

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA



**“IDENTIFICACIÓN DE LOS SITIOS DE CONTAMINACIÓN EN LA CADENA
DE PRODUCCIÓN DE TOMATE Y CHILE JALAPEÑO MEDIANTE LA
DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS INDICADORES DE
CONTAMINACIÓN FECAL Y ENTEROPATÓGENOS”**

POR:

QFB. RAFAEL GARCÍA LÓPEZ

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA.**

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N. L.

OCTUBRE DE 2013

**“IDENTIFICACIÓN DE LOS SITIOS DE CONTAMINACIÓN EN LA CADENA
DE PRODUCCIÓN DE TOMATE Y CHILE JALAPEÑO MEDIANTE LA
DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS INDICADORES DE
CONTAMINACIÓN FECAL Y ENTEROPATÓGENOS”**

Presidente:
Dra. Norma Laura Heredia Rojas

Secretario:
Dra. Luisa Yolanda Solís Soto

Primer vocal:
Dr. José Santos García Alvarado

Segundo vocal:
Dr. Juan León

Tercer vocal:
Dr. Carlos Hernández Luna

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos bajo la dirección de la Dra. Norma Heredia, la co-dirección del Dr. Santos García y la asesoría de la Dra. Luisa Solís.

Esta investigación fue financiada por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos.

DEDICATORIA

Para toda mi familia que en todo momento me brindaron su gran apoyo, en especial a mis padrinos Guilibaldo e Hilda, que siempre me han dado la mano y no me han dejado solo en ningún momento.

A mis primas y primos, que son mis grandes amigos, Lizeth, Nancy, Magaly, Efrain, Joche, ustedes pusieron la parte divertida en esta estancia.

A mi padre, Noe Garcia, y a mi pequeña hermana Katia, que siempre creyeron en mí.

A toda la familia Castañeda Lopez y Salinas Morales, que ambas son mi segunda familia.

A mis abuelos, que siempre estuvieron apoyándome y dándome consejos de vida. Creían que no les alcanzaba la vida para llegar a verme en este punto, ya vieron que si lo lograron.

A mis queridos tios Cony y Fernando, que se preocuparon por ver como iba en esta etapa.

Finalmente, a mi madre, que siempre me acompaña y esta presente en todo mi camino, no me acompañas físicamente pero siempre te llevo en mi corazón con el mas grande amor. Este logro es totalmente para ti.

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Norma Heredia y al Doctor Santos García por abrirme un lugar en su laboratorio y permitirme trabajar bajo su asesoría y con todo su apoyo.

A la Doctora Luisa Solís por otorgarme su invaluable tiempo y consejos siempre que fue necesario, además por las miles de cosas que pude aprender de ella.

En general a todo el grupo de personas que forman parte del laboratorio, Fabiola, Nere, Aldo, Roberto, Alma, Cindy, Fernando, Rosy, Andrea, Verdaguer, Joel, Mayra, David, quienes tuvieron aportación para poder llevar a cabo el trabajo necesario, sin su ayuda todo hubiera sido más difícil.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
LISTA DE TABLAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE SÍMBOLOS Y NOMENCLATURA.....	xi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	5
III. HIPÓTESIS.....	7
IV. OBJETIVOS.....	8
4. 1. OBJETIVO GENERAL.....	8
4. 2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	8
V. ANTECEDENTES.....	9
5. 1. Enfermedades Transmitidas por Alimentos.....	9
5. 2. Enfermedades transmitidas por los alimentos y su relación con frutas y hortalizas.....	11
5. 3. Brotes por agua.....	12
5. 4. Contaminación por suelo.....	13
5. 5. Etapas de la producción de vegetales.....	15
5. 5. 1. Pre-cosecha.....	15
5. 5. 2. Irrigación.....	15
5. 5. 3. Cosecha.....	15
5. 5. 4. Post-cosecha.....	16
5. 6. Microorganismos Indicadores.....	17
5. 6. 1 <i>Enterococcus</i> spp.....	18
5. 6. 2. Coliformes.....	18
5. 7. Microorganismos patógenos.....	19

5. 7. 1. <i>Salmonella</i>	19
5. 7. 2. <i>Escherichia coli</i>	20
5. 7. 3 <i>Listeria monocytogenes</i>	29
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	32
6. 1. Lugar de estudio.....	32
6. 2. Obtención de muestras	33
6. 3. Cadena	33
6. 4. Muestras compuestas	33
6. 5. Producto	34
6. 6. Suelo	34
6. 7. Agua.....	35
6. 8. Enjuague de manos de los manipuladores	35
6. 9. Análisis de las muestras	36
6. 9. 1. Determinación de organismos indicadores	36
6. 9. 2. Determinación de patógenos	38
6. 10. Confirmación de cepas presuntivas para <i>Salmonella</i> , <i>E. coli</i> O157:H7, STEC y <i>L. monocytogenes</i> mediante PCR.....	39
6. 11. Cepas de referencia.....	40
6. 12. Extracción de DNA.....	40
6. 13. Condiciones de amplificación.....	41
6. 14. Visualización	41
VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	42
VIII. RESULTADOS	43
8. 1. Muestras de la cadena de producción de chile jalapeño.	44
8. 1. 1. <i>Enterococcus</i> spp.....	44
8. 1. 2. <i>E. coli</i>	46
8. 1. 3. Coliformes fecales.....	48
8. 2. Niveles de microorganismos en la cadena de producción de tomate huaje.....	50
8. 2. 1. <i>Enterococcus</i> spp.....	50
8. 2. 2. <i>E. coli</i>	52
8. 2. 3. Coliformes fecales.....	54

8. 3. PATÓGENOS.....	56
8. 3. 1. <i>Escherichia coli</i>	56
8. 3. 2. <i>Salmonella</i>	57
8. 3. 3. <i>Listeria monocytogenes</i>	57
IX. DISCUSIÓN.....	58
9. 1. Microorganismos indicadores.....	58
9. 2. Determinación de patógenos.....	62
X. CONCLUSIÓN	66
XI. LITERATURA CITADA.....	67
XII. RESUMEN AUTOBIOGRAFICO.....	78

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Brotes relacionados a vegetales frescos de 2005 a 2011	14
Tabla 2. Factores de virulencia de <i>E. coli</i> productora de toxina Shiga (STEC).....	24
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de diversas bacterias patógenas mediante la técnica de PCR.....	40
Tabla 4. Numero de muestras compuestas correspondientes a cada tipo de muestra.	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Región de Cadereyta Jiménez representada dentro del estado de Nuevo León.....	32
Figura 2. Diagrama de la cadena de producción de chile jalapeño y tomate huaje.....	34
Figura 3. Concentración de <i>Enterococcus</i> spp. en los diferentes tipos de muestras en la cadena de producción de chile jalapeño.....	45
Figura 4. Concentración de <i>E. coli</i> en los diferentes tipos de muestras de la cadena de producción de chile jalapeño.....	47
Figura 5. Concentración de coliformes fecales en los diferentes tipos de muestras de la cadena de producción de chile jalapeño.....	49
Figura 6. Concentración de <i>Enterococcus</i> spp. en los diferentes tipos de muestras de la cadena de producción de tomate huaje.....	51
Figura 7. Concentración de <i>E. coli</i> en los diferentes tipos de muestras de la cadena de producción de tomate huaje.....	53
Figura 8. Concentración de coliformes fecales en los diferentes tipos de muestras en la cadena de producción de tomate huaje.....	55

LISTA DE SÍMBOLOS Y NOMENCLATURA

\$	Pesos
%	Porcentaje
>	Mayor que
<	Menor que
=	Igual que
°	Grados
°C	Grados Celsius
µg/ml	Microgramos por mililitro
µl	Microlitros
µmol/l	Micromol por litro
cm	Centímetros
dm	Decímetros
g	Gramos
gl	Grados de libertad
ha	Hectáreas
l	Litros
-	Menos
ml	Mililitros
mmol/l	Milimol por litro

msnm	Metros sobre el nivel del mar
N	Normal
NaCl	Cloruro de sodio
pH	Potencial de Hidrógeno
Ton	Toneladas
UFC/g	Unidades Formadoras de Colonias por gramo
UFC/ml	Unidades Formadoras de Colonias por mililitro
UV	Ultravioleta
V	Voltios
ETAs	Enfermedades Transmitidas por Alimentos
CDC	Center for Disease Control and Prevention

RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por alimentos se originan por la ingesta de alimentos contaminados con microorganismos tales como virus, parásitos, mohos y/o bacterias en cantidades suficientes para afectar la salud del consumidor. Los síntomas más comunes incluyen diarrea y vómito. Una serie de brotes han sido relacionados con una variedad de patógenos en frutos frescos y vegetales. Posibles puntos de contaminación se han identificado durante su cadena de producción, incluyendo contaminación durante la producción y cultivo, procesamiento, empaque y distribución. La producción de chile representa el cultivo de hortaliza más importante para Nuevo León, donde el municipio de Cadereyta Jiménez es el que tiene mayor superficie de siembra de hortalizas. En México, el tomate es la segunda hortaliza en importancia después del chile, este ha ocupado 80 mil hectáreas con una producción de 19 millones de toneladas (1991-2000). Resulta de suma importancia recabar datos sobre la incidencia de microorganismos indicadores y/o patógenos en la cadena de producción de chile jalapeño y tomate, así como buscar e identificar los puntos críticos de contaminación para posteriormente poder implementar medidas preventivas y/o correctivas que ayuden a controlar o erradicar la contaminación. En este trabajo se analizaron un total de 117 muestras compuestas, que correspondieron a 341 muestras colectadas en las diferentes etapas de producción de chile jalapeño y tomate huaje. Las muestras provenientes de estas cadenas de producción presentaron cuentas para *Enterococcus* spp. en un rango de 0.3 a 6.8 log UFC/muestra, las muestras de enjuagues de manos fueron las más contaminadas con rangos de 3.7 hasta 9.9 log UFC/mano. Solo se encontró *E. coli* en 16 muestras, estando en rangos de 0.5 a 1.6 log UFC/muestra, los valores más altos fueron en las muestras de manos en la cosecha y manos en la distribución para ambos productos con cuentas de 1.6 y 1.4 log UFC/muestra. Las cuentas de coliformes fecales tuvieron rangos de 0.9 a 7.5 log UFC/muestra. En conclusión, para las muestras colectadas en la cadena de producción de chile jalapeño, los valores medios más elevados se encontraron en muestras de manos tanto en cosecha como en distribución (7.1 y 7.2 log UFC/mano respectivamente). En la cadena de producción de tomate huaje, los valores más elevados correspondieron a las muestras colectadas de manos durante la cosecha (7.5 log UFC/mano) y en el producto tanto durante la precosecha, en la cosecha y durante la distribución con valores de 7.1, 6.9 y 6.9 log UFC/chile respectivamente. No se logró detectar la presencia de microorganismos enteropatógenos como *E. coli* productoras de toxina Shiga (STEC), *Salmonella* spp., ni *Listeria monocytogenes*.

ABSTRACT

Foodborne illnesses are caused by the consumption of food contaminated with microorganisms such as viruses, parasites, molds and/or bacteria in sufficient quantities to affect the consumer health. The most common symptoms include diarrhea and vomit, although abdominal pain, headache, and fever, among others, may be present. A series of outbreaks have been linked to a variety of pathogens in fresh fruits and vegetables. Several potential points of contamination have been identified during the production chain, including contamination during production and growing, processing, packaging and distribution. The production of jalapeño pepper represents the most important vegetable crop for Nuevo Leon; in fact, the municipality of Cadereyta Jimenez is actually the one with largest area of vegetable planting. In Mexico, tomato is the second most important crop after pepper; on average, its planting area has occupied 80 hectares with a production of 19 million tons (1991-2000). Therefore it is extremely important to collect data on the incidence of indicator organisms and/or pathogens in the production chain of huaje tomato and jalapeño pepper, as well as to seek and identify contamination hotspots to subsequently implement corrective and preventive measures to help control or eradicate contamination to reduce the risk of illness due to consumption. In this case, a total of 177 composite samples were analyzed, corresponding to 341 samples collected in all the different production stages of jalapeño pepper and huaje tomato. Samples from these production chains presented accounts for *Enterococcus* spp. between 0.3 to 6.8 log CFU/sample; the handwashing samples were the most contaminated with values of 3.7 to 9.9 log CFU/hand. *E. coli* was found in only 16 samples, with a range of 0.5 to 1.6 log CFU/sample; the highest ranges were found in the samples of the stages of harvesting and distribution, both of them with accounts of 1.6 and 1.4 log CFU/sample. Fecal coliform accounts ranges were 0.9 to 7.5 log CFU/sample. In conclusion: in the samples collected in the production chain of jalapeño pepper, the average highest values were found in both harvest and distribution handwashing samples (7.1 and 7.2 log CFU/hand respectively). In the production chain of huaje tomato, the highest values were found in the handwashing samples of the harvest phase (7.5 log UFC/hand). And in the product itself the highest values were found in the pre-harvest, harvest and distribution stages with values 7.1, 6.9 and 6.9 log CFU/jalapeño pepper, respectively. Bacteria such as Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), *Salmonella* spp. or *Listeria monocytogenes* were not detected.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) resultan de la ingestión de alimentos o agua contaminada con microorganismos patógenos y/o sus productos tóxicos. Son llamadas así porque el alimento actúa como vehículo de transmisión de organismos dañinos y/o sustancias tóxicas. Se ha denominado brote cuando dos o más personas sufren una enfermedad similar después de ingerir un mismo alimento y los análisis epidemiológicos señalan al mismo alimento como el origen de la enfermedad.

Desde el punto de vista sanitario, los alimentos pueden ser vehículos de infecciones (ingestión de microorganismos patógenos) o intoxicaciones (ingestión de toxinas producidas por microorganismos) graves. Muchas veces la causa de la contaminación del alimento se debe a medidas higiénicas inadecuadas en su producción, preparación y/o conservación; lo que facilita la presencia y el desarrollo de microorganismos que, producto de su actividad y haciendo uso de las sustancias nutritivas presentes en éste, lo transforman volviéndolo inaceptable para la salud humana.

Para garantizar la inocuidad del alimento, se requiere el establecimiento de controles para evitar la contaminación o desarrollo de microorganismos patógenos y/o toxinas. Los microorganismos indicadores son comúnmente utilizados como indicadores de contaminación fecal en agua y alimentos, estos microorganismos tienen la ventaja de que su detección puede resultar adecuada desde un enfoque de prevención de riesgos, indicando un manejo inadecuado o presencia de contaminación, que puede ser potencialmente nociva. Además, que su determinación puede resultar más sencilla, rápida y económica, pudiendo brindar información higiénico-sanitaria del producto de manera oportuna.

Dado que la producción de chile jalapeño y tomate en la región de Cadereyta Jiménez, Nuevo León, es significativa para la economía en dicho estado, se consideró importante un estudio que permitiera identificar las posibles fuentes de contaminación de estos alimentos durante su producción ayudando así a lograr minimizar riesgos a los posibles consumidores finales que pudieran llegar a representar estos alimentos al estar contaminados.

La importancia de este estudio radica en la necesidad de conocer algunos de los riesgos de contaminación que pudieran encontrarse en la cadena de producción de alimentos como el

chile jalapeño y el tomate, además, de las consecuencias que podrían tener en caso de llegar a encontrarse contaminados.

Por lo anterior, en el presente trabajo se determinaron los principales puntos de contaminación en la cadena de producción de chile jalapeño y tomate en la región de Cadereyta Jiménez, Nuevo León, determinando también la presencia de microorganismos patógenos e indicadores en las diferentes etapas de su producción, tales como: la precosecha, la cosecha, la distribución y el empaque.

II. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.

El riesgo de contaminación en los alimentos hace necesario el control de microorganismos en los mismos, de modo que determinar el tipo de organismos presentes y su concentración son herramientas indispensables para mejorar la calidad del producto y la toma de decisiones en relación a su control y tratamiento.

Una creciente proporción de brotes asociados al consumo de vegetales se ha reportado en los últimos años (Tauxe, R, *et al.*, 1997). Algunas investigaciones realizadas por el el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en Inglés) en Atlanta, GA, EUA, se han asociado con diversos patógenos en frutos frescos y vegetales cosechados en los Estados Unidos y otros países, incluyendo México. En algunos de estos brotes, los puntos de contaminación identificados incluyeron contaminación durante la producción y cultivo, procesamiento, empaque o bien durante su distribución (Rushing, JW, *et al.*, 1996).

Los cultivos hortícolas que se siembran en nuestro país son diversos; sin embargo, los cultivos de tomate y de chile jalapeño representan las hortalizas más importantes cultivadas en el estado de Nuevo León, y dentro de este, el municipio de Cadereyta Jiménez es el que tiene mayor superficie de siembra (<http://www.agronuevoleon.gob.mx/oeidrus/censohortalizas>).

Cabe mencionar que las hortalizas de Cadereyta Jiménez, Nuevo León, tienen significado a nivel nacional, ya que el cultivo de chile jalapeño y tomate son las dos actividades más preponderantes de la zona. Por ejemplo, en el 2006 se determinó que se sembraron aproximadamente 880 hectáreas de chile jalapeño (<http://www.oeidrus-nl.gob.mx/oeidrus/index.php>).

Hoy en día aunque se cuenta con diferentes métodos y equipo que pueden facilitar la identificación de riesgos y zonas contaminadas con microorganismos enteropatógenos, no hay estudios que nos indiquen los niveles de microorganismos presentes ni los puntos

críticos en la cadena de producción de estas hortalizas. Este conocimiento sin duda proporcionará la información necesaria para llevar a cabo medidas correctivas y/o preventivas en caso de identificarse posibles productos comestibles que se encuentren contaminados con microorganismos enteropatógenos.

Debido a lo anterior, es necesario recabar datos epidemiológicos sobre la incidencia de microorganismos indicadores y patógenos en la cadena de producción de chile jalapeño y tomate de la región de Cadereyta Jiménez, Nuevo León, así como buscar e identificar los puntos críticos de contaminación para así implementar medidas correctivas que ayuden a controlar o erradiquen dicha contaminación, reduciendo el riesgo de enfermarse debido a su consumo y asegurando con ello una mejor calidad de estos productos.

III. HIPÓTESIS

Algunos puntos en la cadena de producción del chile jalapeño y tomate huaje de la región de Cadereyta Jiménez, Nuevo León, presentan altos números de microorganismos indicadores de contaminación fecal así como la presencia de microorganismos enteropatógenos.

IV. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles de microorganismos indicadores de contaminación fecal y la presencia de enteropatógenos (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* y *E. coli* STEC) en la cadena de producción de chile jalapeño y tomate huaje que se cultiva a cielo abierto en la región de Cadereyta Jiménez, Nuevo León.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar los niveles de microorganismos indicadores de contaminación y la presencia de microorganismos patógenos como *Salmonella* spp, *E. coli* STEC y *L. monocytogenes* que se encuentran en suelo, producto, manos de los manipuladores, agua de irrigación y de fuente, durante los diferentes niveles la producción de chile jalapeño y tomate huaje.
- Establecer las relaciones entre la presencia y concentración de microorganismos indicadores de contaminación fecal con enteropatógenos en las cadenas de producción de chile jalapeño y tomate cultivados en Cadereyta Jiménez, Nuevo León.
- Determinar los puntos de la cadena de producción que son más susceptibles de contaminación y que pueden afectar la calidad del chile jalapeño y tomate huaje que se producen en la región de Cadereyta Jiménez, Nuevo León.

V. ANTECEDENTES

5. 1. Enfermedades Transmitidas por Alimentos

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son aquellas que se originan por la ingesta de alimentos contaminados con microorganismos tales como virus, parásitos, mohos y/o bacterias, así como sus toxinas en cantidades suficientes para afectar la salud del consumidor. Estas enfermedades, usualmente, derivan de la ingestión del patógeno, seguida su proliferación e incluso en ocasiones invasión de los tejidos, liberación de toxinas, o ambos (Prescott, *et al.*, 2004). Los síntomas más comunes en el humano incluyen diarrea y vómito, aunque también se pueden manifestar con dolor abdominal, cefalea y fiebre, entre otros. Entre las bacterias comúnmente reconocidas como causantes de ETAs en México y el mundo, se encuentran bacterias como *Campylobacter jejuni/coli*, *Salmonella* spp, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, así como algunos serotipos de la enterobacteria *Escherichia coli*, principalmente el O157:H7 (Blackburn *et al.*, 2002).

Aunque muchas infecciones son autolimitadas, un curso más grave que incluye deshidratación severa, perforación gastrointestinal y septicemia, se puede presentar en algunos pacientes. También se han descrito otras complicaciones extraintestinales además de la septicemia, tales como endocarditis, neumonía, meningitis y abscesos. El síndrome urémico hemolítico (HUS por sus siglas en inglés), que es la causa más común de falla renal en lactantes, ha sido particularmente asociado con la infección por *E. coli* productora de la toxina Shiga (STEC) (Helms, Simonsen, *et al.*, 2006).

Se estima que las ETAs afectan aproximadamente a 48 millones de personas anualmente en los Estados Unidos, de los cuales alrededor de 9.4 millones de enfermedades son producidas por patógenos conocidos (Scallan, E. *et al.*, 2011). Una estimación por el CDC sobre las ETAs que ocurren tan solo en los Estados Unidos concluyó que cerca de 48 millones de personas son afectadas, produciéndose 128,000 hospitalizaciones y 3,000 muertes (Scallan, *et al.*, 2011). De 479 brotes reportados con un solo agente etiológico confirmado, norovirus fue el patógeno más común, responsable de un 49% de los brotes y

46% de enfermedades. En tanto que *Salmonella* fue el segundo provocando 23% de brotes y 31% de enfermedades (Painter, J. A. *et al.*, 2009).

El CDC define un brote de ETA como la presencia de dos o más personas enfermas de manera similar provocado por la ingestión de un alimento en común (CDC, 2006). Datos recabados en el 2008 arrojaron que en EUA 1276 personas resultaron hospitalizadas por ETAs, siendo *Salmonella* el agente causal más frecuente, seguido de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC). De las 22 muertes asociadas a brotes de ETAs en ese mismo año, 20 fueron atribuidas a agentes etiológicos bacterianos (13 *Salmonella*, 3 *L. monocytogenes*, 3 STEC [2 O157, 1 O111], y 1 por *Staphylococcus aureus*) (Barton, *et al.*, 2008).

La amenaza de la transmisión de los patógenos contaminantes de alimentos a los consumidores se ha incrementado debido a la industrialización y la globalización de la cadena de suministro de alimentos y el cambio de hábitos alimenticios de la población. Con el fin de proteger a los consumidores de la contaminación en el consumo de los alimentos, es importante optimizar las técnicas de detección de microorganismos de índole sanitaria (Wu, 2009).

Las frutas y vegetales son componentes importantes de una dieta saludable y balanceada, sin embargo, en muchas ocasiones son consumidos crudos y han sido reconocidos como importantes vehículos para la transmisión de patógenos a los humanos. A pesar de esta asociación, existe un limitado conocimiento sobre en qué parte de la cadena de producción ocurre la contaminación o sobre el mecanismo por el cual los patógenos colonizan y sobreviven en estos productos (Cedric, N. *et al.*, 2010). Esto se ha visto mermado por la dificultad de trabajar o analizar muestras en campo, por lo que se ha propuesto el uso de indicadores microbianos que se puedan identificar mediante el uso de métodos sencillos, rápidos y económicos (Huespanhol, I. and Prost, M. 1994) y cuya presencia indique la existencia de condiciones favorables, en donde también pudieran desarrollarse bacterias patógenas.

5. 2. Enfermedades transmitidas por los alimentos y su relación con frutas y hortalizas

Algunas fuentes indican que un amplio rango de frutas y vegetales pueden estar potencialmente contaminados con patógenos para los humanos, reportándose brotes de enfermedades gastrointestinales causados por bacterias, virus y parásitos a través de diferentes vegetales crudos o procesados y en menor proporción a frutas (Leifert C., *et al.*, 2007).

Es bien sabido que el consumo de frutas y vegetales es un factor de riesgo para la infección por patógenos entéricos. Se han documentado brotes relacionados al consumo de productos frescos como espinaca y lechuga contaminados con *E. coli* O157:H7, o bien, *Salmonella* Typhimurium y *S. Newport* presentes en tomate y lechuga, y *S. Thompson* en rábano (Heaton and Jones, 2008).

En el periodo de 2005-2006, cuatro brotes de infección por *Salmonella* causaron 459 casos confirmados y fueron asociados al consumo de tomates crudos en restaurantes de 21 estados de los Estados Unidos (CDC, 2007).

Esto aunado a que muchos microorganismos han desarrollado mecanismos para unirse, sobrevivir, o crecer en micronichos en diferentes vegetales. En la superficie de los productos los microorganismos interactúan en agregados, posiblemente compitiendo por los limitados nutrientes disponibles de las células epidérmicas donde las ceras cuticulares son menos densas, el agua se acumula, y los nutrientes están más disponibles que en otros lugares. Se ha determinado por ejemplo que la humedad de la superficie del chile jalapeño puede proporcionar un ambiente protector para cepas de *E. coli* y *Salmonella*. También se ha visto que los microorganismos se pueden internalizar en los vegetales a través de canales de agua en diferentes maneras y que los microorganismos internalizados generalmente se encuentran protegidos contra el estrés ambiental (Castro-Rosas, *et al.*, 2011).

Estudios previos identificaron que con el tiempo suficiente y bajo las condiciones adecuadas, los microorganismos pueden estar firmemente adheridos y proliferar en la superficie de los vegetales (Pao, *et al.*, 2012).

Estudios llevados a cabo durante un brote multiestatal de infección por *Salmonella enterica* serotipo Saintpaul en 2008 revelaron asociaciones entre la enfermedad y el consumo de chiles jalapeños en Estados Unidos. La cepa responsable del brote se aisló de una muestra de chile jalapeño obtenido de un importador de productos agrícolas en Texas que recibió chiles jalapeños de una planta de empaque en Nuevo León, México. La rastreabilidad de los chiles jalapeños implicados condujeron a las granjas de Tamaulipas y Nuevo León, México, como responsables (Barton, 2008).

5. 3. Brotes por agua.

Diversos estudios indican que el agua es una fuente ambiental importante de contaminación por algunos microorganismos patógenos como *Salmonella*, particularmente el agua de irrigación que contiene abono, heces de animales silvestres o efluentes de aguas residuales (Islam, 2004). La irrigación con agua de baja calidad es una forma en la que los cultivos se pueden contaminar con patógenos. Las aguas subterráneas, aguas superficiales y las aguas residuales son comúnmente utilizadas para irrigación. El riesgo de transmisión de enfermedades de microorganismos patógenos presentes en el agua de irrigación está influenciado por el nivel de contaminación, la persistencia de patógenos en agua, suelo y en los cultivos, y la ruta de exposición. El agua subterránea generalmente es de buena calidad microbiológica, a menos que esta se contamine por ejemplo con escurrimientos superficiales contaminados (Steele and Odumeru, 2004).

Uno de los vehículos más comunes por los cuales *E. coli* O157:H7 puede ser introducido a los cultivos es el agua de irrigación. La contaminación del agua se está volviendo más común en áreas rurales en los Estados Unidos como resultado de grandes operaciones animales, y hasta un 40% de los pozos de agua potable analizados están contaminados con *E. coli* (Ibeke M, *et al.*, 2004). Recientemente, brotes causados por *E. coli* O57:H7 se han relacionado con el agua contaminada (Solomon, *et al.*, 2002).

Existe la posibilidad de que insectos o aves puedan transmitir a los microorganismos patógenos a los chiles, por ejemplo Moore *et al.*, (2003) mencionaron que insectos pertenecientes al género *Chironomus* fueron vectores directos o indirectos de bacterias entéricas en agua y alimentos.

5. 4. Contaminación por suelo.

El uso de fertilizantes hechos a base de estiércol de animales y aplicado a frutos orgánicos y cultivos vegetales, han desencadenado preocupaciones sobre el incremento del riesgo que ocurra contaminación y como consecuencia, de que enteropatógenos entren en la cadena de producción de alimentos (Guan and Holley, 2003).

La contaminación del suelo puede deberse a heces de animales domésticos o silvestres que están asociados a dichas áreas. Se ha visto que animales como aves, roedores, reptiles y anfibios, pueden también actuar como reservorios de *Salmonella* y contaminar cultivos por medio de las heces o contacto directo (Fatica, *et al.*, 2011).

Además de la contaminación de las superficies de frutas y hortalizas que pueden ocurrir por salpicaduras de lluvia, aerosol o contaminación del suelo, la internalización de *Salmonella* en las plantas, especialmente en lechuga y tomate, se ha documentado (Klerks, 2007). Por ejemplo, se ha reportado que *S. Typhimurium* puede alcanzar el tomate vía translocación interna desde las hojas probablemente a través del floema (Gu G, 2011); y aunque la posibilidad de movimiento interno es baja, una vez que las células bacterianas alcanzan el fruto, se pueden multiplicar en altas densidades dentro de él (Gu G, Cevallos-Cevallos JM, van Bruggen AHC, 2013).

Existe un sinnúmero de brotes de ETAs asociados al consumo de diversos productos hortofrutícolas, donde los patógenos principalmente asociados incluyen *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*. Un recuento de estos brotes del 2005 al 2011 se compila en la tabla 1

Tabla 1. Brotes relacionados a vegetales frescos de 2005 a 2011

Lugar	Año	Patógeno	Producto	Casos (muertes)
Canadá	2005	<i>Salmonella</i>	Germen de soya	592
EU	2005	<i>Salmonella</i>	Tomate	459
EU	2006	<i>E. coli</i> O157:H7	Espinaca	199 (3)
Australia	2006	<i>Salmonella</i>	Germinado de alfalfa	125
EU	2006	<i>Salmonella</i>	Tomate	183
EU	2006	<i>E. coli</i> O157:H7	Lechuga	81
Australia	2006	<i>Salmonella</i>	Melón	115
EU	2006	<i>E. coli</i> O157:H7	Espinaca	22
Europa	2007	<i>Salmonella</i>	Espinaca	354
Australia, Europa	2007	<i>Shigella sonnei</i>	Zanahoria	230
Europa	2007	<i>Salmonella</i>	Germinado de alfalfa	45
EU, Canadá	2008	<i>Salmonella</i>	Pimientos	1442 (2)
EU, Canadá	2008	<i>E. coli</i> O157:H7	Lechuga	134
Reino Unido	2008	<i>Salmonella</i>	Albahaca	32
EU	2008	<i>Salmonella</i>	Melón	51
EU, Canadá	2008	<i>Salmonella</i>	Mantequilla de maní	714 (9)
EU	2009	<i>Salmonella</i>	Germinado de alfalfa	235
EU	2010	<i>E. coli</i> O157:H7	Lechuga	26
EU	2010	<i>Salmonella</i>	Germinado de alfalfa	44
EU	2010	<i>L. monocytogenes</i>	Apio	10 (5)
EU	2011	<i>Salmonella</i>	Germinado de alfalfa	140
EU	2011	<i>Salmonella</i>	Melón	20
EU	2011	<i>Salmonella</i>	Papaya	106
EU	2011	<i>L. monocytogenes</i>	Melón	146 (31)
EU	2011	<i>E. coli</i> O157:H7	Fresa	15 (1)
EU	2011	<i>E. coli</i> O157:H7	Lechuga	60

Fuente: Olaimat, *et al.*, 2012.

5. 5. Etapas de la producción de vegetales.

5. 5. 1. Pre-cosecha

Esta etapa es considerada como la primera etapa de la cadena desde la granja a la mesa, e incluye el sembrado, crecimiento, riego, así como otras actividades y tratamientos asociados con la planta madura (León *et al.*, 2009).

De acuerdo a Doyle y Erickson (2007), existen dos factores importantes que pueden incrementar la contaminación de microorganismos patógenos en los vegetales:

1. Proximidad de la parte comestible de la planta al suelo. Los tubérculos como las zanahorias, cebollas, papas, etc. o cultivos que crecen cerca al suelo como lechuga, tomate, cilantro, etc. tienen más probabilidad de contaminarse.
2. Concentración de patógenos en suelo contaminado en el cual crece el vegetal. Altas poblaciones de microorganismos patógenos en el suelo incrementan la probabilidad que el vegetal esté contaminado al momento de la cosecha. Así mismo altas concentraciones de contaminación en agua de irrigación se convertirán en altas cargas de contaminación en el suelo y en altas probabilidades de contaminación en la planta.

5. 5. 2. Irrigación

Donde quiera que el agua entre en contacto con productos frescos, la calidad de ésta determina el potencial de contaminación con patógenos. La fuente del agua de riego, cómo es distribuida y el tipo de riego que es usado, son factores importantes que influyen en la contaminación de frutas y vegetales frescos (USFDA-CFSAN, 1998).

5. 5. 3. Cosecha

La etapa de cosecha en los campos de cultivo marca el inicio de una cadena de operaciones que alteran el estado fisiológico de los vegetales. Principalmente está el daño

mecánico que se produce al cortar el vegetal, esta operación crea superficies susceptibles a contaminarse con bacterias patógenas si no se manejan adecuadamente (Doyle and Erickson, 2007).

Las fuentes de contaminación en esta fase son variadas, debido a que puede influir la contaminación que ocurrió durante la pre-cosecha. Además, el tipo de contaminación que pueda ocurrir durante y después de la cosecha son afectados si los vegetales son empacados en el campo (listos para su distribución inmediata) o si el producto es sujeto a un lavado y seguido del empacado en la planta de procesamiento (área de empacado) (León *et al.*, 2009).

La significancia de la contaminación de productos vegetales durante el crecimiento y la cosecha no está bien establecida debido a que una vez que el brote ocurre, es difícil determinar si la fuente de contaminación fue específicamente durante la pre-cosecha. Sin embargo, para la mayoría de los productos, la contaminación ocurre en la superficie de los mismos, existiendo evidencia de que los agentes patógenos pueden estar presentes por la acción capilar a través de los espacios o grietas y/o tejido dañado de la planta durante su producción (León *et al.*, 2009).

5. 5. 4. Post-cosecha

Un producto fresco recibe mucho menos tratamiento después de la cosecha; algunos productos son empacados y enviados sin ningún tratamiento previo, mientras que otros son lavados, saneados y empacados antes de ser enviados. Muchos de los productos frescos pasan a través de áreas especializadas llamadas áreas de empacado. El objetivo de los empaques es preparar al producto, que viene directamente del campo, para su distribución, cabe destacar que en ciertos cultivos como los de melón, cilantro y perejil, tienen una contaminación significativamente más alta cuando salen del área de empacado para ser distribuidos que cuando salen del campo y se mandan directamente a su distribución. Esto sugiere que ciertos procesos que se llevan a cabo en el empacado tienen una contaminación cruzada y/o proliferación microbiana, desafortunadamente es difícil determinar si las

superficies de equipos pueden ser fuente de contaminación hacia los productos o viceversa (Castillo *et al.*, 2004).

5. 6. Microorganismos Indicadores

Las verduras frescas normalmente acarrean microorganismos epífitos no patógenos, sin embargo, durante el crecimiento, cosecha, transporte y manejo pueden contaminarse con patógenos de origen animal y/o humano (Aarestrup *et al.*, 2008).

Los microorganismos indicadores son aquellos que tienen un comportamiento similar a los patógenos (concentración y reacción frente a factores ambientales y barreras artificiales), sin embargo, su detección es más rápida, económica y fácil. Una vez que se ha evidenciado la presencia de microorganismos indicadores, se puede inferir que existe el riesgo de que los microorganismos patógenos se encuentren presentes y que su comportamiento frente a diferentes factores como pH, temperatura, presencia de nutrientes, tiempo de retención hidráulica o sistemas de desinfección sea similar a la del indicador (Madigan, M, *et al.*, 1997).

El sistema de microorganismos indicadores más comúnmente utilizado para el estudio sanitario de alimentos en general es el recuento de microorganismos coliformes, los cuales son especies bacterianas bioquímicamente parecidas a *E. coli*, tales como *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter*. En general se reconoce que la presencia de coliformes indica un mal estado sanitario y, por tanto, riesgo de que existan microorganismos patógenos.

Además de los coliformes, los estreptococos fecales, también llamados Enterococos, son habitantes comunes del tracto intestinal de humanos y animales inferiores, y por lo tanto pueden también ser utilizados como indicadores de contaminación fecal (Toranzos and McFeters, 1997).

5. 6. 1 *Enterococcus* spp.

Estos microorganismos son considerados estreptococos fecales, y se utilizan como indicadores de la calidad principalmente del agua. Estas bacterias son cocos Gram positivos, catalasa negativa que se unen a la esculina y no son inhibidos por sales biliares. Son clasificados como *Streptococcus* grupo D por su reactividad a antisueros. Los *Enterococcus*, que fueron formalmente clasificados como *Streptococcus* del grupo fecal, son reconocidos como un indicador útil de calidad de agua y actualmente son clasificados en el género *Enterococcus*. Estos pueden ser diferenciados del gran grupo de los estreptococos fecales por su capacidad de crecer a 10 y 45°C, a pH de 9.6, y en un medio con 6.5% de NaCl. Resultados de varios estudios han sugerido que los enterococos pudieran ser mejores organismos indicadores que los coliformes fecales. Los *Enterococcus* spp, pueden sobrevivir por más tiempo en ambientes marinos que los coliformes fecales, y su rango de sobrevivencia a través del procesamiento de aguas residuales es mayor que el de los coliformes fecales (Hardwood, Valerie, *et al.*, 2000).

Aunado a esto, son comensales, que habitan el tracto gastrointestinal de humanos y otros mamíferos. Las bacterias del género *Enterococcus*, como por ejemplo, *E. faecalis* pueden causar infecciones gastrointestinales comprometidas en humanos (Schleifer KH and Kilpper-Balz R, 1984).

5. 6. 2. Coliformes

Los coliformes totales son bacilos Gram negativos, oxidasa negativo, no formadores de esporas, que fermentan lactosa con producción de gas a 35°C, después de 48 horas, en un medio con sales biliares (Grabow, 1996). Cuando se realiza la prueba de coliformes, diversos géneros de la familia *Enterobacteriaceae* como lo son *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*, dan resultado positivo y por lo tanto se consideran coliformes de acuerdo a esta definición (Madema, J.G. *et al.*, 2003). Por el contrario, los coliformes fecales son tradicionalmente definidos como coliformes que fermentan la lactosa a 44.5°C en un medio con sales biliares (Gauthier and Archibald, 2001).

5. 7. Microorganismos patógenos

5. 7. 1. *Salmonella*

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, y está integrada por bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, no formadores de espora. Poseen, por lo tanto, las características generales de las enterobacterias: son fermentadores de la glucosa, catalasa positivo, oxidasa negativo y suelen ser móviles; a excepción de *Salmonella Gallinarum* (Adak GK, *et al.*, 2002).

Este género está compuesto por tres especies: *S. enterica*, *S. bongori* y *S. subterranea*. *Salmonella enterica* la cual es causante de gastroenteritis, esta subdividida en cientos de serovariedades. Es el patógeno más frecuentemente ligado al consumo de frutas y vegetales. Algunas serovariedades de *S. enterica* pueden colonizar semillas, brotes de semillas, hojas y frutos de una variedad de especies de plantas (Cedric, N. *et al.*, 2010).

Salmonella puede causar dos síndromes conocidos como salmonelosis tifoidea y salmonelosis no tifoidea. La salmonelosis no tifoidea es una enfermedad causada por *Salmonella enterica*, que es la bacteria más común en enfermedades de origen alimentario en los Estados Unidos. El consumo de productos contaminados, ha sido la causa más repetitiva de salmonelosis en los últimos años. La dosis infecciosa de este microorganismo en seres humanos se encuentra situado generalmente en el orden de 10^6 UFC.

Entre las salmonelosis descritas en países en desarrollo se encuentran la fiebre tifoidea y la fiebre paratifoidea producida por *S. enterica* serovariedades Typhi y Paratyphi, respectivamente; estas infecciones son graves y pueden producir complicaciones y muerte, y en forma exclusiva afectan al humano, el único reservorio y fuente de contaminación (Cedric, N. *et al.*, 2010).

La colonización de plantas de tomate por *S. enterica* ha provocado muchos brotes de enfermedades, los cuales han involucrado cientos de casos. Anualmente los brotes de salmonelosis (2002 a 2008) han sido provocados por el consumo de tomates frescos

contaminados producidos de forma doméstica. La biología de la interacción planta/microbio es pobremente entendida, sin embargo, la evidencia epidemiológica respalda la idea de que la mayoría de los brotes se deben a una contaminación en el campo antes de la cosecha (Barak D, *et al.*, 2010).

La contaminación de productos también puede ocurrir en la etapa de procesamiento pero las fuentes de contaminación también han sido asociadas con algunos campos de producción. Sin embargo poco se sabe sobre las rutas de contaminación en las plantas. Durante la producción de cultivos, se ha sugerido que la irrigación de agua, puede ser una importante fuente de contaminación de las plantas con *Salmonella*. La aplicación de fertilizantes o pesticidas donde fue utilizada agua contaminada para diluir los productos también podría contaminar las plantas (Gu G, *et al.*, 2010).

5. 7. 2. *Escherichia coli*

Escherichia coli es un grupo de bacterias genéticamente heterogéneo cuyos miembros son típicamente no patógenos y que son parte de la microflora normal del tracto intestinal de los humanos y animales, constituyendo la bacteria más predominante de la flora normal intestinal (Farthing, 2004).

Aunque normalmente se encuentran en el intestino de los humanos como comensales, algunas cepas pueden ser patógenas, tanto intestinal como extraintestinalmente. Los patógenos intestinales también son conocidos como *E. coli* diarreogénicas (DEC) de las cuales se han caracterizado seis categorías: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (Campos, *et al.*, 2004).

Sin embargo, muchas clonas de *E. coli* han adquirido islas de patogenicidad a través de la transferencia horizontal de genes que les permite causar infecciones en el tracto urinario y enfermedades como la diarrea. Básicamente las *E. coli* diarreogénicas pueden causar

enfermedades desde diarrea moderada hasta complicaciones severas como el síndrome urémico hemolítico (Cedric, N. *et al.*, 2010).

Cabe mencionar que existen algunas clonas de *E. coli* que han adquirido factores de virulencia específicos, los cuales aumentan su habilidad de adaptación a nuevos nichos y les permite causar un amplio espectro de enfermedades. Las cepas pueden adquirir DNA externo codificante de enterotoxinas, adhesinas o factores de invasión, volviéndose así virulentas y pudiendo causar ya sea una simple diarrea acuosa o disentería inflamatoria, hasta un caso severo (Weintraub Andrej, 2007).

Existen diversos serotipos de *E. coli*, basados en el antígeno O (Ohne) determinado por la porción polisacárida del lipopolisacárido de la pared celular (LPS) y el antígeno H (Hauch) que se debe a la proteína flagelar. Existen 174 antígenos O (numerados de 1 a 181, con los números 31, 47, 67, 72, 93, 94, y 122 excluidos) y 53 antígenos H en el esquema internacional de serotipificado (Gyles C. L., 2007).

5. 7. 2. 1. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

Este grupo se considera como la principal causa de colitis hemorrágica o diarrea con sangre y se caracterizan por la producción de verotoxinas o toxinas similares a la toxina Shiga producida por *Shigella*, y que son conocidas como toxinas Shiga tipo 1 y 2 (Stx1 y Stx2) siendo ampliamente asociadas a ETAs en humanos. El principal reservorio de EHEC es el ganado bovino y los primeros brotes causados por esta bacteria fueron asociados al consumo de carne de hamburguesa mal cocida. A raíz de eso, el consumo de agua contaminada y una gran variedad de alimentos se han relacionado con las enfermedades causadas por EHEC, incluyéndose salsas, leche no pasteurizada, lechuga, melón, sidra de manzana y rábanos. Siendo este último producto, el responsable de un brote que ocasionó 8,000 casos de infección en Japón (Nataro *et al.*, 1998).

Se ha determinado que la transmisión puede darse de persona a persona y el serotipo O157:H7 es el más común en Norte América, Reino Unido y Japón, aunque muchos otros

serotipos, particularmente aquellos como el O26 y O111, pueden causar también enfermedad, e incluso en algunos países presentar brotes aún más severos que los provocados por *E. coli* O157:H7. Otra característica que diferencia al serotipo O157:H7 de otras *E. coli*, es su ausencia o poca fermentación del sorbitol y no poseen actividad glucuronidasa, por lo que estas características son usadas para aislar e identificar a este patógeno a partir de muestras biológicas (Nataro *et al.*, 1998).

La evidencia ha mostrado que *E. coli* O157:H7 es una de las bacterias patógenas más comúnmente aisladas de carne y productos frescos después de *Campylobacter*, *Salmonella* y *Shigella* spp (Mead, PS, *et al.*, 1999). Además de los Estados Unidos, diversos brotes de infecciones por *E. coli* O157:H7 se han reportado en otros países convirtiendo a este patógeno en una creciente preocupación de salud pública a nivel mundial (Griffin PM, Tauxe RV, 1991). Este microorganismo puede ser transportado a través del agua de riego, dando oportunidad de esparcirse a su reservorio secundario, comúnmente lechos de agua y suelos. La persistencia y el crecimiento en esos hábitats pueden incrementar el potencial de la bacteria de entrar en la cadena de producción de alimentos y por lo tanto constituir un riesgo de salud pública (Ma J, *et al.*, 2011). Tan solo en los Estados Unidos anualmente *E. coli* O157:H7 causa más de 75,000 infecciones y 17 brotes de enfermedad (CDC, 2006).

Al ser ingerido el alimento contaminado con la bacteria, puede generar gastroenteritis en humanos. Se ha estimado que la dosis infectiva puede ser tan baja como 10 células, aunque algunos estudios han reportado que generalmente es entre 10^3 y 10^4 UFC por gramo, su periodo de incubación puede ser desde doce horas hasta 10 días y los síntomas que causa incluyen diarrea, vómito y dolor abdominal. La gastroenteritis puede complicarse y causar colitis hemorrágica y HUS (Doyle *et al.*, 2007).

5. 7. 2. 1. 1. *E. coli* STEC

E. coli productora de toxina Shiga (STEC), se refiere a las cepas de *E. coli* que producen al menos 1 miembro de la clase de potentes citotoxinas llamadas toxinas Shiga. Las STEC

que causan colitis hemorrágica y HUS son llamadas *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) (Levine *et al.*, 1987; Nataro and Kaper, 1998).

Estos organismos poseen diversos factores de virulencia, sin embargo el requerimiento principal es la habilidad de secretar una toxina Shiga (Stx) para la cual los humanos tienen receptores. Las toxinas Shiga son limitadas a especies ya que no todas las Stx son tóxicas para los humanos, por lo tanto, no todas las STEC son necesariamente EHEC (Taylor Mark, 2008).

Como se mencionó, la toxina Shiga (Stx) es el factor de virulencia crucial en enfermedades por STEC. Dos tipos de Stx, llamadas Stx1 y Stx2, fueron originalmente reconocidas (Strockbine *et al.*, 1986), siendo la molécula Stx1 una estructura altamente conservada que es idéntica a la toxina Shiga tipo 1 de *S. dysenteriae* (Takao *et al.*, 1988).

Para el caso de la toxina Shiga tipo 2, existen varias variantes antigénicas de Stx2, nombradas stx2c, stx2d, stx2d-activable, stx2e y stx2f, que difieren en su actividad biológica y asociación con enfermedad (tabla 2).

Existe evidencia de una asociación de Stx2 con un riesgo mayor de desarrollar HUS y la presencia de los genes, *eae* y *stx2* (que codifican para la intimina y *stx2*) en aislados de STEC, es considerado como un propulsor potencial del HUS (Boerlin *et al.*, 1999; Ethelberg *et al.*, 2004). Se ha reportado que la Stx2 es cerca de 1,000 veces más tóxica para las células endoteliales microvasculares que la Stx1 (Louise and Obring, 1995).

Tabla 2. Factores de virulencia de *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC)

Factor de virulencia	Características
Toxinas Shiga	Proteínas citotóxicas que son el principal factor de virulencia de STEC
Stx1	Toxina Shiga producida por STEC y casi idéntica a Stx producida por <i>Shigella dysenteriae</i> serotipo 1
Stx1c	Variante de Stx1 que se encuentra en algunas STEC <i>eae</i> negativas; asociada con la ausencia de síntomas o diarrea leve en humanos
Stx2	Prototipo de toxinas no Stx1; asociadas con enfermedad severa en humanos
Stx2c	Asociada con diarrea y SUH en humanos; común en STEC de bovinos
Stxd	Asociada con STEC <i>eae</i> negativas y enfermedad leve en humanos
Stxd _{act}	La citotoxicidad en células Vero se incrementa de 10 a 1000 veces por la elastasa en el moco intestinal; cepas con esta toxina son altamente virulentas
Stx2e	Variante responsable de enfermedad de edema en cerdos; rara en humanos y asociadas con diarrea leve o infección asintomática
Stx2f	Una variante frecuentemente aislada de excremento de palomas; rara en enfermedad de humanos
Adherencia	Induce la formación de lesión AE, incluye genes para SST3; intimina; receptor translocado de intimina.

Fuente: Gyles C. L., 2007.

E. coli productora de toxina Shiga es considerado un patógeno zoonótico que coloniza principalmente al ganado vacuno y pequeños rumiantes. Aunque los productos de ganado vacuno, principalmente carne, son los más comúnmente reconocidos como fuentes de infecciones con *E. coli* O157 debido a que son su reservorio natural, las frutas y vegetales que se consumen crudos también son vectores importantes (Rangel *et al.*, 2005). *E. coli* O157 emplea múltiples mecanismos para colonizar plantas y están bien adaptadas a esa biosfera. Como *Salmonella*, *E. coli* O157 también puede alcanzar la cavidad subestomacal y sobrevivir en ese ambiente (Cedric, N. *et al.*, 2010).

El primer brote reportado que fue provocado por de *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) ocurrió en los Estados Unidos en 1982 y fue causado por el serotipo O157:H7 (CDC, 1982). Un examen retrospectivo de antiguas colecciones de cultivos de antes de los 1980's indicó que este patógeno era de reciente aparición en escena con una rara prevalencia (Griffin and Tauxe, 1991). Otros brotes de STEC O157:H7 ocurrieron sucesivamente en el Reino Unido, así como otros países del continente europeo, África y Nueva Zelanda en la siguiente década y brotes asociados con carne contaminada y agua fueron un común denominador (Johnson *et al.*, 2006). Este serotipo fue bien conocido por su habilidad de provocar brotes y HUS (Bettelheim, 2007). Sin embargo, cerca de 150 serotipos de no-O157 han sido atribuidos a infecciones esporádicas en humanos. Es por ello que suelen nombrarse como STEC O157 y no-O157 (Gould *et al.*, 2009).

La supervivencia de *E. coli* O157:H7 ha sido estudiada bajo diversas condiciones y diferentes ambientes. Se considera que esta bacteria generalmente sobrevive muy bien en el medio ambiente. Su supervivencia, sin embargo, puede ser afectada por varios factores como comunidades microbianas autóctonas, temperatura, deshidratación, humedad y condiciones aeróbicas. Wang y Doyle (1998) mostraron que *E. coli* O157:H7 puede sobrevivir por varias semanas en los depósitos de agua y en agua de lago. Siendo la sobrevivencia mayor en agua fría (8°C) que en agua tibia (25°C). Sus resultados también indicaron que esta bacteria puede entrar en estado viable no cultivable en agua (Chauret Christian, 2011).

5. 7. 2. 2. Otros patotipos de *E. coli*

5. 7. 2. 2. 1 Enterotoxigénica

Brevemente las cepas enterotoxigénicas (ETEC) son consideradas como el prototipo de la cepa diarreica. Estos organismos colonizan la superficie de la mucosa del intestino delgado por medio de fimbrias. Estas fimbrias tienen una regulación compleja, ya que los genes estructurales (*cs1*, *cs2*, *cs3*) se encuentran en el cromosoma, sin embargo, su regulación depende de un gen plasmídico (*rms*). Una vez adheridas al intestino, las cepas ETEC producen una o ambas toxinas, enterotoxina termolábil (LT) y enterotoxina termoestable

(ST), con su control genético en plásmidos transmisibles. ETEC también produce uno o más de los muchos factores de colonización ya previamente definidos (Pili/fimbria o no fimbrial), que están también bajo control de plásmido (Kenneth *et al.*, 2006).

Se encontró que la toxina LT es muy similar fisiológicamente, estructuralmente y antigénicamente a la toxina del cólera y tiene un modo de acción similar. Siguiendo la colonización del intestino delgado por ETEC y liberación de LT, las subunidades de LTB se unen irreversiblemente a gangliosidos GM1, y la subunidad S activa la adenilato ciclasa, lo cual resulta en el incremento de AMP cíclico, el cual estimula la secreción de cloruro en las células de la cripta intestinal e inhiben el cloruro de sodio neutro en las puntas de las vellosidades. Cuando estas acciones exceden la capacidad de absorción del intestino, esto resulta en una diarrea acuosa.

5. 7. 2. 3. *E. coli* enteropatógena

Las cepas enteropatógenas (EPEC) son de las principales causantes de diarrea en niños menores de dos años en países en vías emergentes como el nuestro. La principal característica histopatológica de la infección es una lesión que induce la EPEC en el intestino, conocida como la lesión A/E (adherencia y remoción). Las bacterias se adhieren a los enterocitos y permiten la acumulación de la actina en el citoesqueleto, en la región apical de la célula, hasta formar una estructura de tipo “pedestal” y causar la eliminación de las microvellosidades intestinales, generando con ello diarrea y dolores abdominales (Nataro and Kaper, 1998).

Existen tres etapas en la patogénesis de EPEC: (I) adherencia inicial a la célula del hospedero, (II) producción y translocación de las proteínas bacterianas a través de un complejo de aguja vía sistema de secreción tipo III, y (III) unión íntima bacteriana con formación de pedestal (Chen and Frankel, 2005).

Las principales proteínas de virulencia compartidas por todas las EPEC son codificadas en una isla de patogenicidad cromosómica de 35kb denominada locus de eliminación de enterocito (LEE). Entre estas proteínas esta la intimina, la cual es necesaria para la unión de la bacteria a las células epiteliales del hospedero (Chen and Frankel, 2005). Entre las proteínas no LEE codificadas esta BFP (paquete de formación de pilus), y el pili tipo IV, codificados en un plásmido llamado factor de adherencia EPEC (EAF) (Chen and Frankel, 2005). La BFP es responsable del fenotipo de la adherencia localizada (LA) de EPEC, caracterizada por la habilidad de la bacteria de formar microcolonias en la superficie de las células epiteliales del intestino. Por definición todas las EPEC carecen de genes para producir la toxina Shiga (Ochoa Theresa, *et al.*, 2008).

5. 7. 2. 4. *E. coli* enteroagregativa

La cepa enteroagregativa (EAEC) causa diarrea persistente en niños. Al igual que la cepa enterotoxigénica, produce toxinas ST y hemolisinas, que se adhieren al intestino delgado sin invadir. Sin embargo, a diferencia de la ETEC, esta cepa se encuentra típicamente cubierta por estructuras fibrilares delgadas, que se supone, son estructurales adhesivas que les permiten agregarse en cúmulos y causar diarrea crónica (Cravioto *et al.*, 1991).

En 1979, Cravioto y su grupo de colaboradores describieron un ensayo *in vitro* basado en la adhesión de la bacteria a células HEp-2 mostrando que EPEC se une a las células en un patrón localizado (Cravioto *et al.*, 1979). Unos años después se mostró que cepas adherentes no EPEC fueron asociadas con diarrea. Estas cepas fueron llamadas “*E. coli* enteroadherentes” (Cravioto *et al.*, 1991). Al mismo tiempo, Nataro *et al.* (1987) reconocieron dos fenotipos diferentes entre las cepas enteroadherentes, es decir, difusa y agregativa. El descubrimiento de Nataro fue la primera descripción de EAEC. La adherencia agregativa es caracterizada por una formación de ladrillo apilado de células bacterianas unidas a las células HEp-2 (Nataro & Kaper, 1998; Nataro *et al.*, 1998). La estrategia básica de EAEC parece constar de la colonización de la mucosa intestinal, probablemente predominantemente la parte del colon, seguida de la secreción de

enterotoxinas y citotoxinas (Nataro *et al.*, 1998). Estudios en muestras intestinales humanas indican que EAEC provoca leve daño en la mucosa (Hicks *et al.*, 1996).

Para poder causar enfermedad diarreica, EAEC se adhiere a la mucosa intestinal, forma un biofilm mucoide e induce efectos tóxicos en la mucosa intestinal que causa la diarrea (Weintraub Andrej, 2007).

5. 7. 2. 5. *E. coli* enteroinvasiva

La cepas enteroinvasivas son muy similares a *Shigella* spp en sus características bioquímicas y patogénesis, ya que no fermentan la lactosa (las demás cepas de *E. coli* si lo hacen), no son móviles y son negativas en la prueba de lisina descarboxilasa (Nataro and Kaper, 1998). Presentan también un plásmido idéntico a *Shigella* que contiene los genes de invasión (*vir*). Las EIEC son capaces de causar diarrea líquida sin sangre, similar a la causada por ETEC y ocasionalmente (al igual que *Shigella*) puede invadir las células del intestino del hospedero y causar disentería. Las EIEC causan epidemias relacionadas a contaminación de agua y alimentos, siendo el humano el principal reservorio de este microorganismo (Doyle *et al.*, 2007).

5. 7. 2. 6. *E. coli* de adherencia difusa

E. coli adherente difusa (DAEC) es el grupo más difícil de clasificar. Este grupo causa estructuras como “dedos” en las células epiteliales del intestino, las cuales embeben a la bacteria, causando diarrea líquida, principalmente en niños (Beinke *et al.*, 1998). El nombre de este grupo proviene del tipo característico de adherencia de estas bacterias a las células HEP-2 en cultivos de líneas celulares.

Estudios morfológicos han descrito que las cepas DAEC generan un fenotipo inusual de adherencia celular sobre el cultivo de células HEP-2, observándose la inducción de algunas proyecciones de la membrana celular (Peiffer, *et al.*, 2000). La lesión se lleva a cabo mediante un mecanismo de virulencia complejo, que induce la degeneración de las

microvellosidades y altera la morfología normal de la región apical del enterocito (Riveros Maribel, *et al.*, 2011).

Los datos de diversos estudios epidemiológicos sobre la diarrea pediátrica en países en desarrollo, han indicado que *E. coli* adherente difusa es mucho más frecuente en los niños con diarrea que en los niños sin diarrea de iguales características. Esta cepa no produce toxinas ST ni LT (Doyle *et al.*, 2007).

5.7.3 *Listeria monocytogenes*

Esta bacteria es un patógeno que se distribuye ampliamente en el medio ambiente y por lo tanto se puede encontrar en alimentos en estado natural (Oravcova, Kuchta *et al.*, 2007). Es una bacteria patógena Gram-positiva, pequeña (0,4 a 0,5 micrones de ancho x 0,5 a 1,2 de largo) y anaerobia facultativa capaz de proliferar en un amplio rango de temperaturas (1 °C a 45 °C) y a una elevada concentración de sal. Es catalasa positiva y no presenta cápsula ni espora. Tiene flagelos peritricos, gracias a los cuales presenta movilidad a 30 °C o menos, siendo inmóvil a 37 °C, temperatura a la cual sus flagelos se inactivan, además es responsable de la listeriosis humana, la cual causa fiebre, dolor muscular y algunas veces síntomas gastrointestinales como náusea o diarrea (Watson, D, *et al* 2009).

Si la infección se disemina al sistema nervioso se pueden presentar síntomas como dolor de cabeza, rigidez del cuello, confusión, pérdida del equilibrio o convulsiones (Mead *et al.*, 2006). En individuos sanos la infección generalmente es poco severa, sin embargo, en mujeres embarazadas, la infección puede producir aborto, que el producto nazca muerto, nacimiento prematuro o infección en el recién nacido. Las personas con un sistema inmunológico suprimido y los ancianos son más propensos a una enfermedad más severa, en donde las consecuencias fatales son elevadas (Garrido *et al.*, 2008).

La transmisión generalmente es a través del consumo de alimentos contaminados, además, se ha encontrado en una variedad de alimentos crudos como carnes y vegetales; aunque las fuentes potenciales de contaminación incluyen también a manipuladores de alimentos,

consumidores y fuentes ambientales como los utensilios y el equipo, los cuales pueden contener microorganismos patógenos o servir como vehículo de contaminación si la limpieza y sanitización es inadecuada debido en parte a que este microorganismo tiene la capacidad de desarrollar un biofilm en estas superficies (Di Pinto, A., *et al.*, 2010).

La contaminación con *L. monocytogenes* ha sido asociada principalmente al consumo de productos lácteos, carne de res, de cerdo, de aves y mariscos (Beuchat, L. 2002). Sin embargo, los datos sugieren que los vegetales para ensaladas, como el repollo, el apio, lechuga, pepino, cebolla, berros, rábanos, tomates, y el hinojo, entre otros, pueden tener una alta incidencia de *L. monocytogenes*, y algunos de estos productos han sido relacionados con brotes de listeriosis (Thunberg, *et al.*, 2002).

En los últimos 30 años, *L. monocytogenes* se ha convertido en un paradigma para el estudio de las interacciones hospedero/bacteria (Hamon M, Bierne H, Cossart P, 2006). La ecología de *L. monocytogenes* es compleja y esta bacteria tiene la sorprendente habilidad de cambiar de saprofitismo, que es cuando obtiene su energía de materia orgánica muerta o detritos desechados por otros organismos en el medio ambiente, a vivir dentro del hospedero (Gray MJ, *et al.*, 2006). Durante la vida saprofita se encuentra en los alimentos y en el ambiente del procesamiento de los mismos, granjas lecheras, heces de los animales y en humanos portadores asintomáticos. Los ambientes naturales en los que se puede detectar *L. monocytogenes* incluyen sistemas de agua, vegetación y suelo. Los suelos son un reservorio importante de esta bacteria y un vector de transmisión en agrosistemas y a través de la cadena alimenticia (Piveteau P, *et al.*, 2011).

Esta bacteria está bien adaptada a la vida en el ambiente y en el citosol de células eucariotas hospedadoras (Drevets DA, Bronze MS, 2008). *L. monocytogenes* ha sido aislada de suelos, ensilaje, aguas subterráneas, aguas negras y vegetación (Thevenot D, *et al.*, 2006). Después de la ingestión por una persona susceptible, la bacteria es capaz de hacer la transición a un estado fisiológico que promueve la sobrevivencia y la replicación de la bacteria en las células hospedadoras (Freitag E, *et al.*, 2009).

En base a lo anterior en este trabajo se buscó recopilar datos de cuantificación para estos microorganismos, para poder determinar en qué punto de la cadena de producción existe mayor riesgo, para de esta forma poder tomar medidas preventivas y/o correctivas para disminuir la aparición de brotes infecciosos que afecten al consumidor final.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6. 1. Lugar de estudio

La toma de muestras se realizó en la región de Cadereyta Jiménez, Nuevo León (Figura 1).

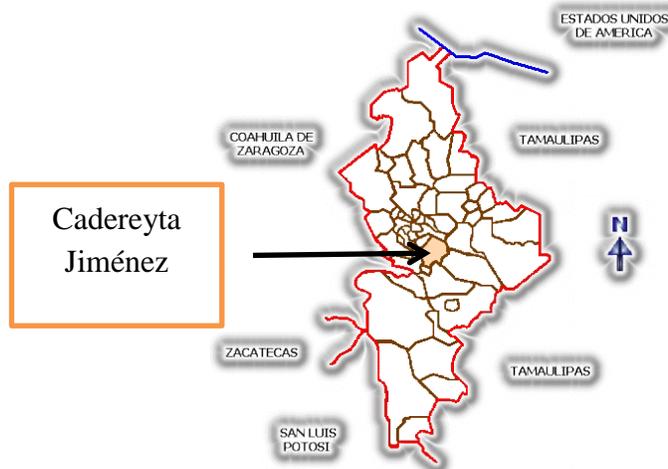


Figura 1. Región de Cadereyta Jiménez representada dentro del estado de Nuevo León.

Dicha región se encuentra ubicada en la parte central del estado de Nuevo León a una altura de 360 metros sobre el nivel del mar. Sus límites son: al norte con el municipio de Pesquería, al sur con Santiago, Allende y Montemorelos, al este con General Terán y Los Ramones y al oeste con Juárez. El clima es seco estepario, muy cálido, con temperatura media anual de 23°C. En días de verano alcanza hasta los 44°C y en invierno desciende hasta los -5°C. Las lluvias son más abundantes principalmente en el sur y sureste, registrándose con mayor sucesión de Agosto a Enero; por lo general de Febrero a Mayo ocurren ligeras lloviznas y raras veces aguaceros torrenciales; la precipitación pluvial media anual es de 601 a 800 milímetros (www.inegi.org.mx).

En cuanto al uso potencial del suelo, el área de este municipio está dedicado principalmente a la agricultura con 59,773 hectáreas, le sigue actividades ganaderas con 39,252 hectáreas y solo 288 hectáreas comprenden áreas urbanas (www.cadereyta.gob.mx)

6. 2. Obtención de muestras

El muestreo fue completamente aleatorio, se utilizó una tabla de números al azar para tomar las muestras en campo. Las muestras se tomaron a lo largo de la cadena de producción que incluyó: a nivel de campo, distribución de los productos.

Los tipos de muestras que se manejaron fueron las siguientes:

- Producto: hasta 4 muestras por cadena (en campo antes de la cosecha, en campo después de la cosecha por un trabajador, en la distribución y en el empaque por un trabajador).
- Suelo: una muestra por cadena en el campo.
- Enjuague de manos de manipuladores: hasta 3 muestras por cadena (en campo, distribución y empaque).
- Agua: hasta 2 muestras por cadena, en sitio (manguera que irriga a la planta) y fuente (llave de riego principal).

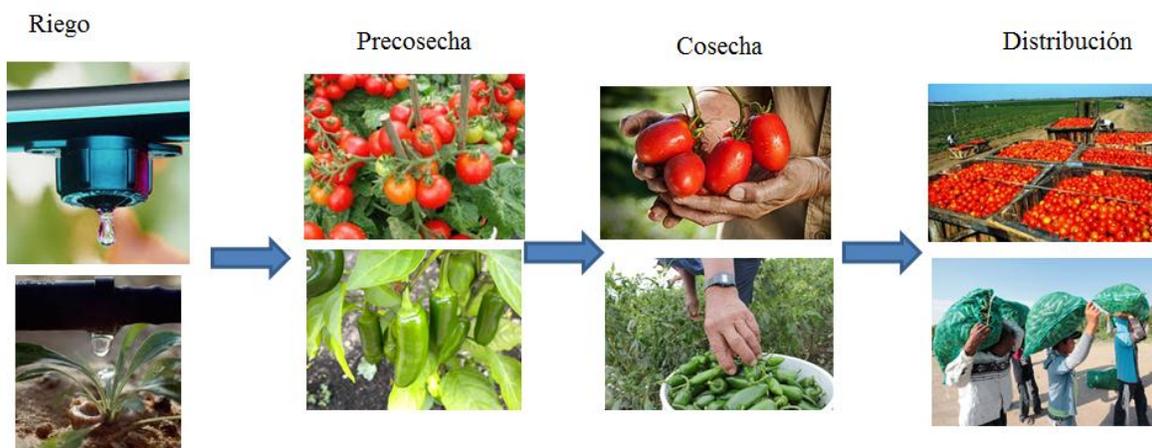
6. 3. Cadena

Se denominó una cadena completa a las muestras compuestas colectadas (procedentes de tres submuestras) de Producto, Suelo, Enjuague de manos y Agua, de precosecha, cosecha y distribución de tomate o jalapeño.

6. 4. Muestras compuestas

Se denominó muestra compuesta a la combinación de los enjuagues de 3 diferentes puntos en la huerta para cada tipo de muestra.

Figura 2. Diagrama de la cadena de producción de chile jalapeño y tomate huaje



6. 5. Producto

Los productos recolectados fueron chiles jalapeños y tomates huaje. Previamente se determinó que el tamaño de la muestra sería de 14 chiles jalapeños y 18 tomates huaje. Estas cantidades representaban la misma superficie.

Para la colecta de cada muestra se tomaron 3 submuestras utilizando para esto la tabla de números aleatorios. Los chiles jalapeños y tomates se colectaron personalmente utilizando guantes de látex en el caso de precosecha y distribución, y se pidió a un trabajador que colectara los mismos en el caso de muestra de cosecha (sin guantes). En todos los casos, estos se colocaron en una bolsa con 500 ml de agua peptonada al 0.1%. Posteriormente la bolsa se cerró y se agitó vigorosamente a fin de arrastrar el material pegado en la superficie del chile jalapeño y/o tomate huaje, por espacio de 30 segundos. Esto se repitió en cada uno de los 3 puntos seleccionados (submuestras), para finalmente realizar la muestra compuesta mezclando los 3 enjuagues y hacer una muestra compuesta.

6. 6. Suelo

Para la toma de muestra de suelo se utilizó el sitio que se había obtenido al azar en el punto anterior correspondiente al producto. Se insertó una cuchara estéril en el suelo a un ángulo de 45° y a una profundidad de 5 cm.

Se colectaron siete muestras de aproximadamente 30 g en un perímetro circular dentro de 30 cm de donde se encontraba la planta de chile jalapeño o de tomate huaje. Esto se hizo en los tres puntos seleccionados, y finalmente las muestras se combinaron para formar una muestra compuesta consistiendo de un mínimo de 100 g de suelo por cadena.

6. 7. Agua

Se analizaron muestras de agua de irrigación la cual se definió como aquella que irriga directamente a la planta y agua de la fuente que se definió como aquella que se utiliza para el riego de toda la huerta. Se utilizaron recipientes estériles para volúmenes de 4 y 5 litros respectivamente.

Para el caso de agua de irrigación, se colectaron tres submuestras, procurando seleccionar el sitio más cercano posible al lugar de muestreo del producto. Para colectar la muestra se sanitizó el área exterior de la manguera, tubería, o llave con una torunda impregnada con hipoclorito de sodio al 10% por espacio de 15 segundos. Se dejó correr el agua por aproximadamente 30 segundos antes de colectar la muestra. Se colectó 1.5 litros de cada punto, y se etiquetó el recipiente y se mantuvo en una hielera con geles fríos. Se combinaron las 3 submuestras de los 3 puntos seleccionados y se obtuvo la muestra compuesta.

Para la muestra de agua de fuente, se sanitizó el área con una torunda impregnada con hipoclorito de sodio al 10%, igualmente se dejó fluir el agua por 30 segundos y colectaron 4.5 litros de un solo punto, y se colocaron en una hielera con geles fríos.

6. 8. Enjuague de manos de los manipuladores

Se seleccionó al empleado de la huerta que se encontraba trabajando en el punto más cercano de donde se colectó el fruto y la muestra de suelo. Se le leyó al empleado el formato de consentimiento informado y si éste otorgó su consentimiento se le solicitó que

se enjuagara ambas manos (una a la vez), en una bolsa con 750 ml de agua peptonada al 0.1%, para lo cual, se abrió la bolsa y el empleado metió una mano en el agua hasta la muñeca y agitó la mano como si las estuviera lavando por 30 segundos, seguido de un masaje por parte del muestreador fuera de la bolsa por otros 30 segundos, asegurándose masajear cada dedo, la palma y la muñeca. El procedimiento fue el mismo para ambas manos.

Una vez que el empleado sacó su mano con cuidado, se le ofreció un papel secante con el que se limpiaría las manos y se le agradeció por su colaboración. Se realizó la mezcla de las 3 submuestras obteniendo de esta manera una muestra compuesta que incluía el enjuague de manos de 3 trabajadores (6 manos en total)

Al final todas las muestras fueron transportadas al laboratorio bajo condiciones de refrigeración y se procesaron en menos de 24 horas de tomada la muestra.

6. 9. Análisis de las muestras

6. 9. 1. Determinación de organismos indicadores

Se realizó mediante un sistema de filtración con vacío (Pall Corporation) y membranas de nitrocelulosa con poro de 0.45 μm (S-PAK, Millipore Corporation).

Cabe mencionar que todas las muestras consistieron en las muestras provenientes de los enjuagues de manos de los manipuladores y de la hortaliza, a excepción de las muestras de suelo, en las cuales se realizó una dilución 1:10 en agua peptonada al 0.1%.

6. 9. 1. 1. *Enterococcus* spp.

Se filtraron volúmenes de cada muestra (suelo, producto y enjuague de manos), a través de un sistema de filtración. Los volúmenes filtrados fueron 10 μl , 100 μl , 1 ml y 10 ml. Para el caso de las muestras de agua los volúmenes fueron de: 10 ml, 100 ml y 250 ml, para lograr una mayor concentración de microorganismos debido a que en agua los niveles de estos microorganismos generalmente son bajos.

Para el caso cuando se filtraron volúmenes muy pequeños (10 µl) el procedimiento consistió en colocar la membrana estéril en el embudo y cerrar el vacío. Posteriormente se añadieron sobre la membrana 10 ml de agua peptonada estéril (al 0.1%) y sobre esta se agregaron los volúmenes de muestra distribuyéndola homogéneamente, posteriormente se abrió el vacío y se dejó filtrar la muestra.

Una vez finalizado todo el volumen, las membranas se retiraron del sistema de filtración con ayuda de pinzas estériles, se colocaron sobre la superficie de un agar KF *Streptococcus* (BD) y se incubaron a 37°C por 48 h.

Pasado el tiempo de incubación se seleccionaron las colonias características de *Enterococcus* en este agar las cuales son de color café a marrón y se realizó su cuantificación. Todos los ensayos se realizaron por duplicado

6. 9. 1. 2. *Escherichia coli* y Coliformes fecales

En este caso se filtraron volúmenes de cada muestra (suelo, producto y enjuague de manos) de 100 µl, 1 ml, 10 ml y 50 ml. Para el caso de muestras de agua los volúmenes filtrados fueron de 10 ml, 100 ml y 250 ml.

Se repitió el procedimiento especificado en el punto anterior, con la diferencia de que la membrana se colocó sobre una placa de Petri con agar Rapid *E. coli* 2 (BIO-RAD) y se incubaron a 44.5°C por 24 h. Pasado el tiempo de incubación se cuantificaron las colonias, para lo cual las de color morado correspondieron a *E. coli*, ya que el medio contiene un sustrato cromogénico que al estar en contacto con la enzima β-D-Glucuronidasa presente en *E. coli*, produce la coloración morada. En tanto que las de color azul a verdes junto con las colonias moradas se consideraron coliformes fecales. Todos los ensayos se llevaron a cabo por duplicado.

6. 9. 2. Determinación de patógenos

Enriquecimiento general.

Este se utilizó para la detección de *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *E. coli* STEC y *L. monocytogenes*. Un volumen de 300 ml de la muestra compuesta, fue pre-filtrada a través de papel filtro estéril (Whatman No. 1) con ayuda de un matraz Kitazato y una bomba de vacío, el líquido filtrado fue refiltrado a través de una membrana de filtración con poro de 0.45 µm.

Tanto el papel filtro como la membrana de filtración se introdujeron a una bolsa con 90 ml de caldo de enriquecimiento universal (DIFCO) y se incubaron a 37°C por 24 h para *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y STEC y en caldo LEB (DIFCO) a 30°C por 48 h para *Listeria monocytogenes*.

6. 9. 2. 1. *Escherichia coli* O157:H7

Para determinar *E. coli* O157:H7 se tomó una asada del caldo de enriquecimiento universal y se sembró en el agar selectivo cromogénico *E. coli* O157:H7 (DIBICO) y las placas se incubaron a 37°C por 24 h. Las colonias presuntivas de *E. coli* O157:H7 (colonias azules y sin fluorescencia con luz UV a una longitud de onda de 365 nm visualizados con una lámpara de luz UV marca Entela) se conservaron en tubos con agar cerebro corazón (ICC, Bioxon) en pico de flauta para su posterior identificación por PCR.

6. 9. 2. 2. *Escherichia coli* productora de toxina Shiga

Para determinar las *E. coli* STEC se tomó una asada del caldo de enriquecimiento universal y se sembró en el agar cromogénico TBX (OXOID) para aislar colonias presuntivas, las cuales son verdes y redondas en dicho agar y se incubaron a 37°C por 24 h.

Dichas colonias fueron seleccionadas como *E. coli* y se almacenaron a 4°C en agar ICC inclinado para una posterior identificación y tipificación por PCR.

6. 9. 2. 3. *Salmonella* spp.

Para determinar *Salmonella* se tomó una asada del caldo de enriquecimiento universal y se sembró en los agares selectivos Sulfito de Bismuto (SB) y Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) y se incubaron a 37°C por 24 h. Pasado el tiempo de incubación se seleccionaron las colonias presuntivas de dichos agares, (para SB cafés, grises o negras con o sin brillo metálico, generalmente el halo es café, tornándose posteriormente a negro y algunas cepas producen colonias verdes sin la formación de halo oscuro, en tanto que en XLD son colonias rosas o rojas, que pueden ser transparentes con o sin centro negro, aunque también pueden aparecer completamente negras).

Las colonias presuntivas se almacenaron a 4°C en agar ICC en agar inclinado para su posterior identificación por PCR.

6. 9. 2. 4. *Listeria monocytogenes*

Para determinar *L. monocytogenes* se tomó una asada del caldo LEB y se sembró en el agar selectivo Oxford (Difco) y las placas se incubaron a 30°C por 24-48 h. Se seleccionaron las colonias presuntivas (café a negras, planas o cóncavas, que provocaron un viraje de color en el medio de cultivo de amarillo a negro, debido a la hidrólisis de la esculina) y se almacenaron a 4°C en tubos con agar ICC inclinado para su posterior identificación por PCR.

6. 10. Confirmación de cepas presuntivas para *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, STEC y *L. monocytogenes* mediante PCR

Para la confirmación de las cepas de *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, STEC y *L. monocytogenes*, se siguió la metodología propuesta por Wang and Cerniglia (Wang *et al.*, 1997) que consistió en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), donde se utilizaron oligonucleótidos para realizar la amplificación del gen *invA* para *Salmonella*, el gen *eaeA*, y el EHEC *hly* para *E. coli* O157:H7, el gen *stx1* y *stx2* para STEC y el gen *hly* para *L. monocytogenes*, cuyos oligonucleótidos, secuencias y el tamaño del fragmento amplificado se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de diversas bacterias patógenas mediante la técnica de PCR.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Tamaño del producto (bases)	Referencia
EHEC <i>hly</i>	Fwr- ACGATGTGGTTTATTCTGGA Rev- CTTACACGTGACCATACATAT	165	Fagan, <i>et al.</i> , 1999
<i>stx₁</i>	Fwr- ACACTGGATGATCTCAGTGG Rev- CTGAATCCCCCTCCATTATG	614	
<i>stx₂</i>	Fwr- CCATGACAACGGACAGCAGTT Rev- CCTGTCAACTGAGCAGCACTTTG	779	
<i>eaeA</i>	Fwr- GTGGCGAATACTGGCGAGACT Rev- CCCCATTTCTTTTTTCACCGTCG	890	
<i>invA</i>	Fwr- TATCGCCACGTTTCGGGCAA Rev- TCGCACCGTCAAAGGAACC	275	Wang, <i>et al.</i> , 1997
<i>hly</i>	Fwr- CGGAGGTTCCGCAAAAAGATG Rev- CCTCCAGAGTGATCGATGTT	234	

6. 11. Cepas de referencia

Se utilizaron cepas de referencia como controles positivos, los cuales comprendieron a *E. coli* O157:H7 ATCC 43895, *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *L. monocytogenes* ATCC 19114

6. 12. Extracción de DNA

De las cepas que se aislaron, así como de las que se usaron de referencia se tomó una asada y se inocularon en tubos con 5 ml de caldo soya tripticasa con extracto de levadura al 0.6% (CSTEL). Posteriormente se incubaron a 37°C por 24 h. Pasado el tiempo de incubación, se tomó una alícuota de 0.5 ml y se homogenizó con 1 ml de amortiguador salino fosfatado (PBS, 0.05 M a pH 7,4). Se centrifugó a 9000 x g por 3 min en una microcentrifuga (Eppendorf modelo 5415 C) y el precipitado se lavó dos veces más con PBS. Finalmente se

lavó una vez con agua ultrapura (miliQ). El precipitado se resuspendió con 50 µl de agua miliQ. Se diluyó 1:10 con Triton X-100 al 1% (SIGMA). Esta mezcla se sometió a ebullición por 5 minutos, e inmediatamente después se enfrió en baño de hielo. Finalmente se utilizaron 2 µl como templado para realizar la amplificación.

6. 13. Condiciones de amplificación

A los 2 µl del DNA extraído se le adicionó 23 µl de la mezcla de reacción que contenía 50 mmol/l Tris-HCl (pH 8.5), 0.20 mmol/l KCl, 3 mmol/l MgCl₂, 0.25 mmol/l de cada uno de los 4 desoxirribunucleótidos (dATP, dGTP, dTTP y dCTP), 0.25 µmol/l de cada oligonucleótido (Tabla 2) y 0.9 U de Taq polimerasa. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (TermoHybaid) usando el protocolo reportado por Wang *et al.* en 1997 que consistió en un ciclo de 94 °C por 15 segundos, 35 ciclos de 94 °C por 3 segundos, 50 °C por 10 segundos y 74 °C por 35 segundos y un ciclo final de 74 °C por 2 minutos y 45 °C por 2 segundos

6. 14. Visualización

Los productos de la amplificación (10 µl de cada uno) fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2% con una corriente de 120 V, y finalmente teñidos con bromuro de etidio (50 µg/ml) para ser visualizados bajo luz UV de un transiluminador (Uvitec modelo STS-20WL)

VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se llevó a cabo la determinación de los niveles medios y la prevalencia de los indicadores y agentes patógenos en las muestras de chile jalapeño y tomate, así como en las correspondientes muestras ambientales. Además, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de diferencia de medias estadísticas (DMS) con el uso del programa SPSS Statistics 17.0.

VIII. RESULTADOS

Se colectaron un total de 117 muestras compuestas, que correspondieron a 341 muestras durante la etapa de cosecha del año 2012 (Abril y Diciembre). Los tipos de muestra compuestas colectadas incluyeron agua de fuente (5), agua de irrigación (16), enjuague de manos durante la cosecha (16), enjuague de manos en la distribución (16), enjuague de producto en cosecha (16), enjuague de producto en distribución (16), enjuague de producto en precosecha (16) y suelo (16). En la tabla 5 se muestra el número de muestras compuestas recolectadas, que corresponden a cada tipo de muestras. Las 117 muestras fueron colectadas de 4 diferentes huertas de la región de Cadereyta Jiménez, Nuevo León.

Tabla 4. Número de muestras compuestas correspondientes a cada tipo de muestra.

Tipo de muestra	Numero de muestras compuestas de producción de tomate	Numero de muestras compuestas de producción de chile jalapeño
Agua de fuente	2*	3*
Agua de irrigación	9	7
Manos cosecha	9	7
Manos distribución	9	7
Producto precosecha	9	7
Producto cosecha	9	7
Producto distribución	9	7
Suelo	9	7
Cadenas en total	9	7

*En este caso el agua de fuente se compartía en diversas cadenas.

8. 1. Muestras de la cadena de producción de chile jalapeño.

8. 1. 1. *Enterococcus* spp.

Encontramos que al realizar el análisis estadístico de las muestras analizadas la distribución de *Enterococcus* spp. entre las muestras fue diferente. Cuando analizamos la diferencia de medias estadísticas (DMS), se determinó que las muestras provenientes de agua de fuente presentaron diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) con las muestras de manos (cosecha y distribución) así como con las muestras de producto en las etapas de cosecha, distribución y precosecha, aunque no presentaron diferencia significativa ($p > 0.05$) con respecto a las muestras de agua irrigación y suelo.

Las muestras de agua entre sí no mostraron diferencia significativa ($p \leq 0.05$), sin embargo, las muestras correspondientes a manos en cosecha y distribución fueron diferentes significativamente ($p \leq 0.05$) contra el resto de las muestras. Las muestras de producto en la cosecha mostraron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) únicamente con las muestras de agua de fuente e irrigación. Específicamente las muestras de suelo presentaron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con las muestras de agua de irrigación, manos en cosecha, manos en distribución, producto en cosecha y producto en distribución, no así con las muestras de agua de fuente y producto en precosecha.

Con respecto a las cuentas de *Enterococcus* en estas muestras en general se observaron rangos que fueron desde < 1 log UFC (o niveles no detectables) hasta 9.9 log UFC (tomando en cuenta que el *límite* de detección mínimo entre todas las muestras es de 0.4 UFC). Las muestras donde hubo mayor concentración y distribución de *Enterococcus* fueron las de manos (en cosecha y en distribución) con rangos de 3.7 hasta 9.9 log UFC/muestra, así como en los productos (en precosecha, cosecha y distribución) con rangos de 1.9 hasta 7.9 log UFC/muestra. Las muestras en las que hubo menos concentración de estas bacterias fueron las muestras de agua donde hubo rangos de < 1 log UFC hasta 1.4 log UFC (Figura 3).

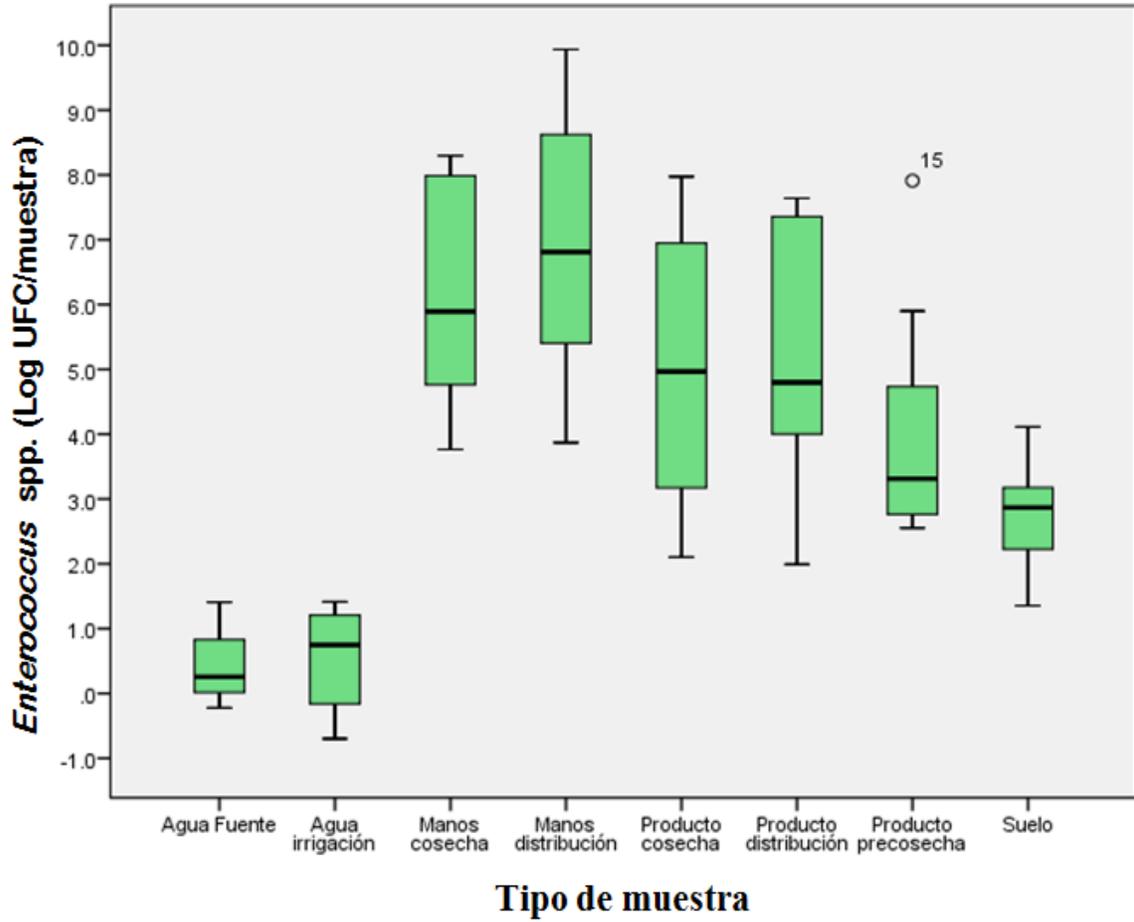


Figura 3. Concentración de *Enterococcus* spp. en los diferentes tipos de muestras en la cadena de producción de chile jalapeño.

8. 1. 2. *E. coli*

Con respecto a la concentración de *E. coli* como indicador de contaminación, encontramos al realizar el análisis estadístico que la distribución de este microorganismo (Figura 4) entre las muestras fue diferente. Cuando analizamos la diferencia de medias estadísticas (DMS), se determinó que las muestras provenientes de manos en la cosecha presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) con las muestras de agua de fuente, agua de irrigación, manos en distribución, producto en cosecha, producto en distribución, producto en precosecha y suelo. Esto mismo ocurrió al analizarse los datos de manos en distribución. Para el caso de agua de fuente, se encontró que existe diferencia significativa ($P \leq 0.05$) al compararse con las muestras de manos en cosecha, manos en distribución y suelo, y no se presentó diferencia significativa ($p > 0.05$) con las muestras de producto ya sea en cosecha, en distribución y en precosecha. Las muestras de agua de irrigación presentaron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con las muestras de manos (en cosecha y en distribución), productos (en cosecha, en distribución y en precosecha) así como con el suelo; las muestras de agua de irrigación no presentaron diferencia significativa ($p > 0.05$) con las muestras de agua de fuente. Las muestras de suelo no presentaron diferencia significativa ($p > 0.05$) con las muestras de producto en las etapas de cosecha, de distribución y en precosecha.

Con respecto a las cuentas de *E. coli* en cada muestra en general encontramos valores que fueron desde < 1 log UFC hasta 4.2 log UFC/muestra, tomando en cuenta que el límite de detección mínimo entre todas las muestras es de 0.4 UFC. La mayor variación se encontró en las muestras de manos durante la cosecha, donde hubo rangos desde 0.8 a 4.2 log UFC/muestra. Los valores medios para este microorganismo se encontraron en 0.6 log UFC/muestra. Las muestras con cuentas menores de *E. coli* fueron generalmente las muestras de agua tanto de fuente como de irrigación.

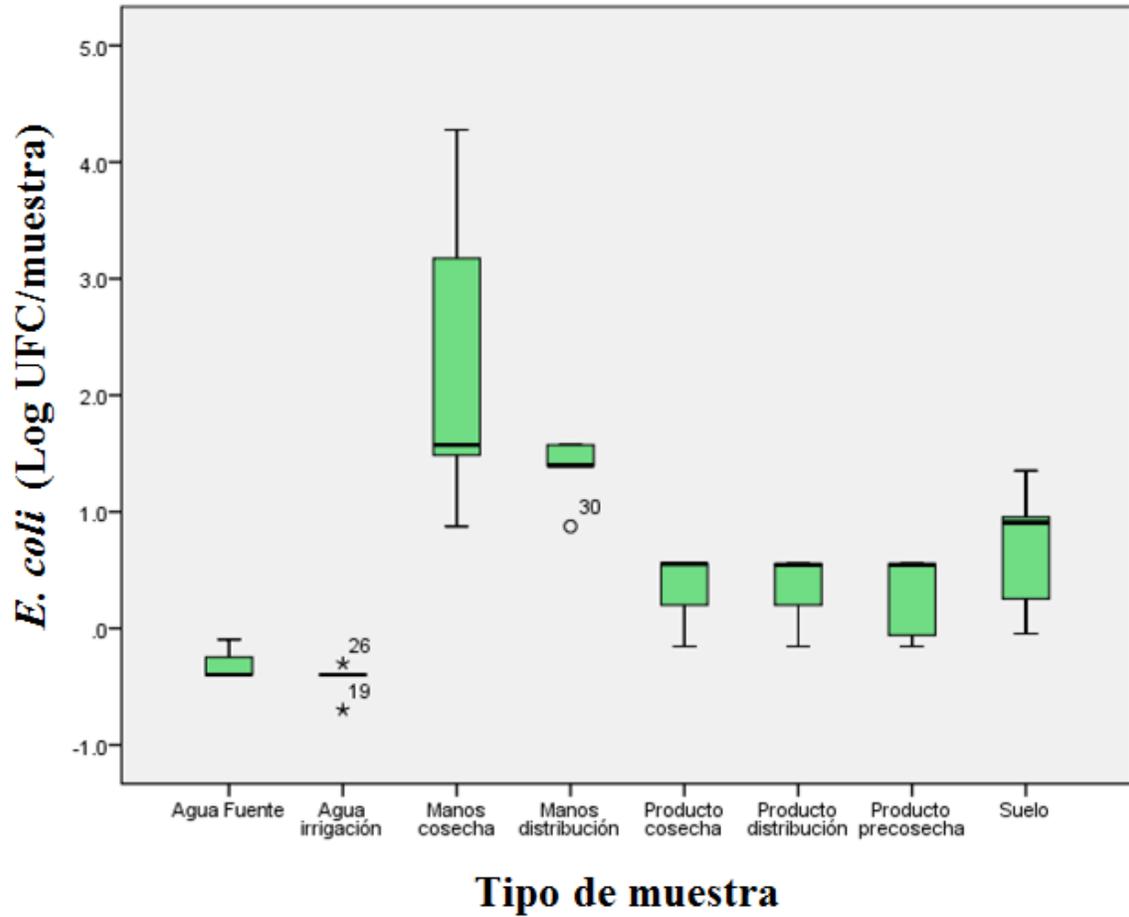


Figura 4. Concentración de *E. coli* en los diferentes tipos de muestras de la cadena de producción de chile jalapeño.

8. 1. 3. Coliformes fecales

Dentro de los microorganismos indicadores que analizamos, se incluyeron a los coliformes fecales. Para este caso al realizar el análisis estadístico se observó que la distribución de la cuenta de estos microorganismos entre las muestras también fue diferente (figura 5). Cuando analizamos la diferencia de medias estadísticas (DMS), se determinó que las muestras provenientes de las manos de cosecha no presentaron diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$) con las muestras de manos durante la distribución, y en producto ya sea en cosecha, en distribución y en precosecha; en tanto que entre las muestras de agua de fuente e irrigación sí se presentó diferencia estadísticamente significativa al ser comparadas con las manos en cosecha ($p \leq 0.05$). Al realizar el análisis de este tipo de agua contra el resto de las muestras sí se encontró diferencia significativa entre ellas ($P < 0.05$).

Dentro de todos los valores de cuentas de coliformes fecales encontrados, hubo un límite mínimo < 1 log UFC y un máximo de 10.1 log UFC/muestra. La media de las muestras de manos fue de 6.2 log UFC/mano y en producto se encontró en 5.3 log UFC/muestra, en tanto que para las muestras de agua fue de 1.3 log UFC/muestra.

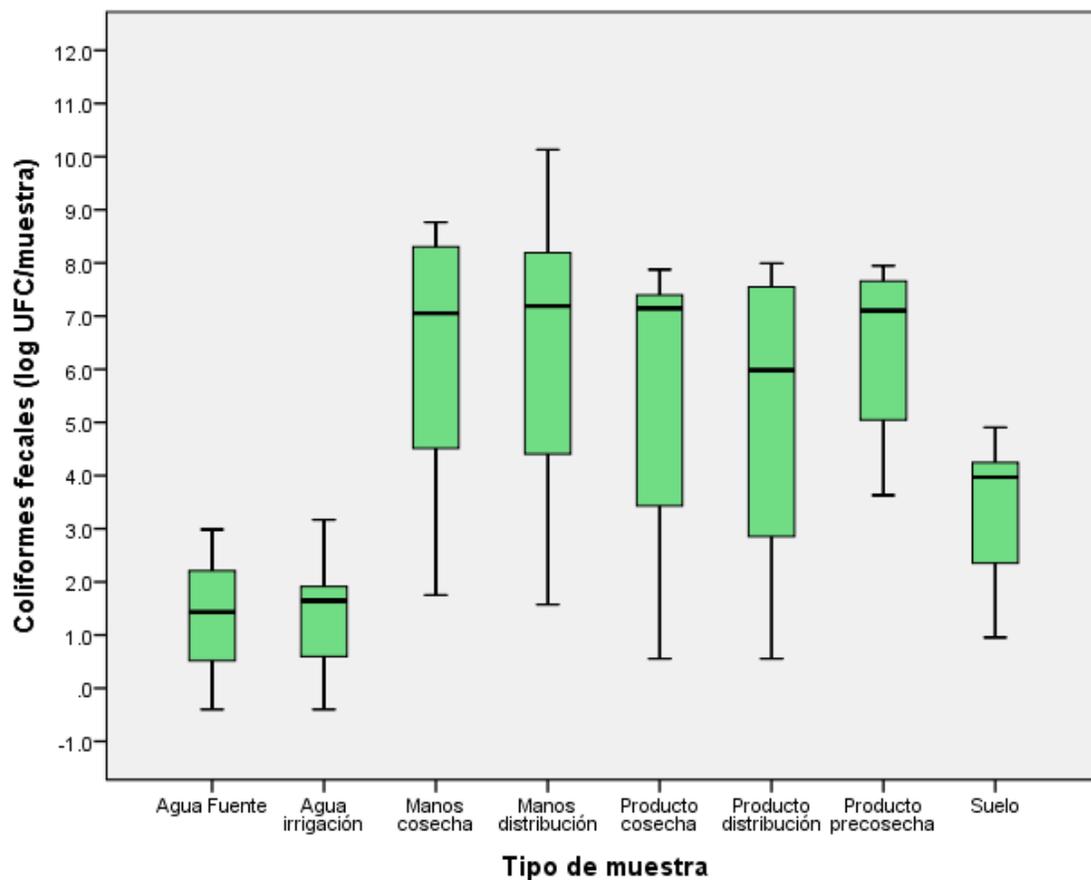


Figura 5. Concentración de coliformes fecales en los diferentes tipos de muestras de la cadena de producción de chile jalapeño.

8. 2. Niveles de microorganismos en la cadena de producción de tomate huaje.

8. 2. 1. *Enterococcus* spp.

Con respecto a la distribución de la concentración de *Enterococcus* en las muestras de tomate, al realizar el análisis estadístico encontramos que todas las muestras colectadas en la cadena de producción del tomate huaje fue diferente (Figura 6).

Cuando analizamos la diferencia de medias estadísticas (DMS), se determinó que las muestras provenientes del agua de fuente e irrigación no mostraron diferencia significativa ($P > 0.05$) entre ellas, sin embargo, sí mostraron diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con el resto del tipo de muestras. Con respecto a las muestras de manos (en cosecha y en distribución) no se presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre ellas, no así con el resto de las muestras. Las muestras de producto en cosecha sólo mostraron diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con las muestras de agua de fuente, agua de irrigación y suelo. Las muestras de producto (en distribución y en precosecha) mostraron diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con las muestras de agua, manos y suelo. Finalmente las muestras de suelo mostraron diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con todos los otros tipos de muestras analizadas.

En este caso las muestras que presentaron rangos más elevados de *Enterococcus* fueron manos (en distribución y en cosecha) desde 3.7 hasta 9 log UFC/muestra, y producto (en precosecha, cosecha y en distribución) con valores desde 2.6 hasta 8.7 log UFC/muestra. Los niveles más bajos se encontraron en las muestras de agua (de fuente y de irrigación) con valores de < 1 log UFC a 1.9 log UFC/muestra.

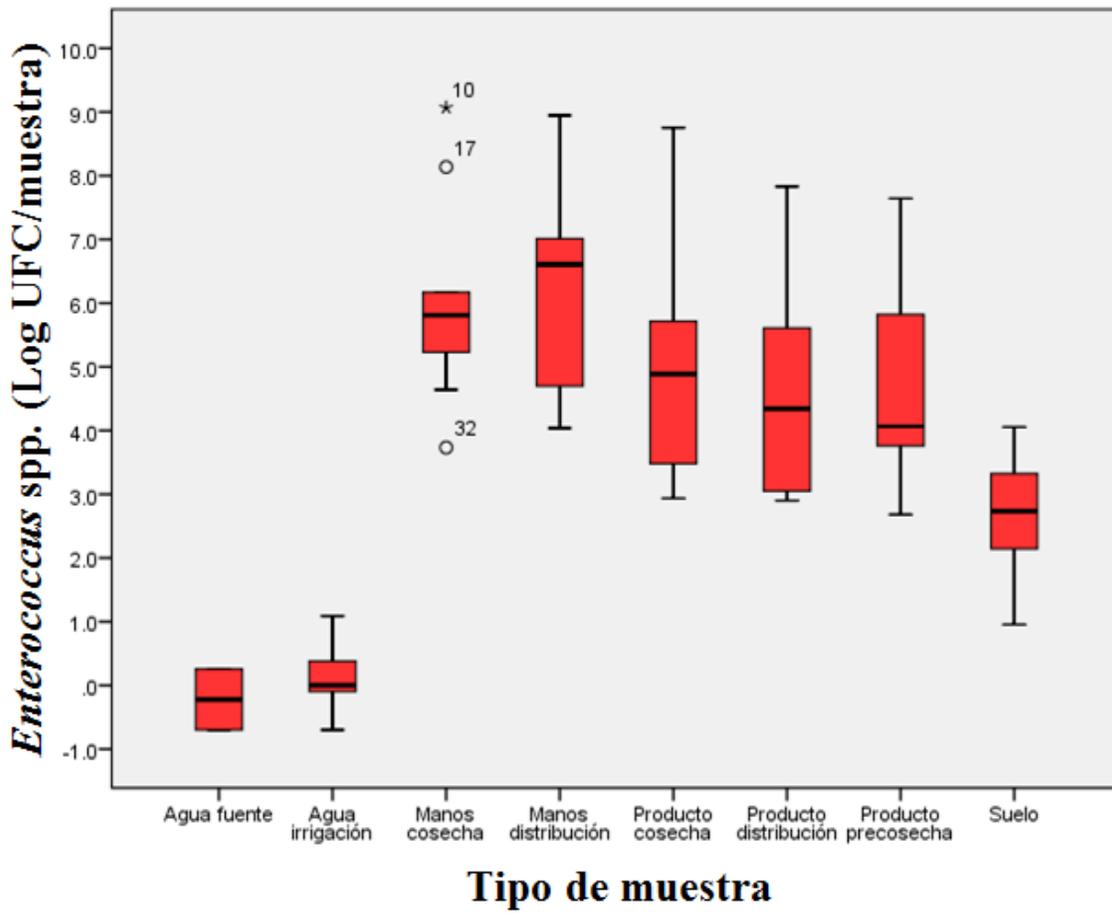


Figura 6. Concentración de *Enterococcus* spp. en los diferentes tipos de muestras de la cadena de producción de tomate huaje.

8. 2. 2. *E. coli*

Para el caso de *E. coli* al realizar el análisis estadístico se observó que su distribución entre las muestras de la cadena de producción de tomate huaje también fue diferente (Figura 7). Cuando analizamos la diferencia de medias estadísticas, se determinó que las muestras provenientes de agua de fuente mostraron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con las muestras de agua de irrigación y de manos (en cosecha y en distribución), mas no presentaron diferencia significativa ($P > 0.05$) con las muestras de producto (en cosecha, distribución y en precosecha) y suelo.

Las muestras de agua de irrigación sólo mostraron diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con las muestras de manos en cosecha y manos en distribución, así como agua de fuente. Las muestras de manos en cosecha y manos en distribución fueron estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$) de las muestras de agua (de fuente y de irrigación), producto (en cosecha, distribución y en precosecha) y de suelo. Todas las muestras de producto (en cosecha, distribución y en precosecha) y suelo mostraron diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con las muestras de manos (en cosecha y en distribución).

Dentro de las cuentas de este microorganismo podemos destacar cuentas desde < 1 log UFC hasta 6.3 log UFC/muestra en general, sin embargo, las muestras con cuentas mayores (de 0.4 a 6.3 log UFC/muestra) fueron las muestras de manos ya sea en cosecha o en distribución.

Por otro lado las muestras de agua (de fuente y de irrigación) fueron las que menor concentración de *E. coli* tuvieron, siendo los rangos de < 1 log UFC a 1.3 log UFC/muestra.

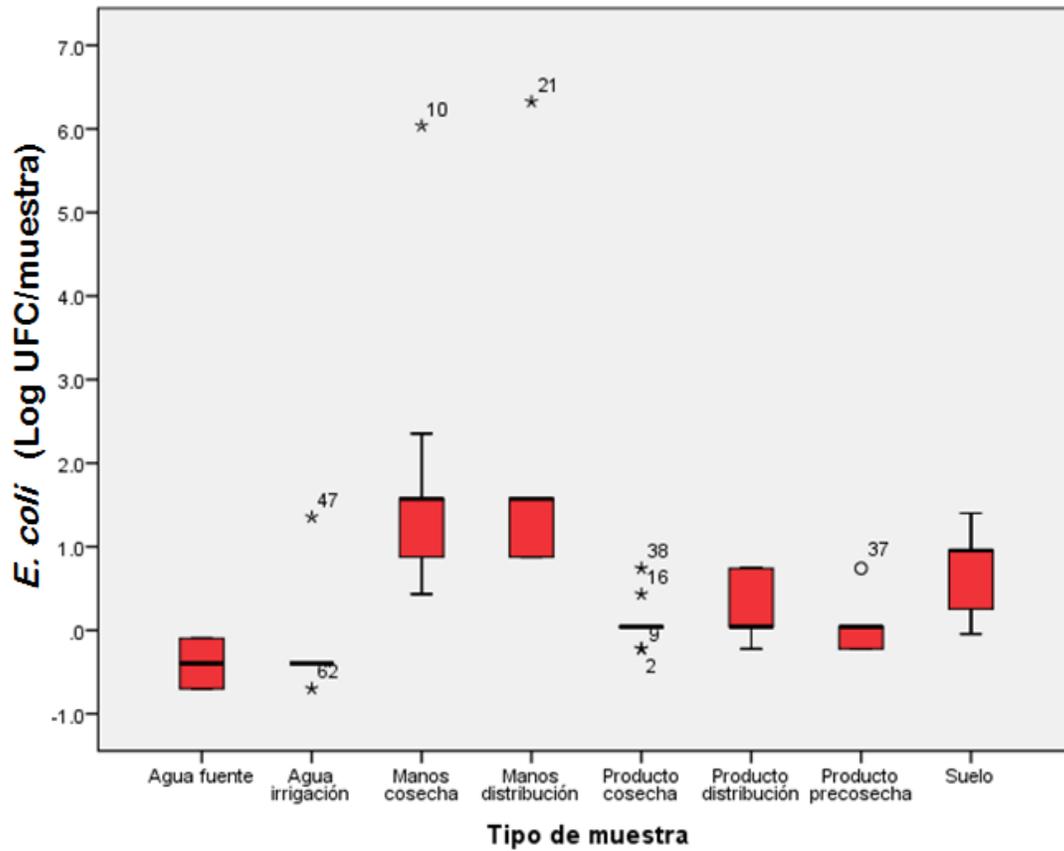


Figura 7. Concentración de *E. coli* en los diferentes tipos de muestras de la cadena de producción de tomate huaje.

8. 2. 3. Coliformes fecales.

Encontramos mediante un análisis estadístico que la distribución de las cuentas entre las muestras obtenidas en la cadena de producción de tomate fue diferente (Figura 8). Cuando analizamos la DMS, se determinó que las muestras procedentes de agua de fuente presentaron diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$) con el resto del tipo de muestras a excepción de las muestras de agua de irrigación, con la cual no existió diferencia significativa ($P > 0.05$).

En cuanto a las muestras de manipuladores observamos que las muestras de manos en cosecha y en distribución no presentaron diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$) entre ellas ni con las muestras de producto ya sea en cosecha, en distribución y en precosecha, aunque sí tuvieron diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con las muestras de agua de fuente, agua de irrigación y suelo.

Entre las muestras de productos (en cosecha, distribución y en precosecha) no hubo diferencia significativa ($P > 0.05$) con las muestras de manos (en cosecha y en distribución), sin embargo, sí mostraron diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con las muestras de agua (de fuente y de irrigación) así como de suelo. Cabe mencionar que las muestras de suelo fueron diferentes significativamente ($P \leq 0.05$) con el resto de tipo de muestras analizadas.

Con respecto a la concentración en general de coliformes fecales en todas las muestras encontramos que la mayor distribución se albergó en muestras tanto de manos (en cosecha y en distribución) con cuentas desde 4 hasta 9.6 log UFC/muestra, así como en producto (en precosecha, cosecha y en distribución) con cuentas desde 3.1 hasta 8 log UFC/muestra.

Las muestras con menor concentración de coliformes fecales fueron las aguas donde la concentración fue de < 1 log UFC a 2.8 log UFC/muestra.

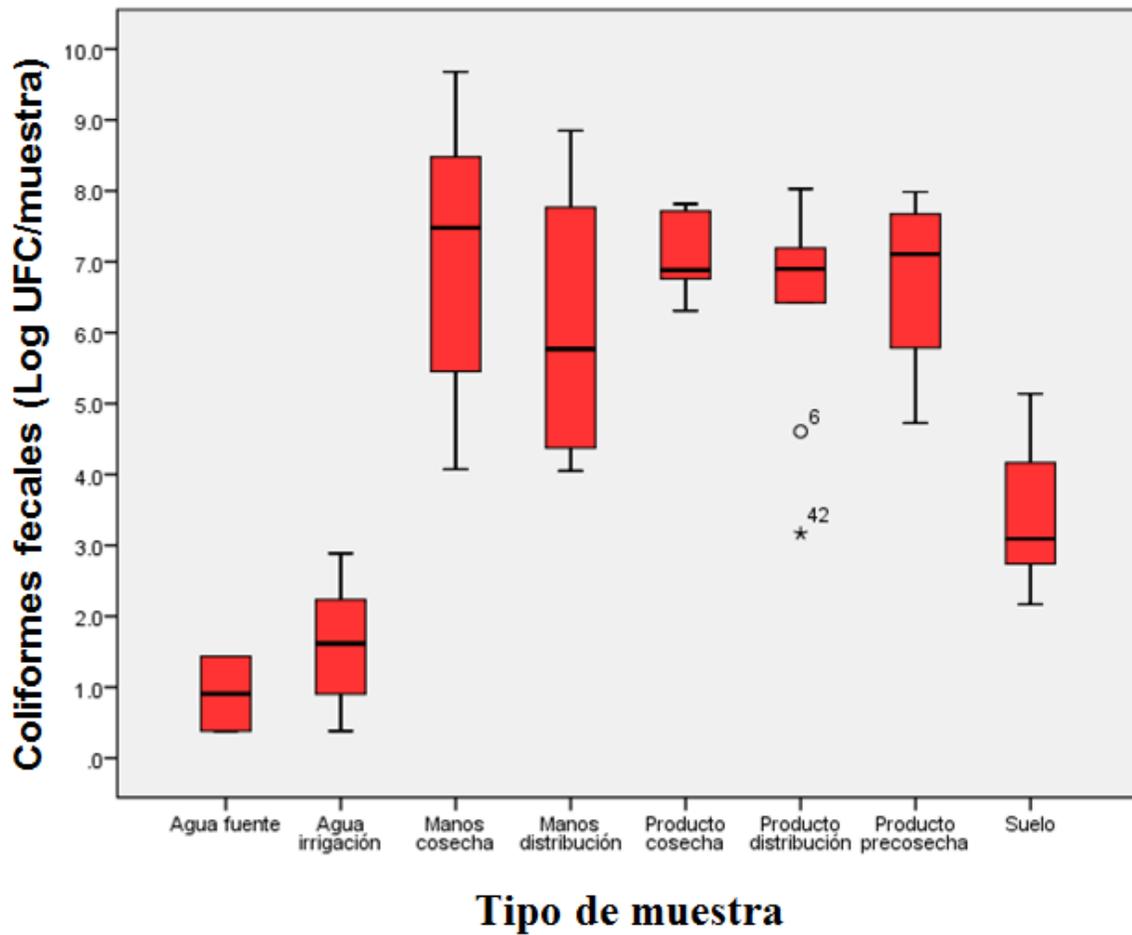


Figura 8. Concentración de coliformes fecales en los diferentes tipos de muestras en la cadena de producción de tomate huaje.

8. 3. PATÓGENOS

8. 3. 1. *Escherichia coli*.

De las 117 muestras compuestas analizadas se logró aislar presuntivamente a *E. coli* en 16 de ellas representando el 13.6% de las muestras compuestas totales, de acuerdo a su morfología colonial (moradas y redondas). Estos 16 aislados de *E. coli* correspondieron a 10 muestras de la cadena de producción de tomate (agua de irrigación [3], agua de fuente [2], manos en cosecha [3], manos en distribución [1] y suelo [1]). Las muestras restantes (6) provenían de la cadena de producción de chile jalapeño (manos en cosecha [2], producto en precosecha [1], agua de fuente [1], agua de irrigación [1] y suelo [1]).

Así mismo se buscó la presencia de *E. coli* O157:H7 mediante el uso del agar selectivo *E. coli* O157:H7 en donde las colonias características son verdosas, sin precipitado y sin fluorescencia al observarse bajo luz UV a una longitud de onda de 365nm. De estas placas se aislaron 6 cepas presuntivas correspondientes a una muestra de producto en precosecha y agua de irrigación de la cadena de producción de tomate y las otras cuatro correspondieron a la cadena de producción de chile jalapeño (manos en cosecha, manos en distribución, producto en precosecha y producto en cosecha). Estas cepas fueron sometidas a confirmación mediante una PCR analizando la presencia de los genes de la enterohemolisina (*hly*) y la intimina (*eae*). Este análisis arrojó que ambas cepas eran negativas, por lo que no se consideraron *E. coli* O157:H7.

También en este trabajo analizamos la presencia de *E. coli* productoras de la toxina Shiga (STEC). Para esto el agar selectivo seleccionado fue el TBX, en donde se buscó la presencia de colonias azul-verdosas al incubarse a 37°C. En este caso se obtuvieron 31 aislados presuntivos, correspondiendo 19 a la cadena de producción de tomate (5 muestras de manos en cosecha, 4 muestras de manos en distribución, 2 muestras de producto en precosecha, 2 muestras de producto en precosecha, 2 muestras de agua de fuente, 3 muestras de agua irrigación y 1 muestra de suelo), en tanto que las 12 restantes provenían de la cadena de producción de chile jalapeño (manos en cosecha, producto en distribución, suelo, agua de irrigación, agua de fuente, manos en distribución, producto en precosecha y producto en cosecha, 2, 2, 2, 2, 2, 1, 1, 1, respectivamente). Dichos aislados presuntivos

fueron sometidos a confirmación por PCR para la búsqueda de los genes característicos de la Shiga toxina 1 y 2 (stx1 y stx2 respectivamente), sin embargo, resultaron negativos para estos genes.

8. 3. 2. *Salmonella*.

De las 117 muestras compuestas analizadas se logró aislar colonias presuntivas en base a su morfología para *Salmonella* spp. de 13 de ellas, representando el 11.1% del total de las muestras. Estos aislados correspondieron a 6 muestras de la cadena de producción de tomate huaje (2 muestras de producto en distribución, 1 muestra de producto en cosecha, 1 muestra de manos en distribución, 1 muestra de agua de fuente y 1 muestra de agua de irrigación) y las 7 restantes provenían de la cadena de producción de chile jalapeño (2 muestras de agua de irrigación, 1 muestra de agua de fuente, 1 muestra de producto en precosecha, 1 muestra de producto en distribución, 1 muestra de manos en distribución y 1 muestra de suelo). Estos aislados fueron sometidos a confirmación mediante una PCR buscando el gen *invA* característico de este patógeno, para el cual todos los aislados fueron negativos.

8. 3. 3. *Listeria monocytogenes*.

De las 117 muestras compuestas analizadas se logró aislar cepas presuntivas de acuerdo a su morfología colonial para *L. monocytogenes* de 4 de ellas, representando el 3.4% del total de las muestras. Estos aislados correspondieron a 2 muestras de la cadena de producción de tomate huaje (1 muestra de manos en cosecha y 1 muestra de producto en cosecha) y las 2 restantes provenían de la cadena de producción de chile jalapeño (1 muestra de producto en cosecha y 1 muestra de producto en precosecha). Estos aislados fueron sometidos a confirmación mediante una PCR buscando el gen *hly* característico de este patógeno, para el cual todos los aislados fueron negativos.

IX. DISCUSIÓN

9. 1. Microorganismos indicadores

De las 117 muestras compuestas que fueron analizadas pertenecientes a la cadena de producción de chile jalapeño y tomate huaje, todas presentaron cuentas para *Enterococcus* spp. en un rango de 0.3 a 6.9 log UFC/muestra (entiéndase como las cuentas presente en un chile, un tomate, una mano, gramo de suelo o 100 ml H₂O), sin embargo, las cuentas más elevadas fueron en las muestras correspondientes a manos en cosecha y manos en distribución para ambos productos con valores medios de 6.2 a 6.9 log UFC/mano, lo cual concuerda con reportes realizados recientemente realizados por Molina-Loya y Cardenas-Cardenas en el 2012.

Enterococcus spp. ha sido aislado de diversos vegetales y frutas y específicamente de tomates adquiridos en mercados (Abriouel *et al.*, 2008; McGowan *et al.*, 2006; McGowan-Spicer *et al.*, 2008), así mismo en melón y hojas de mostaza en las que se determinaron niveles que iban desde 1.3 hasta 4.3 log UFC/g (Johnston *et al.*, 2005).

Recientemente Molina-Loya (2012), encontró niveles de 10²-10³ UFC/ml de *Enterococcus* durante la cosecha de chile jalapeño, específicamente en el enjuague de producto, así como niveles de 10³-10⁴ UFC/ml para las muestras de manos de los manipuladores.

En ese mismo año Cardenas-Cardenas reportó cuentas de *Enterococcus* con valores de 73.75 UFC/g (suelo), 251.25 UFC/ml (producto en precosecha), 68139.67 UFC/ml (manos durante la cosecha), 10193.67 UFC/ml (producto en cosecha), 5157.53 UFC/ml (producto en distribución), 78949.80 UFC/ml (manos durante la distribución), 403.68 UFC/ml (agua de fuente), y 0.1908 UFC/ml (agua de sitio), para la cadena de producción de tomate.

La presencia elevada de estos microorganismos en los productos indica que existe cierto grado de contaminación en los mismos, lo cual puede indicar un riesgo para desencadenar una infección en el consumidor final en caso de que junto con esta carga microbiana haya microorganismos patógenos. Además, al ser considerado como un microorganismo

indicador, los niveles elevados pueden llegar a ser relacionados con la presencia de microorganismos patógenos, los cuales pudieran llegar a causar algún brote infeccioso.

E. coli se encontró únicamente en 16 (13.6%) de las muestras de la cadena de producción de chile jalapeño y tomate huaje. Los rangos en los que se encontraron fueron desde 0.5 hasta 1.6 log UFC/muestra, sin embargo las muestras con valores más elevados fueron las muestras de manos en cosecha y en distribución (2.2 y 1.7 log UFC/muestra respectivamente) para ambos productos.

Estudios previos han reportado la presencia de este microorganismo en otros puntos de la cadena de producción, tal es el caso de Forslund *et al.* (2012) quienes encontraron *E. coli* en el 5.5% de las muestras de suelo analizado (1/18). El aislado provenía de una parcela previamente irrigada con agua de la llave. Las muestras de tomate analizadas en nuestro estudio fueron negativas para este microorganismo.

Los resultados obtenidos por Molina-Loya (2012), muestran que los niveles *E. coli* en las manos de los recolectores de chile jalapeño fueron bajos, reportando 3.14 UFC/mano de trabajador en la cosecha, estos resultados concuerdan con los resultados en el estudio de Orozco *et al.*, en el 2008 donde se reportaron cuentas del género *Enterobacteriaceae* de 2 UFC/mano de trabajador.

En otro estudio en el 2012 Maffei *et al.* analizaron la presencia de *E. coli* en muestras de diversos vegetales tales como lechuga, arugula y acelgas que se expenden en Brasil y encontraron que el 40% de las muestras contenían a este microorganismo en niveles de 1 a 2 Log UFC/g.

Cardenas-Cardenas en el 2012, reportó niveles de *E. coli* en la cadena de producción de tomate que iban de 7.87 UFC/ml (manos durante la cosecha) a 2.83 UFC/ml (manos durante distribución). Estos valores difieren de los determinados en esta investigación ya que en esta ocasión los valores encontrados para ese mismo producto fueron más bajos que los reportados.

La mayoría de las muestras de producto de verduras de hojas verdes, repollos, chiles y tomates analizadas por Mukherjee *et al.* (2006), no tuvieron contaminación detectable de *E. coli*, encontrando que solo un 2% (13 de 102) fueron positivas para este microorganismo. Así mismo, no se detectó la presencia de *Salmonella* ni *E. coli* O157:H7 en ninguna de las muestras analizadas.

Con respecto a la cuantificación de bacterias coliformes fecales en ambas cadenas de producción, encontramos en todas las muestras rangos que fueron de 0.9 a 7.1 log UFC/muestra. Específicamente para las muestras de la cadena de producción de chile jalapeño, los valores medios más elevados de estas bacterias se encontraron en muestras de manos (en cosecha y en distribución) siendo de 6.1 y 7.2 log UFC/mano respectivamente y en producto (en precosecha y en cosecha) donde los valores medios fueron de 6.2 y 5.3 log UFC/chile respectivamente.

En el caso de las muestras de la cadena de producción de tomate huaje, los valores medios más elevados se encontraron en las muestras de manos en cosecha con valores de 6.9 log UFC/mano y en producto (en precosecha, cosecha y en distribución) con valores de 6.8, 7.1 y 6.4 log UFC/tomate respectivamente. En este caso estos valores encontrados concuerdan con los obtenidos en otras investigaciones recientes.

Molina-Loya en el 2012 examinó la calidad microbiológica del chile jalapeño durante su cadena de producción, en el que las muestras de manos de los manipuladores durante la cosecha se encontraron cuentas de coliformes fecales mayores a 10^5 UFC/ml.

Cardenas-Cardenas en 2012, reportó cuentas de coliformes fecales en la cadena de producción de tomate con los siguientes valores: 1727.33 UFC/g (suelo), 2677.13 UFC/ml (producto en precosecha), 10160.27 UFC/ml (manos durante la cosecha), 2771.13 UFC/ml (producto durante la cosecha), 10692.60 UFC/ml (producto en distribución), 17871.60 UFC/ml (manos durante distribución), 38.40 UFC/ml (agua de fuente), 2.4 UFC/ml (agua de sitio). A diferencia de estos resultados, los obtenidos en nuestra investigación son un poco más elevados, esto podría deberse a que en una etapa de muestreo se presentaron lluvias ocasionales, lo cual provocó que la cuenta de microorganismos se elevara

considerablemente y en la investigación llevada a cabo en el 2012 no existen datos de las condiciones climáticas que pudieran afectar las cuentas de estos.

Johnston *et al.* (2005) estudiaron la calidad de vegetales como arugula, melón, cilantro y espinaca, en diferentes etapas de producción y procesado en el sur de Estados Unidos y encontraron coliformes en niveles entre 1.0 y 3.5 log UFC/g en cosecha, lavado y en el empacado.

Es bien sabido que dentro del grupo coliformes fecales se incluyen géneros como *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*, las cuales pueden llegar a causar enfermedad al humano al ser consumido el producto contaminado. Además de ser un excelente parámetro o indicador de contaminación fecal debido a que comparten características bioquímicas y de resistencia con algunas bacterias patógenas como *E. coli*.

De manera generalizada en las muestras de agua de fuente, agua de irrigación y en las muestras de suelo, se observó que tuvieron las cuentas más bajas en relación a las otras analizadas, con lo cual podría descartarse la posibilidad de que en estos puntos sea donde existe un mayor riesgo de contaminación del producto. Aunque numerosos patógenos facultativos como *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Serratia*, están comúnmente presentes en suelo, agua y plantas (Schwaiger Karin, *et al.*, 2011), por lo cual su presencia no siempre pudiera ser ligada a la presencia de una contaminación fecal.

Esto concuerda con lo reportado por Molina (2012), donde observaron que el análisis de microorganismos coliformes fecales, *E. coli* y *Enterococcus* en las muestras tanto de agua de sitio como agua de fuente en la cadena de producción de chile jalapeño en todas las muestras se encontraron niveles menores a 10 UFC/ml.

En un estudio realizado por Won *et al.* (2013) encontraron que la carga bacteriana difiere entre los vegetales de hoja verde (lechuga) y las frutas (tomate), aun cuando fueron irrigados con la misma fuente de agua. Además, ellos consideraron debido a los resultados de sus estudios, que otros factores ambientales como la salpicadura de suelo, la intrusión de

animales silvestres o el polvo, pueden ser las fuentes de contaminación más importantes para los productos que el agua de irrigación.

Las cuentas elevadas de microorganismos indicadores de contaminación fecal en las muestras del enjuague de manos de los trabajadores pudiera deberse a que los trabajadores no tienen la costumbre, educación o capacitación de lavarse las manos, o en caso de estar enfermos no dejan de asistir a su jornada laboral, o que no cuentan con la infraestructura para realizar un lavado de manos adecuado.

De igual manera, en algunas ocasiones se observó la presencia de bebés en las huertas, lo cual pudiera significar una posible fuente de contaminación ya que al realizar el cambio de pañales, el trabajador podría entrar en contacto con materia fecal.

La presencia de bacterias coliformes termotolerantes en una muestra ha sido tradicionalmente asociada con contaminación fecal, las bacterias coliformes termotolerantes de origen no fecal (*Enterobacter* spp. y *Klebsiella* spp.) han sido aisladas comúnmente de vegetales (Ostenvik, 1998). Por lo tanto, el vínculo natural entre bacterias coliformes termotolerantes como *Klebsiella* spp. y *Enterobacter* spp. y los vegetales, limita el valor de las bacterias coliformes termotolerantes como un indicador de contaminación fecal en vegetales (Johannessen Gro S. *et al.*, 2002).

Así mismo, este estudio también reveló que durante la evaluación de la calidad de higiene de los vegetales, *E. coli* es probablemente un mejor organismo indicador que los coliformes fecales y los *Enterococcus*, ya que la incidencia de *E. coli* fue muy baja y la existencia de microorganismos patógenos fue nula en las muestras analizadas.

9. 2. Determinación de patógenos

En esta investigación se evaluó también la presencia de microorganismos patógenos, sin embargo, estos microorganismos no fueron detectados en ninguna de las muestras analizadas. La nula incidencia de microorganismos patógenos coincide con otros estudios

publicados en otras partes del mundo. La FDA (2000) en estudios realizados a productos importados encontraron que de 1028 muestras vegetales evaluadas (melón, apio, cilantro, lechuga, perejil, cebolla cambray, fresas y tomates), el 99% de estas, estuvieron libres de *Shigella*, *Salmonella*, y *E. coli* O157.

Las frutas y hortalizas han sido previamente ligados como vehículo para la infección con *E. coli* O157:H7. Sin embargo, existen algunos trabajos realizados en los Estados Unidos y Europa donde no se detectó *E. coli* O157:H7 en muestras de vegetales (Johnston *et al.* 2005).

De las muestras analizadas que resultaron presuntivas para los diferentes microorganismos patógenos que se buscaron en esta investigación, no se encontró ninguna muestra positiva para *E. coli* O157:H7, *E. coli* STEC, *Salmonella* spp o *L. monocytogenes*.

La ausencia de los patógenos refleja la ausencia de una posible fuente potencial de contaminación y garantiza una buena calidad del producto, aunque en nuestro estudio las muestras fueron tomadas al azar.

Cabe señalar que en este estudio solo se analizaron las superficies externas de los tomates y los chiles jalapeños. Se ha demostrado que *Salmonella* no solo puede sobrevivir y crecer en la superficie del tomate, sino que también puede ser internalizada a través de la cicatriz del tallo (Zhuang *et al.*, 1995). En este estudio la información de la posible internalización de algunos patógenos no está disponible y aunque es muy baja la probabilidad, pudiera el interior llegar a contener patógenos que no fueron detectados en este estudio.

Se conoce poco sobre la interacción de los microorganismos patógenos con microorganismos deterioradores de los productos. Dicha interacción es principalmente antagónica reportándose para el caso de las bacterias ácido láctico que son componentes importantes de la flora nativa de frutas y hortalizas. Esta interacción puede ser debida entre otras cosas a la disminución del pH, generación de peróxido de hidrógeno, competencia por nutrientes y producción de compuestos antimicrobianos, tales como bacteriocinas o antibióticos (Francis, *et al.*, 1999), esto pudiera ayudar a explicar la razón por la cual no se lograron detectar microorganismos patógenos en las muestras analizadas.

Johannessen *et al.* (2002) no detectaron la presencia de *E. coli* O157:H7 ni de *Salmonella* en ninguna de las muestras de vegetales que ellos analizaron e incluía lechuga, ensaladas precortadas, germinados, champiñones y fresas, aunque *L. monocytogenes* (serogrupo 4) fue detectada en una muestra de lechuga y en otra de fresa, mientras *L. monocytogenes* (serogrupo 1) se aisló de una muestra de champiñones.

Seow *et al.* (2012) reportaron que ninguna de las muestras analizadas de vegetales de Singapur que incluyeron una variedad de manzanas, naranjas, mangos, tomate, lechugas y germinados fue positiva para *E. coli* O157:H7 o *Salmonella* spp.

En otro estudio se analizaron 466 muestras de vegetales de hoja verde, y melón, provenientes Estados Unidos y México, en donde no se logró detectar la presencia de *E. coli* O157:H7 ni *Salmonella* spp. (Johnston *et al.*, 2006). Lo mismo sucedió en Noruega donde una investigación que incluyó 890 muestras de vegetales, ninguna fue positiva para *Salmonella* spp. ni *E. coli* O157 (Johannessen, Loncarevic, & Kruse, 2002).

La ausencia de *L. monocytogenes* en ciertos productos puede ser explicada por el menor contacto entre el fruto y el suelo. Además en ciertos vegetales la ausencia puede deberse a algún efecto antimicrobiano de algunos de los componentes de los vegetales, como se ha observado en zanahorias, aunque la flora acompañante presente en los vegetales podría también tener efectos inhibitorios contra *L. monocytogenes* (Beuchat L. 2002).

Schwaiger *et al.* (2011) determinaron la presencia de *Listeria* spp. en 1.1% de un total de 1,001 muestras analizadas de tomate, pimiento, calabacín, pepino, zanahoria, cilantro, rábano, lechuga y espinacas. De estas, cuatro y tres muestras pertenecían a las especies patógenas *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* respectivamente.

El proceso que comprende la etapa de postcosecha incrementa la concentración de microorganismos en el producto, esto puede ocurrir por el contacto con manos contaminadas, el agua de lavado, el contacto con superficies, el contacto con animales y/o

sus desechos, o con otro producto que esté contaminado (contaminación cruzada) (Ailes, *et al.*, 2008).

Los microorganismos entéricos de origen fecal son secretados durante una infección, sin importar si el individuo presenta síntomas o no, muchos de esos patógenos entéricos son de importancia en salud tal como *Salmonella*, que puede contaminar las manos después de la defecación, o al entrar en contacto con ropa sucia o superficies contaminadas con materia fecal. El problema se puede hacer mayor cuando las uñas están largas, lo que las hace más difícil de limpiar. Esto último fue observado de manera constante con recolectores. Esto pudiera contribuir a incrementar los niveles de contaminación ya que en este trabajo encontramos que el nivel de microorganismos indicadores presentes en los vegetales aumentó después de la manipulación del producto por parte de los recolectores.

El hecho de que en nuestro trabajo no encontráramos ninguna muestra que contuviera bacterias patógenas concuerda con trabajos realizados en otras partes de mundo, por ejemplo, en el 2003 y 2004, Mukherjee *et al.*, no lograron aislar a este tipo de bacterias partir de ninguna de las 476 muestras analizadas de 32 cultivos orgánicos y convencionales de tomates, lechugas, pimiento verde, repollo, pepino, fresas y manzanas entre otras.

X. CONCLUSIÓN

- De acuerdo a la hipótesis planteada, algunos puntos de la cadena de producción de chile jalapeño y tomate huaje presentan altos números de microorganismos indicadores, sin embargo, no se logró determinar la presencia de microorganismos enteropatógenos.
- Las muestras de enjuague de manos fueron las que tuvieron mayor concentración de microorganismos indicadores para la cadena de producción de chile jalapeño y tomate huaje.
- Las muestras con mayor contaminación con *Enterococcus* fueron las muestras de enjuague de manos con cuentas de hasta 9.9 log UFC/mano para chile jalapeño y 9 log UFC/mano para tomate.
- Las muestras con mayor contaminación con *E. coli* fueron las muestras de manos con cuentas de hasta 4.2 log UFC/mano para la cadena de producción de chile jalapeño y 6.3 log UFC/mano para la cadena de producción de tomate. Las cuentas de *E. coli* fueron menores que las cuentas de *Enterococcus* y coliformes fecales en las cadenas de producción de ambos productos.
- Las muestras con mayor contaminación con Coliformes fecales fueron los enjuagues de manos con cuentas de hasta 10.1 log UFC/mano para la cadena de producción de chile jalapeño y 6.3 log UFC/mano para la cadena de producción de tomate.
- Las muestras que presentaron menor contaminación de microorganismos indicadores fueron las muestras de agua de irrigación y agua de fuente en la cadena de producción de ambos productos.
- En ninguna de las muestras analizadas se logró detectar la presencia de microorganismos patógenos.
- Se logró observar que el punto que exhibe mayor contaminación fue cuando el producto es manipulado por los trabajadores, el cual es la cosecha y la distribución, el cual pudiera representar el punto más crítico de contaminación en la cadena de producción de estos dos productos.

XI. LITERATURA CITADA

1. Aarestrup FM, Wegener HC, Collignon P. 2008. Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 6:733-750
2. Abriouel, H., Omar, N.B., Molinos, A.C., López, R.L., Grande, M.J., Martínez-Viedma, P., Ortega, E., Cañamero, M.M., & Galvez, A. (2008) Comparative Analysis of Genetic Diversity and Incidence of Virulence Factors and Antibiotic Resistance among Enterococcal Populations from Raw Fruit and Vegetable Foods, Water and Soil, and Clinical Samples. *International Journal of Food Microbiology*, 123, 38-49
3. Ailes, Elizabeth, *et al.*, 2008, "Microbial Concentrations on Fresh Produce Are Affected by Postharvest Processing, Importation, and Season", *Journal of Food Protection*, Vol. 71, No. 12, 2008, Pages 2389–2397
4. Barton Behravesh C, Mody RK, Jungk J, 2008 outbreak of *Salmonella* Saintpaul infections associated with raw produce. *N Engl J Med* 2011;364:918–27.
5. Beinke C, Laarmann S, Wachter C, Karch H, Greune L, Schmidt MA. 1998. Diffusely adhering *Escherichia coli* strains induce attaching and effacing phenotypes and secrete homologs of Esp proteins. *Infect Immun*. 1998;66(2):528-39.
6. Bettelheim, K. A., 2007. The non-O157 Shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; under-rated pathogens. *Crit. Rev. Microbiol*. 33, 67–87.
7. Beuchat, L., 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes Infect*. 4:413–423
8. Blackburn, C., P. McClure. In. En: Blackburn, C y P. McClure. Foodborne pathogens. Hazards, risk analysis and control. Boca Raton, FL: CRC Press; 2002: 3-12.
9. Boerlin, P., S. A. McEwen, F. Boerlin-Petzold, J. B. Wilson, R. P. Johnson, and C. L. Gyles. 1999. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J. Clin. Microbiol*. 37:497–503.

10. Campos Leila, Franzolin Marcia and Trabulsi Luiz, (2004), “Diarrheagenic *Escherichia coli* Categories among the Traditional Enteropathogenic *E. coli* O Serogroups - A Review”, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 99(6): 545-552
11. Cardenas-Cardenas Ma del Carmen, 2012, Identificación de Fuentes de contaminación durante la producción de tomate en el estado de Nuevo León, México. Facultad de Ciencias Biologías, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
12. Castillo A, Mercado I, Lucia LM, Martínez-Ruiz Y, Ponce de León J, Murano EA, Acuff GR. 2004. *Salmonella* contamination during production of cantaloupe: a binational study. *Journal of Food Protection*. 67:713–720.
13. Castro-Rosas Javier, *et al.*, 2011, “Frequency and Behavior of *Salmonella* and *Escherichia coli* on Whole and Sliced Jalapeño and Serrano Peppers”, *Journal of Food Protection*, Vol. 74, No. 6, 2011, Pages 874–881 doi:10.4315/0362-028X.JFP-10-398
14. CDC (2006) *Multistate Outbreak of E. coli O157 Infections, November–December 2006* (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta), www.cdc.gov/ecoli/2006/december/121406.htm, accessed 2007.
15. CDC (2007). Multistate Outbreaks of *Salmonella* Infections Associated with Raw Tomatoes Eaten in Restaurants --- United States, 2005—2006. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5635a3.htm>
16. CDC. (1982). Isolation of *E. coli* O157:H7 from sporadic cases of hemorrhagic colitis – United States. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 31, 580–585.
17. Cedric, N. Berger, *et al.*, 2010. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology* 12(9), 2385-2397
18. Chauret Christian, 2011, “Survival and control of *Escherichia coli* O157:H7 in foods, beverages, soil and water”, *Virulence* 2:6, 593-601
19. Chen HD, Frankel G., 2005, Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol. Rev* 2005;29:83–98. [PubMed: 15652977]

20. Cravioto, A., Gross, R. J., Scotland, S. M. & Rowe, B. (1979). An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol* 3, 95–99.
21. Cravioto, A., Tello, A., Navarro, A., Ruiz, J., Villafan, H., Uribe, F. & Eslava, C. (1991). Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. *Lancet* 337, 262–264.
22. D. Barak Jeri D., Lara C. Kramer, and Ling-yun Hao. 2010. Colonization of Tomato Plants by *Salmonella enterica* Is Cultivar Dependent, and Type 1 Trichomes Are Preferred Colonization Sites. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. 77(2). 498-504
23. Di Pinto Angela, Novello Lucia, Montemurro Filomena, Bonerba Elisabetta, Tantillo Giuseppina, 2010. “Occurrence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods from supermarkets in Southern Italy”. *NEW MICROBIOLOGICA*, 33, 249-252
24. Doyle MP, Erickson MC. 2007. Summer meeting 2007 – the problems with fresh produce: an overview. *Journal of Applied Microbiology* 105:317–330.
25. Drevets DA, Bronze MS. *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. *FEMS Immunol. Med. Microbiol* 2008;53:151–165.
26. Ethelberg, S., K. E. Olsen, F. Scheutz, C. Jensen, P. Schiellerup, J. Enberg, A. M. Petersen, B. Olesen, P. Gerner-Smidt, and K. Molbak. 2004. Virulence factors for hemolytic uremic syndrome, Denmark. *Emerg. Infect. Dis.* 10:842–847.
27. Fagan Peter, Hornitzky Michael, Bettelheim Karl and Djordjevic Steven, 1999, “Detection of Shiga-Like Toxin (*stx1* and *stx2*), Intimin (*eaeA*), and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Hemolysin (EHEC *hlyA*) Genes in Animal Feces by Multiplex PCR”, *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, p. 868–872 Vol. 65, No. 2
28. Farthing, M.J. (2004) Bugs and the gut: an unstable marriage. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18: 233–239.
29. Fatica Marianne, *et al.*, 2011, “*Salmonella* and produce Survival in the plant environment and implications in food safety”, *Virulence* 2:6, 573-579

30. FDA, 2000. Mejorando la seguridad y calidad de frutas y hortalizas frescas manual deformación para instructores. USA. Disponible en el sitio de red:http://www.jifsan.umd.edu/pdf/gaps_es/INTRODUCCION.pdf. [Revisado el día 4 de Agosto 2011].
31. Forslund A., *et al.*, (2012), " Escherichia coli contamination and health aspects of soil and tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) subsurface drip irrigated with on-site treated domestic wastewater" *water research* 46 (2012) 5917 – 5934.
32. Francis GA, Thomas C, O'Beirne D. 1999. The microbiological safety of minimally processed vegetables. *Int J Food Sci Technol* 34:1–22.
33. Freitag Nancy E, Port Gary C., Miner Maurine D. 2009. *Listeria monocytogenes* — from saprophyte to intracellular. *Nat Rev Microbiol.* 2009 September ; 7(9): 623. doi:10.1038/nrmicro2171
34. GARRIDO V., TORROBA L., GARCÍA-JALÓN I., VITAS A.I. (2008). Surveillance of listeriosis in Navarre, Spain, 1995-2005 - epidemiological pattern and characterization of clinical and food isolates. *Euro Surveill.* 13, (49)
35. Gauthier, F.; Archibald, F. The Ecology of —Faecal Indicator Bacteria Commonly Found in Pulp and Paper Mill Water Systems. *Water Res.* 2001, 35, 2207–2218.
36. Gould, L. H., Bopp, C., Strockbine, N., Atkinson, R., Baselski, V., Body, B., Carey, R., Crandall, C., Hurd, S., Kaplan, R., Neill, M., Shea, S., Somsel, P., Tobin-D'angelo, M., Griffin, P. M., and Gerner-Smidt, P. (2009). Recommendations for diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections by clinical laboratories. *MMWR Recomm. Rep.* 58, 1–14.
37. Grabow, W.O.K. Waterborne Diseases: Update on Water Quality Assessment and Control. *Water SA* 1996, 22, 193–202.
38. Gray MJ, Freitag NE, Boor KJ (2006) How the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* mediates the switch from environmental Dr. Jekyll to pathogenic Mr. Hyde. *Infect Immun* 74: 2505–2512.
39. Griffin, P. M., and Tauxe, R. V. (1991). The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.* 13, 60–98.

40. Gu G, Cevallos-Cevallos JM, van Bruggen AHC, 2013 “Ingress of Salmonella enterica Typhimurium into Tomato Leaves through Hydathodes”. PLoS ONE 8(1): e53470. doi:10.1371/journal.pone.0053470
41. Gu G, Hu J, Cevallos-Cevallos JM, Richardson SM, Bartz JA, *et al.* (2011) Internal Colonization of Salmonella enterica Serovar Typhimurium in Tomato Plants. PLoS ONE 6(11): e27340. doi:10.1371/journal.pone.0027340
42. Guan, T.Y. and Holley, R.A. (2003) Pathogen survival in Swine manure environments and transmission of human enteric illness – a review. J Environ Qual 32, 383–392.
43. Gyles C. L., 2007, “Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview”, J. Anim. Sci. 2007. 85(E. Suppl.):E45–E62 doi:10.2527/jas.2006-508
44. Hamon M, Bierne H, Cossart P (2006) *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. Nat Rev Microbiol 4: 423–434.
45. Harwood Valerie J., Whitlock John and Withington Victoria, (2000),” Classification of Antibiotic Resistance Patterns of Indicator Bacteria by Discriminant Analysis: Use in Predicting the Source of Fecal Contamination in Subtropical Waters”, *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66(9):3698. DOI: 10.1128/AEM.66.9.3698-3704.2000.
46. Heaton, J. C. and K. Jones (2008). “Microbial contamination of fruit and vegetables and the behavior of enteropathogens in the phyllosphere: a review.” J Appl Microbiol 104(3): 613-26.
47. Helms, M., J. Simonsen, *et al.* (2006). “Foodborne bacterial infection and hospitalization: a registry-based study” Clin Infect Dis 42(4): 498-506.
48. HESPANHOL, I. AND PROST, M. (1994). “WHO guidelines and national standards for reuse and water quality”. *Waert Research.* 28, 119-124.
49. Hicks, S., Candy, D. C. & Phillips, A. D. (1996). Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro. Infect Immun 64, 4751–4760.
50. <http://www.agronuevoleon.gob.mx/oeidrus/censohortalizas> (Revisado 12 de Febrero de 2012)
51. <http://www.oeidrus-nl.gob.mx/oeidrus/index.php> (Revisado 21 de Febrero de 2012)

52. Ibekwe Mark, Watt Pamela, Shouse Peter, Grieve Catherine, (2004), "Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in irrigation water on soils and plants as validated by culture method and real-time PCR", *Canadian Journal of Microbiology*, 2004, 50(12): 1007-1014, 10.1139/w04-097
53. Islam, M., J. Morgan, M. P. Doyle, S. C. Phatak, P. Millner, and X. Jiang. 2004. Fate of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on carrots and radishes grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:2497–2502.
54. Johannessen, G. S., Loncarevic, S., & Kruse, H. (2002). Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. *International Journal of Food Microbiology*, 77, 199-204.
55. Johnson, K. E., Thorpe, C. M., and Sears, C. L. (2006). The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin- producing *Escherichia coli*. *Clin. Infect. Dis.* 43, 1587–1595.
56. Johnston, Lynette, *et al.*, 2005, "A Field Study of the Microbiological Quality of Fresh Produce", *Journal of Food Protection*, Vol. 68, No. 9, 2005, Pages 1840–1847
57. Klerks MM, van Gent-Pelzer M, Franz E, Zijlstra C, van Bruggen AHC (2007) Physiological and molecular responses of *Lactuca sativa* to colonization by *Salmonella enterica* serovar Dublin. *Appl Environ Microbiol* 73: 4905–4914.
58. Leifert C., Ball K., Volakakis N. and Cooper J. M., 2008. Control of enteric pathogens in ready-to-eat vegetable crops in organic and 'low input' production systems: a HACCP-based approach. *Journal of Applied Microbiology* 105 (2008) 931–950
59. León JS, Jaykus LA, Moe CL. 2009. *Food safety issues and the microbiology of fruits and vegetables*. In: *Microbiologically safe foods*. Heredia N, Wesley I, García S. (eds). Wiley: Estados Unidos de América. pp. 255- 258.
60. Levine, M. M., J. G. Xu, J. B. Kaper, H. Lior, V. Prado, B. Tall, J. Nataro, H. Karch, and K. Wachsmuth. 1987. "A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome". *J. Infect. Dis.* 156:175–182.

61. Louise, C. B., and T. G. Obrig. 1995. Specific interaction of *Escherichia coli* O157:H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. *J. Infect. Dis.* 172:1397–1401.
62. Ma J, Ibekwe AM, Yi X, Wang H, Yamazaki A, (2011) Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 and Its Mutants in Soils. *PLoS ONE* 6(8): e23191. doi:10.1371/journal.pone.0023191
63. MADIGAN, M.; MARTINKU, J. Y PARKER, J. (1997). “Biología de los microorganismos”. Prentice Hall. Madrid. Octava edición. Pp 986
64. Maffei Daniele Fernanda, *et al.*, 2012, “Microbiological quality of organic and conventional vegetables sold in Brazil”, *Food Control* 29 (2013) 226-230.
65. MEAD P.S., DUNNE E.F., GRAVES L., WIEDMANN M., PATRICK M., HUNTER S., SALEI E., MOSTASHARI F., CRAIG A., MSHAR P., BANNERMAN T., SAUDERS B.D., HAYES P., DEWITTW., SPARLING P., GRIFFIN P., MORSE D., SLUTSKER L., SWAMINATHAN B. (2006). Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat. *Epidemiol. Infect.* 134, 744-751.
66. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, (1999) Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5: 607–625.
67. Medema, G.J.; Payment, P.; Dufour, A.; Robertson, W.; Waite, M.; Hunter, P.; Kirby, R.; Anderson, Y. Safe drinking water: an ongoing challenge. In *Assessing Microbial Safety of Drinking Water. Improving Approaches and Method*; WHO & OECD, IWA Publishing: London, UK, 2003; pp. 11–45.
68. Molina-Loya Karina Guadalupe, 2012, Determinación de la calidad microbiologica en punto de venta de chile jalapeño y chile serrano e identificación de peligros microbiológicos durante su cultivo. Estudio de la región de Cadereyta Jimenez, N. L. Facultad de Ciencias Biologicas, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Mexico.
69. Mooijman KA *et al.*, 2001: Optimisation of the ISO-method on enumeration of somatic coliphages (draft ISO 10705–2). *Water Science and Technology*, 43:205–208

70. Moore, B. C., E. Martinez, J. M. Gay, and D. H. Rice. 2003. Survival of *Salmonella enterica* in freshwater and sediments and transmission by the aquatic midge *Chironomus tentans* (Chironomidae: Diptera). *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4556–4560.
71. Mukherjee Avick, *et al.*, 2006, “Longitudinal Microbiological Survey of Fresh Produce Grown by Farmers in the Upper Midwest”, *Journal of Food Protection*, Vol. 69, No. 8, 2006, Pages 1928–1936
72. Nataro, J. P., and J. B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:142–201.
73. Nataro, J. P., Kaper, J. B., Robins-Browne, R., Prado, V., Vial, P. & Levine, M. M. (1987). Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr Infect Dis J* 6, 829–831.
74. Ochoa Theresa, *et al.*, 2008, “New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection” *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008 September ; 102(9): 852–856. doi:10.1016/j.trstmh.2008.03.017
75. Olaimat Amin and Holley Richard, 2012, “Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review”, *Food Microbiology* 32 (2012) 1-19
76. Oravcova, K., T. Kutcha, *et al.*, 2007. “A novel real-time PCR-based method for the detection of *Listeria monocytogenes* in food.” *Lett Appl Microbiol* 45(5): 568-73.
77. Orozco L, Rico-Romero L, Escartín E. 2008. Microbiological Profile of Greenhouses in a Farm Producing Hydroponic Tomatoes. *Journal of Food Protection.* 71:60-65.
78. Østensvik, Ø., 1998. Faecal indicator bacteria in drinking water. *Nor. Veterinaertidsskr.* 110, 606–614.
79. Painter JA, Ayers T, Woodruff R, *et al.*, 2009. Recipes for foodborne outbreaks: a scheme for categorizing and grouping implicated foods. *Foodborne Pathog Dis* 2009;6:1259–64.
80. Pao Steven, *et al.*, 2012, “Salmonella Population Rebound and Its Prevention on Spray Washed and Non-washed Jalapeño Peppers and Roma Tomatoes in Humid Storage”, *FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE* Volume 9, Number 4, 2012

81. Peiffer I, Guignot J, Barbat A, Carnoy C, Moseley SL, Nowicki BJ, *et al.*, 2000, “Structural and functional lesions in brush border of human polarized intestinal Caco-2/TC7 cells infected by members of the Afa/Dr diffusely adhering family of *Escherichia coli*”. *Infect Immun.* 2000;68(10):5979-90.
82. Piveteau P, Depret G, Pivato B, Garmyn D, Hartmann A, 2011. Changes in Gene Expression during Adaptation of *Listeria monocytogenes* to the Soil Environment. *PLoS ONE* 6(9): e24881. doi:10.1371/journal.pone.0024881.
83. Prescott, Lansing, *et al.*, 2004. “Microbiologia” 5a edicion, editorial McGraw-Hill. Pp1034 – 1036
84. Rangel, J.M., Sparling, P.H., Crowe, C., Griffin, P.M., and Swerdlow, D.L. (2005) Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982–2002. *Emerg Infect Dis* 11: 603–609.
85. Riveros Maribel, *et al.*, 2011, “PATRONES DE ADHERENCIA DE CEPAS DE *Escherichia coli* DIFUSAMENTE ADHERENTE (DAEC) PROVENIENTES DE NIÑOS CON Y SIN DIARREA”, *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2011; 28(1): 21-28.
86. Rushing JW, Angulo FJ, Beuchat LR. Implementation of a HACCP program in a commercial fresh-market tomato packinghouse: a model for the industry. *Dairy, Food and Environmental Sanitation* 1996;16:549-53.
87. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, *et al.*, 2011. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg Infect Dis* 2011;17:1–15
88. Schleifer KH; Kilpper-Balz R, 1984. «Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov.». *Int. J. Sys. Bacteriol.* 34: pp. 31–34.
89. Schwaiger Karin, *et al.*, 2011, “Comparative analysis of the bacterial flora of vegetables collected directly from farms and from supermarkets in Germany”, *International Journal of Environmental Health Research* Vol. 21, No. 3, June 2011, 161–172.
90. Seow Joceyln, *et al.*, 2012, “Microbiological quality of fresh vegetables and fruits sold in Singapore”, *Food Control* 25 (2012) 39-44

91. Solomon Ethan B., Yaron Sima, and Matthews Karl R., 2002, “Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from Contaminated Manure and Irrigation Water to Lettuce Plant Tissue and Its Subsequent Internalization”, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, p. 397–400 Vol. 68, No. 1, DOI: 10.1128/AEM.68.1.397–400.2002
92. Steele Marina, Odumeru Joseph, 2004. “Irrigation Water as Source of Foodborne Pathogens on Fruit and Vegetables”, Journal of Food Protection®, Volume 67, Number 12, December 2004, pp. 2839-2849(11)
93. Strockbine, N. A., L. R. Marques, J. W. Newland, H. W. Smith, R. K. Holmes, and A. D. O’Brien, 1986. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. Infect. Immun. 53:135–140.
94. Takao, T., T. Tanabe, Y. M. Hong, Y. Shimonishi, H. Kurazono, T. Yutsudo, C. Sasakawa, M. Yoshikawa, and Y. Takeda, 1988. Identity of molecular structure of Shiga-like toxin I (VT1) from *Escherichia coli* O157:H7 with that of Shiga toxin. Microb. Pathog. 5:57–69.
95. Tauxe R, Kruse H, Hedberg C, Potter M, Madden J, Wachsmuth K., 1997. Microbial hazards and emerging issues associated with produce; a preliminary report to the National Advisory Committee on Microbiologic Criteria for Foods. Journal of Food Protection.
96. Taylor Mark, 2008, “Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* type 1-induced haemolytic uraemic syndrome”, Pediatr Nephrol (2008) 23:1425–1431 DOI 10.1007/s00467-008-0820-3
97. Thevenot D, Dernburg A, Vernozy-Rozand C., 2006. An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. J. Appl. Microbiol 2006;101:7–17.
98. Thunberg, R. L., T. T. Tran, R. W. Bennett, R. N. Matthews, and N. Belay, 2002. Microbial evaluation of selected fresh produce obtained at retail markets. J. Food Prot. 65:677–682.
99. Toranzos GA, McFeters GA., 1997. Detection of indicator microorganisms in environmental freshwaters and drinking waters. In: Hurst CJ, Knudsen GR,

- McInerney MJ, Stetzenbach LD, Walter MV, editors. Manual of Environmental Microbiology. Washington DC: ASM Press. P 184-194
100. USFDA-CFSAN. 1998. *Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards for Fresh Fruits and Vegetables* [internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/ProduceandPlanProducts/UCM169112.pdf> [Revisado el 15 de Enero de 2013].
 101. Wang R and Cerniglia, 1997, "A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods", *Journal of applied microbiology*, 83, 727-736.
 102. Watson D, Sleator RD, Casey PG, Hill C, Gahan CG., 2009. Specific osmolyte transporters mediate bile tolerance in *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 2009, 77:4895-4904.
 103. Weintraub Andrej, 2007, "Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection", *Journal of Medical Microbiology* (2007), 56, 4-8 DOI 10.1099/jmm.0.46930-0
 104. Wu, Y., 2009. "Multiplex PCR-capillary electrophoresis-SSCP used to identify foodborne pathogens." *Eur Food Res Technol* 228: 511-518.

XII. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Rafael García López

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Acentuación en Microbiología

Tesis: IDENTIFICACIÓN DE LOS SITIOS DE CONTAMINACIÓN EN LA CADENA DE PRODUCCIÓN DE TOMATE Y CHILE JALAPEÑO MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS INDICADORES DE CONTAMINACIÓN FECAL Y ENTEROPATÓGENOS.

Campo de estudio: Inocuidad Alimentaria.

Datos personales: Nacido en Francisco I. Madero, Coahuila el 18 de Septiembre de 1987, hijo de Noe García Luján y Norma López Ramírez.

Educación: Egresado de la Universidad Juárez del Estado de Durango, Grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo en 2011.