



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**Facultad de Ciencias Químicas**

**Departamento de Microbiología**

**Calidad sanitaria e investigación de *Salmonella* sp. y  
*Escherichia coli* O157:H7 en muestras de cilantro  
(*Coriandrum sativu*) utilizado en taquerías ambulantes en  
la zona sur de la ciudad de Puebla.**

**TESIS**

**Para obtener el título de Licenciatura en**

**Químico Farmacobiólogo**

**PRESENTA:**

**Sandra Mata Jiménez**

**Director de tesis:**

**M.S.P. Carlos Cabrera Maldonado**

**Puebla, Pue**

**Noviembre 2015**



Facultad de Ciencias Químicas

## ÍNDICE:

Resumen		
1	Introducción.	1
2	Marco teórico.	2
2.1	¿Qué es el cilantro?	2
2.2	Uso de las hojas del cilantro.	3
2.3	¿Por qué se puede contaminar el cilantro?	3
2.4	Calidad sanitaria.	4
2.5	Grupo de indicadores en los alimentos.	4
2.5.1	Microorganismos deterioradores.	4
2.5.2	Microorganismos indicadores.	5
2.5.3	Bacterias mesofílas aerobias (BMA).	5
2.5.4	Coliformes totales.	5
2.5.5	Coliformes fecales.	6
2.5.6	Microorganismos patógenos.	6
2.5.7	<i>Salmonella</i> sp.	7
2.5.8	<i>Escherichia coli</i> .	8
2.5.9	<i>Escherichia coli</i> O157:H7.	8
2.6	Recomendaciones de la OMS: cinco claves para mejorar la inocuidad de los alimentos.	10
3	Marco de referencia.	11
4	Planteamiento del problema.	15
5	Justificación.	16
6	Objetivos.	17
6.1	General.	17
6.2	Particulares.	17
7	Diseño de la investigación.	18
7.1	Tipo de estudio.	18

7.2	Tamaño de muestra.	<b>18</b>
7.3	Sede y lugar de estudio.	<b>18</b>
7.4	Periodo de muestreo.	<b>18</b>
7.5	Criterios de inclusión.	<b>18</b>
7.6	Criterios de exclusión.	<b>18</b>
7.7	Criterios de eliminación.	<b>18</b>
7.8	Análisis estadístico de la información.	<b>19</b>
8	Materiales y metodología.	<b>19</b>
8.1	Muestras.	<b>19</b>
8.2	Metodología.	<b>19</b>
8.3	Esquema general de trabajo No. 1.	<b>20</b>
8.4	Esquema de trabajo No. 2 Recuento de bacterias mesofilícas aerobias (BMA)	<b>21</b>
8.5	Esquema de trabajo No. 3 Determinación de bacterias coliformes fecales. Método: NMP.	<b>22</b>
8.6	Esquema de trabajo No. 4 Investigación de <i>Salmonella</i> sp.	<b>23</b>
8.7	Esquema de trabajo No. 5 Investigación de <i>E. coli</i> O157:H7.	<b>24</b>
8.8	Recursos humanos.	<b>25</b>
8.9	Recursos materiales.	<b>26</b>
8.10	Recursos financieros	<b>26</b>
9	Resultados.	<b>27</b>
10	Discusión de resultados.	<b>29</b>
11	Conclusiones.	<b>32</b>
12	Bibliografía.	<b>33</b>
13	Anexos.	<b>37</b>

## Resumen

Se ha reconocido el peligro microbiológico de las bacterias patógenas cuando están presentes en alimentos de origen vegetal. Estudios realizados por investigadores en otros países al analizar vegetales frescos que se consumen crudos, han alertado a la población en general de la presencia de estos patógenos, lo que constituye un riesgo para la salud de las personas, debido a que estos microorganismos son capaces de generar problemas gastrointestinales, y son éstas patologías, una de las primeras causas de consulta médica, de muerte en México y en el mundo. El objetivo de este estudio fue cuantificar las bacterias mesofílicas aerobias (BMA), coliformes fecales (CF) e investigar la presencia de *Salmonella* sp. y *E. coli* O157:H7 en 20 muestras de cilantro (*Coriandrum sativu*), mediante un muestreo por selección intencional durante los meses de septiembre y octubre del año 2013, adquiridas en taquerías ambulantes en la zona sur de la ciudad de Puebla, Puebla, México. Las metodologías utilizadas fueron los procedimientos descritos en la Normas Oficiales Mexicanas: bacterias mesofílicas aerobias (NOM-092-SSA1-1994) y *Salmonella* sp. (NOM-114-SSA1-1994), que incluyó las etapas de pre-enriquecimiento, enriquecimiento selectivo, inoculación en medios selectivos y diferenciales e identificación bioquímica y serológica; además del Manual de Procedimientos, diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de alimentos.

Los resultados de los análisis microbiológicos revelaron altos recuentos de bacterias mesofílicas aerobias y coliformes fecales en todas las muestras de cilantro que sobrepasaron los niveles de aceptación marcados en la Norma Oficial Mexicana, utilizada como referencia en esta investigación, lo cual indican una calidad sanitaria deficiente. Lo que permitió el aislamiento de una cepa de *Salmonella* sp que fue confirmada con los ensayos bioquímicos (convencionales y mediante el equipo automatizado Vitek<sup>®</sup>2 compact) y por serología. No hubo recuperación de cepas de *E. coli* O157:H7 en las muestras analizadas; sin embargo, se identificaron otras enterobacterias. Finalmente, se recomienda que el cilantro sea sometido a un proceso de desinfección, ya que es un producto que generalmente, se consume crudo. Esta investigación demuestra la importancia de investigar la posible presencia de agentes patógenos bacterianos en vegetales como el cilantro y la necesidad de incrementar la vigilancia e investigación permanente, que garanticen las condiciones sanitarias en la comercialización de los tacos

de venta en la zona sur de la ciudad de Puebla, ya que su consumo puede representar un riesgo para la salud pública.

## 1 Introducción

La calidad de los alimentos está sustentada por tres áreas de estudio: microbiológica, físico-química y sensorial. De las cuales la que reviste mayor importancia es la calidad microbiológica, ya que a través de ella se puede determinar la inocuidad de los alimentos; es decir, que no produzcan enfermedades a las personas que los consumen.

En la actualidad, los cambios en el estilo de vida, los hábitos dietéticos de las personas, así como los modelos tradicionales de comidas en las familias han sufrido modificaciones importantes, que han orillado a las personas a consumir en menor proporción alimentos preparados en casa y aumentado el consumo de alimentos de venta en vía pública. En la ciudad de Puebla, como en las grandes urbes, los diferentes tipos de comida y las horas de consumo han variado, lo que ha permitido a los vendedores de comida rápida específicamente taquerías tener disponibles a toda hora y épocas del año productos alimenticios como los tacos.

Sin embargo, si se toma en cuenta que las enfermedades relacionadas al consumo de alimentos (ETA), constituyen un problema mundial y en las últimas décadas ha tomado un papel importante en la sociedad, al grado que la Organización Mundial de la Salud (OMS) alerta sobre patógenos bacterianos presentes en los alimentos tanto de origen animal como vegetal.

El presente estudio tuvo como objetivo cuantificar las bacterias mesofílicas aerobias (BMA), coliformes fecales (CF) y la investigación de *Salmonella sp.* y *E. coli* O157:H7 en cilantro (*Coriandrum sativu*) que se adiciona justo antes de servir los tacos de venta en la zona sur de la ciudad de Puebla, ya que si no se encuentra previamente desinfectado, su consumo puede representar un riesgo para la salud pública

## 2 Marco teórico

Una hortaliza, es una planta comestible que está formada por tallos y hojas verdes, se puede utilizar como parte o ingrediente en los alimentos preparados, ya sea cruda o cocinada. El cultivo de hortalizas y verduras, junto con el de frutas y tubérculos, constituyen aproximadamente 10% de la producción agraria mundial. La mayor parte se cultiva en campos, jardines e invernaderos.

### 2.1 ¿Qué es el cilantro?

*Coriandrum sativum*, llamado popularmente cilantro, es una planta comestible que alcanza aproximadamente 40 - 60 cm de altura, tiene tallo erecto, hojas compuestas, flores blancas<sup>16</sup>.



Fig. 1 Cilantro: como se adquiere en los sitios de venta.

Sus orígenes parecen inciertos, aunque generalmente se considera nativo del norte de África y el sur de Europa. Es de uso común en la cocina mediterránea, latinoamericana, china, hindú y del sureste asiático. Todas las partes de la planta son comestibles, pero generalmente se usan las hojas frescas y las semillas secas.

La importancia del consumo de hortalizas o verduras de hojas verdes radica en que el consumo de estos vegetales proporciona un beneficio para la salud pública por la concentración de nutrientes y su bajo nivel calórico.<sup>16</sup>

## 2.2 Uso de las hojas del cilantro

Todas las partes de la planta son comestibles, sin embargo, son las hojas frescas y las semillas secas las de uso culinario más frecuente. Las hojas frescas son un ingrediente esencial de la salsa verde y el guacamole. Las hojas picadas también se usan como adorno, añadidas al final del cocimiento o justo antes de servir, sobre sopas y otros platillos. El cilantro fresco nunca se cocina porque el calor destruye totalmente su aroma y sabor. Debe conservarse en refrigeración dentro de envases herméticos, procurando consumirlo en pocos días, ya que se marchita rápidamente. No debe secarse, ni congelarse, porque pierde el aroma.

En México su uso es muy variado, se utiliza en la preparación de diversas salsas, moles, como saborizante en sopas y caldos. Fresco y picado se usa como aderezo de diferentes tipos de tacos y antojitos<sup>16</sup>.

## 2.3 ¿Por qué se puede contaminar el cilantro?

Numerosas investigaciones realizadas a partir de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA), han centrado su interés en la transmisión de los agentes etiológicos (bacterias, parásitos, virus) transferidos de los alimentos de origen animal a los humanos. Sin embargo, estudios recientes han alertado que productos frescos como lechugas, rábano, espinacas, apio, etc. contaminados con *Salmonella sp.*, *E. coli*, *Campylobacter sp.* y *Listeria sp.*, también pueden ser la fuente<sup>2, 3, 4, 6, 7, 12, 13, 23, 26, 28, 29</sup>.

Adicionalmente la manipulación de las hortalizas con “objetos sucios”, como mesas de trabajo, tablas para cortar verduras y carnes, contacto con papel moneda, perillas de puertas, pasamanos, tazas y vasos comunes para beber, además del uso de alimentos crudos, ingredientes como el cilantro que se adicionen a los “tacos” justo antes de ser consumidos, que no hayan sido desinfectados.<sup>8</sup> Todos estos factores pueden contribuir para que el resultado de la evaluación microbiológica de un alimento se pueda evidenciar en él la presencia de grupos indicadores {bacterias mesofílicas aerobias (BMA), coliformes fecales (CF)}, que reflejan su calidad microbiológica<sup>2</sup>.

Por lo tanto, los microorganismos de interés sanitario en los alimentos pueden tener dos tipos de acciones sobre éstos: a) pueden ser agentes que ocasionan su deterioro, tanto de su vida en anaquel como modificadores de sus propiedades



organolépticas; b) agentes patógenos causantes de diversas enfermedades en el ser humano, como por ejemplo gastroenteritis, enterocolitis, entre muchas otras.

¿Cómo es posible que los microorganismos lleguen a los alimentos y causar dichas acciones?

Independientemente de la contaminación de origen, existen diversos escenarios posibles para que esto pueda ocurrir, pero todos ellos llevarían a un mismo resultado: “Las malas prácticas higiénicas” en la elaboración, distribución, almacenamiento y transporte de los alimentos<sup>8, 14</sup>.

## **2.4 Calidad sanitaria**

La calidad sanitaria de un alimento está en función de sus características organolépticas y de su contenido en microorganismos patógenos o sus productos, de indicadores de malas prácticas durante su manejo o capaces de causar alteraciones en él<sup>8</sup>.

## **2.5 Grupo de indicadores en los alimentos**

Los alimentos pueden contener una gran cantidad y diversidad de microorganismos, con excepción de los alimentos que han recibido un tratamiento antimicrobiano severo o térmico, en los cuales se supone debe haber ausencia de microorganismos. Su diversidad permite agruparlos según la acción en los alimentos, y es posible que un microorganismo se encuentre en más de un grupo<sup>8</sup>.

- Deterioradores
- Indicadores.
- Patógenos.

### **2.5.1 Microorganismos deterioradores**

El deterioro de un alimento es caracterizado por algún cambio en el producto que lo hace inaceptable para el consumidor desde el punto de vista sensorial. Este cambio podría ser daño físico, cambios químicos (oxidación, cambios de color), aparición de olores y sabores desagradables resultado del crecimiento microbiano y sus metabolitos en el alimento. La descomposición microbiana es por mucho la causa más común de deterioro y

se manifiesta por sí misma como un crecimiento visible (lama, colonias), con cambios en la textura (degradación de polímeros), la producción de gas, con el consecuente abombamiento de envases o empaques o bien con la aparición de olores y sabores desagradables.<sup>5, 9, 26</sup>

- ✓ Ejemplos de microorganismos deterioradores: psicrófilicos; bacterias Gram negativas fermentativas (enterobacterias).

## **2.5.2 Microorganismos indicadores.**

Son microorganismos presentes en los alimentos y se agrupan en base a sus características fisiológicas, tipo de medio de cultivo utilizado para su desarrollo, temperatura de incubación, etc. Los grupos microbianos indicadores de mayor relevancia en los alimentos son las bacterias mesofílicas aerobias (BMA), los organismos coliformes totales (CT), coliformes fecales (CF), los hongos y levaduras, entre otros grupos.

## **2.5.3 Bacterias mesofílicas aerobias (BMA)**

También conocida como cuenta total viable, en este grupo se cuantifican todas las bacterias que crecen en un rango de 20 – 40°C (con una temperatura óptima de crecimiento  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ ) en presencia de oxígeno<sup>17</sup>. Recuentos elevados reflejan problemas asociados a:

- ✓ Que tan contaminado está el alimento, las condiciones higiénicas en las cuales se manejó y preparó.
- ✓ El nivel de frescura.

Este grupo no tiene significado sanitario en:

- ✓ Productos fermentados (por ejemplo quesos)
- ✓ Alimentos que en su formulación tienen conservadores.

## **2.5.4 Coliformes totales.**

El grupo coliforme está formado por bacilos Gram negativos, aerobios y anaerobios, no esporulados que fermentan la lactosa, con producción de gas dentro de las 48 horas de incubación a 35° C. La denominación de coliformes designa a un grupo de bacterias que tienen características bioquímicas en común, este grupo incluye cuatro géneros

principalmente: *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp., y *Klebsiella* sp. tienen importancia como indicadores de contaminación del agua y de los alimentos.

El uso de los coliformes totales como indicador sanitario puede aplicarse para: a) La detección de prácticas sanitarias deficientes en el manejo y en la fabricación de alimentos; b) Como indicador de prácticas higiénicas inadecuadas<sup>9, 22</sup>.

### **2.5.5 Coliformes fecales**

Cumplen con la definición de los CT, pero además tienen la capacidad de fermentar la lactosa con producción de gas a una temperatura de 44.5°C. El principio de utilizar a los coliformes fecales como indicadores más confiables de contaminación fecal que los coliformes totales, es debido a que un porcentaje más elevado de coliformes aislados de materia fecal y de animales de sangre caliente fermentan la lactosa a esas temperaturas. *E. coli* se considera el prototipo de coliforme fecal, ya que se encuentra de manera constante en el contenido intestinal del hombre y animales superiores.

El uso de los coliformes fecales como indicador sanitario, en los alimentos: su hallazgo no es generalizable para todos los casos; pero proporciona una idea de los antecedentes sanitarios, dudosas prácticas sanitarias de los procesos, así como la probabilidad de encontrar microorganismos patógenos en el alimento, del tipo *E. coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., etc.<sup>9, 22</sup>

### **2.5.6 Microorganismos patógenos**

Pueden estar presentes en los alimentos y originar las intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias.<sup>5</sup> Su presencia en los alimentos no provoca, por norma general, que estos cambien de olor, color y sabor, por lo que no suele ser posible detectar el peligro por el aspecto externo de los mismos. Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) de origen bacteriano son las que con mayor frecuencia se asocian a nivel mundial.

Ejemplos de patologías causadas por microorganismos patógenos: salmonelosis, fiebre tifoidea; shigelosis o disentería bacilar; gastroenteritis por *Escherichia coli* enteropatógena, síndrome urémico hemolítico producido por *E. coli* O157:H7; enteritis por

*Yersinia enterocolitica*; diarreas por *Vibrio parahaemolyticus* y por otros vibrios próximos al *V. cholerae*; enteritis por *Campylobacter* sp. y por *Bacillaceae*; intoxicación estafilocócica, botulismo; intoxicación por *Clostridium botulinum*, etc.

### **2.5.7 *Salmonella* sp**

*Salmonella* sp. es una bacteria patógena descubierta por Daniel Elmer Salmon en 1855, este microorganismo está incluido en la familia *Enterobacteriaceae*. Es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos, con fimbrias y pilis, algunas forman una delgada microcápsula (antígeno capsular Vi) y no producen esporas. Son catalasa positiva, oxidasa negativa, fermenta glucosa, con producción de gas, pero no fermenta la lactosa, ni sacarosa, descarboxila arginina, lisina y ornitina, crece en citrato y produce H<sub>2</sub>S y no hidroliza la urea<sup>1, 5, 8, 9, 21, 27</sup>

Las cepas pueden permanecer viables en diferentes condiciones ambientales, sobreviven a la refrigeración, congelación y pueden resistir al calentamiento<sup>1, 21</sup>. Según el Centro de Control de Enfermedades (CDC), aproximadamente 40,000 casos de salmonelosis son reportados en los Estados Unidos cada año. La transmisión es usualmente a través de manipuladores de alimentos, carnes y huevos no cocinados, siendo el pollo el mejor reservorio<sup>9</sup>.

Los síntomas suelen comenzar de 6 a 72 horas después de la infección, generalmente duran entre 4 a 7 días y puede eventualmente provocar dolor de cabeza, fiebre, dolor abdominal, diarrea, vómito, erupción maculo-papulosa en pecho y espalda<sup>9</sup>. Los síntomas de artritis pueden aparecer de 3 a 4 semanas después de los síntomas agudos. Los enfermos presentan un periodo de convalecencia entre 1 y 8 semanas. Las formas clínicas se pueden agrupar en: 1) infecciones asintomáticas agudas; 2) gastroenteritis aguda; 3) bacteremia con o sin supuración local; 4) fiebre tifoidea y 5) estado de portador crónico asintomático<sup>5,9</sup>. Todas las personas son susceptibles de adquirir esta enfermedad, pero los síntomas son más severos en la población pediátrica, de la tercera edad y los pacientes inmunocomprometidos. La infección puede ocasionar enfermedades crónicas y se debe evitar que las personas con síntomas de salmonelosis o portadores, manipulen alimentos.

### 2.5.8 *Escherichia coli*

*E. coli* es una bacteria que normalmente vive en el intestino del hombre y animales, aunque la mayoría de las variedades de esta bacteria no son patógenas (son inocuas). Los aislamientos se diferencian serológicamente por los antígenos somáticos (O), flagelar (H) y capsular (K). Se han identificado 174 antígenos O, 56 H y 80 K.

La mayoría de las cepas son comensales, pero algunas cepas pueden causar diarrea y han sido clasificadas en seis categorías o grupos: enterohemorrágica (EHEC), enteropatógena (EPEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EaggEC), y de adherencia difusa (DAEC) (cuadro 1).

<b>Cuadro 1. CARACTERÍSTICAS DE <i>E. coli</i> ENTEROHEMORRÁGICA (EHEC) <sup>6</sup></b>			
<b>SÍNTOMAS CLÍNICOS</b>	<b>EPIDEMIOLOGÍA</b>	<b>SEROGUPOS O SEROTIPOS MÁS COMUNES</b>	<b>FACTORES DE PATOGENICIDAD</b>
<b>SUH, diarrea sin sangre, dolor abdominal, fiebre y vómito.</b>	<b>Niños y adultos que la adquieren por comer alimentos contaminados</b>	<b>O157:H7, O26:H11, O103:H2, O113:H21</b>	<b>STX, intimina, A/E, pO157</b>

### 2.5.9 *Escherichia coli* O157:H7

*E. coli* O157:H7 habitualmente produce la colitis hemorrágica y daño renal, que requiere una baja dosis mínima infectante (10-100 células), es uno de los patógenos que mayor atención ha recibido y hacia los cuales la industria de alimentos ha reenfocado su atención como una causa de morbilidad-mortalidad significativas.<sup>2, 6, 7, 13, 14 26, 28, 29</sup>

La capacidad toxigénica de las cepas es necesaria para que el paciente desarrolle colitis hemorrágica y diarrea con sangre, ya que la citotoxina Stx es el principal mecanismo

de virulencia<sup>7, 15, 23</sup>. El periodo de incubación es de 3 a 9 días, los síntomas que presenta el paciente incluyen cólicos severos (dolor abdominal) y diarrea que inicialmente es líquida y luego va acompañada con sangre, también puede producir vómitos, fiebre que suele ser baja o no manifestarse. La enfermedad puede conducir a una pérdida permanente de la función renal denominada síndrome urémico hemolítico (SUH)<sup>7, 23</sup>. *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) es considerada un patógeno emergente transmitido por alimentos asociado a casos esporádicos y brotes de diarrea, colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH)<sup>15</sup>. En el cuadro 2 se describen las diferencias bioquímicas, entre *Escherichia coli* y *Escherichia coli* O157:H7

**Cuadro 2.** Diferencias bioquímicas entre *E. coli* y *E. coli* O157:H7

<b>Pruebas bioquímicas</b>	<b><i>E. coli</i></b>	<b><i>E. coli</i> O157:H7</b>
Fermentación de glucosa	+	+
Fermentación de lactosa	+	+
Fermentación de sacarosa	+	+
Formación de H <sub>2</sub> S	-	-
Producción de gas	+	+
Utilización de citrato	-	-
Producción de indol	+	+
Movilidad	<i>Móvil / no móvil</i>	<i>Móvil / no móvil</i>
<b>Fermentación de sorbitol</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
<b>Actividad β-glucuronidasa</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
Lisina descarboxilasa	+ (90%)	+ (100%)
Ornitina descarboxilasa	+ (95%)	+ (100%)
Fermentación de celobiosa	- (2%)	- (2%)
Producción de ureasa	+/-	+/-

Producción de malonato	-	-
------------------------	---	---

Tomado de 15

## 2.6 Recomendaciones de la OMS: cinco claves para mejorar la inocuidad de los alimentos

La OMS y sus Estados Miembros promueven los beneficios de la inocuidad de los alimentos, desde el productor hasta el consumidor, de prevenir brotes, de las dietas saludables, de la actividad física y de fomentar las "5 claves para la inocuidad de los alimentos"

- ✓ Mantener la limpieza.
- ✓ Separar los alimentos crudos de los cocinados
- ✓ Cocinar bien todos los alimentos
- ✓ Mantener los alimentos a la temperatura adecuada
- ✓ Utilizar agua e ingredientes inocuos.

Los problemas más preocupantes relacionados con la inocuidad de los alimentos son<sup>14</sup>:

- La propagación de los riesgos microbiológicos (entre ellos bacterias como *Salmonella* o *Escherichia coli*).
- Los contaminantes químicos de los alimentos.
- La evaluación de nuevas tecnologías alimentarias, como los alimentos genéticamente modificados, y
- La creación en la mayoría de los países de sistemas sólidos que velen por la inocuidad de los alimentos y garanticen la seguridad de la cadena alimentaria mundial.

### 3 Marco de referencia

✓ Bautista-De León y col., (2013) en el Centro de Investigaciones Químicas, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, determinaron la frecuencia de bacterias indicadoras, *Salmonella* sp. y patotipos de *Escherichia coli* diarreagénicas en ensaladas de vegetales cocidos listos para comer en restaurantes mexicanos, adquiridos en 3 tipos de restaurantes: A) restaurantes de cadena nacionales; B) los restaurantes locales y C) pequeños restaurantes. En las muestras analizadas encontraron la presencia de coliformes totales, coliformes fecales, *Salmonella* sp. y patotipos de *Escherichia coli* productoras de diarreas. Este fue el primer informe sobre la calidad microbiológica y el aislamiento de *Salmonella* sp, *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) y productoras de toxina Shiga de *E. coli* (STEC) en ensaladas de verduras cocidas listos para comer en restaurantes mexicanos, reportado en el estado de Hidalgo.

✓ Barrantes y Achí (2011), en el Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), de la Universidad de Costa Rica, analizaron 37 muestras de lechuga para determinar su calidad microbiológica y la búsqueda de patógenos específicos; encontrando en el 65% de las muestras analizadas *E. coli*, aunque no se encontró *Shigella* sp. ni *Salmonella* sp. mediante el cultivo o PCR-múltiple.

✓ Berger y col., (2010) en el Centro de Microbiología Molecular e infección de la División de Biología Celular y Molecular, Imperial College London, concluyeron que las patologías causadas por *Salmonella* sp y *E. coli* O157:H7 se han vinculado a la carne con más frecuencia que a cualquier otro alimento; sin embargo, se han reportado brotes severos relacionados con el consumo de rábanos contaminados, espinaca pre-ensados y lechugas.

✓ Castro-Rosas y col., (2012) en el Centro de Investigaciones Químicas, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, evaluaron la calidad microbiológica y la prevalencia de patotipos de *E. coli* productores de diarreas en 130 ensaladas de verduras crudas, compradas en restaurantes de la ciudad Pachuca, Hidalgo, donde la mayoría de los vegetales que se consumen a nivel local se riegan con aguas residuales sin tratar. Las muestras fueron adquiridas en restaurantes de tres categorías: a) los restaurantes de cadena nacional; B) restaurantes locales, ambos



con el distintivo H (es un reconocimiento que la Secretaría de Turismo otorga a los restaurantes que manejan materiales con altos niveles de higiene); y C) los pequeños restaurantes económicos locales sin distintivo H. El estudio incluyó 6 restaurantes (2 por categoría). La cantidad de muestras positivas para CF y *E. coli* por ensalada fue similar entre los restaurantes y categorías. Únicamente 8 muestras de ensaladas estuvieron contaminadas, se identificaron 2 cepas *E. coli* productora de toxina Shiga en ensalada de espinacas, 3 cepas de *E. coli* no O157 en una mezcla de ensaladas, 2 cepas de *E. coli* enteroinvasiva y 1 cepa de *E. coli* enterotoxigénica.

✓ Kase y col., (2012a) del Centro para la Seguridad Alimentaria y la Nutrición Aplicada, Food and Drug Administration (FDA) en los Estados Unidos, inocularon *Escherichia coli* O157:H7 y no-O157 en espinacas, lechugas y cilantro. El objetivo del estudio fue preparar diferentes formas de la muestra inicial, para lo cual las verduras inoculadas fueron previamente remojadas, mezcladas en un homogenizador (Stomacher) u homogenización mediante el uso de una licuadora. Para la recuperación de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de cilantro se usaron métodos de cultivo convencional y técnicas de PCR en tiempo real, obteniendo resultados mejores cuando se utilizaron los métodos de inmersión y homogenización con Stomacher.

✓ Kase y col., (2012b) evidenciaron la seguridad y la calidad microbiológica de espinaca y lechuga romana empaquetadas en bolsas listas para su consumo, encontrando altos recuentos de coliformes. No obstante, no se detectó *E. coli* O157:H7. Los lotes con el mayor número de días almacenados en refrigeración tenían menor cantidad de coliformes. Este hallazgo, junto con un mayor contenido de coliformes en las hojas de las verduras analizadas que estaban en el fondo de las bolsas, sugiere que se reestructure el programa de muestreo microbiológico de los productos empaquetados.

✓ Lou y col., (2010) en el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos y Microbiana Ambiental, Departamento de Agricultura USA. Investigaron el impacto de la temperatura de almacenamiento y la evolución de *Escherichia coli* O157: H7 inoculada en bolsas comercialmente disponibles que contenían lechuga romana, lechuga romana fresca picada de diferentes marcas comerciales, procedentes de dos tiendas (una de venta al mayoreo y la otra al menudeo). El estudio demostró que patógenos como *E. coli* O157:H7, pueden crecer significativamente en ensaladas de lechuga envasadas comercialmente, mientras que la calidad visual del producto es completamente aceptable. El controlar la temperatura

de almacenamiento a 5°C o menos es fundamental para evitar la proliferación de patógenos y ayuda mitigar los riesgos de contaminación por estos microorganismos presentes durante el crecimiento del cultivo o después de la cosecha.

✓ Slayton y col., (2011) del CDC en Atlanta, Georgia, USA, reportaron un brote multiestatal de *E. coli* O157:H7 en 10 estados de la Unión Americana, asociado al consumo de lechuga romana, a partir de una ensalada de venta en una cadena de tiendas de comestibles. En el estudio se identificaron 58 casos de los cuales 67% fueron hospitalizados y 6.4% desarrollaron síndrome urémico hemolítico. También determinaron que sólo un lote de lechuga romana proveniente de una granja, era proveedora de la cadena de tiendas de comestibles y un campus universitario.

✓ Torres-Vitela y col., (2013) en el Centro de Investigaciones Químicas, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, investigaron en 280 muestras de jugo de zanahoria fresco: coliformes totales, coliformes fecales (*Escherichia coli*), patotipos de *E. coli* productoras de diarrea, así como la investigación de *Salmonella sp.* Las muestras fueron adquiridas en 3 tipos de restaurantes de la ciudad de Pachuca: A) restaurantes de cadena nacionales; B) los restaurantes locales y C) pequeños restaurantes. Los resultados de laboratorio reflejaron una pobre calidad microbiológica y en el 5% de las muestras en todos los restaurantes de todos los niveles seleccionados hubo presencia de patotipos de *E. coli* productoras de diarrea y *Salmonella sp.*

✓ Tzschoppe y col., (2013) en el Laboratorio Nacional de Referencia de *Escherichia coli*, a raíz de los eventos sanitarios emergentes en el norte de Alemania, producidos por *E. coli* O104:H4, cepa que causó el brote con una alta incidencia de síndrome urémico hemolítico en mayo de 2011, los investigadores analizaron semillas germinadas y verduras que se consumían crudas de venta al menudeo, que en ese momento eran sospechosas de ser los vehículos de transmisión de los patógenos gastrointestinales. Utilizaron CHROMagar y técnicas de PCR en tiempo real para detectar los genes de *E. coli* O157:H7 (stx 1, stx 2, eae, ehxA).

✓ Vandamm y col., (2013) del Departamento de Ciencia de los Alimentos y Nutrición Humana de la Universidad de Florida, USA, realizaron un estudio para determinar el comportamiento de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella sp.*, a

diferentes temperaturas y condiciones de almacenamiento de apio fresco recién cortado y sin cortar, inocularon la parte externa del apio, almacenadas en bolsas de polietileno selladas, durante 1, 3, 5 y 7 días a 4°C ó 12°C, y después de 8 y 17 h, y 1, y 2 días cuando fueron almacenadas a 22°C y 4°C. Los resultados revelaron que las poblaciones bacterianas en las superficies de corte fueron significativamente más altas que las superficies sin cortar y que las poblaciones bacterianas se reducen en condiciones de refrigeración, pero sobreviven y pueden crecer a temperaturas elevadas.

#### 4 Planteamiento del problema

Los cambios en el estilo de vida, la moda, los hábitos dietéticos de las personas, los tiempos de traslado de la casa al trabajo y viceversa; el estrés que se vive en la actualidad, han impactado de manera directa en los modelos tradicionales de comidas en las familias, orillando a las personas a consumir en menor proporción alimentos preparados en casa y aumentado el consumo de alimentos de venta en vía pública. La población de la ciudad de Puebla, como en las grandes urbes, no es ajena a esta problemática, lo que ha permitido a los vendedores de comida rápida, específicamente taquerías, tener disponibles a toda hora, en cualquier época del año, las delicias gastronómicas llamadas: tacos

La expresión del manipulador de alimentos de un puesto ambulante: “con todo”, refiriéndose a la adición de ingredientes crudos (no cocinados) como cilantro, cebolla, salsa y no necesariamente, la incorporación de patógenos bacterianos a los tacos, haría suponer la existencia de múltiples brotes de enfermedades transmitidas por estos alimentos; sin embargo, no se conocen reportes que alerten a la población de la ciudad de Puebla de la evidencia de *Salmonella* sp. y *E. coli* O157:H7 por el consumo de tacos de venta en la vía pública.

Por lo que surge el interés de conocer ¿cuál es el contenido de bacterias mesofílicas aerobias (BMA), coliformes fecales (CF) e investigar la presencia de *Salmonella* sp. y *E. coli* O157:H7 en 20 muestras de cilantro, obtenidas mediante un muestreo por selección intencional en taquerías ambulantes en la zona sur de la ciudad de Puebla, Puebla, México?

## 5 Justificación

El público en general debe estar informado y mantener la confianza en los lugares donde acostumbra adquirir sus alimentos (tacos) para “llevar” o consumir al momento. Los alimentos además de ser la fuente de nutrientes y energía del organismo, brindan placer, favorecen la socialización, pero si no son manipulados adecuadamente pueden convertirse en vehículos de enfermedades gastrointestinales. El cilantro (*Coriandrum sativu*) que se adiciona “crudo” especialmente a los tacos antes de degustarlos, puede venir contaminado de origen por el agua no tratada utilizada para su cultivo, no estar desinfectado, estar desinfectado pero contaminarse con otros ingredientes crudos, por los utensilios o por el manipulador.

Estudios realizados en otros países, han alertado a los consumidores de la presencia de bacterias patógenas en vegetales frescos que se consumen crudos; de esta manera, los resultados obtenidos en la muestra seleccionada, permitió conocer: si hay presencia de *Salmonella* sp. y *E coli* O157:H7 además de conocer cuál es la calidad sanitaria del cilantro utilizado en las taquerías ambulantes que están ubicadas en la zona sur de la ciudad de Puebla.

## **6 Objetivos**

### **6.1 General**

- ✓ Determinar la calidad sanitaria e investigar la presencia de *Salmonella* sp. y *Escherichia coli* O157:H7 en muestras de cilantro (*Coriandrum sativu*), que se sirven en taquerías en la zona sur de la ciudad de Puebla.

### **6.2 Particulares**

1. Realizar los recuentos de bacterias mesofílicas aerobias, según los procedimientos descritos en la NOM-092-SSA1-1994.
2. Realizar los recuentos de coliformes fecales, según los procedimientos descritos en el Apéndice Normativo B de la NOM-145-SSA1-1995.
3. Investigar la presencia de *Salmonella* sp. según los procedimientos descritos en la NOM-114-SSA1-1994.
4. Investigar la presencia *Escherichia coli* O157:H7, tomando como base el Manual de procedimientos, diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de alimentos.

## **7 Diseño de la investigación**

### **7.1 Tipo de estudio**

Prospectivo, descriptivo, transversal y observacional.

### **7.2 Tamaño de muestra**

20 muestras de cilantro (*Coriandrum sativu*), obtenidas en puestos ambulantes (taquerías), ubicadas en la zona sur de la ciudad de Puebla.

### **7.3 Sede y lugar de estudio**

Laboratorio de Microbiología del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

### **7.4 Periodo de muestreo**

Septiembre – Octubre de 2013

### **7.5 Criterios de inclusión**

- ✓ Muestras de cilantro provenientes de puestos ambulantes (taquerías) que expendan sus productos en la vía pública ubicados en el sur de la ciudad de Puebla.

### **7.6 Criterios de exclusión**

- ✓ Muestras de cilantro provenientes de taquerías establecidas.
- ✓ Muestras de cilantro de venta en tiendas de autoservicios, mercados o provengan de domicilios particulares.
- ✓ Se descartaron aquellas muestras provenientes de una zona geográfica distinta a la establecida, de venta en taquerías establecidas o mercados populares.

### **7.7 Criterios de eliminación**

- ✓ Muestras de cilantro que por algún motivo se contaminan por factores externos (durante el transporte).
- ✓ Muestras de cilantro que sobrepasaron el tiempo límite para ser procesadas.

## **7.8 Análisis estadístico de la información**

Se aplicó una estadística descriptiva para presentar la información obtenida mediante tablas y gráficos.

## **8 Materiales y metodología**

### **8.1 Muestras**

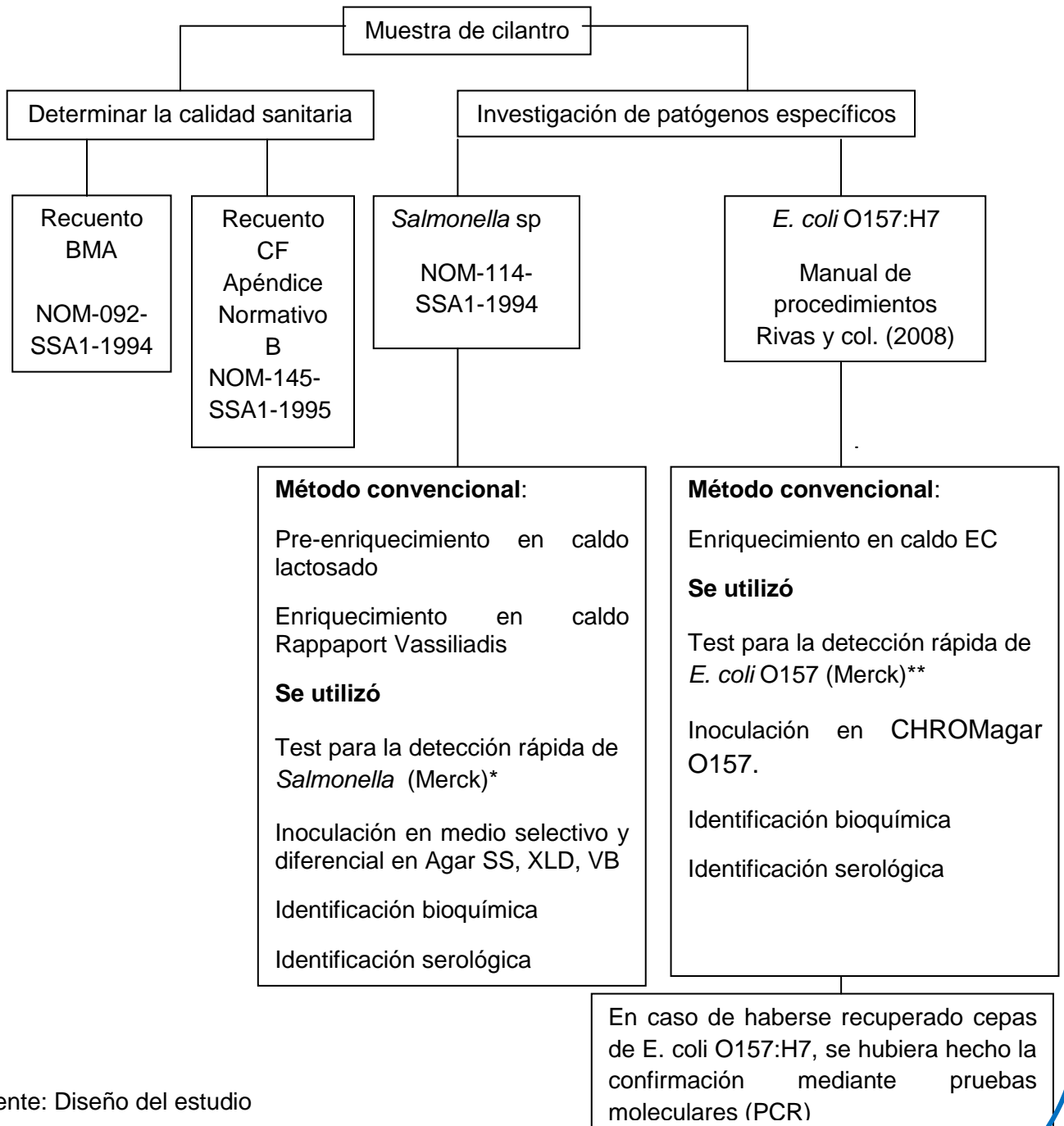
✓ Se recolectaron 20 muestras de cilantro (*Coriandrum sativu*), obtenidas en puestos ambulantes (taquerías), ubicadas en la zona sur de la ciudad de Puebla, mediante un muestreo por selección intencional. Después de realizar la compra de los tacos, las muestras de cilantro empaquetadas por el manipulador de alimentos en bolsas plásticas nuevas, fueron transportadas en un lapso no mayor a 3 horas al Laboratorio en condiciones de refrigeración, como se indica en la NOM-109-SSA1-1994. Bienes y servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Se utilizó un formato diseñado especialmente para la recolección de datos de los sitios de muestreo (Anexo A).

### **8.2 Metodología.**

Los análisis microbiológicos (BMA, CF y *Salmonella* sp) se realizaron mediante los métodos descritos en las Normas Oficiales Mexicanas, y para *E. coli* O157:H7 la metodología descrita por Rivas y col., 2008, respectivamente (esquemas de trabajo 1, 2, 3, 4, 5).



### 8.3 Esquema general de trabajo No. 1



Fuente: Diseño del estudio

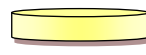
## 8.4 Esquema de trabajo No. 2

### Recuento de bacterias mesófilas aerobias (BMA)

#### Método: vertido en placa



Pesar 10 g de muestra en condiciones de esterilidad, en un frasco con 90 ml de agua peptonada, homogenizar y realizar las diluciones correspondientes ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ )



Tomar 1 ml de muestra y depositar en una placa estéril

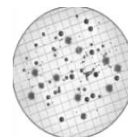


Adicionar 20 ml de agar cuenta estándar estéril

Homogenizar la muestra con el medio de cultivo y dejar gelificar

Incubar a  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 24 – 48 h

Realizar el recuento de UFC con ayuda del contador de colonias.



25 – 250 ufc/g

**Resultado e interpretación**

Fuente: Diseño del estudio<sup>17, 19, 20</sup>

### 8.5 Esquema de trabajo No. 3

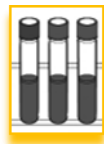
#### Determinación de bacterias coliformes fecales. Método: NMP



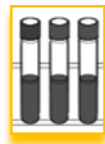
Pesar 10 g de muestra en condiciones de esterilidad, en un frasco con 90 ml de agua peptonada, homogenizar y realizar las diluciones correspondientes ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ )

#### Prueba presuntiva

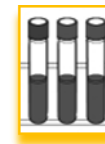
Caldo lauril sulfato



1 ml  
( $10^{-1}$ )



1 ml  
( $10^{-2}$ )

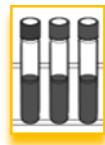
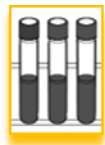


1 ml  
( $10^{-3}$ )

Incubar a 37°C, durante 24 – 48 h  
Tubos positivos:  
Crecimiento y producción de gas

#### Prueba confirmatoria

Caldo EC con MUG



Incubar a 44.5°C, durante 24 h  
Tubos positivos:  
Crecimiento y producción de gas  
Observar fluorescencia con UV

Lectura de tubos y consulta en tablas NMP

#### Resultado e interpretación

Fuente: Diseño del estudio<sup>19, 20, 22</sup>

## 8.6 Esquema de trabajo No. 4

### Investigación de *Salmonella* sp



Pesar 25 g de muestra en condiciones de esterilidad, en un frasco con 225 ml de caldo lactosado

Pre-enriquecimiento



Incubar a 37°C, durante 24 h

Enriquecimiento selectivo en caldo Rappaport Vassiliadis



Incubar a 42°C, durante 24 h

Inoculación en medios selectivos y diferenciales



SS



XLD



VB

Test para la detección rápida de *Salmonella* (Merck)\*

Incubar a 37°C, durante 24 h

Morfología colonial  
Lactosa negativa  
Producción de H<sub>2</sub>S

Identificación bioquímica

TSI LIA MIO CITRATO UREA

Incubar a 37°C, durante 18 -24 h

**RESULTADO**

Fuente: Diseño del estudio<sup>19, 20, 21, 25</sup>

Identificación serológica

### 8.7 Esquema de trabajo No. 5

#### Investigación de *E. coli* O157:H7



Enriquecimiento

Pesar 65 g de muestra en condiciones de esterilidad, en un frasco con 585 ml de caldo EC



Incubar a 42° C, durante 15 – 22 h

Inoculación en medios selectivos y diferenciales

Test para la detección rápida de *E. coli* O157 (Merck)\*\*



CHROMagar O157

Incubar a 37°C, durante 24 h

Morfología colonial  
Color malva

Identificación bioquímica

TSI LIA MIO CITRATO UREA

**RESULTADO**

Identificación serológica

En caso de recuperar cepas de *E. coli* O157:H7, confirmación mediante pruebas moleculares (PCR)

Fuente: Diseño del estudio<sup>15, 24</sup>

En el caso del Test para la detección rápida de *Salmonella* sp (Merck)\* y de *E. coli* O157 (Merck)\*\*, indica que:

- ✓ Si en la prueba rápida se obtenía un resultado negativo, el procedimiento se consideró como negativo.
- ✓ Si en la prueba rápida se obtenía un resultado positivo, el procedimiento se consideró como presuntivo.
- ✓ El límite inferior de detección de las pruebas rápidas es de:  $10^4 - 10^7$  microorganismos/ml.

Para la interpretación de la calidad sanitaria de las muestras de cilantro, se utilizó el Apéndice Informativo B. De las especificaciones sanitarias propuestas en la NOM-093-SSA1-1994, bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos, que establece:

Ensaladas verdes: Crudas o de frutas.

BMA: 150 000 ufc/g

CF: 100 NMP/g.

Para la interpretación de los resultados se informó: presencia o ausencia de *Salmonella* sp., según lo establece la NOM-114-SSA1-1994 y *E. coli* O157:H7 (Rivas y col., 2008), respectivamente.

En la realización del estudio se utilizó como control cepas de *Salmonella typhi* ATCC 14028 y *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 70092, proporcionadas por el Dr. Rigoberto Hernández Castro del Hospital General González, de la ciudad de México, D.F.

## **8.8 Recursos humanos**

Director de tesis: M.S.P. Carlos Cabrera Maldonado.

Tesista: Sandra Mata Jiménez

## **8.9 Recursos materiales**

Todo el material, equipo, medios de cultivo y reactivos utilizados en el Laboratorio de Microbiología Sanitaria.

## **8.10 Recursos financieros**

Esta investigación fue financiada por el Cuerpo Académico Microbiología 038, de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Y formó parte del proyecto de investigación: “Prevalencia de cepas multi-resistentes de *Salmonella* sp. y *Escherichia coli* O157:H7 en alimentos crudos en la ciudad de Puebla”, autorizado por PROMEP.

## 9 Resultados.

**Tabla 1 Resultados de los análisis microbiológicos (BMA, CF) realizados a las muestras de cilantro utilizado en taquerías ambulantes en la zona sur de la ciudad de Puebla.**

No. muestra	BMA (ufc/g)	CF (NMP/g)	BMA log (ufc/g)	CF log (NMP/g)
1	225'000 000	210	8.4	2.3
2	15'000 000	240	7.2	2.4
3	40'000 000	460	7.6	2.7
4	70'000 000	23	7.8	1.4
5	20'000 000	210	7.3	2.3
6	240'000 000	> 1100	8.4	3.0
7	15'000 000	> 1100	7.2	3.0
8	50'000 000	210	7.7	2.3
9	15'000 000	240	7.2	2.4
10	70'000 000	> 1100	7.8	3.0
11	12'000 000	23	7.1	1.4
12	80'000 000	240	7.9	2.4
13	220'000 000	210	8.3	2.3
14	40'000 000	460	7.6	2.7
15	20'000 000	23	7.3	1.4
16	80'000 000	> 1100	7.9	3.0
17	25'000 000	460	7.4	2.7
18	240'000 000	210	8.4	2.3
19	20'000 000	210	7.3	2.3
20	50'000 000	> 1100	7.7	3.0
		<i>Promedio</i>	<i>7.7</i>	<i>2.4</i>
		<i>Desv. std</i>	<i>0.44</i>	<i>0.54</i>

Fuente: Resultados de laboratorio



**Tabla 2 Investigación de patógenos bacterianos en muestras de cilantro utilizado en taquerías ambulantes en la zona sur de la ciudad de Puebla.**

No. muestra	<i>Salmonella</i> sp	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Otras bacterias aisladas
1	Ausencia	Ausencia	<i>Citrobacter freundii</i> , <i>E. coli</i>
2	Ausencia	Ausencia	<i>Citrobacter freundii</i>
3	Ausencia	Ausencia	<i>Citrobacter freundii</i>
4	Ausencia	Ausencia	<i>Citrobacter freundii</i> , <i>E coli</i>
5	Ausencia	Ausencia	<i>E. coli</i> , <i>Proteus</i> sp
6	<b>Presencia</b>	Ausencia	<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterobacter</i> sp
7	Ausencia	Ausencia	<i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> sp, <i>Klebsiella</i> sp
8	Ausencia	Ausencia	<i>Citrobacter freundii</i>
9	Ausencia	Ausencia	<i>E. coli</i> , <i>Proteus</i> sp
10	Ausencia	Ausencia	<i>Enterobacter</i> sp, <i>Proteus</i> sp
11	Ausencia	Ausencia	<i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> sp, <i>Klebsiella</i> sp
12	Ausencia	Ausencia	<i>Citrobacter freundii</i>
13	Ausencia	Ausencia	<i>Citrobacter freundii</i>
14	Ausencia	Ausencia	<i>Enterobacte</i> sp, <i>Klebsiella</i> sp
15	Ausencia	Ausencia	<i>Citrobacter freundii</i>
16	Ausencia	Ausencia	<i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> sp, <i>Klebsiella</i> sp
17	Ausencia	Ausencia	<i>Enterobacter</i> sp, <i>Proteus</i> sp
18	Ausencia	Ausencia	<i>Citrobacter freundii</i>
19	Ausencia	Ausencia	<i>Citrobacter freundii</i>
20	Ausencia	Ausencia	<i>E. coli</i> , <i>Proteus</i> sp

Fuente: Resultados de laboratorio

## 10 Discusión de resultados

Se recolectaron 20 muestras de cilantro (*Coriandrum sativu*), obtenidas en puestos ambulantes (taquerías), ubicadas en la zona sur de la ciudad de Puebla, mediante un muestreo no probabilístico por selección intencional durante los meses de septiembre y octubre del año 2013. Tomando en cuenta su infraestructura de los establecimientos, el 100% eran móviles, lo que les permitía su desplazamiento de un sitio a otro, presentaban una infraestructura metálica, donde se instalaba el quemador para cocinar. El 100% expendían los alimentos directamente en la vía pública y al libre tránsito de personas y vehículos; visualmente el 100% de los contenedores donde estaban colocados los alimentos se apreciaba un estado óptimo; 75% tenían disponible un dispensador de gel. En lo que se refiere a los manipuladores: su aspecto higiénico óptimo fue del 85%; el 100% usaban delantal; el 100% tenían recogido el cabello; 50% usaban cofia; 30% usaban cubrebocas; 80% tenían las uñas cortas y limpias; sólo el 15% usaban guantes para el manejo de los ingredientes.

En el 100% de los casos, los alimentos estaban almacenados a temperatura ambiente; el 50% eran atendidos por 2 personas y 50% por 3 personas; la persona que manejaba el dinero no era el manipulador de alimentos en el 100% de los casos. Visualmente la higiene en la manipulación de los alimentos en el puesto ambulante se calificó como bueno en el 100%. Se solicitó al manipulador de alimentos que colocara las muestras de cilantro por separado en bolsas plásticas, nuevas y fueron transportadas en un lapso no mayor a 3 horas al Laboratorio de Microbiología del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, en condiciones de refrigeración<sup>19</sup>.

La calidad sanitaria de las muestras de cilantro, reflejó una carga microbiana elevada en todas las muestras analizadas, los recuentos de bacterias mesofílicas aerobias (BMA) oscilaban entre 12'000 000 ufc/g (7.1 log ufc/g) como valor mínimo y 240'000 000 ufc/g (8.4 log ufc/g) como valor máximo, obteniendo un valor promedio y desviación estándar de  $7.7 \pm 0.44$  log ufc/g. De igual manera, los recuento de coliformes fecales (CF) fluctuaron entre 23 NMP/g (1.4 log NMP/g) como valor mínimo y 1100 NMP/g (3.0 log NMP/g) como valor máximo, obteniendo un valor promedio y desviación estándar de  $2.4 \pm 0.54$  log NMP/g. Los recuentos de BMA y CF sobrepasaron los niveles de aceptación

marcados en la Norma Oficial Mexicana utilizada como referencia en esta investigación (Apéndice Informativo B de la NOM-093-SSA1-1994, que establece: Ensaladas verdes: BMA: 150 000 ufc/g; CF: 100 NMP/g).

La presencia de altos recuentos de BMA y CF pueden explicarse por la contaminación de origen que pudieran contener las muestras<sup>6, 8</sup>, por una escasa o nula desinfección del producto, por una manipulación incorrecta, entre otros factores. Pero, es importante recordar que el cilantro analizado ya estaba listo para ser servido y que se supone fue sometido a un proceso de desinfección previo, los resultados reflejan malas prácticas higiénicas.<sup>2, 3, 4, 8</sup>. Los resultados de esta investigación fueron similares a los obtenidos por Huerta y col.<sup>10</sup> quien analizó muestras de lechuga de venta en supermercados en la ciudad de Puebla, así como los estudios realizados por Castro y col.<sup>6</sup> Por lo que se recomienda a los consumidores estar informados y mantener la confianza de adquirir sus alimentos (tacos) para “llevar” o consumir al momento en los lugares donde acostumbra

Una carga microbiana elevada sugiere la posible presencia de microorganismos patógenos, como los que se investigaron. Esta afirmación fue confirmada por el aislamiento de una cepa de *Salmonella* sp a partir de una de las muestras de cilantro analizadas mediante las metodologías propuestas en el estudio. La identificación preliminar se realizó después del pre-enriquecimiento en caldo lactosado incubado a 37°C y de la incubación a 42°C, durante 24 h del tubo que contenía el caldo de enriquecimiento selectivo Rappaport Vassiliadis. Al realizar el Test *Salmonella* (Merck) (Siglepath® *Salmonella* Rapid test for the detection of *Salmonella* in foods), se obtuvo un resultado positivo; por lo tanto, el procedimiento se consideró como presuntivo a *Salmonella* sp. Después de inocular e incubar las placas de agar SS, agar XLD y agar verde brillante durante 24 h a 37°C, la morfología colonial fue sugestiva a *Salmonella* sp. en los tres medios de cultivo, observándose colonias lactosa negativas productoras de H<sub>2</sub>S en las placas de agar SS, agar XLD. Los resultados de la identificación bioquímica (convencional y mediante el equipo automatizado Vitek<sup>®</sup>2 compact) lo confirmaron. Finalmente, la cepa de *Salmonella* sp. identificada, se sometió a la identificación serológica utilizando el antisuero polivalente *Salmonella* O: A – I + Vi. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Castro y col.<sup>3</sup>

La identificación preliminar de *E. coli* O157:H7, se realizó después del enriquecimiento en caldo EC incubado a 42°C. Al realizar el Test *E. coli* O157 (Merck) (Siglepath® *E.coli* O157 Rapid test for the detection of *E.coli* O157 in foods) se obtuvo un resultado negativo; por lo tanto, el procedimiento se consideró como negativo a *E. coli* O157. Evento que fue confirmado en el 100% de las muestras, ya que no se presentó desarrollo de colonias color malva en CHROMagar™, que hubieran sugerido la identificación preliminar de *E. coli* O157:H7 en este medio de cultivo, como lo han reportado otros investigadores<sup>11</sup>; sin embargo, se identificó 55% de cepas de *Citrobacter* sp.; 40% de *E coli* no O157; 35% de *Enterobacter* sp.; 25% de *Proteus* sp. y 20% de *Klebsiella* sp.

Este estudio muestra la importancia de investigar la posible presencia de agentes patógenos bacterianos en vegetales como el cilantro y la necesidad de incrementar la vigilancia e investigación permanente, que garanticen las condiciones sanitarias en la comercialización de los tacos. Por lo que se recomienda que el cilantro sea sometido a un proceso de desinfección, ya que es un producto que generalmente, se consume crudo.<sup>2, 3, 4, 6,10, 23, 26, 29</sup>

## 11 Conclusiones

- 1.- La calidad sanitaria de las muestras de cilantro, reflejó una carga microbiana elevada en todas las muestras analizadas, tanto de BMA como de CF que sobrepasaron los niveles de aceptación marcados en la Norma Oficial Mexicana, utilizada como referencia en esta investigación.
- 2.- Sólo se identificó una cepa de *Salmonella* sp que representa el 5% (1/20).
- 3.- No se encontró la presencia de *E. coli* O157:H7 en ninguna de las muestras analizadas.
- 4.- Se identificó 20% de cepas de *Klebsiella* sp., 25% de *Proteus* sp., 35% de *Enterobacter* sp., 40% de *E coli* no O157 y 55% de *Citrobacter* sp.

## 12 Bibliografía.

1. Bacteriological Analytical Methods. (2007). Chapter 5. *Salmonella*. [En línea]. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070149.htm> . Fecha de consulta: Febrero de 2011.
2. Barrantes, K. y Achí, R. (2011). Calidad microbiológica y análisis de patógenos (*Shigella* y *Salmonella*) en lechuga. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 31:31-36.
3. Bautista-De León, H., Gómez-Aldapa, C.A., Rangel-Vargas, E., Vázquez-Barrios, E. y Castro-Rosas, J. (2013). Frequency of indicator bacteria, *Salmonella* and diarrhoeagenic *Escherichia coli* pathotypes on ready-to-eat cooked vegetable salads from Mexican restaurants. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23461467>. Fecha de consulta: Abril de 2013.
4. Berger, C.N., Sodha, S.V., Shaw, R.K., Griffin, P.M., Hand, P. y Frankel, G. (2010). Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. Environ Microbiol. 12(9):2385-2397.
5. Brooks, G., Butel, J. Morse, S. y Mietzner, T. (2011). *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. México: Mc Graw Hill. 221–225 Pp.
6. Castro-Rosas, J., Cerna-Cortés, J. F., Méndez-Reyes, E., López-Hernández, D., Gómez-Aldapa, C.A. y Estrada-García, T. (2012). Presence of faecal coliforms, *Escherichia coli* and diarrheagenic *E. coli* pathotypes in ready-to-eat salads, from an area where crops are irrigated with untreated sewage water. Int J Food Microbiol.15;156(2):176-80
7. European Center for Disease Control. (2011). EU case definition: HUS caused by epidemic strain Shiga toxin 2-producing *Escherichia coli*. [En línea]. Disponible en:

[http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/escherichia\\_coli/epidemiological\\_data/Pages/EU\\_case\\_definition.aspx](http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/escherichia_coli/epidemiological_data/Pages/EU_case_definition.aspx). Fecha de consulta: Mayo de 2012.

8. Fernández, E. (2000). *Microbiología e inocuidad de los alimentos*. México: Universidad Autónoma de Querétaro. 561–572 Pp.
9. Jeffrey, C.P. (2010). *Alcama's Fundamentals of Microbiology*. United States: Jones and Bartlett International Edition. 843 Pp.
10. Huerta, C.J.M. (2012). Determinación de la calidad sanitaria y aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* spp de lechugas expandidas en tiendas de autoservicio de la ciudad de Puebla. Tesis de Licenciatura Químico Farmacobiólogo. Fac. CQ-BUAP. Puebla, Puebla, México. 50 p.
11. Kase, J.A., Maounounen-Laasri, A., Son, I., Deer, D. M., Borenstein, S., Prezioso, S. y Hammack, T.S. (2012a). Comparison of different sample preparation procedures for the detection and isolation of *Escherichia coli* O157:H7 and Non-O157 STECs from leafy greens and cilantro. *Food Microbiol.* 32(2):423-426.
12. Kase, J.A., Borenstein, S., Blodgett, R.J. y Feng, P.C. (2012b). Microbial quality of bagged baby spinach and romaine lettuce: effects of top versus bottom sampling. *J Food Prot.* 75(1):132-136.
13. Lou, Y., He, Q. y McEvoy, J.L. (2010). Effect of storage temperature and duration on the behavior of *Escherichia coli* O157:H7 on packaged fresh-cut salad containing romaine and iceberg lettuce. *J Food Sci.* 75(7):390-397.
14. Organización Mundial de la Salud. (2011). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). [En línea]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/>. Fecha de consulta: Febrero de 2012.
15. Rivas, M., Leotta, G. y Chinen, I. (2008). Manual de Procedimientos, diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de alimentos. WHO Global Salm Surv. [En línea]. Disponible en:

<http://fos.panalimentos.org/LinkClick.aspx?fileticket=IhllApW7G8c%3D&tabid=120&mid=460&language=es-ES>. Fecha de consulta: Enero de 2010.

16. Sagarpa. (2012). El cilantro. [En línea]. Disponible en: <http://w4.siap.sagarpa.gob.mx/AppEstado/monografias/Hortalizas/Cilantro.html>. Fecha de consulta: Enero de 2012.

17. Secretaría de Salud. (1995). Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, bienes y servicios. Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Diario Oficial de la Federación. 12 de diciembre de 1995.

18. Secretaría de Salud. (1994). Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994, bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos. Apéndice informativo B. De las especificaciones sanitarias. Diario Oficial de la Federación. 4 de octubre de 1995.

19. Secretaría de Salud. (1994). Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994. Bienes y servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Diario Oficial de la Federación. 04 de noviembre de 1994.

20. Secretaría de Salud. (1995). Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994. Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Diario Oficial de la Federación. 16 de octubre de 1995.

21. Secretaría de Salud. (1995). Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos. Diario Oficial de la Federación. 22 de septiembre de 1995.

22. Secretaría de Salud. (1995). Apéndice Normativo B. Norma Oficial Mexicana NOM-145-SSA1-1995, productos cárnicos troceados y curados. Productos cárnicos curados y madurados. Disposiciones y especificaciones sanitarias. B. De la estimación de la



densidad microbiana por la técnica del número más probable. Diario Oficial de la Federación. 3 de diciembre de 1999.

23. Slayton, R. B., Turabelidze, G., Bennett, S. D., Schwensohn, C. A., Yaffee, A. Q., Kham, F., Butler, C., Trees, E., Ayers, T. L., Davis, M. L., Laufer, A.S., Gladbach, S., Williams, I. y Gieraltowski, L. B. (2013). Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157:H7 associated with romaine lettuce consumption, 2011. [En línea]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23390525>. Fecha de consulta: Abril de 2013.

24. Test *E. coli* O157 (Merck). Siglepath® *E.coli* O157. Rapid test for the detection of *E.coli* O157 in foods.

25. Test *Salmonella* (Merck).Siglepath® *Salmonella*. Rapid test for the detection of *Salmonella* in foods.

26. Torres-Vitela, M.D.R., Gómez-Aldape, C.A., Cerna-Cortes, J.G., Villaruel-López, A., Rangel-Vargas, E. y Castro-Rosas, J. (2013). Presence of indicator bacteria, diarrhoeagenic *Escherichia coli* pathotypes and *Salmonella* in fresh carrot juice from Mexican restaurants. *Lett Appl Microbiol.* 56(3):180-185.

27. Tortora, G. J., Funke, B. R. y Case, C. L. (2007). *Introducción a la Microbiología*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. 257 Pp.

28. Tzschoppe, M., Martin, A. y Beutin, L. (2013). A rapid procedure for the detection and isolation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serogroup O26, O103, O111, O118, O121, O145 and O157 strains and the aggregative EHEC O104:H4 strain from ready-to-eat vegetables. *Int J Food Microbiol.* 152(1):19-30.

29. Vandamm, J.P., Li, D., Harris, L.J., Schaffner, D.W. y Danyluk, M.D. (2013). Fate of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* on fresh-cut celery. *Food Microbiol.* 24(1):151–157.

### 13 Anexos A.

#### Hoja de recolección de datos de los sitios de muestreo

- 1.- Número: \_\_\_\_\_
- 2.- Ubicación: \_\_\_\_\_
- 3.- Los alimentos que se venden, están expuestos directamente en la vía pública y al libre tránsito de personas y vehículos SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_
- 4.- Visualmente, la limpieza de los contenedores en donde están colocados los alimentos es:  
(salsa, cilantro, cebolla, limones) ÓPTIMO   
BUENO   
INCONVENIENTE
- 5.- Hay disponible un dispensador de gel SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_
- 6.- El aspecto de los manipuladores de alimentos es higiénico SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_
- 7.- Los manipuladores de alimentos usan:
- a) Uniforme (delantal) SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_
  - b) Tiene recogido el cabello SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_
  - c) Cofia SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_
  - d) Cubrebocas SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_
  - e) Tienen las uñas cortas y limpias SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_
  - f) Guantes el manejo de los ingredientes (cilantro, cebolla, etc.) SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_
- 8.- Están almacenados los alimentos a temperatura ambiente: SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_
- 9.- Número de personas que atienden el establecimiento: \_\_\_\_\_
- 10.- El personal que maneja el dinero, es el mismo que manipula los alimentos: SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_
- 11.- Visualmente, como considera la higiene en la manipulación de los alimentos en el puesto ambulante ÓPTIMO   
BUENO   
INCONVENIENTE

**NOTA: Para fines de esta investigación y por ética profesional, los nombres de los establecimientos comerciales y direcciones, fueron sustituidos por un código numérico, para no generar daños a terceros.**

Para fines de la investigación, se decidió clasificar a los puestos ambulantes como:

**ÓPTIMO:** Si cuenta con la infraestructura requerida para la comercialización del producto, así como la limpieza del mismo; el personal porta uniforme (delantal), cubrebocas, cofia, si tiene recogido el cabello y/o cubierto, uñas cortas y limpias o bien el uso de guantes para manipular todos los ingredientes incluido el cilantro; si una persona diferente del manipulador de alimentos realiza el cobro del dinero.

**BUENO:** Si tiene una adecuada infraestructura para la comercialización de los productos, es aceptable la limpieza del inmueble, el personal vestía ropa limpia.

**INCONVENIENTE:** Si se aprecia visiblemente una precaria limpieza del establecimiento, si el personal no luce limpio, no porta delantal de algún tipo, no utiliza cubrebocas, no recoge o cubre su cabello o si el mismo manipulador de alimentos quien maneja de dinero a la hora de atender al consumidor.

## Anexo B. Secuencia fotográfica



Preparación de material



Esterilización de material



Adquisición de las muestras de cilantro en una taquería



Inicia el análisis de las muestras de cilantro



Determinación de BMA



Determinación de BMA (vertido en placa)



Realizando el recuento de BMA



Determinación de coliformes fecales



Incubación de los tubos de caldo lauril sulfato de sodio (prueba presuntiva de CF)



Incubación de tubos de caldo EC (prueba confirmativa de CF realizada a 44.5°C)





Uso de la lámpara de luz UV para evidenciar fluorescencia en caldo EC con MUG (prueba positiva de coliformes fecales)



Inicia la investigación de *Salmonella* sp



Inoculación del cartucho para la identificación de *Salmonella* sp (prueba rápida)



Prueba negativa



Prueba positiva



Inoculación en medios de cultivo selectivos y diferenciales



Crecimiento de *Salmonella* sp en agar SS



Crecimiento de *Salmonella* sp en agar XLD



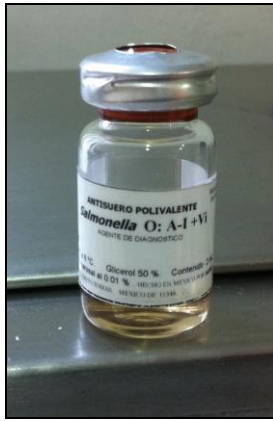
Crecimiento de *Salmonella* sp en agar VB



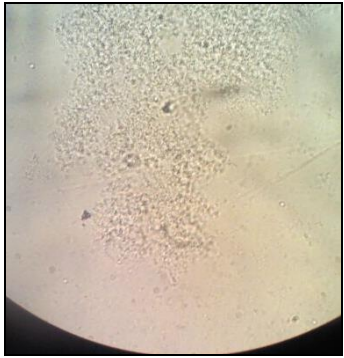
Identificación bioquímica de *Salmonella* sp



Identificación serológica de *Salmonella* sp



Antisero utilizado en la identificación serológica de *Salmonella* sp



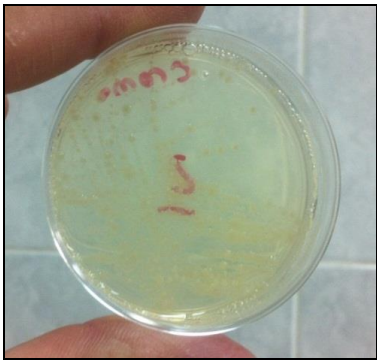
Observación microscópica de la aglutinación (identificación serológica)



Medio de cultivo y complemento utilizado en la identificación de *E. coli* O157:H7

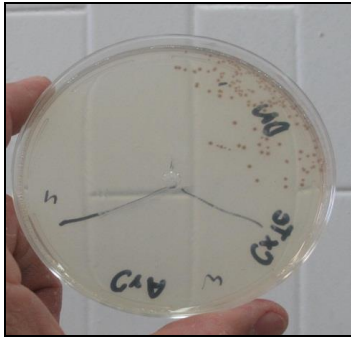


Inoculación en medio de cultivo cromogénico para la identificación de *E. coli* O157:H7



Crecimiento no característico de *E. coli* O157:H7 en agar cromogénico

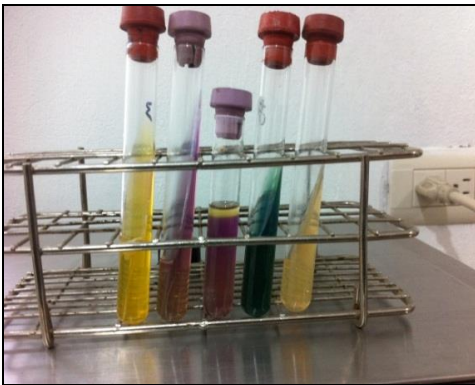




Crecimiento sugestivo de *E. coli* O157:H7 en agar cromogénico



Identificación bioquímica de *E. coli* no O157



Identificación bioquímica de *Enterobacter* sp



Identificación bioquímica de *Klebsiella* sp



Identificación bioquímica de *Proteus* sp



Identificación bioquímica de *Citrobacter* sp