has been involved in research on pathogen detection in drinking water using PCR and the extraction of essential oils from orange peels. Additionally, he has explored the development of chocolate bars and the dehydration of chili varieties to obtain powder.

RAMÓN CURAY EDISON RIVELIÑO

Ecuatoriano nacido en Loja. Celica. Dr. Edison Raveliño Ramón Curay MVZ Docente Investigador Titular de la Universidad Estatal de Bolívar, impartiendo La Catedra de Farmacología General. He ejercido docencia Universitaria en la Universidad Técnica de Babahoyo por 15 años en Calidad de Docente - Contratado. Autor y Coautor de diversas publicaciones en Revistas indexadas de Alto Impacto Scopus, Scielo, Latindex. Autor y Evaluador de Libros de Relevancia. Participación como Director Principal e integrante de Algunos Proyectos de Investigación y Vinculación con la Sociedad. Agradecido con Dios. Dedico La presente obra a las personas que me acompañan incondicionalmente a mi esposa Nelly y mi hijo Fernando.

Ecuadorian, born in Loja, Celica. Dr. Edison Raveliño Ramón Curay, DVM, Tenured Professor and Researcher at the State University of Bolívar, teaching the Chair of General Pharmacology. I have served as a University Lecturer at the Technical University of Babahoyo for 15 years as a Contracted Professor. Author and co-author of various publications in high-impact indexed

journals such as Scopus, Scielo, and Latindex. Author and reviewer of relevant books. Participant as Principal Director and member of several research and community outreach projects. Grateful to God. I dedicate this work to the people who accompany me unconditionally—my wife Nelly and my son Fernando

FRANZ PATRICIO VERDEZOTO MENDOZA

Franz Patricio Verdezoto Mendoza es profesor de la Universidad Estatal de Bolívar, Ecuador, ingeniero químico especializado en Cambio Climático. Ha participado en investigaciones como la detección de metales en partículas de aire, implementación de biodigestores anaeróbicos como alternativas de generación de energía renovable y agricultura sustentable y proyectos en conjunto con otras instituciones de educación superior como “Dietas Funcionales basadas en carotenoides derivados de dos especies de microalgas para mejorar la productividad y salud en peces (*Oncorhynchus mykiss*) en etapas iniciales”

Franz Patricio Verdezoto Mendoza is a professor at the State University of Bolívar, Ecuador, and a chemical engineer specialized in Climate Change. He has participated in research projects such as the detection of metals in airborne particles, the implementation of anaerobic biodigesters as alternatives for renewable energy generation and sustainable agriculture, as well as collaborative projects with other higher education institutions, such as “Functional diets based on carotenoids derived from two species of microalgae to improve productivity and health in fish (*Oncorhynchus mykiss*) during early stages.”

JOSÉ LUIS ALTUNA VÁSQUEZ

Ing. José Luis Altuna Vásquez, Mg., es Decano de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente de la Universidad Estatal de Bolívar (UEB) y profesor agregado de dedicación completa. Posee una maestría en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos por la Universidad de Valladolid (España), es Ingeniero Agroindustrial (UEB), Tecnólogo Superior en Industrialización de Productos Lácteos y Técnico en Agropecuaria por ITS Luis A. Martínez (Ecuador), y actualmente cursa un doctorado en Recursos Naturales y Gestión Sostenible en la Universidad de Córdoba (España). En la esfera investigativa, ha contribuido a proyectos de alto impacto: en 2024 participó en un estudio aplicando PCR para detectar patógenos (*Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp.) en agua de consumo en el cantón Chambo. También colaboró en el desarrollo de un yogurt liofilizado funcional, rico en fibra y proteínas, como alternativa innovadora en la agroindustria láctea, y en una revisión académica sobre el papel de los probióticos en la mejora de la función inmunológica y digestiva.

Ing. José Luis Altuna Vásquez, MSc., is the Dean of the Faculty of Agricultural Sciences, Natural Resources and the Environment at the State University of Bolívar (UEB) and a full-time Associate Professor. He holds a Master's degree in Quality, Development and Innovation of Food Products from the University of Valladolid (Spain), is an Agroindustrial Engineer (UEB), and also holds degrees as a Higher Technologist in Dairy Product Industrialization and Agricultural Technician from ITS Luis A. Martínez (Ecuador). He is currently pursuing a Ph.D. in Natural Resources and Sustainable Management at the University of Córdoba (Spain). In the field of research, he has contributed to high-impact projects: in 2024, he participated in a study applying PCR techniques to detect pathogens (*Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, and *Salmonella* spp.) in drinking water in the Chambo canton. He also collaborated in the development of a functional freeze-dried yogurt, high in fiber and protein, as an innovative alternative in the dairy agroindustry, and participated in an academic review on the role of probiotics in improving immune and digestive function.

CONTRAPORTADA

En un entorno donde la producción y comercialización de alimentos frescos son esenciales para el desarrollo económico y la seguridad alimentaria, la presencia de microorganismos patógenos representa una amenaza latente para la salud pública. Este libro ofrece una mirada científica a una problemática local con implicaciones globales: la contaminación microbiológica en productos hortofrutícolas.

A través de un estudio realizado en los principales mercados del cantón Guaranda, Ecuador, los autores identifican y analizan la presencia de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.* en frutas y hortalizas de consumo masivo como uvas, moras, lechugas y brócoli. Utilizando técnicas microbiológicas, pruebas bioquímicas y PCR convencional, esta investigación revela evidencias concretas de riesgos sanitarios que deben ser atendidos con urgencia.

Esta obra proporciona información importante y recomendaciones prácticas para mejorar las condiciones de inocuidad alimentaria en entornos rurales y urbanos. Es una herramienta útil para estudiantes, profesionales agroindustriales, autoridades sanitarias y responsables de la gestión de mercados y cadenas de abastecimiento.

Este libro más que un diagnóstico es un llamado a la acción para construir sistemas alimentarios más seguros, responsables y sostenibles.



EDITORIAL
UNIÓN CIENTÍFICA

GLEBE

E-ISSN:3103-1234

ISBN: 978-9942-7391-5-5



FRECUENCIA
CUATRIMESTRAL