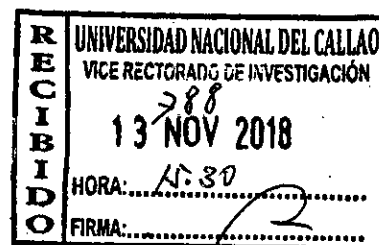
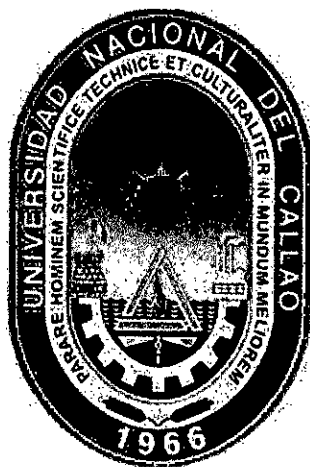


UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO
FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y DE ALIMENTOS
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA
PESQUERA Y DE ALIMENTOS



INFORME FINAL DE INVESTIGACIÓN

“Escherichia coli (ETEC) EN PREPARADOS
ARTESANALES A BASE DE CARNE Y SANGRE
CONSUMIDOS EN PANES Y EMPANADAS”

DRA. ING. DÁNIZA MIRTHA GUERRERO ALVA

PERÍODO DE EJECUCIÓN: 01-11-16 AL 31-10-18

RESOLUCIÓN DE EJECUCIÓN N° 940-2016-R

CALLAO, 2018

I. INDICE

II.	RESUMEN Y ABSTRACT	5
III.	INTRODUCCIÓN	7
IV.	MARCO TEÓRICO	14
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	27
VI.	RESULTADOS	32
VII.	DISCUSIÓN	51
VIII.	REFERENCIALES	59
IX.	APÉNDICE	65
X.	ANEXOS	68



INDICE DE CUADROS

Cuadro N°4.1. Características de los Mercados donde se muestreó los alimentos materia de estudio	32
Cuadro N°4.2. Características de las Muestras colectadas de Salchicha de Huacho en estado crudo y cocido	33
Cuadro N°4.3. Características de las Muestras colectadas de Chorizo en estado crudo y cocido	34
Cuadro N°4.4. Características de las Muestras colectadas de Relleno en estado crudo y cocido	35
Cuadro N°4.5. Características de las Muestras colectadas de Hamburguesa en estado crudo y cocido	36
Cuadro N°4.6. Resultados de la detección del gen heat labile enterotoxine (hle) de <i>Escherichia coli</i> (ETEC) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en las muestras en estado crudo	37
Cuadro N°4.7. Resultados de la detección del gen heat labile enterotoxine (hle) de <i>Escherichia coli</i> (ETEC) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en las muestras en estado cocido	39
Cuadro N°4.8. Incidencia de los casos positivos y negativos en la detección del heat labile enterotoxin (hle) de <i>Escherichia coli</i> (ETEC) en las muestras crudas	40
Cuadro N°4.9. Persistencia de los casos positivos y negativos en la detección del heat labile enterotoxin (hle) de <i>Escherichia coli</i> (ETEC) en las muestras cocidas	41
Cuadro N°4.10. Resultados positivos y negativos en la detección del heat labile enterotoxin (hle) de <i>Escherichia coli</i> (ETEC) por tipo de producto	41
Cuadro N°4.11. Resultados positivos y negativos en la detección del heat labile enterotoxin (hle) de <i>Escherichia coli</i> (ETEC) en productos crudos y cocidos, según el tamaño de muestra y mercado de procedencia	42
Cuadro N°4.12. Resultados positivos y negativos en la detección del heat labile enterotoxin (hle) de <i>Escherichia coli</i> (ETEC) según el mercado de procedencia	42

Cuadro N°4.13. Resultados de la detección de nitratos (mg/L) en las muestras de salchicha de Huacho, chorizo, relleno y hamburguesas en estado crudo	43
Cuadro N° 4.14. Resultados de la detección de nitratos (mg/L) en las muestras de salchicha de Huacho, chorizo, relleno y hamburguesas en estado cocido	44
Cuadro N°4.15. Resultados de la detección de nitritos (mg/L) en las muestras de salchicha de Huacho, chorizo, relleno y hamburguesas en estado crudo	46
Cuadro N°4.16. Resultados de la detección de nitritos (mg/L) en las muestras de salchicha de Huacho, chorizo, relleno y hamburguesas en estado cocido	47
Cuadro N°4.17. Cuadro de frecuencias de los tipos de preparados artesanales y el tipo de resultado positivo o negativo	49
Cuadro N°4.18. Frecuencia esperada de tipo de mercado y resultado positivo o negativo proveniente de cada mercado	50



INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N°4.1: Detección de casos positivos y negativos obtenidos en muestras crudas mediante la PCR	38
Gráfico N°4.2: Detección de casos positivos y negativos obtenidos en muestras cocidas mediante la PCR	40
Gráfico N°4.3: Detección de Nitratos (mg/L) en las muestras crudas de salchicha de Huacho, chorizo, relleno y hamburguesas	44
Gráfico N°4.4: Detección de Nitratos (mg/L) en muestras de salchicha de Huacho, chorizo, relleno y hamburguesas cocidas	45
Gráfico N°4.5: Detección de Nitritos (mg/L) en muestras de salchicha de Huacho, chorizo, relleno y hamburguesas en estado crudo	46
Gráfico N°4.6: Detección de Nitritos (mg/L) en muestras de salchicha de Huacho, chorizo, relleno y hamburguesas cocidas	47

II. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia, incidencia y persistencia del gen (h1e) de *Escherichia coli* ETEC en preparados artesanales de carne y sangre comercializados en los mercados Palermo, Lobatón y del Callao mediante el método de Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR); así como cuantificar los nitratos y nitritos por evaluación reflectométrica en cada producto.

De 22 muestras analizadas -salchicha de Huacho(6), chorizo(6), relleno(5) y hamburguesas(5)- 9 muestras (40,90%, 9/22) tuvieron resultados positivos. La incidencia observada en las muestras crudas fue de 50%, (6/12) y la persistencia en muestras cocidas alcanzó el 30%, (3/10), que demostraron la falta de calidad sanitaria. Sin embargo, los contenidos de nitratos y nitritos estuvieron dentro de los valores recomendados por el reglamento sanitario de alimentos, en la mayoría de las muestras. De manera similar, empleando X^2 con una confianza de 99,9% se probó que al nivel muestreado no fue evidente la relación entre el tipo de preparado artesanal y el mercado con los resultados de la PCR.

Palabras clave: preparados artesanales de carne y sangre, gen h1e de ETEC, PCR, nitratos y nitritos.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the presence, incidence and persistence of the (hle) gene of *Escherichia coli* ETEC in artisan preparations of meat and blood sold in the markets of Palermo, Lobatón and from Callao by means of the Polymerase Chain Reaction (PCR) method; as well as quantifying nitrates and nitrites by reflectometric evaluation in each product.

Of 22 samples analyzed - Huacho sausage (6), chorizo (6), stuffing (5) and hamburgers (5) - 9 samples (40.90%, 9/22) had positive results. The incidence observed in the raw samples was 50%, (6/12) and the persistence in cooked samples reached 30%, (3/10), which demonstrated the lack of sanitary quality. However, the contents of nitrates and nitrites were within the values recommended by the sanitary food regulation, in most of the samples. In a similar way, using X^2 with a confidence of 99.9%, it was proved that at the sampled level the relationship between the type of artisan preparations and the market with the results of the PCR was not evident.

Key words: artisan preparations of meat and blood, hle ETEC gene, PCR, nitrates and nitrites.

III. INTRODUCCIÓN

Descripción y determinación del problema a investigar.

Actualmente se dispone de algunos preparados a base de carne y sangre que no provienen de la industria, sino de la producción artesanal. Estos productos gozan de aceptación y se adicionan como relleno de empanadas, tal es el caso de la salchicha de huacho y el relleno; se preparan en las casas, donde ninguna institución vigila el cumplimiento de las buenas prácticas de manufactura y se venden en los mercados a medio ambiente; sobre un plato y sin protección externa, y se cortan de acuerdo a la porción solicitada por el cliente, empleando el mismo cuchillo usado para otras piezas de carne que también se expenden juntamente, o utilizando una cuchara metálica (caso de la salchicha de huacho). Como los productos están colocados en los mesones de los mercados, físicamente cercanos a los compradores, le resulta difícil al vendedor evitar que sean tocados por los compradores ocasionales o que algún insecto se pose sobre ellos. También se ha incrementado el comercio ambulatorio de chorizo y hamburguesas, que están expuestos a una manipulación inadecuada sin que el expendedor tome las medidas de higiene necesarias. Estos productos preparados carecen de registro sanitario, se desconoce la calidad de la materia prima e insumos empleados y la idoneidad del proceso, o en su defecto no se expenden de manera higiénica.

Los preparados artesanales a base de carne y sangre, son capaces de acumular contaminantes del ambiente, la manipulación, o los insectos, razón por la cual se constituyen en un riesgo para la salud humana.

La diarrea en humanos es una de las formas de expresión de la enfermedad a consecuencia de la infección por *Escherichia coli*, que puede ser causada por la toxina termolábil (LT) producida por la bacteria enterotoxigénica (ETEC), bastante similar a la toxina del cólera¹, junto a otros síntomas como dolores abdominales, náuseas y fiebre. Actualmente una de las principales causas de

¹ GOEZ, M. VAZQUEZ, M. y PENA, P. **Determinación y diferenciación de *Escherichia coli* y Coliformes totales usando un mismo sustrato cromogénico.** Laboratorio Central Aquagest. Galicia, Santiago de Compostela, España, (s/f).

diarrea infantil en los países en vías de desarrollo es *Escherichia coli* (EPEC). Son los gérmenes causantes de la llamada “diarrea del viajero”, enfermedad que aqueja a los visitantes de países tropicales de higiene deficiente. El diagnóstico de la infección por *Escherichia coli* enterotoxigénica (EPEC) no se suele confirmar, ya que se basa en la detección de los genes que codifican la toxina termolábil (LT) por sondas de ADN o reacción en cadena de la polimerasa (PCR)².

Nuestro objetivo de estudio consistió en detectar la bacteria *Escherichia coli* enterotoxigénica (EPEC) en preparados artesanales a base de carne y sangre (salchicha de huacho, relleno, chorizo y hamburguesa), empleando en nuestra investigación un método altamente sensible como la Reacción en Cadena de la Polimerasa para analizar las muestras colectadas en puntos de venta artesanales en tres distritos de Lima, dicho estudio se hará en muestras crudas y cocinadas por los mismos vendedores de los productos, a fin de poder verificar la persistencia en caso de tener un resultado positivo en estado crudo y que pudiera ocasionalmente contaminar el pan o la masa de empanada. Adicionalmente se determinó la posible reducción de nitratos a nitritos en cada una de las muestras, reacción típica de la mayoría de las enterobacterias.

Formulación y planteamiento del problema.

Problema general:

¿En qué medida la presencia de *Escherichia coli* enterotoxigénica (EPEC) productora de toxina termolábil (LT) se constituye como un indicador de la falta de calidad de los preparados artesanales a base de carne y sangre que se expenden en los mercados?

Problemas específicos:

¿Se encontrará el gen de la toxina termolábil (LT) que indica la presencia de *Escherichia coli* enterotoxigénica en preparados artesanales a base de carne y sangre y que se comercializan en panes o como relleno de empanada crudos?

² PUERTA-GARCIA, A. y MATEOS, F. *Enterobacterias*. Unidad de Enfermedades Infecciosas. Servicio de Medicina Interna [en línea] 2010. Complejo Hospitalario Universitario de Albacete. [fecha de consulta: 30 de diciembre 2016]. España. Disponible en: www.fac.med.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf.Enterobacterias_Medicine2010.pdf



¿Se encontrará el gen de la toxina termolábil (LT) que indica la presencia de *Escherichia coli* enterotoxigénica en preparados artesanales a base de carne y sangre y que se comercializan en panes o como relleno de empanada en estado cocido?

¿Cuál será la incidencia del gen heat labile enterotoxin de *Escherichia coli* en cada tipo de preparado artesanal de carne o sangre, en estado crudo?

¿Cuál será la persistencia del gen heat labile enterotoxin de *Escherichia coli* en cada tipo de preparado artesanal de carne o sangre, en estado cocido?

¿Habrá nitratos y nitritos en los preparados artesanales de carne y sangre en estado crudo?

¿Habrá nitratos y nitritos en los preparados artesanales de carne y sangre en estado cocido?

Objetivos y Alcance de la Investigación

Objetivo General:

Determinar la presencia de *Escherichia coli* enterotoxigénica, productora de la toxina termolábil (LT) en preparados artesanales a base de carne y sangre y que se comercializan en panes o como relleno de empanada.

Objetivos Específicos:

1. Detectar el gen heat labile enterotoxin de *Escherichia coli* mediante la reacción en cadena de la polimerasa cualitativa PCR en salchicha de huacho, relleno, chorizo y hamburguesas en estado crudo.
2. Detectar el gen heat labile enterotoxin de *Escherichia coli* mediante la reacción en cadena de la polimerasa cualitativa PCR en salchicha de huacho, relleno, chorizo y hamburguesas en estado cocido.
3. Determinar la incidencia del gen heat labile enterotoxin de *Escherichia coli* en cada tipo de preparado artesanal de carne o sangre, en estado crudo.
4. Determinar la persistencia del gen heat labile enterotoxin de *Escherichia coli* en cada tipo de preparado artesanal de carne o sangre, en estado cocido.
5. Cuantificar los nitratos y nitritos en cada tipo de preparado artesanal de carne o sangre, en estado crudo.



6. Cuantificar los nitratos y nitritos en cada tipo de preparado artesanal de carne o sangre, en estado cocido.

Alcance de la investigación:

Se verá beneficiado el sector de personas consumidoras de preparados artesanales a base de carne y sangre, consumidos ahora también en panes y empanadas; porque se podrá capacitar a los productores para que usen las buenas prácticas de manufactura, en estos alimentos que tienen una demanda importante, no solo por ser agradables y tradicionales sino también nutritivos, alentando así el emprendimiento.

Se podrá iniciar la vigilancia de estos alimentos de producción artesanal, ya que la presencia de *Escherichia coli* enterotoxigénica que produce la toxina termolábil (LT), es un problema de salud pública, muy grave en niños y personas inmunodeprimidas. En nuestro país no se cuenta con estudios referentes a alimentos cárnicos contaminados con *Escherichia coli* ETEC que ayuden a prevenir este problema.

La investigación desarrollada fue experimental y aplicada, ya que comprobó la presencia o ausencia de *Escherichia coli* enterotoxigénica productora de la toxina termolábil (LT) en los preparados artesanales a base de carne y sangre, aplicando una estrategia de la biología molecular que es la detección de genes específicos de microorganismos mediante la Reacción en cadena de la Polimerasa; la incidencia y la persistencia por deficiente freído o recontaminación por la bacteria, así como los nitratos y nitritos que podrían hallarse en las muestras. Código UNESCO: 3309.04.

Importancia y Justificación de la Investigación:

La presente investigación tiene importancia porque se ha reportado numerosos casos en los que *Escherichia coli* ha sido la responsable de muertes y gastroenteritis, como en Japón el año 1.996 con más de 9.500 personas contaminadas y una decena de muertes en Sakai; la infección de varios cientos de personas incluyendo cinco muertos en Inglaterra, causadas por carne de vacuno contaminada con *Escherichia coli*, y de por lo menos 55 muertos en Estados



Unidos y Canadá; así como de la Sociedad Gallega de Microbiología Clínica que reportó que esta bacteria desde el año 1.992 había afectado a ocho personas y en 1.995 se le detectó en un 2% de la carne que llegaba a los camales³.

En Sudamérica todos los años son numerosos los casos de diarreas producidas por *Escherichia coli* en poblaciones de pocos recursos, y especialmente de niños pequeños, que padecen desnutrición o anemia, por consumo de alimentos contaminados y malas condiciones de higiene. Esta investigación aporta en determinar una posible vía de contaminación con este patógeno a través del consumo de los preparados artesanales de carne o sangre, crudos o cocidos que se expenden en pan o como relleno de empanadas.

Formulación de las Hipótesis.

Hipótesis General: la presencia de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) que posee el gen productor de toxina termolábil (LT), hace evidente la falta de calidad sanitaria de los preparados artesanales a base de carne y sangre que se expenden en los mercados.

Hipótesis específica 1: El gen heat labile enterotoxin de *Escherichia coli* debe estar ausente en productos preparados artesanalmente a base de carne y sangre (salchicha de huacho, relleno, chorizo y hamburguesa) crudos.

Hipótesis específica 2: El gen heat labile enterotoxin de *Escherichia coli* debe estar ausente en productos preparados artesanalmente a base de carne y sangre (salchicha de huacho, relleno, chorizo y hamburguesa) cocidos.

Hipótesis específica 3: La incidencia del gen heat labile enterotoxin de *Escherichia coli* debe ser menor a un caso respecto al total de muestras.

Hipótesis específica 4: La persistencia del gen heat labile enterotoxin de *Escherichia coli* debe ser menor a un caso respecto al total de muestras.

Hipótesis específica 5: La cantidad de nitratos y nitritos en los productos preparados artesanalmente a base de carne y sangre (salchicha de huacho, relleno,

³ PUERTA-GARCIA, A. y MATEOS, F. **Enterobacterias**. Unidad de Enfermedades Infecciosas. Servicio de Medicina Interna [en línea] 2010. Complejo Hospitalario Universitario de Albacete. [fecha de consulta: 30 de diciembre 2016]. España. Disponible en: www.fac.med.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf.Enterobacterias_Medicine2010.pdf.

chorizo y hamburguesa) crudos debe ser de 100 mg/kg y 50mg/kg respectivamente.

Hipótesis específica 6: La cantidad de nitratos y nitritos en los productos preparados artesanalmente a base de carne y sangre (salchicha de huacho, relleno, chorizo y hamburguesa) cocidos debe ser de 100mg/kg y 50mg/kg respectivamente.

Variable independiente:

Gen heat labile enterotoxin (hle) de *Escherichia coli* enterotoxigénica .

Variable dependiente:

Calidad de los productos artesanales a base de carne y sangre: Salchicha de Huacho, relleno, chorizo, y hamburguesas.

Cantidad de nitratos y nitritos.

Definición de las variables:

Gen heat labile enterotoxin (hle) de *Escherichia coli* enterotoxigénica que produce la toxina termolábil (LT).

La detección mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa, se basa en una estrategia génica para identificar a la bacteria *Escherichia coli* (EPEC) en productos cárnicos, por ser un germen contaminante asociado a infecciones humanas y con una exactitud de método de PCR de 99,9%.

Calidad de los productos artesanales: Salchicha de Huacho, relleno, chorizo y hamburguesas.

Dentro de la normatividad sanitaria vigente, es un indicador de buena calidad la Ausencia de *Escherichia coli* EPEC que produce toxina termolábil (LT), en todos los preparados artesanales a base de carne y sangre, ya sea crudos o cocidos.

Cantidad de nitratos y nitritos.



Las cantidades de nitratos que pueden ser añadidos en los embutidos industriales producidos con carne son 100mg/kg, para que se reduzcan a nitritos, hasta un valor no mayor a 50mg/kg como valor máximo.

Por otro lado se considera a las Enterobacterias, como gérmenes que en su gran mayoría son capaces de reducir los nitratos a nitritos.

IV. MARCO TEÓRICO

Escherichia coli es una bacilo anaerobio facultativo que pertenece a la familia Enterobacteriaceae⁴ y al género *Escherichia*⁵.

Esta bacteria aunque está ampliamente distribuida en la naturaleza, es una habitante natural del intestino largo de los seres humanos y los animales de sangre caliente. Esto significa que la mayoría de las cepas no producen enfermedades en individuos sanos, pero algunas si son patógenas y tiene la capacidad de causar enfermedades⁶ intestinales y extraintestinales no solo en personas sanas sino también en individuos inmunodeprimidos. Además, se considera que esta bacteria es la principal causa etiológica de diarrea en infantes y niños pequeños de países en desarrollo y es un problema de salud pública⁷ porque causa morbilidad y mortalidad en este grupo etario.

Los países que se ubican en las zonas medias y bajas de África, Asia y América Latina son los más afectados por enfermedades diarreicas unidas a sus condiciones de vida como inadecuados suministros de agua, desarrollo pobre de higiene y sanidad además de insuficiente educación (citado por Gomes T. et al.,2016), representando el mayor problema en dichas áreas⁸.

Las especies de *Escherichia coli* relacionadas con las enfermedades diarreicas se les denomina como *Escherichia coli* diarreogénicas (DEC) (Nataro y Kaper, 1998). Difieren entre sí respecto al sitio de colonización del hospedero,

⁴ PUERTA-GARCIA, A. y MATEOS, F. **Enterobacterias**. Unidad de Enfermedades Infecciosas. Servicio de Medicina Interna [en línea] 2010. Complejo Hospitalario Universitario de Albacete. [fecha de consulta: 30 de diciembre 2016].España. Disponible en: www.fac.med.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias_Medicine2010.pdf.

⁵ En honor al pediatra alemán Theodor Escherich. Citado por: GOMES, T. ELIAS, W. SCALETSKY, I. GUTH, B. RODRIGUES, J. PIAZZA, R. FERREIRA, L. and MARTINEZ, M. **Diarrheogenic *Escherichia coli***. *B.J.Microbiol*, **47**:3-30, 2016.

⁶ NATARO, J.B. and KAPER, J.B. **Diarrheogenic *Escherichia coli***. *Clin. Microbiol Rev*,**11**: 142-201, 1998.

⁷ TOBIAS, J. and VUTUKURU, S-R. **Simple and rapid multiplex PCR for identification of the main human diarrheogenic *Escherichia coli***. *J. Microbiological Research*,**167**: 564-570, 2012.

⁸ PARASHAR, U. UMESH, D. BRESEE, J.S. JOSEPH, S. GLASS, R.I. and Roger, I. **The global burden of diarrheal disease in children**. *Bull WHO*, **81**:236, 2003.



mecanismos de virulencia, síntomas y consecuencias por lo que se les clasifica⁹ como: *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) que pueden ser EPEC típica si posee el plásmido EAF y si no posee dicho plásmido se le reconoce como EPEC atípica¹⁰; *Escherichia coli* enterohemorrágica que produce la toxina Shiga 1(stx1) y 2(stx2) llamada (EHEC/STEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) caracterizada por un patrón de adherencia agregativa¹¹ en cultivo de células epiteliales y por la producción de factores de adherencia agregativa (AAFs), *Escherichia coli* enteroinvasiva¹², *Escherichia coli* adherente invasiva (AIEC) uno de los potenciales agentes de la enfermedad de Crohn (citado por Gomes T. et al., 2016) y *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) que produce la toxina termolábil (LT) y/o la enterotoxina termoestable (ST) en forma de STp ó STh. Existe dos subtipos de la toxina termolábil denominadas LT-I y LT-II.

Las cepas que expresan LT-I son patógenas para humanos y animales, y la LT-II es hallada primariamente en aislados de animales. De manera semejante la enterotoxina estable al calor tiene dos subtipos: STa y STb. Las ETEC aisladas de bovinos y ovinos producen la toxina STa¹³.

Además se puede decir que este grupo de *Escherichia coli* diarreogénicas representa una amplia gama de gérmenes que albergan elementos genéticos móviles como plásmidos y fagos. La gran heterogeneidad fue primero demostrada por rasgos fenotípicos que incluyen la gran diversidad de lipopolisacáridos (LPS), la composición de la flagelina, la expresión de diferentes factores de colonización (CFs) y los tipos de toxinas¹⁴. También debe considerarse que la tipificación

⁹ MOLINA, J. and ESLAVA, C. **Escherichia coli diarrogénica**. [En línea]. 2013, [fecha de consulta: 30 de diciembre 2016]. Disponible en: www.facmed.unam.mx

¹⁰ KAPER, J.B. **Defining EPEC**. *Rev. Microbiol (Sao Paulo)*, **27**:130-133, 1996.

¹¹ JOHNSON, A. KAUSHIK, R. FRANCIS, D. FLECKENSTEIN, J. and HARDWIDGE, P. **Heat-Labile Enterotoxin Promotes Escherichia coli Adherence to Intestinal Epithelial cells**. *J. Bacteriol. January*, **191**(1):178-186, 2009.

¹² MEDINA, M. ESQUIVEL, P. LIFSCHITZ, V. MEDINA, M. LOSCH, L. y MERINO, L. **Detección de Escherichia coli diarreogénicos en niños de barrios humildes de Corrientes, Argentina**. *Rev. Cubana Med. Trop.*, **62** (1):42-47, 2010.

¹³ WANI, S. HUSSAIN, I. BEG, S. RATHER, M. KABLI, Z. MIR, M. and Nishikawa, N. **Diarrhoeagenic Escherichia coli and salmonellae in calves and lambs in Kashmir: absence, prevalence and antibiogram**. *Rev.Sci.Tech. Off.int.Epiz*, **32**: 833-840, 2013.

¹⁴ GAASTRA, W. and SVENNERHOLM, A. **Colonization factors of human enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC)**. *Trends Microbiol*, **4**: 444-452, 1996.



serológica de ETEC en base a la composición de las proteínas de la membrana externa, especialmente en los LPS(O) somáticos y los antígenos flagelares (H). *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) comprende más de 100 serogrupos somáticos (O) y al menos 34 tipos flagelares (H) combinados en un número muy grande de serotipos O:H, pero sólo un número reducido de serotipos están asociados a enfermedades infecciosas, que tienen importancia para la salud pública¹⁵.

En el año 2014 se publicó una investigación en la que 362 cepas derivadas de seres humanos, en nueva generación, fueron secuenciadas, identificándose 21 genotipos y las cepas ETEC pudieron ser clasificadas en cinco filogrupos principales: A, B1, B2, D y E¹⁶. El estudio genético demostró que se trataba de los mismos serotipos, Cf y perfiles de toxinas distribuidos en todo el mundo.

Así como la adherencia a la mucosa del intestino, las cepas de ETEC producen enterotoxinas, que es el segundo componente asociado a la enfermedad. Estas toxinas han sido aisladas en el ser humano y en animales: la LT y la ST. Las dos toxinas median la deregulación de los canales de iones de la membrana liderando la pérdida de iones y la salida de cantidades masivas de agua.

LT está compuesta de cinco monómeros idénticos de 11,5k Da arreglados en una forma de anillo pentamérico (subunidad B) por el dominio A2 helicoidal.

ST es una proteína monomérica de cerca de 5k Da; puede producir deregulación osmótica, activando directamente la guanilato ciclase C localizada en la membrana apical de las células intestinales para producir guanosina monofosfato cíclica intracelular y consecuentemente para generar secreción de iones cloro, sodio, potasio, bicarbonato y agua del epitelio intestinal. Las toxinas LT y ST en forma separada o combinada, son capaces de inducir desbalance.

Como población de riesgo se considera niños en países en desarrollo y viajeros a esas áreas, a través de rutas de transmisión oral y fecal, con síntomas típicos de la enfermedad como: diarrea acuosa, usualmente sin sangre, con fiebre y vómitos en

¹⁵ WOLF, M. Occurrence, distribution and association of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 10:569-584, 1997.

¹⁶ VON MENTZER, A. CONNOR, T. and WIELER, L. Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) clades with long-term global distribution. *Nat Genet*, 46:1321-1326, 2014.

algunos casos (Tobías, 2012). De acuerdo a estadísticas citadas por Qardi (2005)¹⁷ un millón y medio de muertes por año se producen por causa de *Escherichia coli* (ETEC), rotavirus, *Vibrio cholerae* y *Shigella* spp., que son endémicas en los países en desarrollo; pero una gran proporción de pacientes con infecciones de ETEC requieren cortos períodos de hospitalización y sólo el 5% de pacientes necesitó un mayor tiempo de hospitalización. Además en Bangladesh se reportó un estudio de un grupo familiar en el que la infección por la bacteria ETEC se había diseminado en 11% de los contactos tenidos en un período de tiempo de 10 días¹⁸.

Según Echevarría¹⁹ et al., (1984) las transmisiones de la infección se debe a alimentos y agua contaminados, y a la producción manual de los alimentos por parte de las madres. Pero también hay otros alimentos implicados en infecciones por este microorganismo como por ejemplo sustitutos del café, hortalizas, ensaladas y purés de patatas, sushi, quesos blandos madurados por mohos, carne picada insuficientemente cocida (hamburguesas) y accidentalmente la leche fresca. La presencia de *Escherichia coli* ETEC reportada en alimentos²⁰ fue: carne de vacuno 3.7%, carne de cerdo, aves de corral y carne de cordero de 1% a 3%.

Los casos de enfermedad diarreica que incluyó a la bacteria *Escherichia coli* ETEC, investigados en India, resultaron ser más severas por causas adicionales como la malnutrición²¹ y deficiencias en vitamina A y en zinc, que agudizó el problema de morbilidad hallado en dicho país, por lo que se recomendó suplementar la alimentación de los niños con ese nutriente y mejorar la respuesta

¹⁷ QADRI, F. SVENNERHOLM, A. FARUQUE, A. and BRADLEY, R. **Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention.** *Clin. Microbiol. Rev.*, **18**: 465-483, 2005.

¹⁸ BLACK, R. MERSON, M. ROWE, B. TAYLOR, P. ABDUL, A. GROSS, R. and SOCK, D. **Enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea acquired immunity and transmission in an endemic area.** *Bull W.H.O.*, **59**: 236-238, 1981.

¹⁹ ECHEVARRIA, P. SERIWATANA, J. LEKSOMBOON, U. TIRAPAT, C. CHAICUMPA, W. and BOWE, B. **Identification by DNA hybridization of enterotoxigenic *Escherichia coli* in homes of children with diarrhea.** *Lancet*, **1**: 63-66, 1984.

²⁰ GRUPO ANALIZA CALIDAD. ***Escherichia coli* en alimentos** [en línea]. 2016 [fecha de consulta: 30 de agosto 2017]. Disponible en: www.analizacalidad.com.

²¹ MATHUR, R. REDDY, V. NAIDU, A. and KRISHNAMACHARI, K. **Nutritional status and diarrheal morbidity: a longitudinal study in rural Indian preschool children.** *Hum. Clin. Nutr.*, **39**:447-454, 1985.

inmune como se prescribe en el caso del cólera²² y la shigelosis. Según Dallas y Falkows²³ aunque *Escherichia coli* forma parte de la flora natural del intestino, algunas cepas causan una enfermedad semejante al cólera en humanos y en animales de granja.

También se considera que la estación más caliente o de temperatura más elevada en los países en los que se registra las infecciones por ETEC y por otras bacterias entéricas, son las que presentan más casos de infecciones y los viajeros²⁴ han mostrado mayor vulnerabilidad a enfermedades diarreicas en dichas estaciones del año.

En cuanto a la dosis infectiva se puede indicar que para ETEC, es de 10^6 a 10^{10} ufc²⁵, y lógicamente cantidades menores resultan ser menos patógenas, pero siempre son importantes los factores de colonización, la producción de enterotoxinas y la actividad secretora de agua que produce la deshidratación del organismo.

La mortalidad debida a ETEC se considera baja si se trata en un centro de salud (<1%), pero si el paciente no es atendido adecuadamente el porcentaje puede ser mucho mayor. La Organización Mundial de Salud (World Health Organization, WHO) ha reportado unas 380.000 muertes de niños menores de 5 años ocurridas en los países en desarrollo y que son causadas por ETEC²⁶ sin embargo es necesario considerar que muchos casos no son reportados porque no se pudo hacer el análisis microbiológico en el lugar del deceso, de allí que se presume que el número de fallecidos sea mayor. En el caso de ETEC, esta bacteria es más

²² ALBERT, M. QADRI, F. WAHED, M. AHMED, T. RAHMAN, A. AHMED, F. BHUIYAN, N. ZAMAN, K. BAQUI, A. CLEMENS, J. and BLACK, R. **Supplementation with zinc but not vitamin A, improves seroconversion to vibriocidal antibody in children given an oral cholera vaccine.** *J. Infect. Dis.*, **187**: 909-913, 2003.

²³ DALLAS, W. and FALKOW, S. **The molecular nature of heat-labile enterotoxin (LT) of E coli.** *Nature*, **277**:406-407, 1979.

²⁴ MATTILA, L. SIITONE, A. KYRONSEPPA, H. SIMULA, I. OKSANEN, P. STENVIK, P. and PELTOLA, H. **Seasonal variation in etiology of "travelers" diarrhea.** Finnish-Moroccan Study Group. *J. Infect. Dis.*, **165**:385-388, 1992.

²⁵ LEVINE, M. NALIN, D. HOOVER, D. BERGQUIST, E. HORNICK, R. and YOUNG, C. **Immunity to enterotoxigenic *Escherichia coli*.** *Infect. Immun.*, **23**:729-736, 1979.

²⁶ WORLD HEALTH ORGANIZATION. **New frontiers in the development of vaccines against enterotoxigenic (ETEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli* infections.** *Weekly Epidemiol. Rec.*, **13**:98-100, 2004.

difícil de reconocer a diferencia de otros gérmenes relacionados con esta infección, tal es el caso de *Shigella* spp., rotavirus y *Vibrio cholerae* que cuentan con métodos estandarizados. Otros reportes indicaron que las infecciones debidas a diferentes cepas de ETEC excedieron posiblemente a los 200 millones de casos anualmente, con unas 75.000 muertes de bebés y niños pequeños que habrían vivido en zonas pobres del trópico y con deficiencia de servicios de agua y limpieza²⁷.

Reacción en cadena de la polimerasa:

Por otro lado, la reacción en cadena de la polimerasa es un método que permite obtener muchas copias de una porción deseada de ADN en base a una muestra que contiene cantidades muy pequeñas del ADN en estudio, con 99,9% de sensibilidad. Se emplea en estudios de genes, diagnóstico de enfermedades como el papiloma virus humano, o de porciones del ADN de determinadas bacterias, o microbios, para ayudar a diagnosticar una infección²⁸.

La PCR tiene muchas aplicaciones en la investigación y en la práctica se utiliza de forma rutinaria en la clonación de ADN, el diagnóstico médico y el análisis forense de ADN.

Los aspectos más importantes de este método son:

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de laboratorio utilizada para hacer muchas copias de una región de interés particular de ADN. Por ejemplo, podría ser un gen involucrado en la resistencia al frío en un vegetal,

²⁷ GOMES, T. VIEIRA, M. WACHSMUTH, I. BLAKE, P. and TRABULSIR, R. **Serotype-specific prevalence of *Escherichia coli* strains with EPEC adherence factor genes in infants with and without diarrhea in Sao Paulo, Brazil.** *J Infect Dis*, 160(1):131-135, 1989.

²⁸ INSTITUTO Nacional de Cáncer, NIH. **Reacción en cadena de la polimerasa** [en línea]. 2018 [fecha de consulta: 16 de abril de 2018]. Disponible en :

https://www.google.com.pe/search?source=hp&ei=-4LGW7ulJcid5wL1qJHwBA&q=definicion+de+reacci%C3%B3n+en+cadena+de+la+polimerasa&oq=definicion+de+reacci%C3%B3n+en+cadena+de+la+polimerasa&gs_l=psy-ab.3..0i22i30k1i5.7000.22687.0.23475.49.49.0.0.0.0.263.7647.0j42j2.44.0....0...1.1.64.psy-ab..5.44.7640...0j0i131k1.0.OiNi3WzvKFO



o a una determinada enfermedad, por lo que se produce abundante ADN de interés que podría ser empleado para continuar con la investigación planificada²⁹.

La Taq polimerasa proveniente de la bacteria *Thermus aquaticus*, la metodología además requiere una enzima ADN polimerasa responsable de la generación de nuevas cadenas de ADN usando como base la cadena de ADN molde, y que resista temperaturas elevadas de ciclado.

Los cebadores para PCR son pedazos cortos de ADN de cadena sencilla. En cada reacción de PCR se añaden dos cebadores diseñados para flanquear la región de interés que debe ser copiada a la que se unen nucleótidos por complementariedad de bases. Una vez unidos los cebadores al ADN molde, la Taq polimerasa los extiende y se produce la copia de la región comprendida entre ambos.

Los pasos de la PCR son (Khan Academy, 2018):

Primero se requiere tener todos los elementos para una reacción de PCR y que se han definido como Taq polimerasa, cebadores, ADN molde y nucleótidos, que se colocan en un tubo junto con los cofactores que necesite la enzima, y se someten a ciclos repetidos de calentamiento y enfriamiento que permiten la síntesis del ADN, de la siguiente manera:

Desnaturalización (96°C): se efectúa a una temperatura de 96°C para separar o desnaturalizar las cadenas de ADN y así conseguir los moldes de cadena sencilla para continuar con la reacción.

Templado (55°C - 65°C): los cebadores se unen a sus secuencias complementarias en el ADN molde de cadena sencilla, de allí la importancia de disminuir la temperatura de trabajo para conseguir dicha unión.

Extensión (72°C): luego se eleva la temperatura a 72°C para que la enzima Taq polimerasa extienda los cebadores sobre el ADN molde y sintetice de este modo las nuevas cadenas de ADN (Khan Academy, 2018).

Este ciclo se repite 35 veces en una reacción de PCR típica, que generalmente tarda entre 2 horas y 4 horas, según la longitud de la región de ADN que se copia.

²⁹ KHAN ACADEMY. **Reacción en cadena de la polimerasa.**[en línea] .2016. [fecha de consulta: 12 de marzo de 2016]. Disponible en: <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr>



Estas reacciones producen miles de millones de copias en base a unas pocas copias de la región blanco. Pero se debe considerar que en esta metodología no solo se emplea el ADN molde inicial en cada ciclo, sino que en cada evento el ADN nuevo generado entra como ADN molde para la siguiente síntesis de nuevo ADN, de allí el crecimiento exponencial de las copias y también habrá suficientes cebadores y enzima Taq polimerasa en el medio que actúen para continuar con las reacciones durante el tiempo ya estimado.

Seguidamente, los resultados de una reacción de PCR se visualizan mediante electroforesis en gel (Khan Academy, 2018).

La electroforesis en gel es una técnica auxiliar en la que una corriente eléctrica impulsa los fragmentos de ADN a través de una matriz de gel (por ejemplo de agarosa o de poliacrilamida) consiguiendo que los fragmentos de ADN se separen según su tamaño. Siempre se debe incluir un estándar, o marcador de peso molecular conocido, para que pueda determinarse el tamaño de los fragmentos en la muestra de PCR.

Los fragmentos de ADN de la misma longitud forman una "banda" o línea horizontal en el gel que se puede identificar a simple vista si el gel se tiñe con un pigmento que se una al ADN. Una banda de ADN contiene muchas copias de la región blanco de ADN, y no solo una o unas cuantas copias. Debido a que el ADN es microscópico, deben existir muchas copias de este para poder verlo a simple vista (Khan Academy, 2018). Un elemento que se suele emplear para visualiza los resultados de la electroforesis es bromuro de etidio.

Muestras:

Las muestras artesanales que fueron analizadas en este trabajo de investigación correspondieron a las siguientes definiciones, composiciones y características generales:

Salchicha de Huacho: se le considera un embutido crudo ya que en la formulación se emplea materia prima cruda que podría ser curada o no (carne de cerdo, bovino,



ave o equino) y que no requiere tratamiento térmico. Los ingredientes se trituran y mezclan con especias y aditivos³⁰.

Las carnes curadas pueden recibir 300 ppm de nitrato de potasio ó 150 ppm de nitrato de sodio, o finalmente 300 ppm de la mezcla de ambas sales. De acuerdo a la composición del producto puede ser fino, extra y económico (INDECOPI, 1999).

Relleno: según la NTP 201.014 este producto que también es uno de los preparados artesanales analizados, corresponde a la mezcla desarrollada en base a sangre, grasa, recortes de vísceras y porcino, triturados y mezclados, y agregados de especias que se distribuyen homogéneamente³¹, para constituir un producto suave pero de corta duración.

De acuerdo a Collazos³² et al., por 100 gramos de producto, el relleno contiene agua 75,5g, grasa 5g, proteína 14,4g, cenizas 1,9g. Minerales importantes: calcio 63mg, fósforo 41 mg, hierro 16,9 mg.

Hamburguesa: es otro preparado crudo y fresco que se prepara con carnes de diferentes especies como de res, mezclada con grasa de cerdo, harinas y/o almidones (de papa o yuca) que se forma y posteriormente congela³³.

De acuerdo a información disponible³⁴ la composición de la hamburguesa por 100 gramos de producto es: grasa 13,5 g, proteína 12,9g, carbohidratos 27,3g, agua 54,4g y sodio 0,5g.

³⁰ INSTITUTO NACIONAL DE LA COMPETITIVIDAD Y DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL (Perú). NTP 201.014:1999: **Carne y productos cárnicos**. Embutidos con tratamiento térmico antes de embutir o enmoldar.- Definiciones, clasificación y requisitos. Lima: INDECOPI, 1999. 15 p.

³¹ INSTITUTO NACIONAL DE LA COMPETITIVIDAD Y DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL (Perú). NTP 201.014:1999: **Carne y productos cárnicos**. Embutidos con tratamiento térmico antes de embutir o enmoldar.- Definiciones, clasificación y requisitos. Lima: INDECOPI, 1999. 15 p.

³² COLLAZOS, C. WHITE, P. WHITE, H. VINAS, E. ALVISTAN, E. URQUETA, R. VASQUEZ, S. DIAZ, C. QUIROZ, A. ROCE, A. HENGSTED, D. BRODFIELD, R. HERRERA, N. FACHING, A. ROULES, N. HERNANDEZ, E. y AMES, M. **Tablas Peruanas de Composición de Alimentos**. 7ª. Ed. Lima: Instituto Nacional de Salud, Centro Nacional de Alimentación y Nutrición, 1966.

³³ BUSTACAR, A. y DUVAN, F. **Elaboración de tres productos cárnicos: chorizo, longaniza y hamburguesa, con 100% de carne de babilla**. (Tesis de pregrado). Universidad de Salle. Bogotá, Colombia, 2007.

³⁴ YAZYO. **Hamburguesa**. [en línea].2017 [fecha de consulta: 12 de marzo de 2016]. Disponible en: <https://www.Yazio.com>.



Según la Norma Técnica del ICONTEC 1325³⁵ la hamburguesa puede ser cruda o sometida a tratamiento térmico preparada con carnes de abasto, y con sustancias de uso permitido tales como sal, sal de cura, cebolla, azúcar, ajo, páprika, pimienta, comino y orégano; expresando además la fórmula siguiente: carne magra de res 70%, grasa de cerdo 10%, agua fría 15% y harina de trigo 5%.

Chorizo: son embutidos crudos (INDECOPI, 1999) preparados con carne de cerdo y de res, adicionada de sal y condimentos, que se introduce en tripa de cerdo, se atan y se exponen al medio ambiente. Puede seguir un proceso de maduración en el que el producto adquiere textura firme y aroma adecuado, empleando nitratos y nitritos.

De acuerdo a la Tabla de Composición de Alimentos Industrializados³⁶, el chorizo tiene la siguiente composición por 100 gramos de chorizo: agua 46,3g, proteína 15,2g, grasa 34,5g, y cenizas 4g.

Nitratos y nitritos:

Las carnes magras poseen diferentes tonos de rojo debido a la concentración de mioglobina, que corresponde a las tres cuartas partes del pigmento total que contiene la carne roja³⁷, ya que la otra parte es la hemoglobina de la sangre.

Los cambios de color de la carne se producen por cambios en la mioglobina que posee el grupo hem, el cual está constituido por cuatro anillos pirrólicos unidos en un anillo porfirínico donde la resonancia de los dobles enlaces conjugados da lugar al color de los pigmentos presentes en el músculo. El anillo tiene también un átomo de hierro divalente enlazado covalentemente con los 4 átomos de nitrógeno; el quinto nitrógeno está unido al resto histidilo de la globina; el sexto enlace de coordinación puede fijar H₂, O, O₂, NO mientras que el hierro permanece divalente. De todo ello, proviene el color rojo púrpura de la carne recién cortada. En contacto con el aire la carne presenta color rojo brillante por

³⁵ INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIONES (Colombia). NTC 1325. Industria alimentaria. **Productos cárnicos procesados no enlatados**. 5° actualización. Bogotá: ICONTEC, 2008. 32 p.

³⁶ BEJARANO, E. BRAVO, M. HUAPAYA, C., HUAMAN, M. ROCA, A., y E. ROJAS, E. **Tabla de composición de alimentos industriales**. Ministerio de Salud. Lima: Instituto Nacional de Nutrición, 1993.

³⁷ FOX, J. **The chemistry of the meat pigments**. *J. Agr. Food Chem*, 14: 207-210, 1966.

formación de oximioglobina. A bajos niveles de oxígeno el complejo oxigeno-mioglobina se disocia y el hierro se oxida a estado férrico, dando lugar a la metamioglobina de color rojo marrón.

La mioglobina también puede unirse al óxido nítrico lo que ocurre en el curado de carnes³⁸, produciendo color rosa en carne de res, tocino, jamón, etc.

La molécula de NO proveniente del nitrito o de la reducción enzimática o bacteriana del nitrato, se fija con el Fe²⁺ mediante enlaces de coordinación, originando así compuestos rojos o rosados que resisten la oxidación manteniéndose el color del producto. Este procedimiento inhibe además la proliferación de bacterias contaminantes, toxinas de Clostridium y algunas reacciones enzimáticas³⁹. La carne cocida tiene color oscuro por pigmentos formados por desnaturalización de la mioglobina, cuando el átomo de hierro se encuentra en estado oxidado y algunas reacciones sobre los lípidos, azúcares reductores y proteínas.

Los nitratos denominados también salitre o nitro, son sustancias que se usan para conservar alimentos y son componentes naturales de los vegetales como la remolacha, ruibarbo, col, brocolera y col de flor que contienen hasta 1mg/kg de nitratos, que después de uno o dos días se convierten en nitritos⁴⁰. Se conoce que Gillis Beukel, holandés que murió en 1397, empleaba nitratos para conservar pescado y que la palabra "Pökeln" o salazón se cree que deriva de su nombre.

Se suele emplear nitrato sódico o nitrato potásico en forma pura, o en mezcla junto con cloruro de sodio y otras sustancias.

El nitrato de sodio tiene como peso molecular 84,99 siendo muy higroscópico; el nitrato de potasio tiene peso molecular de 101,11. La dosis letal (DL50) para ratas es de 3g a 7 g por kilo de peso. Para animales de mayor peso el nitrato es más tóxico. En el ser humano la dosis de 30 g a 35g por kilo de peso es mortal. El nitrato potásico en menor dosis produce irritación del intestino y diarrea. Los

³⁸ CHARLEY, Helen. **Tecnología de Alimentos**. México D.F.: Editorial LIMUSA, 1987, 767 p.

³⁹ CHEFTEL, Jean-Claude ET CHEFTEL, Henry. **Introduction a la Biochimie et a la Technologie des Aliments**. Volume I et II. Paris, France: Editorial Technique et Documentation, 1976, 736 p.

⁴⁰ BENDER, Arnold. **Diccionario de nutrición y tecnología de los alimentos**. Butterworth & Co. Zaragoza: Editorial Acribia; 1994, 341p.

nitratos son transformados por reacciones enzimáticas o por la actividad de los microorganismos, Esta reacción es espontánea en el alimento y en el tracto digestivo del ser humano.

En los individuos adultos la transformación se lleva a cabo en el intestino, en los lactantes ocurre en el estómago o en el duodeno donde los nitritos son absorbidos en forma rápida de allí su peligrosidad. La acción antimicrobiana es sobre bacterias anaerobias por los nitritos originados. Se les añade en productos lácteos (quesos), productos cárnicos y en el pescado⁴¹.

Los nitritos se emplean también en forma directa ya que la conversión de los nitratos a nitritos no era fácilmente controlable en el alimento. Se indica que desde 1899 se conocía que eran los nitritos los que ejercían la actividad antimicrobiana y se suele añadir nitrito sódico con sal (sal de salazón), de dosificación más segura y sencilla.

El peso molecular del nitrito sódico es 69,0 y se le obtiene como cristales de color blanco o amarillo pálido. Es muy soluble en agua pero poco soluble en alcohol.

Toxicidad aguda: la DL50 en animales pequeños es de 100mg a 200mg por kilogramo de peso corpóreo; en el ser humano es mucho más tóxico y la DL50 es de 32mg/kg de peso, lo que corresponde aproximadamente a dos gramos por individuo⁴².

La toxicidad alta del nitrito ha originado casos de intoxicación cuando se le ha usado combinado con los nitratos o en forma pura, por lo que actualmente se usa mezclado con sal común.

En cuanto a la toxicidad subcrónica de la sustancia, si se añade 1,4 gramos de nitrito sódico por litro de agua a los animales experimentales por 200 días, se observó que aumentó el contenido de metahemoglobina en sangre y se produjo alteraciones en algunos órganos como hígado, bazo, riñones y miocardio.

Los nitritos no se les considera cancerígenos pero el problema es que pueden formar nitrosaminas que se forman por reacción de aminas secundarias y otros

⁴¹ LÜCK, Erich. *Conservación química de los alimentos*. Universidad Complutense de Madrid. Zaragoza, España: Editorial ACRIBIA, 1977, 243 p.

⁴² BURDEN, E. *The toxicology of nitrates and nitrites with particular reference to the potability of water supplies*. *Analyst*, 86: 429-433, 1961.



compuestos nitrogenados y los nitritos en solución ácida. Los nitritos se absorben rápidamente en el tracto intestinal, disminuyendo el tono del músculo liso, con descenso de la presión arterial; si la dosis es elevada se forma metahemoglobina con producción de cianosis.

Inhiben el crecimiento microbiano (por unión de grupos amino del sistema deshidrogenasa de la célula microbiana y el ácido nitroso y los óxidos), siendo el pH un elemento importante en la reducción microbiana y la cantidad de nitritos requerido para asegurar su función. Tiene acción inhibidora del Clostridium y por tanto de sus toxinas (Lück, 1981).



V. MATERIALES Y MÉTODOS

El tipo y diseño de investigación

Por la manipulación de la variable fue una investigación experimental porque manipuló una variable independiente ejerciendo control y aplicando una metodología cualitativa y cuantitativa. Por la naturaleza de los objetivos fue un estudio de tipo exploratorio, ya que es un problema muy poco investigado en nuestro medio. Por el tema fue una investigación aplicada que busca solucionar este problema práctico, generando aportes al conocimiento tecnológico y de vigilancia sanitaria. Tuvo también investigación de campo ya que estudió el fenómeno en el lugar que se produce de manera constante y finalmente, también se puede decir que fue una investigación de laboratorio al manipular una variable no comprobada, en condiciones controladas, para determinar de qué modo y por qué causa se produce una situación particular.

Población.

La población estuvo formada por los preparados artesanales denominados salchicha de huacho, relleno, chorizo y hamburguesa que se expenden de manera rutinaria en tres mercados; dos de Lima y el tercero en el mercado del Callao. En los dos distritos de Lima (Lince y La Victoria) en los que se tomó las muestras se observó aproximadamente 10 kilos de salchicha de huacho, chorizo y de relleno que se ofrecen diariamente en cada puesto de comercio, cantidad que se repone de acuerdo a la venta. En cuanto a los chorizos y hamburguesas que se comercializan en el mercado del Callao, estos se pudieron apreciar en una cantidad visible de aproximadamente 4 kilos.

Muestra.

Se estudió 22 muestras biológicas correspondientes a los productos artesanales a base de carne y sangre y no veinte muestras como en un principio con la finalidad de tomar una muestra de cada uno de los productos en estudio y de todos los

vendedores; por tanto fueron un total de 12 muestras en estado crudo y 10 muestras cocidas, a la venta.

Las muestras fueron colectadas en el mercado Lobatón de Lince y Palermo de La Victoria, así como del mercado del Callao; establecimientos en los que se observó falta de buenas prácticas de manipulación y expendio, y sin el debido control sanitario.

Cada muestra fue manipulada con guantes y trasladada al laboratorio dentro de las medidas de bioseguridad en recipientes estériles y refrigerados, que fueron cerrados herméticamente y codificados para el estudio molecular. Se tomaron muestras de 100 gramos de los productos crudos, mientras que en los productos cocidos, se llevaron unidades completas tal como se comercializan en panes o empanadas.

Equipos:

Termociclador Applied Biosistem, EUA para la genodetección de *Escherichia coli*.

Cámara de electroforesis, EUA.

Transiluminador UVP, EUA

Microcentrífuga CLINICA 'S

Centrífuga CELMA, Brasil.

Ultracongeladora FERROBRAS, Brasil.

Método de Reacción en cadena de la Polimerasa cualitativa:

Se procedió con el estudio piloto para la estandarización de los procedimientos de PCR con dos controles comerciales positivos.

Extracción de ADN:

Para iniciar el proceso de extracción de ADN bacteriano (*Escherichia coli*), del material biológico fresco o cocido por freído en una plancha, se tomó de cada muestra 200 mg de material, cantidad que fue triturada en una placa Petri descartable estéril e individual sobre una gota de buffer PBS pH 7,4. El triturado

homogenizado fue depositado en un microtubo con 500 µl de PBS y centrifugado a 3 200 rpm durante 15 minutos.

Digestión enzimática:

Se decantó el sobrenadante y al botón tisular se le adicionó 200 µl de solución TNE pH 8,0, 20 µl de SDS al 10% y 10 µl de PK al 20%. Se llevó a incubar durante 24 horas a 50°C.

Extracción Orgánica:

Fue realizada siguiendo los métodos sugeridos por Sambrook (1989) para tejidos⁴³, estandarizando previamente el procedimiento en un estudio piloto de una muestra y el control comercial positivo; empleando fenol y cloroformo-alcohol isoamílico 24:1. Se precipitó el ADN con acetato de sodio 3M y etanol absoluto a -37°C durante dos horas. Luego se centrifugó durante 20 minutos y decantó el sobrenadante, liofilizándose el botón de ADN durante 15 minutos y se resuspendió en agua de grado molecular. Se mantuvo a -36°C hasta la realización de la PCR.

La mezcla de reacción se preparó de acuerdo al inserto del fabricante para el kit Maxim Biotech, Inc. SP-10207 con secuencia de *Escherichia coli* heat labile enterotoxin (hle).

Se adicionó 3 µl de ADN de cada muestra a una mezcla de reacción que contiene buffer PBS, desoxynucleótido trifosfato, cloruro de magnesio, cebadores sentido y antisentido de la enterotoxina heat labile de *Escherichia coli* alineados sobre la base de datos JO1G46 (Oligo 5': CCC CAG TCT ATT ACA GAA CTA TG, Oligo 3': CCA TAC TGA TTG CCG CAA TTG).

La reacción de amplificación se realizó en un termociclador Applied Biosystem, durante 35 ciclos de 96°C por un minuto, a 58°C por un minuto y a 72°C por un minuto. Con una extensión final de 72°C por 10 minutos. Se amplificaron en paralelo un control comercial positivo, un control conocido negativo y un control blanco.

⁴³ SAMBROOK, J. and MANIATIS, T. **Isolation of high molecular weight DNA from mammalian cells:** Protocol I, II. *Molecular cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989, (9.16-9.20) p.



El control positivo determinó la talla del amplicón que fue de 301 pares de bases (pb), los controles negativo y blanco determinaron la viabilidad de los reactivos y la ausencia de contaminación durante el proceso.

Electroforesis:

El producto de amplificación de las muestras estudiadas fue sometido a una corrida electroforética en gel de agarosa al 2% durante 30 minutos a 100V. En cada corrido se incluyó el marcador de peso molecular ϕ X174 RFDNA/HaeIII.

El gel fue analizado en un Transiluminador con luz UV y fotografiado.

Análisis de Nitratos y Nitritos:

Para cada caso se tomó una muestra de 5 gramos, moliéndola finamente en un mortero para ser tratada con 8 mL de acetato de sodio 1N, mezclando por un minuto. Posteriormente se filtró tomando una alícuota de 10 mililitros para hacer la lectura empleando las tiras reactivas de marca Macherey-Nagel de Alemania, leyéndose el resultado en los siguientes 60 segundos. Finamente se comparó el color de las almohadillas reactivas semicuantitativas con la escala de colores y concentraciones de nitratos y nitritos correspondientes.

Los rangos de medidas son:

Evaluación visual: 10 a 500 mg/L de Nitratos

1 a 80 mg/L de Nitritos.

Evaluación reflectométrica: 10 a 500 mg/L de Nitratos

0,5 a 80 mg/L de Nitritos.

Técnicas e instrumentos de recolección de datos:

Los resultados experimentales han sido trabajados en cuadros de acuerdo a la hipótesis general e hipótesis específicas ya expuestas, y para tal fin se planteó:

Las características de los mercados donde se muestreó los alimentos en estudio.

Los cuadros correspondientes de todas las muestras por cada mercado de expendio y en estado crudo y cocido por freído.

Cuadros de resultados de la detección cualitativa del gen heat labile enterotoxine (hle) en muestras crudas y cocidas por freído.

Cuadros de detección de nitratos y nitritos en las muestras tanto crudas como cocidas por freído.

Cuadro de incidencia del gen heat labile enterotoxine (hle) en muestras crudas y cocidas por freído.

Cuadro de persistencia del gen heat labile enterotoxine (hle) en muestras crudas y cocidas por freído.

Cuadro de muestras con resultado positivo y negativo por tipo de producto.

Cuadro de casos positivos y negativos por tipo de alimento y estado, crudo o cocido por freído, respecto a los mercados de expendio.

Cuadro de análisis estadístico de X^2 que determinó la relación entre los alimentos y los mercados versus los resultados positivos hallados.



VI. RESULTADOS

Como paso previo se indica brevemente las características generales de los mercados de abasto en los que fueron muestreados los alimentos motivo del presente estudio, vale decir salchicha de Huacho, relleno, chorizo y hamburguesas.

Cuadro N°4.1.
Características de los Mercados donde se muestreó los alimentos materia de estudio.

MERCADO	DIRECCIÓN	DISTRITO	CARACTERÍSTICAS
Lobatón	Av. Petit Thouars cdra. 16	Lince	Personal con mandil. Insectos voladores en el ambiente, presencia de animales domésticos (perros y gatos). Limpieza deficiente de pisos, mesones y muros, con techo completo. Zonas de paso interrumpidos por viveres. Productos crudos a medio ambiente y otros en vitrinas refrigeradas, productos cocidos expuestos en vitrinas.
Palermo	Av. Palermo cdra. 2	La Victoria	Personal con guardapolvo. Insectos voladores en el ambiente, animales domésticos (gatos). Techo a dos aguas de cemento e incompleto, pisos nuevos pero sucios, muros de calidad regular. Productos crudos a medio ambiente y los cocidos expuestos en vitrinas a medio ambiente.
Del Callao	Av. Buenos Aires	Callao	Personal, algunos con mandil sucio, otros en ropa casual. Insectos voladores en el ambiente, animales domésticos (perros y gatos). Condición completamente deficiente en todas las instalaciones, e inundado y con fango. Productos crudos refrigerados y a medio ambiente, productos cocidos se prepararon en el momento.

Fuente: Resultados obtenidos en la presente investigación.

Seguidamente se presenta en el Cuadro N°4.2 la relación de muestras colectadas en estado crudo y cocido de salchicha de Huacho.

Cuadro N°4.2.
Características de las Muestras colectadas de Salchicha de Huacho en estado
crudo y cocido

CÓDIGO DE MUESTRA	MERCADO	TIPO	CARACTERÍSTICAS
SH1	Palermo		Visitado por Gastón Acurio. Producto de color amarillo oscuro externo, casi marrón, y color rojo naranja al interior. Olor a comino. Se observó partículas de grasa y cartilago de tamaño mediano en el interior. Venta a medio ambiente.
SH2	Palermo		Venta: Sr. Don Alberto. Producto compacto. Presentó partículas de grasa y cartilago de tamaño mediano. Venta a medio ambiente.
SH3	Lince	Salchicha de Huacho en estado crudo	Producto de color anaranjado. Leve olor a condimento. Las partículas de carne y grasa de tamaño grande.
SH4	Lince		Producto de color claro y poco aroma a condimentos. Partículas de tamaño mediano de carne y grasa.
SH5	Palermo	Salchicha de Huacho, producto cocido	Venta a medio ambiente, en vitrina, en emparedado.
SH6	Lince		Venta a medio ambiente, en vitrina, en emparedado.

Fuente: Resultados obtenidos en la presente investigación.

Las muestras en forma cocida, fueron presentadas por los comerciantes, como sandwichs para consumo especialmente en el momento del desayuno, por lo que iban acompañadas de pan francés.

Este producto es comercializado diariamente en forma cruda o cocida en los mercados de Palermo y Lobatón, no así en el mercado del Callao.

Por otro lado en el Cuadro N°4.3. se puede observar las características de las muestras de chorizo colectadas en los mercados de Palermo, Lobatón y del Callao.

Cuadro N°4.3.
Características de las Muestras colectadas de Chorizo en estado crudo y cocido

CÓDIGO	MERCADO	TIPO	CARACTERÍSTICAS
CH1	Palermo		Producto de color obscuro, con puntos oscuros de carne y trocitos pequeños de grasa y pimienta negra. Olor a ácido, Refrigerado.
CH2	Lobatón	Chorizo en estado crudo.	Producto de color rosado con trozos de grasa y trozos de carne oscura. Refrigerado.
CH3	Callao		Producto de color obscuro. Venta a medio ambiente y sobre el mostrador. Sin ningún tipo de protección.
CH4	Callao		Empanadas. Completa el relleno un guiso de cebolla y verdura. Venta a medio ambiente.
CH5	Palermo	Chorizo en estado cocido, por freído en aceite.	Producto freído. Expuesto al medio ambiente. Acompañada con papas al hilo en pan francés.
CH6	Lobatón		Producto expuesto al medio ambiente. Acompañado con papas al hilo en pan francés.

Fuente: Resultados obtenidos en la presente investigación.

Con respecto a las muestras de Relleno, este tipo de alimento sólo pudo ser muestreado en los mercados de Palermo y Lobatón, ya que no se expende en el mercado del Callao.

Cuadro N°4.4.
Características de las Muestras colectadas de Relleno en estado crudo y cocido

CÓDIGO	MERCADO	TIPO	CARACTERÍSTICAS
R1	Palermo		Producto con 25% de grasa sólida, 10% de cebolla y hierba buena y 65% de sangre. Venta a medio ambiente, en una bandeja sobre el mostrador.
R2	Palermo	Relleno en estado crudo	Punto de expendio visitado por Gastón Acurio. Producto con trozos de grasa pequeños, poca sangre y abundante aderezo de cebolla roja, cebolla china y hierba buena. Poco aromático. Venta a medio ambiente, sobre una bandeja.
R3	Lobatón		Producto de color muy oscuro. Venta a medio ambiente sobre el mostrador. Con una mosca en la superficie.
R4	Palermo		Producto expuesto al medio ambiente. Se expende en pan francés.
R5	Lobatón	Relleno en estado cocido, por freído en aceite.	Producto expuesto al medio ambiente. Se expende en pan francés, con vegetales.

Fuente: Resultados obtenidos en la presente investigación.

Finalmente las hamburguesas, crudas y cocidas fueron muestreadas en el mercado del Callao y comercios de expendio de la periferia del mercado, con los resultados que se citan en el cuadro siguiente.

Cuadro N°4.5.
Características de las Muestras colectadas de Hamburguesa en estado crudo y cocido

CÓDIGO	MERCADO	TIPO	CARACTERÍSTICAS
H1		Hamburguesa en estado crudo	Se observa un producto con carne molida y grasa. De color oscuro. Venta a medio ambiente.
H2			Producto con carne molida y grasa. Venta a medio ambiente.
H5	Callao		Producto que se expende a medio ambiente, en pan francés.
H6		Hamburguesa en estado cocido por freído	Producto que se pone a la venta a medio ambiente en una vitrina. En pan francés.
H7			Venta inmediata y directa. Se ofrece en pan francés con lechuga picada, papitas fritas y mayonesa.

Fuente: Resultados obtenidos en la presente investigación.

A continuación se detectó el gen heat labile enterotoxin (hle) de *Escherichia coli* mediante la reacción en cadena de la polimerasa cualitativa PCR en salchicha de huacho, relleno, chorizo y hamburguesas en estado crudo con los siguientes

resultados:

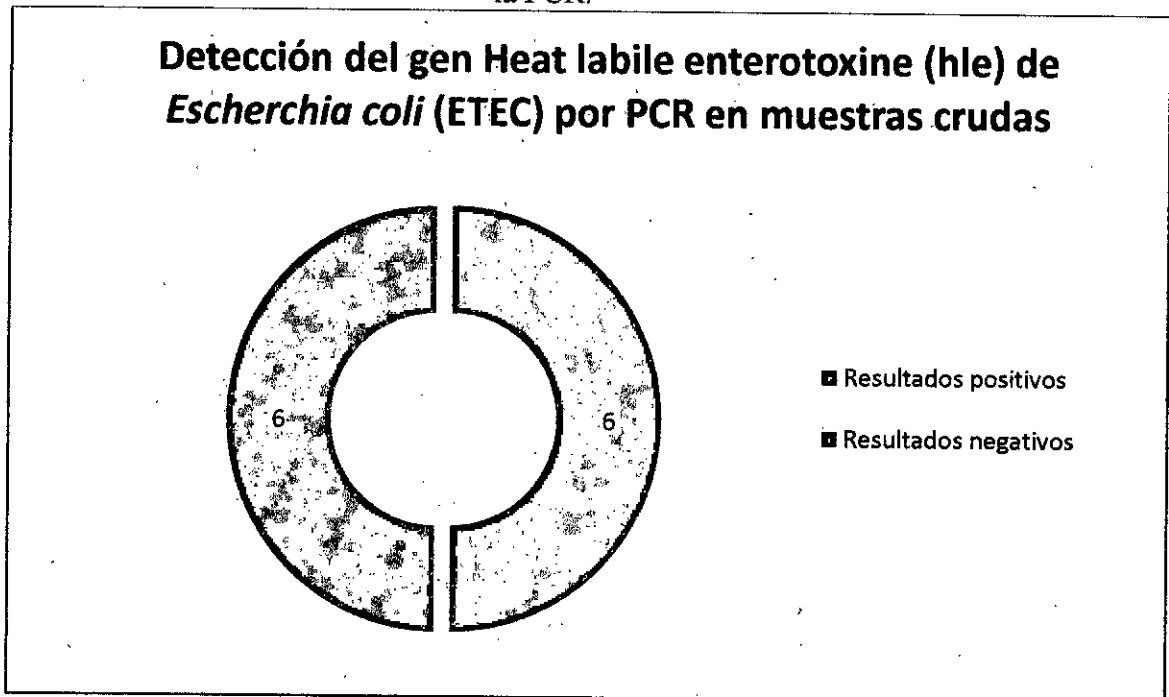
Cuadro N°4.6.
Resultados de la detección del gen heat labile enterotoxine (hle) de *Escherichia coli* (ETEC) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en las muestras en estado crudo

CÓDIGO	MERCADO	TIPO DE MUESTRA	RESULTADO DE LA PCR
SH1	Palermo		Positivo
SH2	Palermo	Salchicha de	Positivo
SH3	Lince	Huacho	Negativo
SH4	Lince		Negativo
CH1	Palermo	Chorizo	Positivo
CH2	Lince		Negativo
CH3	Callao		Negativo
R1	Palermo		Negativo
R2	Palermo	Relleno	Positivo
R3	Lince		Positivo
H1	Callao	Hamburguesa	Positivo
H2	Callao		Negativo

Fuente: Resultados obtenidos en la presente investigación.

En el siguiente gráfico se puede visualizar el número de casos positivos y negativos obtenidos como resultado de la detección del gen de la toxina termolábil de *Escherichia coli* (ETEC) en todas las muestras crudas, hallándose el gen hle en seis de las doce muestras.

Gráfico N°4.1:
Detección de casos positivos y negativos obtenidos en muestras crudas mediante la PCR.



Fuente: Resultados obtenidos en la presente investigación.

De manera análoga, se detectó el gen heat labile enterotoxin (hle) de *Escherichia coli* mediante la reacción en cadena de la polimerasa cualitativa PCR en salchicha de Huacho, relleno, chorizo y hamburguesas en estado cocido por freído. Los resultados se citan a continuación.

2011

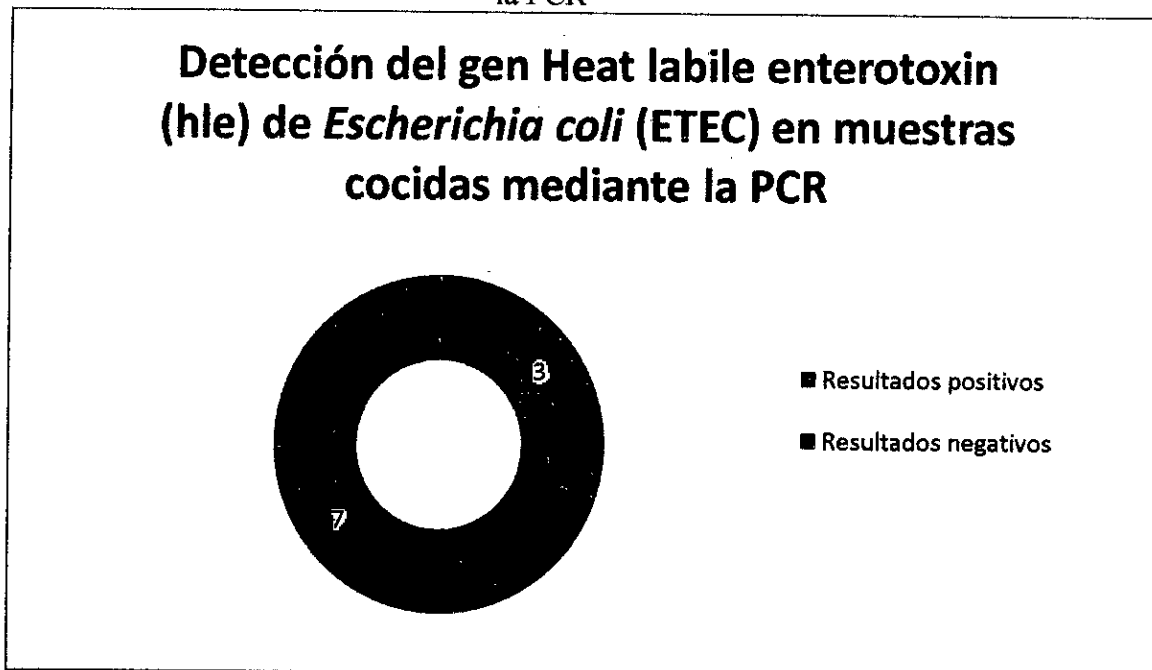
Cuadro N°4.7.
Resultados de la detección del gen heat labile enterotoxine (hle) de *Escherichia coli* (ETEC) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en las muestras en estado cocido

CÓDIGO	MERCADO	TIPO DE MUESTRA (COCIDAS POR FREÍDO)	RESULTADO DE LA PCR
SH5	Palermo	Salchicha de	Negativo
SH6	Lince	Huacho	Negativo
CH4	Callao		Negativo
CH5	Palermo	Chorizo	Positivo
CH6	Lince		Positivo
R5	Palermo	Relleno	Negativo
R6	Lince		Negativo
H5	Callao		Negativo
H6	Callao	Hamburguesa	Positivo
H7	Callao		Negativo

Fuente: Resultados obtenidos en la presente investigación.

En el siguiente gráfico podemos observar los casos positivos y negativos obtenidos al analizar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cualitativa, las muestras cocidas. Se halló el gen hle en tres de las diez muestras estudiadas.

Gráfico N°4.2:
Detección de casos positivos y negativos obtenidos en muestras cocidas mediante la PCR



Fuente: Resultados obtenidos en la presente investigación.

Por otro lado, podemos observar en el Cuadro N°4.8 la incidencia de los casos positivos y negativos resultado del análisis de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en cada tipo de las muestras crudas (salchicha de Huacho, chorizo, relleno, y hamburguesa).

De un total de 12 muestras crudas se obtuvo seis casos positivos en los que se halló el gen hle de ETEC, con una incidencia de (6/12), vale decir del 50%.

Cuadro N°4.8.

Incidencia de los casos positivos y negativos en la detección del heat labile enterotoxin (hle) de *Escherichia coli* (ETEC) en las muestras crudas

MUESTRA	CASOS POSITIVOS	PORCENTAJE	CASOS NEGATIVOS	PORCENTAJE
Salchicha de Huacho	$\frac{2}{4}$	50,0	$\frac{2}{4}$	50,0
Chorizo	$\frac{1}{3}$	33,34	$\frac{2}{3}$	66,66
Relleno	$\frac{2}{3}$	66,66	$\frac{1}{3}$	33,34
Hamburguesa	$\frac{1}{2}$	50,0	$\frac{1}{2}$	50,0

Fuente: Resultados obtenidos en la presente investigación.

También se evaluó la persistencia de la toxina termolábil (hle) de *Escherichia coli* (ETEC) en las muestras cocidas (salchicha de Huacho, chorizo, relleno y hamburguesas). Del total de muestras analizadas se observó que el gen hle de la *Escherichia coli* productora de la toxina termolábil estuvo presente en tres muestras de diez que se cocinaron mediante freído en aceite con una persistencia de (3/10) y que correspondió a un porcentaje de 30%.

Cuadro N°4.9.

Persistencia de los casos positivos y negativos en la detección del heat labile enterotoxin (hle) de *Escherichia coli* (ETEC) en las muestras cocidas

MUESTRA	RESULTADOS			
	POSITIVOS	PORCENTAJE	NEGATIVOS	PORCENTAJE
Salchicha de Huacho	$\frac{0}{2}$	0	$\frac{2}{2}$	100,0
Chorizo	$\frac{2}{3}$	66,66	$\frac{1}{3}$	33,34
Relleno	$\frac{0}{2}$	0	$\frac{2}{2}$	100,0
Hamburguesa	$\frac{1}{3}$	33,34	$\frac{2}{3}$	66,66

Fuente: Resultados obtenidos en la presente investigación.

En el siguiente Cuadro se puede observar los resultados positivos y negativos detectados en todas las muestras analizadas por tipo de producto alimenticio, en estado crudo y cocido.

Cuadro N°4.10.

Resultados positivos y negativos en la detección del heat labile enterotoxin (hle) de *Escherichia coli* (ETEC) por tipo de producto

MUESTRA	RESULTADOS			
	POSITIVOS	PORCENTAJE	NEGATIVOS	PORCENTAJE
Salchicha de Huacho	$\frac{2}{6}$	33,34	$\frac{4}{6}$	66,66
Chorizo	$\frac{3}{6}$	50,0	$\frac{3}{6}$	50,0
Relleno	$\frac{2}{5}$	40,0	$\frac{3}{5}$	60,0
Hamburguesa	$\frac{2}{5}$	40,0	$\frac{3}{5}$	60,0

Fuente: Resultados obtenidos en la presente investigación.

Seguidamente, en el siguiente Cuadro se presenta los resultados positivos y negativos detectados en todas las muestras analizadas por tipo de producto

(salchicha de Huacho, chorizo, relleno y hamburguesa) en estado crudo y cocido, por mercado de procedencia.

Cuadro N°4.11.

Resultados positivos y negativos en la detección del heat labile enterotoxin (hle) de *Escherichia coli* (ETEC) en productos crudos y cocidos, según el tamaño de muestra y mercado de procedencia

Muestra Total	Mercado	RESULTADOS							
		* (+)	%	* (-)	%	° (+)	%	° (-)	%
7	Callao	$\frac{1}{3}$	33,34	$\frac{2}{3}$	66,67	$\frac{1}{4}$	25,0	$\frac{3}{4}$	75,0
7	Lince	$\frac{1}{4}$	25,0	$\frac{3}{4}$	75	$\frac{1}{3}$	33,34	$\frac{2}{3}$	66,67
8	Palermo	$\frac{4}{5}$	80,0	$\frac{1}{5}$	20,0	$\frac{1}{3}$	33,34	$\frac{2}{3}$	66,67

Fuente: Resultados obtenidos en la presente investigación.

(*): Casos positivos y negativos en productos crudos.

(°): Casos positivos y negativos en productos cocidos.

También se obtuvo los porcentajes correspondientes a resultados positivos y negativos en la detección del gen hle en todas las muestras analizadas tanto crudas como cocidas según el tamaño de muestra por cada mercado de expendio.

Cuadro N°4.12.

Resultados positivos y negativos en la detección del heat labile enterotoxin (hle) de *Escherichia coli* (ETEC) según el mercado de procedencia

MERCADO	RESULTADOS				MUESTRA TOTAL
	POSITIVOS*	PORCENTAJE	NEGATIVOS°	PORCENTAJE	
Callao	$\frac{2}{7}$	28,57	$\frac{5}{7}$	71,42	7
Lince	$\frac{2}{7}$	28,57	$\frac{5}{7}$	71,42	7
Palermo	$\frac{5}{8}$	62,5	$\frac{3}{8}$	37,5	8

Fuente: Resultados obtenidos en la presente investigación.

(*): Resultados positivos en muestras crudas y cocidas.

(°): Resultados negativos en muestras crudas y cocidas.

Las muestras en estudio también fueron evaluadas en términos del contenido de nitratos presente en cada una de ellas. Los resultados analíticos se citan a continuación expresados en mg/L.

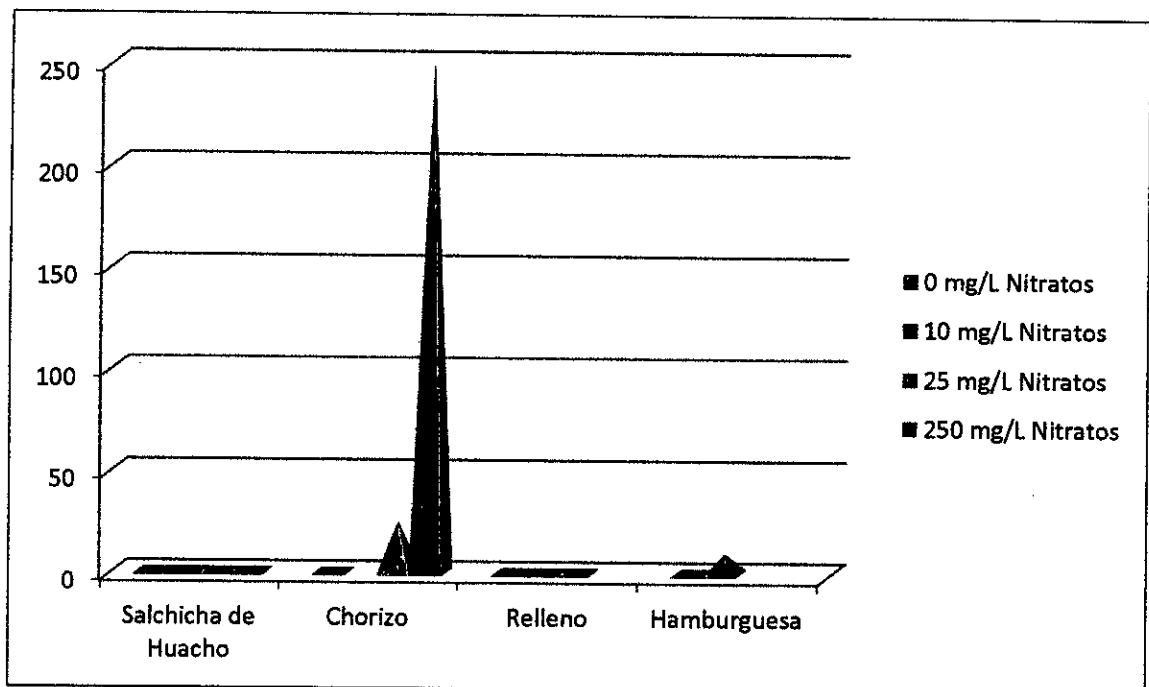
Cuadro N°4.13.
Resultados de la detección de nitratos (mg/L) en las muestras de salchicha de
Huacho, chorizo, relleno y hamburguesas en estado crudo

CÓDIGO	MERCADO	TIPO DE MUESTRA	RESULTADO NITRATOS (mg/L)
SH1	Palermo	Salchicha de Huacho	0
SH2			0
SH3			0
SH4			0
CH1	Palermo	Chorizo	0
CH2	Lince		250
CH3	Callao		25
R1	Palermo	Relleno	0
R2			0
R3			0
H1	Callao	Hamburguesa	<10
H2			0

Fuente: Resultados obtenidos en la presente investigación.

En el gráfico N°4.3 se expone el contenido de nitratos (mg/L) efectuado en las muestras crudas (salchicha de Huacho, relleno y hamburguesa) estudiadas.

Gráfico N°4.3:
 Detección de Nitratos (mg/L) en las muestras crudas de salchicha de Huacho, chorizo, relleno y hamburguesas



Fuente: Resultados obtenidos en la presente investigación.

Pero también se detectó la cantidad de nitratos expresados en mg/L en las muestras cocidas que formaron parte del estudio con los siguientes resultados.

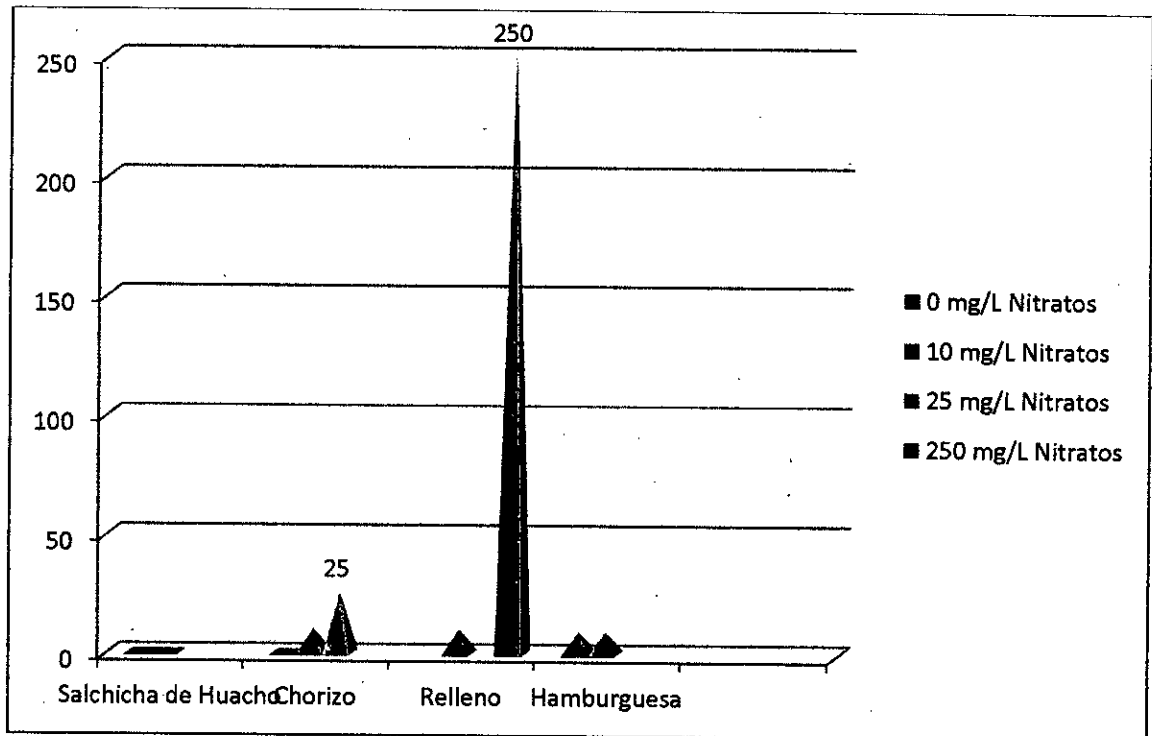
Cuadro N°4.14.
 Resultados de la detección de nitratos (mg/L) en las muestras de salchicha de Huacho, chorizo, relleno y hamburguesas en estado cocido por freído

Código	Mercado	Tipo de Muestra	Resultado Nitratos (mg/L)
SH5	Palermo	Salchicha de	0
SH6	Lince	Huacho	0
CH4	Callao		0
CH5	Palermo	Chorizo	10
CH6	Lince		25
R5	Palermo	Relleno	10
R6	Lince		250
H5	Callao		<10
H6	Callao	Hamburguesa	<10
H7	Callao		<10

Fuente: Resultados obtenidos en la presente investigación.

En el gráfico N°4.4 se puede observar los resultados obtenidos en la detección de nitratos en las muestras cocidas.

Gráfico N°4.4:
Detección de Nitratos (mg/L) en muestras de salchicha de Huacho, chorizo, relleno y hamburguesas cocidas



Fuente: Resultados obtenidos en la presente investigación.

Por otro lado, también se determinó en las muestras crudas de salchicha de Huacho, chorizo, relleno y hamburguesas, el contenido de nitritos con los siguientes resultados:

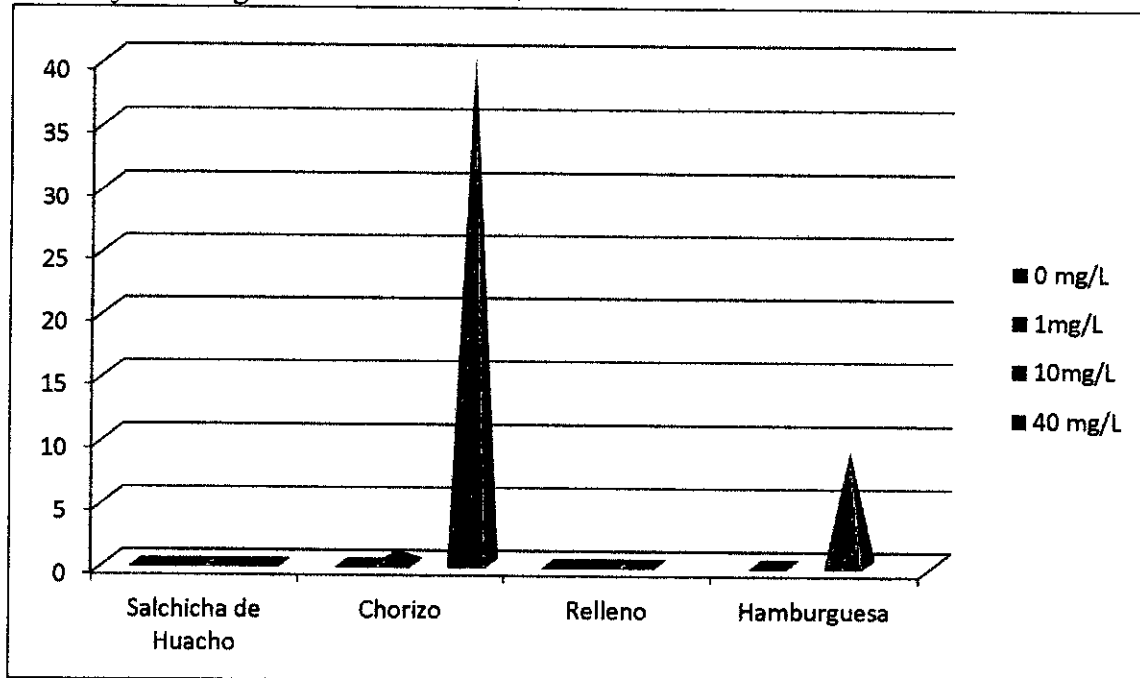
[Firma manuscrita]

Cuadro N°4.15.
Resultados de la detección de nitritos (mg/L) en las muestras de salchicha de Huacho, chorizo, relleno y hamburguesas en estado crudo

Código	Mercado	Tipo de Muestra	Resultado Nitritos (mg/L)
SH1	Palermo		0
SH2	Palermo	Salchicha de Huacho	0
SH3	Lince		0
SH4	Lince		0
CH1	Palermo		0
CH2	Lince	Chorizo	40
CH3	Callao		1
R1	Palermo		0
R2	Palermo	Relleno	0
R3	Lince		0
H1	Callao	Hamburguesa	<10
H2	Callao		0

En el siguiente gráfico se puede observar el contenido máximo de nitritos en las muestras analizadas.

Gráfico N°4.5:
Detección de Nitritos (mg/L) en muestras de salchicha de Huacho, chorizo, relleno y hamburguesas en estado crudo



Fuente: Resultados obtenidos en la presente investigación.

Con respecto a los contenidos de nitritos hallados en las muestras cocidas por freído, los resultados se citan en el siguiente cuadro.

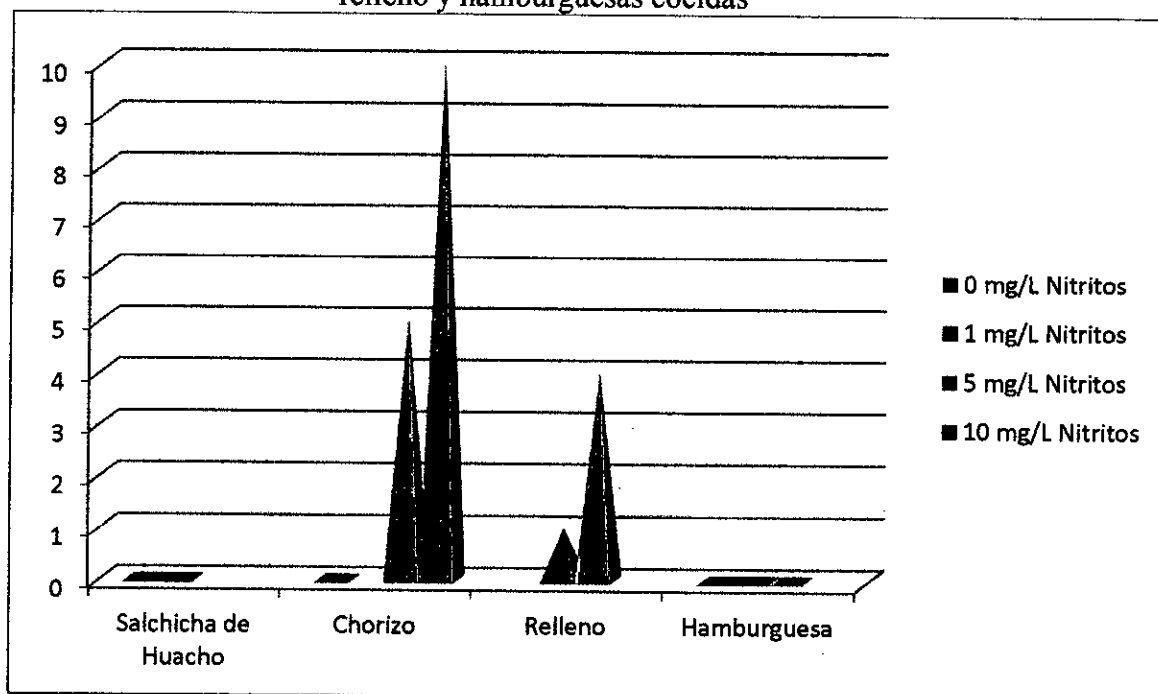
Cuadro N°4.16.
Resultados de la detección de nitritos (mg/L) en las muestras de salchicha de Huacho, chorizo, relleno y hamburguesas en estado cocido

Código	Mercado	Tipo de Muestra	Resultado Nitritos (mg/L)
SH5	Palermo	Salchicha de	0
SH6	Lince	Huacho	0
CH4	Callao		0
CH5	Palermo	Chorizo	5
CH6	Lince		10
R5	Palermo	Relleno	1
R6	Lince		<5
H5	Callao		0
H6	Callao	Hamburguesa	0
H7	Callao		0

Fuente: Resultados obtenidos en la presente investigación.

En el gráfico N°4.6. a continuación se puede observar los resultados del análisis de nitritos mg/L en todas las muestras investigadas.

Gráfico N°4.6:
Detección de Nitritos (mg/L) en muestras de salchicha de Huacho, chorizo, relleno y hamburguesas cocidas



Fuente: Resultados obtenidos en la presente investigación.

Finalmente los resultados positivos y negativos obtenidos en la presente investigación, en los cuatro tipos de alimentos preparados con carne y sangre, en la salchicha de Huacho, relleno, chorizo y hamburguesas, fueron analizados mediante el estadístico de X^2 .

a. Respecto a la independencia de los tipos de preparados artesanales (salchicha de Huacho, chorizo, relleno y hamburguesa) y el tipo de resultado positivo o negativo observado en la PCR cualitativa.

Hipótesis planteadas:

H_0 : el tipo de producto preparado artesanalmente con carne y /o sangre de ganado (salchicha de Huacho, chorizo, relleno y hamburguesa) es independiente del resultado positivo o negativo obtenido empleando la PCR cualitativa.

H_a : la hipótesis nula no es verdadera.

La probabilidad de los distintos niveles de cada variable respecto la población (22 unidades) fue:

$$P^*(A)=6/22 \quad P^*(B)=5/22 \quad P^*(C)=6/22 \quad P^*(D)=5/22$$

$$P^*(+)=9/22 \quad P^*(-)=13/22$$

Aceptando la independencia de los factores (producto preparado artesanalmente con carne y sangre, y el resultado positivo o negativo obtenido mediante la PCR), se estimaron como el producto de los estimadores de las probabilidades de cada uno de ellos.

En base a las probabilidades por el total de muestras $n=22$ se halló la frecuencia teórica o esperada e_{ij} , tal como se muestra en el siguiente cuadro:

Cuadro N°4.17.
Frecuencias esperadas de los tipos de preparados artesanales y el tipo de resultado positivo o negativo

RESULTADOS	SALCHICHA				TOTAL
	HUACHO (A)	RELLENO (B)	CHORIZO (C)	HAMBURGUESA (D)	
POSITIVO	2 (2,45)	2 (2,04)	3 (2,45)	2 (2,04)	9
NEGATIVO	4 (3,54)	3 (2,95)	3 (3,54)	3 (2,95)	13
TOTAL	6	5	6	5	22

Fuente: Resultados obtenidos en la presente investigación.

Entonces: para X^2 con $i=1$ hasta 4 y $j=1$ hasta 2, tendrá como resultado $X^2= 0,351$

Con $\alpha=0,01$ la región de rechazo que le correspondió a la prueba de X^2 con $(4-1) (2-1)=3$ grados de libertad fue 11,34.

Se puede decir que con 99% de confianza se pudo concluir que el tipo de preparado artesanal (salchicha de Huacho, chorizo, relleno y hamburguesa) influyó en el tipo de resultado positivo o negativo obtenido.

b. Respecto al mercado de expendio y el resultado positivo o negativo obtenido mediante la PCR cualitativa.

Hipótesis planteadas:

H_0 : los mercados donde se comercializó los productos artesanales con carne y /o sangre son independientes del resultado positivo o negativo obtenido mediante la PCR cualitativa.

H_a : la hipótesis nula no es verdadera.

Probabilidad de los distintos niveles de cada variable respecto a la población:

$$P^*(A)=8/22 \quad P^*(B)=7/22 \quad P^*(C)=7/22$$

$$P^*(+)=9/22 \quad P^*(-)=13/22$$

Admitiendo la independencia de los factores (mercado de expendio y resultado positivo o negativo obtenido), las probabilidades de los niveles cruzados se estimaron como el producto de los estimadores de las probabilidades de cada uno de ellos.

La frecuencia teórica o esperada e_{ij} , respecto al total de muestras es la siguiente:

Cuadro N°4.18.
Frecuencia esperada de tipo de mercado y resultado positivo o negativo
proveniente de cada mercado

RESULTADO	Palermo	Lince	Callao	TOTAL
POSITIVO	5 (3,27)	2 (2,86)	2 (2,86)	9
NEGATIVO	3 (4,72)	5 (4,13)	5 (4,13)	13
TOTAL	8	7	7	22

Fuente: Resultados obtenidos en la presente investigación.

Entonces: para X^2 con $i=1$ hasta 3 y $j=1$ hasta 2,

$$X^2 = 2,4203$$

Con $\alpha=0,01$ la región de rechazo que le correspondió a la prueba de X^2 con $(3-1)(2-1)=2$ grados de libertad fue 9,21.

Luego con un 99% de confianza se pudo concluir que el mercado de expendio no influyó en el tipo de resultado obtenido.

VII. DISCUSIÓN

Como paso previo a la discusión de resultados se puede indicar que se efectuó visitas a los tres mercados en los que se obtuvo las muestras en estudio, y se observó lo siguiente:

- ☛ Deficiencias en el mantenimiento de la limpieza de cada mercado (techo, pisos y paredes).
- ☛ Mobiliario constituido por mesones en regular estado.
- ☛ Falta de cámaras de refrigeración y de vitrinas de exhibición refrigeradas que almacene los productos durante las horas de venta al público en todos los mercados.
- ☛ Presencia de animales domésticos e insectos voladores y rastreros.
- ☛ Falta de información sobre el tiempo de vida de los productos artesanales.
- ☛ Falta de vigilancia por parte de inspectores autorizados en los mercados de abasto.
- ☛ Personal portando mandiles y gorros sucios que reciben el dinero en las manos y luego pesan y embolsan los productos (chorizo, relleno, hamburguesa y salchicha de Huacho), contaminando durante la manipulación.
- ☛ Como caso particular, la salchicha de Huacho y el relleno, no se expende en el mercado del Callao en forma cruda ni cocida en panes o empanadas.

Del Cuadro N°4.2. se puede decir que las muestras de salchicha de Huacho, ya sea cruda o cocida, se manipularon a medio ambiente, estando expuestas a insectos voladores y personas que toquen los productos, contaminándolos.

Los mercados de Palermo y Lobatón sí emplean cámaras de refrigeración en la venta de chorizo crudo (muestras CH1 y CH2). En cambio en el mercado del Callao las muestras crudas y los productos freídos carecieron de equipos de refrigeración para conservar dichos alimentos de manera adecuada (Cuadro N°4.3.).

Por otro lado el relleno se presenta a los consumidores a medio ambiente, no solo el producto cocido que se corta en tajadas y se fríe para luego llenar los



panes con dicho preparado, sino también el producto crudo. La muestra R3 adquirida tuvo una mosca posada sobre su superficie, lo que sin duda influyó en el resultado obtenido (Cuadro N°4.4.).

En cuanto a las hamburguesas crudas vendidas en el mercado del Callao, también fueron comercializadas a medio ambiente, mientras que las hamburguesas freídas en aceite la vendedora las colocó dentro de pan francés acompañadas de papas fritas al hilo, lechuga y mayonesa (Cuadro N°4.5.).

En base al Cuadro N°4.6. de un total de doce muestras crudas se detectó mediante la PCR cualitativa, seis resultados positivos en los cuales estuvo presente el gen de la toxina termolábil (hle) de *Escherichia coli* (ETEC).

Los resultados positivos estuvieron en los cuatro tipos de alimentos crudos en estudio, procedentes de los tres mercados, vale decir salchicha de Huacho (SH1, SH2 del mercado de Palermo), chorizo (CH1), relleno (R2, R3, del mercado de Lince y que tuvo una mosca posada sobre la superficie del producto) y hamburguesa (H1) del Callao. Reis et al., ya habían hallado en hamburguesas crudas la presencia de *Escherichia coli* ETEC⁴⁴.

En el Gráfico N°4.1 se pudo observar que el número de casos positivos fue igual al número de casos negativos, en éstos últimos no estuvo presente el gen de la toxina termolábil de *Escherichia coli* ETEC; correspondiendo a un porcentaje de 50%, (6/12).

Los resultados negativos, en las muestras en que no se detectó el gen de la toxina termolábil de *Escherichia coli* (ETEC), correspondieron a las muestras de salchicha de Huacho (SH3, SH4), chorizo (CH2, CH3), relleno (R1), y hamburguesa (H2), de los cuatro tipos de productos en estudio.

Por otro lado en el Cuadro N°4.7. se observó que efectuando la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cualitativa se detectó el gen de la toxina termolábil de *Escherichia coli* (ETEC) en tres muestras de los productos cocidos: de chorizo (CH5, del mercado de Palermo y CH6, del mercado de Lince) y una muestra de hamburguesa (H7, del mercado del Callao); de un

⁴⁴ REIS, M. VASCONCELOS, J. and TRABULSI, L. Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in some processed raw food from animal origin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39: 270-271, 1980.



total de diez muestras. Por tanto siete muestras presentaron resultado negativo, ya que no se halló en ellas el gen de la toxina termolábil (hle) de *Escherichia coli* (ETEC). En un estudio efectuado en 1.977 por Sack et al., lograron aislar de alimentos procesados unas 240 cepas de *Escherichia coli*, de las cuales fueron *Escherichia coli* enterotoxigénica aproximadamente unas 19 cepas, siendo las muestras tomadas, alimentos de origen animal⁴⁵, lo que deja claro que estos gérmenes pueden contaminar estos tipos de alimentos.

No se halló resultados positivos en muestras de salchicha de Huacho ni de relleno cocidas.

En el Gráfico N°4.2 se puede visualizar que el número de casos positivos disminuyó a tres respecto a las 10 muestras cocidas por freído 30%, (3/10); mientras que en muestras crudas se tuvo seis resultados positivos de un total de doce muestras investigadas. Esto posiblemente se deba a que el método de cocción fue por freído en aceite, que alcanza una temperatura superior a la cocción en agua caliente lo que elimina muy eficientemente los gérmenes.

Las muestras con resultado negativo fueron salchicha de Huacho (SH5 del mercado de Palermo, SH6 del mercado de Lince), chorizo (CH4 del mercado del Callao), relleno (R5 de Palermo, R6 de Lince), hamburguesa (H5, H7 del mercado del Callao). Todas las muestras analizadas de salchicha de Huacho y relleno tuvieron resultado negativo. En los tres mercados en los que se tomó las muestras se detectaron resultados negativos de la presencia de la toxina (hle).

En cuanto al porcentaje total de casos positivos (9) sobre el total de las muestras analizadas (22) mediante la PCR cualitativa, en las que se halló el gen (hle) de *Escherichia coli* ETEC fue de 40,90%, (9/22).

La incidencia de casos positivos en los que se halló el gen (hle) en las muestras crudas correspondió a 50%, (6/12).

La incidencia observada por producto fue para salchicha de Huacho (50%, 2/4), en el chorizo (33,34%, 1/3), de relleno (66,66%, 2/3) y de hamburguesa

⁴⁵ SACK, R. SACK, D. MEHLMAN, I. ORSKOV, F. and ORSKOV, I. Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from food. *J. Infect. Dis.*, 135:313-317, 1977.



(50%, 1/2). De ello se puede indicar que la mayor incidencia se observó en el relleno, seguido de las hamburguesas y salchicha de Huacho, y en menor porcentaje en las muestras de chorizo.

La persistencia de los casos positivos en las diez muestras cocidas por freído estudiadas fue de 30%, (3/10).

En las muestras de salchicha de Huacho y relleno vendidas en emparedados, no se detectó el gen de la toxina termolábil (hle) de ETEC. En las muestras de chorizo se halló una mayor persistencia 66,67%, (2/3) y en segundo lugar en las muestras de hamburguesa 33,34%, (1/3). Según Shuhong⁴⁶ et al. (2016) de 559 muestras provenientes de alimentos listos para consumir al por menor, muestreadas en 24 ciudades de China, se hallan 36 muestras con *Escherichia coli* ETEC; los investigadores determinan que los alimentos más contaminados son las pastas refrigeradas y carnes cocidas y de las 36 cepas de *Escherichia coli* ETEC, ocho expresan el gen de la toxina termolábil y doce ETEC tienen la capacidad genética de expresar la toxina termolábil (LT) y la termoestable (ST).

En el Cuadro N°4.10. se expone los resultados positivos en los que se halló el gen (hle) de ETEC por tipo de alimento y respecto al total de las muestras (crudas y cocidas por freído). En salchicha de Huacho (33,34%, 2/6), chorizo (50%, 3/6), relleno (40%, 2/5) y hamburguesa (40%, 2/5). Por tanto el preparado artesanal que tuvo mayor número de casos positivos fue el chorizo, de 3 casos positivos sobre un total de 6 muestras analizadas, y en menor porcentaje las muestras de relleno, hamburguesa y salchicha de Huacho. En la ciudad de Osaka⁴⁷ Japón, toman 32 befes de res, 28 de cerdo, 20 de ave de corral, 136 pescados, 66 frutas y vegetales y 51 muestras de alimentos listos para comer. Los investigadores hallaron *Escherichia coli* diarreogénica en un

⁴⁶ SHUHONG, Z. WU, Q. ZHANG, J. LAI, Z. and ZHU, X. Prevalence, genetic diversity, and antibiotic resistance of enterotoxigenic *Escherichia coli* in retail ready-to-eat foods in China. *Food control*, 68:236-243, 2016.

⁴⁷ WANG, L. NAKAMURA, H. KAGE-NAKADAI, E. HARA-KUDO, Y. and NISHIKAWA, Y. Prevalence, antimicrobial resistance and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from different retail foods. *Int. J. Food Microbiol*, 249: 44-52, 2017.

total de 82 cepas de un total de 64 muestras de alimentos. La mayor prevalencia de esta bacteria fue en aves de corral (100%, 20/20), seguida de cerdo (54%, 15/28), befe (28%, 9/32), frutas y vegetales (12%, 8/66), pescado (6,6%, 9/136), y alimentos listos para consumir (5,9%, 3/51). Del aislamiento de todas estas bacterias diarreogénicas, dos de estas cepas corresponden a *Escherichia coli* enterotoxigénica ETEC. En este trabajo se puede observar los valores altos de prevalencia de *Escherichia coli* diarreogénica por tipo de alimento, bastante elevadas como en el presente trabajo de investigación, pero referidas a *Escherichia coli* ETEC.

De acuerdo al mercado de expendio (Cuadro N°4.11.) se tuvo siete muestras procedentes del Callao, de las cuales dieron resultado positivo por presencia del gen (hle) de ETEC el 33,34%, (1/3) en muestras crudas y 25%, (1/4) en muestras cocidas por freído. De manera semejante del mercado de Lobatón en Lince se obtuvo 7 muestras, de las cuales dieron resultado positivo 25%, (1/4) de muestras crudas y 33,34%, (1/3) de muestras cocidas. Finalmente, de ocho muestras obtenidas en el mercado de Palermo, se halló resultados positivos para el gen (hle) de ETEC en 80%, (4/5) muestras crudas, mientras que en muestras cocidas por freído fue de 33,34%, (1/3). Por tanto el mayor porcentaje de muestras con resultado positivo obtenido mediante la PCR cualitativa fue en las muestras crudas provenientes del mercado de Palermo.

Al hacer una evaluación de los resultados positivos hallados en las muestras provenientes de cada mercado, pero agrupando las muestras crudas y cocidas por freído, analizadas mediante PCR cualitativa se tuvo que el porcentaje de casos positivos para (hle) ETEC en el mercado del Callao fue de (28,57%, 2/7), en el mercado de Lince de (28,57%, 2/7) y en el mercado de Palermo las muestras que dieron resultado positivo fue de (62,5%, 5/8).

Por tanto el mayor porcentaje de casos positivos demostrados por la PCR cualitativa, en los que estuvo el gen hle de *Escherichia coli* ETEC fue el mercado de Palermo en el distrito de la Victoria, y en menor porcentaje en los mercados de Lobatón en Lince y del Callao.

Analizando el contenido de nitratos, se halló que la muestra de chorizo crudo (CH2) del mercado de Lince tuvo 250mg/L de nitratos, valor superior al recomendado en el Reglamento sanitario de alimentos vigente de DIGESA (2011), que norma una cantidad no mayor a 100mg/kg, por el contrario las muestras CH3 y H1 contuvieron cantidades de nitratos de 25mg/L y <10mg/L. En las muestras de salchicha de Huacho y relleno no se detectó nitratos en ninguna de las muestras crudas analizadas así como en las muestras de chorizo CH1, hamburguesa H2 del mercado del Callao. En el Gráfico N°4.3 se puede observar la muestra CH2 con 250mg/L de nitratos, por encima de los valores recomendados.

En cuanto al contenido de nitratos en las muestras en estado cocido, se halló 250 mg/L de nitratos en la muestra de relleno (R6), valor muy superior a lo indicado en el reglamento de DIGESA, que como ya se ha indicado es de 100mg/kg de nitratos. En el Gráfico N°4.4 se puede observar la cantidad de nitratos que contuvieron las muestras de salchicha de Huacho, chorizo, relleno y hamburguesas en estado cocido.

En el Cuadro N°4.15. se puede observar que no se detectó nitritos en muestras de salchicha de Huacho y relleno crudos, así como en las muestras de chorizo (CH1) y hamburguesa (H2). Las muestras de chorizo (CH2) y hamburguesa (H1) contuvieron 40mg/L y 1 mg/L de nitritos, valores por debajo del valor máximo permitido que es de 50 mg/L según DIGESA⁴⁸.

En el Gráfico N°4.5 se pudo observar que todas las muestras contuvieron menos de 50mg/L de nitritos en las muestras crudas.

Con respecto a las muestras cocidas por freído no se detectó nitritos en todas las muestras de salchicha de Huacho, hamburguesas y chorizo. Las muestras de chorizo (CH5, CH6) y relleno (R5, R6) tuvieron contenidos menores de

⁴⁸ DIRECCIÓN GENERAL DE SALUD AMBIENTAL (DIGESA). Reglamento sanitario de Alimentos. Aditivos para embutidos. 2011. Disponible en: www.digesa.sld.pe/orientacion/comunicado_embutidos.pdf

56

nitritos respecto a lo normado por el reglamento sanitario de alimentos de DIGESA.

En el Gráfico N°4.6 se observa que los valores de nitritos de cada una de las muestras estudiadas cocidas por freído, cumplieron con lo especificado por el citado reglamento de alimentos.

El contenido de nitritos en todas las muestras crudas se tuvo valores menores a 50mg/L que es la cantidad máxima de nitritos permitida por el reglamento de DIGESA.

No se detectó nitritos en ninguna de las muestras de salchicha de Huacho ni de relleno como productos crudos.

Sólo las muestras CH2 y CH3 provenientes de los mercados de Lince y Callao contuvieron nitritos en una cantidad de 40mg/L y 1mg/L respectivamente.

En una de las muestras provenientes del mercado del Callao (H1) presentó menos de 10 mg/L de nitritos, por tanto todas las muestras crudas analizadas cumplieron con el reglamento de DIGESA, lo cual puede observarse en el Gráfico N°4.5.

En las muestras de salchicha de Huacho y de hamburguesas cocidas que se expenden en pan francés, no se halló nitritos.

Se detectó nitritos en las muestras de relleno (R5 y R6) en una cantidad de 1mg/L de nitritos y menos de 5 mg/L de nitritos; mientras que en las muestras de chorizo CH5 de Palermo se obtuvo 5 mg/L y en la muestra CH6 del mercado de Lince se detectó la cantidad de 10 mg/L.

Todas las muestras que contuvieron nitritos cumplieron con lo especificado en el reglamento de DIGESA como puede observarse en el Gráfico N°4.6, ya que contuvieron menos de 50mg/L de nitritos.

Finalmente, en el análisis estadístico⁴⁹ usando el estadístico de X^2 con un nivel de confianza de 99,8% concluyó que no hubo relación entre el tipo de preparado artesanal (salchicha de Huacho, chorizo, relleno y hamburguesa) versus tipo de resultado obtenido ya sea positivo o negativo, y entre los mercados donde se colectó las muestras versus el tipo de resultado obtenido con la PCR cualitativa.

⁴⁹ VELIZ, C. Estadística. Lima: Servicio Copias Gráficas S.A, 3° edición, 1998.

Conclusión:

De las 22 muestras estudiadas se determinó mediante PCR cualitativa, la presencia del gen hle de *Escherichia coli* enterotoxigénica en 9 muestras equivaliendo al 40,90% del total; siendo el producto artesanal con más resultados positivos el chorizo como muestra cruda o freída en aceite que se comercializa en emparedado y el mercado de Palermo en el distrito de la Victoria, como el mercado que aportó mayor número de muestras positivas para hle; por lo que se requiere implementar medidas de higiene y buenas prácticas de manufactura, a fin de proteger a los consumidores; ya que podría convertirse en un grave problema de salud pública especialmente en las estaciones con mayor temperatura ambiental en nuestro país.



XI. REFERENCIALES

- ALBERT, M. QADRI, F. WAHED, M. AHMED, T. RAHMAN, A. AHMED, F. BHUIYAN, N. ZAMAN, K. BAQUI, A. CLEMENS, J. and BLACK, R. **Supplementation with zinc but not vitamin A, improves seroconversion to vibriocidal antibody in children given an oral cholera vaccine.** *J. Infect. Dis*, 187:909-913, 2003.
- BEJARANO, E. BRAVO, M. HUAPAYA, C. HUAMAN, M. ROCA, A. y ROJAS, E. **Tabla de composición de alimentos industriales.** Ministerio de Salud. Lima: Instituto Nacional de Nutrición, 1993.
- BENDER, Arnold. **Diccionario de nutrición y tecnología de los alimentos.** Butterworth & Co. Zaragoza: Editorial Acribia; 1994, 341p.
- BLACK, R. MERSON, M. ROWE, B. TAYLOR, P. ABDUL, A. GROSS, R. and SOCK, D. **Enterotoxigenic Escherichia coli diarrhea acquired immunity and transmission in an endemic area.** *Bull W.H.O.*, 59: 236-238, 1981.
- BURDEN, E. **The toxicology of nitrates and nitrites with particular reference to the potability of water supplies.** *Analyst*, 86: 429-433, 1961.
- BUSTACAR, A. y DUVAN, F. **Elaboración de tres productos cárnicos: chorizo, longaniza y hamburguesa, con 100% de carne de babilla.** (Tesis de pregrado) Bogotá: Universidad de Salle, 2007.
- CHARLEY, Helen. **Tecnología de Alimentos.** México D.F.: Editorial LIMUSA, 1987.
- CHEFTEL, Jean-Claude et CHEFTEL, Henry. **Introduction a la Biochimie et a la Technologie des Aliments.** Volume I et II. Paris, France: Editorial Technique et Documentation, 1976, 736 p.
- DALLAS, W. and FALKOW, S. **The molecular nature of heat-labile enterotoxin (LT) of E coli.** *Nature*, 277:406-407, 1979.

- DIRECCIÓN GENERAL DE SALUD AMBIENTAL (DIGESA). **Reglamento sanitario de Alimentos**. Aditivos para embutidos. 2011. Disponible en: www.digesa.sld.pe/orientacion/comunicado_embutidos.pdf
- ECHEVARRIA, P. SERIWATANA, J. LEKSOMBOON, U. TIRAPAT, C. CHAICUMPA, W. and BOWE, B. **Identification by DNA hybridization of enterotoxigenic Escherichia coli in homes of children with diarrhea**. *Lancet*, 1: 63-66, 1984.
- FOX, J. **The chemistry of the meat pigments**. *J. Agr. Food Chem*, 14: 207-210, 1966.
- GAASTRA, W. and SVENNERHOLM, A. **Colonization factors of human enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC)**. *Trends Microbiol*, 4:444-452, 1996.
- GOEZ, M. VÁZQUEZ, M. y PENA, P. **Determinación y diferenciación de Escherichia coli y Coliformes totales usando un mismo sustrato cromogénico**. *Laboratorio Central Aquagest*. Galicia, Santiago de Compostela, España, (s/f).
- GOMES, T. ELIAS, W. SCALETSKY, I. GUTH, B. RODRIGUES, J. PIAZZA, R. FERREIRA, L. and MARTINEZ, M. **Diarrheagenic Escherichia coli**. *B.J.Microbiol*, 47:3-30, 2016.
- GOMES, T. VIEIRA, M. WACHSMUTH, I. BLAKE, P. and TRABULSIR, R. **Serotype-specific prevalence of Escherichia coli strains with EPEC adherence factor genes in infants with and without diarrhea in Sao Paulo, Brazil**. *J Infect Dis*, 160(1):131-135, 1989.
- GRUPO ANALIZA CALIDAD. **Escherichia coli en alimentos** [en línea].2016 [fecha de consulta: 30 de agosto 2017]. Disponible en: www.analizacalidad.com.
- INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIONES (Colombia). NTC 1325. Industria alimentaria. **Productos cárnicos procesados no enlatados**. 5º actualización. Bogotá: ICONTEC, 2008. 32 p.

- INSTITUTO NACIONAL DE CÁNCER, NIH. **Reacción en cadena de la polimerasa** [en línea]. 2018 [fecha de consulta: 16 de abril de 2018]. Disponible en : https://www.google.com.pe/search?source=hp&ei=-4LGW7uIJcid5wL1qJHwBA&q=definicion+de+reacci%C3%B3n+en+cadena+de+la+polimerasa&oq=definicion+de+reacci%C3%B3n+en+cadena+de+la+polimerasa&gs_l=psy-ab.3..0i22i30k1l5.7000.22687.0.23475.49.49.0.0.0.0.263.7647.0j42j2.44.0....0...1.1.64.psy-ab..5.44.7640...0j0i131k1.0.OINi3WzvKF0
- INSTITUTO NACIONAL DE LA COMPETITIVIDAD Y DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL (Perú). NTP 201.014:1999: **Carne y productos cárnicos**. Embutidos con tratamiento térmico antes de embutir o enmoldar.- Definiciones, clasificación y requisitos. Lima: INDECOPI, 1999. 15 p.
- JOHNSON, A. KAUSHIK, R. FRANCIS, D. FLECKENSTEIN, J. and HARDWIDGE, P. **Heat-Labile Enterotoxin Promotes Escherichia coli Adherence to Intestinal Epithelial Cells**. *J. Bacteriol.* January, 191(1): 178-186, 2009.
- KAPER, J.B. **Defining EPEC**. *Rev. Microbiol (Sao Paulo)*, 27: 130-133, 2010.
- KHAN ACADEMY. **Reacción en cadena de la polimerasa** [en línea]. 2016. [fecha de consulta: 12 de marzo de 2016]. Disponible en: <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr>
- LEVINE, M. NALIN, D. HOOVER, D. BERGQUIST, E. HORNICK, R. and YOUNG, C. **Immunity to enterotoxigenic Escherichia coli**. *Infect. Immun.* 23:729-736, 1979.
- LÜCK, Erich. **Conservación química de los alimentos**. Universidad Complutense de Madrid. Zaragoza, España: Editorial ACRIBIA, 1977, 243 p.

- MATHUR, R. REDDY, V. NAIDU, A. and KRISHNAMACHARI, K. **Nutritional status and diarrheal morbidity: a longitudinal study in rural Indian preschool children.** *Hum. Clin. Nutr*, 39:447-454, 1985.
- MATTILA, L. SIITONE, A. KYRONSEPPA, H. SIMULA, I. OKSANEN, P. STENVIK, P. and PELTOLA, H. **Seasonal variation in etiology of "travelers"diarrhea.** Finnish-Moroccan Study Group. *J. Infect. Dis*, 165:385-388, 1992.
- MEDINA, M. ESQUIVEL, P. LIFSCHITZ, V. MEDINA, M. LÖSCH, L. and MERINO, L. **Detección de Escherichia coli diarreogénicos en niños de barrios humildes de Corrientes, Argentina.** *Rev. Cubana Med. Trop*, 62(1):42-47, 2010.
- MOLINA, J. and ESLAVA, C. **Escherichia coli diarrogenica.** [En línea]. 2013, [fecha de consulta: 30 de diciembre 2016]. Disponible en: www.facmed.unam.mx
- NATARO, J.B. and KAPER, J.B. **Diarrheogenic Escherichia coli.** *Clin. Microbiol*, 11: 142-201, 1998.
- PARASHAR, U. UMESH, D. BRESEE, J.S. JOSEPH, S. GLASS, R.I. and ROGER, I. **The global burden of diarrheal disease in children.** *Bull WHO*, 81:236, 2003.
- PUERTA-GARCIA, A. y MATEOS, F. **Enterobacterias.** Unidad de Enfermedades Infecciosas. Servicio de Medicina Interna [en línea] 2010. Complejo Hospitalario Universitario de Albacete. [fecha de consulta: 30 de diciembre 2016]. España. Disponible en: www.fac.med.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf.Enterobacterias_Medicine2010.pdf.
- QADRI, F. SVENNERHOLM, A. FARUQUE, A. and BRADLEY, R. **Enterotoxigenic Escherichia coli in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention.** *Clin. Microbiol. Rev*, 18: 465-483, 2005.

- REIS, M. VASCONCELOS, J. and TRABULSI, L. **Prevalence of enterotoxigenic Escherichia coli in some processed raw food from animal origin.** *Appl. Environ. Microbiol*, 39: 270-271, 1980.
- SACK, R. SACK, D. MEHLMAN, I. ORSKOV, F. and ORSKOV, I. **Enterotoxigenic Escherichia coli isolated from food.** *J. Infect. Dis*, 135:313-317, 1977.
- SAMBROOK, J. and MANIATIS, T. **Isolation of high molecular weight DNA from mammalian cells:** Protocol I, II. *Molecular cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989, (9.16-9.20) p.
- SHUHONG, Z. WU, Q. ZHANG, J. LAI, Z. and ZHU, X. **Prevalence, genetic diversity, and antibiotic resistance of enterotoxigenic Escherichia coli in retail ready-to-eat foods in China.** *Food control*, 68:236-243, 2016.
- TOBIAS, J. and VUTURUKU, S-R. **Simple and rapid multiplex PCR for identification of the main human diarrheagenic Escherichia coli.** *J. Microbiol Res*, 167:564-570, 2012.
- VELIZ, C. **Estadística.** Lima: Servicio Copias Gráficas S.A, 3° edición, 1998.
- VON MENTZER, A. CONNOR, T. and WIELER, L. **Identification of enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) clades with long-term global distribution.** *Nat Genet*, 46:1321-1326, 2014.
- WANG, L. NAKAMURA, H. KAGE-NAKADAI, E. HARA-KUDO, Y. and NISHIKAWA, Y. **Prevalence, antimicrobial resistance and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis profiles of diarrheagenic Escherichia coli isolated from different retail foods.** *Int. J. Food Microbiol*, 249: 44-52, 2017.
- WANI, S. HUSSAIN, I. BEG, S. RATHER, M. KABLI, Z., Mir, M., and Nishikawa, N. (2013). **Diarrhoeagenic Escherichia coli and salmonellae in calves and lambs in Kashmir: absence, prevalence and antibiogram.** *Rev.Sci.Tech. Off.int.Epiz.* 32:833-840, 2013.

- WOLF, M. **Occurrence, distribution and association of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic Escherichia coli.** *Clin Microbiol Rev*, 10:569-584, 1997.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **New frontiers in the development of vaccines against enterotoxigenic (ETEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) Escherichia coli infections.** *Weekly Epidemiol. Rec*, 13:98-100, 2004.
- YAZYO. **Hamburguesa.** [en línea].2017 [fecha de consulta: 12 de marzo de 2016]. Disponible en: <https://www.Yazio.com>.



IX. APÉNDICE

A) Análisis estadístico de X^2 sobre independencia de los tipos de preparados artesanales vs tipo de resultado positivo o negativo obtenido mediante la PCR cualitativa

Se consideró en el estudio las hipótesis.

Ho: el tipo de producto preparado artesanalmente con carne y /o sangre de ganado es independiente al resultado positivo o negativo obtenido.

Ha: la hipótesis nula no es verdadera.

Se halló la Probabilidad de los distintos niveles de cada variable o factor en toda la población:

$$P^*(A)=6/22 \quad P^*(B)=5/22 \quad P^*(C)=6/22 \quad P^*(D)=5/22$$

$$P^*(+)=9/22 \quad P^*(-)=13/22$$

Si se admite la independencia de los factores (tipo de producto preparado artesanal y resultado obtenido), las probabilidades de los niveles cruzados se estimaron como el producto de los estimadores de las probabilidades de cada uno de ellos.

Multiplicando estas probabilidades por el total de muestras $n=22$ se halló la frecuencia teórica o esperada e_{ij} , tal como se muestra en el siguiente cuadro:

Cuadro N°17.
Frecuencias esperadas de los tipos de preparados artesanales y el tipo de resultado positivo o negativo

RESULTADOS	SALCHICHA HUACHO (A)	RELLENO (B)	CHORIZO (C)	HAMBURGUESA (D)	TOTAL
POSITIVO	2 (2,45)	2 (2,04)	3 (2,45)	2 (2,04)	9
NEGATIVO	4 (3,54)	3 (2,95)	3 (3,54)	3 (2,95)	13
TOTAL	6	5	6	5	22

Fuente: Resultados obtenidos en la presente investigación.

Entonces:

Para X^2 con $i=1$ hasta 4 y $j=1$ hasta 2, será:

$$X^2 = (2 - 2,45)^2/2,45 + (2 - 2,04)^2/2,04 + (3 - 2,45)^2/2,45 + (2 - 2,04)^2/2,04 \\ + (4 - 3,54)^2/3,54 + (3 - 2,95)^2/2,95 + (3 - 3,54)^2/3,54 + (3 - 2,95)^2/2,95 = 0,351$$

Con $\alpha=0,01$ la región de rechazo que le correspondió a la prueba de X^2 con $(4-1)(2-1)=3$ grados de libertad fue 11,34.

Luego con el valor hallado se pudo concluir que el tipo de preparado artesanal no influyó en el tipo de resultado obtenido.

B) Análisis estadístico de X^2 sobre independencia del mercado en el que se comercializó las muestras en estudio y el resultado positivo o negativo obtenido mediante la PCR:

Se formuló las siguientes hipótesis:

H_0 : el mercado donde se comercializó los productos artesanales con carne y /o sangre es independiente al resultado obtenido mediante la PCR.

H_a : la hipótesis nula no es verdadera.

Seguidamente se halló la probabilidad de los distintos niveles de cada variable o factor en toda la población:

$$P^*(A)=8/22 \quad P^*(B)=7/22 \quad P^*(C)=7/22$$

$$P^*(+)=9/22 \quad P^*(-)=13/22$$

Si se admite la independencia de los factores (mercado y resultado positivo o negativo obtenido), las probabilidades de los niveles cruzados se estimaron como el producto de los estimadores de las probabilidades de cada uno de ellos.

Multiplicando estas probabilidades por el total de muestras $n=22$ se halló la frecuencia teórica o esperada e_{ij} , tal como se muestra en el cuadro siguiente:

Cuadro N°18.
Frecuencia esperada de tipo de mercado y resultado positivo o negativo
proveniente de cada mercado

RESULTADO	Palermo	Lince	Callao	TOTAL
POSITIVO	5 (3,27)	2 (2,86)	2 (2,86)	9
NEGATIVO	3 (4,72)	5 (4,13)	5 (4,13)	13
TOTAL	8	7	7	22

Fuente: Resultados obtenidos en la presente investigación.

Entonces: para X^2 con $i=1$ hasta 3 y $j=1$ hasta 2, será:

$$X^2 = (5 - 3,27)^2/3,27 + (2 - 2,86)^2/2,86 + (2 - 2,86)^2/2,86 + (3 - 4,72)^2/4,72 \\ + (5 - 4,13)^2/4,13 + (5 - 4,13)^2/4,13 = 2,4203$$

Con $\alpha=0,01$ la región de rechazo que le correspondió a la prueba de X^2 con $(3-1)(2-1)=3$ grados de libertad fue 9,21.

Luego con el valor hallado se pudo concluir que el mercado no influyó en el tipo de resultado positivo o negativo hallado mediante la PCR cualitativa.

**X. ANEXOS:
MATRIZ DE CONSISTENCIA**

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPOTESIS	METODO	POBLACION												
<p>En qué medida la presencia de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC) productora de toxina termolábil (LT) es constituyente como un indicador de la falta de calidad de los preparados artesanales a base de carne y sangre que se expenden en los mercados?</p>	<p>OBJETIVO GENERAL: Determinar la presencia de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica, productora de la toxina termolábil (LT) en preparados artesanales a base de carne y sangre y que se comercializan en panes o como relleno de empanada.</p> <p>OBJETIVOS ESPECÍFICOS:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Detectar el gen heat labile enterotoxigen de <i>Escherichia coli</i> mediante la reacción en cadena de la polimerasa cualitativa PCR en salchicha de huacho, relleno, chorizo y hamburguesas en estado crudo. 2. Detectar el gen heat labile enterotoxigen de <i>Escherichia coli</i> mediante la reacción en cadena de la polimerasa cualitativa PCR en salchicha de huacho, relleno, chorizo y hamburguesas en estado cocido. 3. Determinar la incidencia del gen heat labile enterotoxigen de <i>Escherichia coli</i> en cada tipo de preparado artesanal de carne o sangre, en estado crudo. 4. Determinar la persistencia del gen heat labile enterotoxigen de <i>Escherichia coli</i> en cada tipo de preparado artesanal de carne o sangre, en estado cocido. 5. Cuantificar los nitratos y nitritos en cada tipo de preparado artesanal de carne o sangre, en estado crudo. 6. Cuantificar los nitratos y nitritos en cada tipo de preparado artesanal de carne o sangre, en estado cocido. 	<p>Hipótesis: la presencia de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC) que posee el gen productor de toxina termolábil (LT), hace evidente la falta de calidad sanitaria de los preparados artesanales a base de carne y sangre que se expenden en los mercados.</p> <p>Variable independiente: GEN HEAT LABILE ENTEROTOXIN DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROTOXIGENICA (LT).</p> <p>Variable dependiente: CALIDAD ARTESANALES A BASE DE CARNE Y SANGRE: SALCHICHA DE HUACHO, RELLENO, CHORIZO, Y HAMBURGUESAS. CANTIDAD DE NITRATOS Y NITRITOS.</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 30%;">Variable</th> <th style="width: 30%;">Dimensión</th> <th style="width: 40%;">Indicador</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">GEN HEAT LABILE ENTEROTOXIN DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROTOXIGENICA (LT)</td> <td style="text-align: center;">Detección del Gen heat labile enterotoxigen de 301 pb de <i>E. coli</i> mediante la reacción en cadena de la polimerasa cualitativa PCR</td> <td>Un resultado será considerado POSITIVO cuando el amplión evidencie un producto de amplificación expresado en pares de bases (pb) equivalente a los pb del control positivo de referencia. Un resultado será considerado NEGATIVO cuando el amplión NO evidencie banda de amplificación equivalente al número de bases del control positivo de referencia. En cada estudio electroforético se controlará un marcador de peso molecular conocido.</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">CALIDAD DE LOS PRODUCTOS ARTESANALES: SALCHICHA DE HUACHO, RELLENO, CHORIZO, Y HAMBURGUESA</td> <td style="text-align: center;">Norma sanitaria para prods cárnicos c. <i>E. coli</i></td> <td style="text-align: center;">Ausencia</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">Nitratos y nitritos</td> <td style="text-align: center;">Cantidad 50 mg/kg</td> </tr> </tbody> </table>	Variable	Dimensión	Indicador	GEN HEAT LABILE ENTEROTOXIN DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROTOXIGENICA (LT)	Detección del Gen heat labile enterotoxigen de 301 pb de <i>E. coli</i> mediante la reacción en cadena de la polimerasa cualitativa PCR	Un resultado será considerado POSITIVO cuando el amplión evidencie un producto de amplificación expresado en pares de bases (pb) equivalente a los pb del control positivo de referencia. Un resultado será considerado NEGATIVO cuando el amplión NO evidencie banda de amplificación equivalente al número de bases del control positivo de referencia. En cada estudio electroforético se controlará un marcador de peso molecular conocido.	CALIDAD DE LOS PRODUCTOS ARTESANALES: SALCHICHA DE HUACHO, RELLENO, CHORIZO, Y HAMBURGUESA	Norma sanitaria para prods cárnicos c. <i>E. coli</i>	Ausencia		Nitratos y nitritos	Cantidad 50 mg/kg	<p>7.1 El tipo y diseño de la investigación es experimental.</p> <p>METODO Se procederá con el estudio piloto para la estandarización de los procedimientos de PCR:</p> <p>Estudio piloto en dos controles comerciales positivos.</p> <p>Estudio piloto en dos muestras para estandarizar procedimientos.</p> <p>Extracción de ADN.</p> <p>Electroforesis</p> <p>Análisis con transiluminador.</p> <p>Análisis de nitratos y nitritos.</p> <p>7.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.</p> <p>a) Tabla de resultados para el análisis de las muestras crudas, que incluya los códigos de cada una, procedencia y resultado positivo y/o negativo.</p> <p>b) Tabla de resultados para el análisis de las muestras cocidas, que incluya los códigos de cada una, procedencia y resultado positivo y/o negativo.</p> <p>c) Tabla de incidencia de <i>E. coli</i> ETEC (LT) en muestras crudas.</p> <p>d) Tabla de persistencia de <i>E. coli</i> ETEC (LT) en muestras cocidas.</p> <p>e) Tabla de contenido de nitratos y nitritos en c/ tipo de prep. artesanal crudo.</p> <p>f) Tabla de contenido de nitratos y nitritos en c/ tipo cocido.</p> <p>7.5. Análisis estadístico, mediante X².</p>	<p>7.2. Población. En los dos distritos de Lima en los que se tomará las muestras se observa aproximadamente 10 kilos de salchicha de huacho y de relleno que se ofrecen diariamente en cada puesto de comercio, cantidad que se repone de acuerdo a la venta. En cuanto a los chorizos y hamburguesas, estos pueden apreciarse en una cantidad visible de aproximadamente 4 kilos.</p> <p>7.3. Muestra. Se estudiarán 20 muestras biológicas correspondientes a los productos artesanales a base de carne, tanto crudos como cocidos, a la venta. Las muestras serán colectadas en los mercados de expendio de los productos en estudio, de dos distritos de Lima, en los que se observe inadecuada manipulación sin control sanitario. Cada muestra será manipulada con guantes y trasladada al laboratorio dentro de las medidas de bioseguridad en recipientes estériles y refrigerados que son cerrados herméticamente, para iniciar el estudio molecular. En los productos crudos se tomará muestras de 100 gramos cada una, mientras que en los productos cocidos, serán unidades completas tal como se comercializan.</p>
Variable	Dimensión	Indicador														
GEN HEAT LABILE ENTEROTOXIN DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROTOXIGENICA (LT)	Detección del Gen heat labile enterotoxigen de 301 pb de <i>E. coli</i> mediante la reacción en cadena de la polimerasa cualitativa PCR	Un resultado será considerado POSITIVO cuando el amplión evidencie un producto de amplificación expresado en pares de bases (pb) equivalente a los pb del control positivo de referencia. Un resultado será considerado NEGATIVO cuando el amplión NO evidencie banda de amplificación equivalente al número de bases del control positivo de referencia. En cada estudio electroforético se controlará un marcador de peso molecular conocido.														
CALIDAD DE LOS PRODUCTOS ARTESANALES: SALCHICHA DE HUACHO, RELLENO, CHORIZO, Y HAMBURGUESA	Norma sanitaria para prods cárnicos c. <i>E. coli</i>	Ausencia														
	Nitratos y nitritos	Cantidad 50 mg/kg														