



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

**“INVESTIGACIÓN DE *Salmonella* spp y
E. coli O157: H7 EN HORTALIZAS DE LA CIUDAD DE PUEBLA”**

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

pQFB. María de los Ángeles Rios Serrano

DIRECTOR Y ASESOR:

Dr. en C. Fausto Tejeda Trujillo

FECHA:

Junio 2016

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por darme la vida, por sostenerme día a día, por tu soberanía, porque me has permitido ver el poder de tu mano sobre mí, porque cuando he caído me has levantado y me has dado tus fuerzas, porque me has consolado en los malos momentos y has reído conmigo en los buenos. Gracias porque me has alcanzado, porque has bendecido mi vida y por amarme incluso antes de que yo te conociera, gracias por esta etapa y por las grandes y maravillosas cosas que emprenderemos en adelante. Gracias padre por todo.

A mis padres, Sergio y Noemí

Gracias por amarme, por convertirme en la mujer que soy ahora, gracias por su apoyo, por su alegría y por su ejemplo, gracias también por sus regaños, consejos y llamados de atención. Gracias por cuidarme y defenderme, por el esfuerzo que han hecho para ayudarme a concluir esta etapa y por ayudarme a construir las bases para mi futuro. Agradezco a Dios por elegirlos a ustedes como mis padres.

A mis hermanitos, Serch y Liz

Gracias por el amor, por las risas con y sin causa, los ánimos, los enojos, gracias por existir mis niños.

Al Dr. C. Fausto Tejeda Trujillo

Gracias por darme la oportunidad de formar parte de su equipo, por creer en mí, por su paciencia, confianza y por el apoyo. Gracias por enseñarme a ser una gran profesionalista y una mejor persona, pero sobre todo, gracias por la amistad que usted y su familia me han brindado.

A mis sinodales

A la M.C. María Elena Hernández Ramos, a la M. C. Gloria León Tello, y a la D.C. Ana Marta de los Ángeles Lobo Sánchez por su tiempo, paciencia y dedicación, por su interés y por acompañarme en esta importante etapa para mí. Gracias por los consejos y porque siempre esperaban más de mí apoyándome para darlo.

ÍNDICE

1. RESUMEN	
2. INTRODUCCIÓN	1
3. MARCO TEÓRICO	3
3.1. HORTALIZAS.....	3
3.2. ENFERMEDADES TRANSMISIBLES POR ALIMENTOS.....	4
3.3. RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS.....	4
3.4. GRUPOS INDICADORES.....	6
3.5 <i>Escherichia coli</i> COMO INDICADOR DE CONTAMINACIÓN FECAL.....	6
3.6. <i>Escherichia coli</i> O157: H7.....	7
3.7 <i>Salmonella</i> spp.....	8
4. MARCO DE REFERENCIA.....	11
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
6. JUSTIFICACIÓN.....	14
7. OBJETIVOS.....	15
8. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	16
9. MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	18
9.1 MATERIALES.....	18
9.2 METODOLOGÍA	18
9.2.1. <i>Escherichia coli</i> COMO INDICADOR DE CONTAMINACIÓN FECAL.....	18
9.2.2. <i>Escherichia coli</i> O157: H7.....	19
9.2.3. <i>Salmonella</i> spp.....	20

10. DIAGRAMAS DE TRABAJO.....	23
10.1 DIAGRAMA GENERAL.....	23
10.2 DIAGRAMA PARA IDENTIFICAR <i>E. coli</i> O157:H7.....	24
10.3 DIAGRAMA PARA IDENTIFICAR <i>Salmonella</i> spp	25
10.4 DIAGRAMA DE MULTIRRESISTENCIA A ANTIBIOTICOS.....	26
11. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
12. CONCLUSIONES.....	37
13. BIBLIOGRAFÍA.....	38

1. RESUMEN

La incidencia de las Enfermedades Transmisibles por Alimentos (ETA's) ha tenido un incremento alarmante a nivel mundial y son adquiridas por el consumo de alimentos que se encuentren contaminados con patógenos, que fueron consumidos mal cocidos o crudos, aunado a esto es de considerar que algunas enterobacterias tienen la capacidad de penetrar y sobrevivir en los tejidos de las hortalizas, sumado al descuido que existe en nuestro país con respecto de la higiene que se tiene con los vegetales durante su producción, cosecha, comercialización y más aún, cuando son utilizados en el hogar o lugares en donde se preparan alimentos, convirtiendo a estos vegetales en vehículos potenciales para la transmisión de ETA's. Dentro del grupo de las enterobacterias, se encuentran dos géneros de gran relevancia, *Salmonella* spp y *Escherichia coli* O 157: H7; debido a la carencia de estudios de estos patógenos en las hortalizas, este trabajo tuvo como objetivo principal, investigar la presencia de *Salmonella* spp y *Escherichia coli* O157:H7 en lechuga, cilantro, espinacas y perejil de venta en Mercados y Supermercados de la Ciudad de Puebla. La metodología empleada para identificar a *Escherichia coli* como indicador de contaminación fecal fue de acuerdo a la NOM-112; para *Escherichia coli* O 157: H7 fue de acuerdo al Bacteriological Analytical Manual- FDA: 2011, y para el caso de *Salmonella* spp, de acuerdo a la NOM- 114. Al final se evaluó la multirresistencia a antimicrobianos de las cepas aisladas, los antimicrobianos probados fueron: amikacina, ampicilina, bacitracina, ceftriaxona, ciprofloxacino, cloranfenicol, doxiciclina, gentamicina, nitrofurantoina y levofloxacino, mediante el método de difusión en placa (Kirby- Bauer). Los resultados obtenidos en un periodo de muestreo de marzo a junio del año 2015, arrojaron a *Escherichia coli* como indicador de contaminación fecal en 61 muestras, principalmente en perejil; en el caso de *Escherichia coli* O 157: H 7 no fue encontrada en ninguna de las muestras analizadas, no así con *Salmonella* spp que fue hallada en 16 muestras, principalmente en cilantro, concluyendo así, que es evidente que el riego, fertilización, cosecha, transporte, almacenamiento, venta y utilización de hortalizas no son los adecuados, pues encontramos *Escherichia coli* como indicador de contaminación fecal y *Salmonella* spp en las muestras analizadas.

2. INTRODUCCIÓN

Las hortalizas se definen como las partes comestibles de los vegetales incluidas las hojas, raíces y semillas ², son un conjunto de plantas cultivadas, generalmente, en huerta o regadíos, que se consumen como alimento, ya sea de forma cruda o cocida, el término “hortaliza”, incluye a las verduras y a las legumbres verdes, ². Las más utilizadas en la gastronomía de México son: acelga, ajo, alcachofa, apio, berenjena, brócoli, calabacín, calabaza, cebolla, chícharo, col, coliflor, champiñón, espárrago, espinaca, haba, lechuga, nabo, papa, pepino, perejil, pimiento, rábano, tomate y zanahoria. Estos alimentos contienen agua, carbohidratos, proteínas, lípidos, sustancias volátiles, vitaminas y minerales ¹. El consumo de hortalizas, es vital para la salud humana puesto que poseen innumerables propiedades alimenticias, son fuente inagotable de vitaminas, minerales, fibra y energía³.

Las hortalizas pueden contaminarse en los campos en los que se encuentran sembradas, (por el contacto con abono de origen animal o desechos de la industria avícola que no se han tratado de forma correcta, deposiciones de pájaros, animales o insectos) ⁴ y también por las condiciones de cosecha, transporte, durante su almacenamiento, o bien cuando son utilizadas convirtiéndose así, en un vehículo potencial para la transmisión de Enfermedades Transmisibles por Alimentos (ETA's).

En México los datos arrojados por INEGI fueron: para la comercialización exterior de hortalizas, plantas, raíces y tubérculos en el 2010 de 4'380,863 toneladas y en el 2011 de 4'944, 862 toneladas mientras que los preparados de hortalizas, frutos y plantas en el 2010 de 885, 678 toneladas y en el 2011 de 1'069, 896 toneladas ⁵.

A nivel mundial, se ha incrementado la incidencia de las Enfermedades Transmisibles por Alimentos (ETA's), asociadas al consumo de diferentes alimentos contaminados con diversos patógenos entre los que destaca *Salmonella* spp y *Escherichia coli* O157:H7. Algunos reportes indican que los microorganismos tienen la capacidad de penetrar y sobrevivir en los tejidos de las hortalizas, de manera que si no se lavan o desinfectan adecuadamente, representan un vehículo potencial para la transmisión de microorganismos patógenos ⁶. Esto aunado al descuido que existe en nuestro país con respecto de la higiene que se tiene con los vegetales durante su

producción, cosecha, comercialización y más aún, cuando son utilizados en el hogar o lugares en donde se preparan alimentos, suelen surgir las ETA's ⁷, un clásico ejemplo de las ETA's, es la salmonelosis, que es una de las más frecuentes e importantes, pues es una infección de alto impacto para la salud humana, con alta mortalidad en grupos vulnerables de la población y cuya incidencia está ampliamente relacionada con la ingesta de alimentos o bebidas contaminadas. Entre los vegetales con mayor riesgo de contaminación se encuentran aquellos de consumo crudo como lo son las lechugas, espinacas, perejil y cilantro pues no presentan ningún tipo de procesamiento previo a su ingesta. Además de que el expendio de estos alimentos así como otros vegetales de consumo crudo, se mantienen a temperatura ambiente, en bandejas o anaqueles sucios y en algunos casos estas bandejas se encuentran en el piso en mercados y tiendas principalmente ⁸.

Anualmente, se estima que unos cien millones de personas resultan infectadas por salmonelosis por el consumo de diversos productos y mediante diferentes formas de contagio, esta es la primera causa de gastroenteritis y de fiebre tifoidea, mencionaron los expertos del Centro Francés de Investigaciones Científicas (CNRS en sus siglas en francés) ⁹. Debido a la importancia que tiene detectar oportunamente la posible fuente de contaminación y a la ausencia de estudios en las hortalizas de uso más frecuente en nuestra ciudad, es que se llevó a cabo la investigación de *E. coli* como indicador de contaminación fecal, *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* spp en estos alimentos, de distribución en la Ciudad de Puebla.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Hortalizas

Las hortalizas son un conjunto de plantas cultivadas generalmente en huertas o regadíos, que se consumen como alimento, ya sea de forma cruda o cocida. El término hortaliza incluye a las verduras y a las legumbres verdes ¹.

3.1.1 Espinaca

Su nombre científico es: *Spinacia oleracea*. La espinaca fue introducida en Europa alrededor del año 1,000 procedente de regiones asiáticas, probablemente de Persia. La espinaca es una hortaliza con un elevado valor nutricional y carácter regulador, debido a su alto contenido en agua y riqueza en vitaminas y minerales ¹.

3.1.2 Lechuga

Su nombre científico es: *Lactuca sativa*. El origen de la lechuga no parece estar muy claro, aunque se afirma que procede de la India, sin embargo, hoy día los botánicos no se ponen de acuerdo, por existir un seguro antecesor de la lechuga, *Lactuca scariola*, que se encuentra en estado silvestre en la mayor parte de las zonas templadas. La lechuga es una hortaliza pobre en calorías, y las hojas exteriores son más ricas en vitamina C ¹.

3.1.3 Perejil

Su nombre científico es: *Petroselinum hortense*. Es una verdura originaria del Mediterráneo y del sureste de Europa. Es la hierba condimentaria más utilizada, tanto para adornar como para cocinar. Se puede emplear en casi cualquier plato y conviene usarlo crudo para preservar así sus vitaminas. Tiene dos tipos de hojas: las rizadas y las planas. El plano posee un sabor más fuerte y persistente. El rizado un sabor más suave, casi dulce y es más decorativo. Es un alimento que contiene vitamina C, hierro y calcio ¹.

3.1.4 Cilantro

Su nombre científico es *Coriandrum sativum*. Es originario de la región del Mediterráneo y actualmente se cultiva en la mayoría de las regiones templadas del mundo; los principales países

productores son La Unión Soviética, India, Marruecos, México, Rumania, Argentina, Irán y Pakistán. México ocupa el 4.º lugar mundial como productor de cilantro ¹⁰.

Las hortalizas antes mencionadas, debido a su consumo, que la mayoría de las veces es crudo, además de los numerosos riesgos a los que se someten, desde la etapa de precosecha hasta su utilización, pueden llegar a ser vehículos potenciales para la transmisión de ETA`s.

3.2 Enfermedades Transmisibles por Alimentos (ETA`s)

Entre los problemas de salud más prevalentes que afectan a la población humana, se encuentran las ETA`s que han sido catalogadas por parte de los expertos de la OMS como el problema de Salud Pública más diseminado a nivel mundial. Estas enfermedades siguen aumentando, pese a los esfuerzos que realizan los organismos que se preocupan de la protección de los alimentos a nivel nacional e internacional ¹¹. Las ETA`s se producen por la ingestión de alimentos y/o bebidas contaminados con microorganismos patógenos que afectan la salud del consumidor en forma individual o colectiva y sus síntomas más comunes son diarreas y vómitos, pero también se pueden presentar otros como choque séptico, hepatitis, cefaleas, fiebre, visión doble, entre otros ¹².

Estudios que se han llevado a cabo en Latinoamérica, reportan contaminación fecal y con ello, el riesgo de contraer ETA`s por consumo de hortalizas que se venden en mercados y expendios de vegetales, es bien sabido que éstas enfermedades también representan un gasto económico prominente, que además, afecta a individuos, familia, industria, sistemas de salud y comunidades enteras ⁸ y que, debido al incremento en su ocurrencia, a sus formas de transmisión, a grupos poblacionales vulnerables, al impacto socioeconómico que ocasionan, aunado a que muchos de los patógenos asociados a ETA`s han sido asociados al desarrollo de multirresistencia a antimicrobianos (dificultando así, el tratamiento adecuado a seguir), la incidencia de estas enfermedades es un indicador directo de la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos y constituye un problema para la Salud Pública.

3.3 Resistencia a antimicrobianos

Una cepa resistente se define como aquella que es capaz de multiplicarse y sobrevivir en

presencia del antimicrobiano en cuestión¹² y se refiere a la capacidad de los microorganismos infecciosos de adaptarse por medio de mecanismos evolutivos a nuevos entornos medioambientales, de esta manera, las bacterias pueden cambiar su estructura celular para ser capaces de sobrevivir al ataque de estos fármacos; cuando la bacteria se vuelve resistente, el antimicrobiano deja de ser eficaz frente a las infecciones producidas por dicha bacteria¹⁴, esto genera que el tratamiento de los pacientes sea difícil, costoso o imposible, y su desarrollo es un fenómeno natural en los microorganismos que se ve acelerado por la presión selectiva ejercida por el uso y mal uso de estos fármacos en humanos y animales.⁴⁰

Los antimicrobianos son productos del metabolismo secundario de diversos microorganismos que poseen mecanismos de resistencia a los mismos antimicrobianos que producen. Paralelamente, en esta competencia dinámica, otras bacterias han desarrollado sus propios mecanismos de resistencia o los han adquirido de aquellas que son productoras de antimicrobianos. La capacidad de producir estas sustancias y los mecanismos de resistencia son, entonces, el resultado de un intenso proceso evolutivo ocurrido durante miles de millones de años en la naturaleza¹⁵.

El problema de la resistencia y su incremento a nivel mundial está bien estudiado, siendo España un país destacado en el mundo por la alta prevalencia de resistencia, siendo también uno de los países con mayor consumo de antibióticos por habitante, sobre todo en especies que causan infecciones fundamentalmente extrahospitalarias entre las que se encuentran *Salmonella* spp y *E. coli*¹⁶, y que asimismo, reportes han mostrado un incremento en la emergencia de *Salmonella* spp y *E. coli* con niveles significativos de resistencia a los antimicrobianos posiblemente debido a la medicación terapéutica, en veterinaria y en agricultura en donde se aplican antimicrobianos de manera indiscriminada¹⁷.

Para poder conocer la inocuidad de un alimento se utilizan diferentes marcadores, como son: las Bacterias Mesofílicas Aerobias (BMA) y grupos indicadores de la contaminación fecal (CT y CF), teniendo a *Escherichia coli* como indicador de contaminación fecal, asimismo, la búsqueda de patógenos como *Salmonella* spp y EHEC en hortalizas como cilantro, perejil, lechuga y espinacas también es un determinante de la inocuidad alimentaria.

3.4 Grupos indicadores

Los grupos indicadores son conjuntos de microorganismos o productos de su metabolismo que sugieren o se asocian con un antecedente que compromete su calidad sanitaria. Los grupos de microorganismos indicadores utilizados como indicadores de calidad en los alimentos, habitualmente no responden a criterios de agrupación taxonómica. Se definen, en función de ciertas características ecológicas y fisiológicas que apoyan o justifican el valor aplicativo que se les interesa conferir.

Escherichia coli es un germen cuyo hábitat natural es el tracto digestivo del hombre y de otros animales de sangre caliente, siendo excretado en las heces fecales²⁶, debido a eso, la presencia de *Escherichia coli* en un alimento nos sugiere que éste entro en contacto con materia fecal del hospedante, por ello se emplea a esta bacteria como un indicador para la contaminación fecal en alimentos²⁷, en el caso de las verduras, su presencia es sugestiva de contaminación fecal reciente, considerando que en ausencia de materia fecal no suele existir en estos productos y que muy pobremente, si acaso, se multiplica en ellos y tiende a morir²⁸.

3.5 *Escherichia coli*

El género *Escherichia* está constituido por 5 especies, de las cuales, *E. coli* es la más frecuente y la más importante desde el punto de vista clínico, este microorganismo se asocia con una gran cantidad de enfermedades como sepsis, ITU, meningitis y, en especial la gastroenteritis causada por el consumo de alimentos crudos como el cilantro, perejil, lechuga y espinacas.

Se define como bacilos rectos gramnegativos, de 1.1-1.5 x 2.0- 6.0 μm . Pueden estar individuales o en pares. Las cápsulas y micro cápsulas se encuentran en muchas cepas, móviles por flagelos peritricos o inmóviles, anaerobios facultativos, quimiorganotrofos, poseen ambos tipos de metabolismo oxidativo y fermentativo. Su temperatura óptima de crecimiento es a 37 °C. La D-Glucosa y otros carbohidratos son catabolizados con la producción de ácido y gas. Oxidasa negativo, catalasa positiva, rojo de metilo positivo, Voges Proskauer negativo y usualmente citrato negativo, H₂S negativo, reducen el nitrato a nitrito. Todas o la mayoría de las cepas fermentan L- arabinosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, L-ramnosa, tretalosa y D-

xilosa. Positivas a O- Nitrofenil- B-D-galactopiranosido. Se encuentra como flora normal en la parte inferior del intestino de animales de sangre caliente. Algunos virotipos de *E.coli* tienen enterotoxinas y otros factores de virulencia, incluidos factores de invasividad y colonización que causan enfermedad diarreica.

3.6 *Escherichia coli* O157:H7 (EHEC)

Este virotipo tiene lugar de acción en el intestino grueso generando colitis hemorrágica (CH), con fuertes dolores abdominales, iniciando con diarrea acuosa seguida de diarrea sanguinolenta macroscópica; puede progresar a síndrome urémico hemolítico (SUH), su acción esta mediada por toxinas Shiga (Stx-1, Stx-2), que interrumpen la síntesis de proteínas, lesiones A/E con destrucción de la microvellosidad intestinal que da lugar a una disminución de la absorción.

Desarrollo

E. coli O157:H7 puede sobrevivir a la fermentación, a la desecación y al almacenamiento de los embutidos durante un tiempo de hasta 2 meses a 4 °C. La temperatura óptima de crecimiento se encuentra en el rango de 32-37 °C con un límite superior de 45-46 °C. El pH óptimo de crecimiento es el cercano a la neutralidad, un pH por debajo de 4.8 se traduce en una disminución del crecimiento de *E. coli* ²².

Alimentos relacionados

La mayoría de los brotes humanos por *E. coli* O157:H7 confirmados han sido relacionados con el consumo de carne de res mal cocida y con menor frecuencia, con leche pasteurizada, así como en hortalizas de consumo crudo como cilantro, perejil, lechuga y espinacas ²⁹.

Si bien los brotes con *E. coli* O157:H7 normalmente están relacionados con productos de carne de res picada, a veces han sido implicadas las hortalizas de las barras de ensaladas, presuntamente debido a la contaminación cruzada.

Epidemiología

En el año 2006, un brote de *Escherichia coli* entero hemorrágica en Estados Unidos, asociado a espinacas, afectó a más de veinte estados y a países importadores, especialmente a México,

Canadá y Tailandia, *Escherichia coli* O 157: H 7 es un microorganismo patógeno relacionado con infecciones graves en el hombre y producidas por contaminación del agua y los alimentos²⁹, a lechuga también fue el origen de un brote con este serotipo de *Escherichia coli* que afectó a más de 100 personas en Montana en 1997.²³

En el año 2011 en Hamburgo, durante los últimos días de mayo cuando la subsecretaria de Salud señaló a los pepinos españoles como la fuente de una severa infección originada por el virotipo O157:H7 de *Escherichia coli*. Sin embargo luego se supo que el origen de la bacteria no se localizaba en las hortalizas españolas sino en los brotes de vegetales germinados de una huerta de agricultura orgánica del norte de Alemania. A causa de la contaminación con esta bacteria, en Alemania murieron 36 personas y otra en Suecia. Además, se estima que 4,000 personas resultaron infectadas³⁰.

3.7 *Salmonella* spp

Bacilos rectos de 0.7-1.5 x 2-5 µm. Gram negativos. Son usualmente móviles por flagelos peritricos, anaerobios facultativos. Quimiorganotrofos, poseen ambos tipos de metabolismo, oxidativo y fermentativo. Su temperatura óptima de crecimiento es a 37 °C, D-Glucosa y otros carbohidratos son catabolizados con la producción de ácido y gas. Oxidasa negativo, catalasa positiva, indol y Voges Proskauer negativos, rojo de metilo y Citrato de Simmons positivo; Lisina y ornitina descarboxilasa positivas. Produce H₂S, no hidroliza la urea. Reduce nitratos. Los carbohidratos que son fermentados son L- arabinosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, L-ramnosa, D-sorbitol, tetralosa y D-xilosa. Habita en humanos, animales de sangre caliente y fría, alimentos y en el ambiente. Es patógena para humanos y muchas especies animales. Es un agente que causa fiebre tifoidea, fiebres entéricas, gastroenteritis y septicemia¹⁸.

El género *Salmonella* spp consta de sólo dos especies, *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica* (antes *Salmonella choleraesuis*) dividida esta última en seis subespecies que se diferencian por sus características bioquímicas y genéticas: *entericae*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Cada subespecie contiene a su vez varias serovariedades (serotipos) definidas por su fórmula antigénica. *Salmonella enteritidis*, *S. typhi* y *S. typhimurium* son en la actualidad serovariedades de *Salmonella enterica* subespecie *enterica*¹⁹.

La salmonelosis es una zoonosis, una bacteria presente en el intestino de humanos y animales, se ha encontrado relacionada con las carnes y con los vegetales (especialmente aquellos que son regados con aguas residuales).

Dependiendo de la especie, tamaño del inóculo, factores de virulencia expresados por la cepa, hospedero involucrado, estado inmunológico del paciente e intervención médica puede ocasionar desde una infección gastrointestinal media a severa hasta una infección sistémica que compromete la vida del paciente. La salmonelosis es una infección de importancia tanto en salud pública como en salud animal debido al impacto económico que ocasiona; es una enfermedad aguda, de distribución mundial, transmitida por los alimentos ²⁰.

A nivel de los consumidores, se cree que el portador de *Salmonella* spp desempeña un papel en la transmisión de la salmonelosis, aunque no se conoce del todo qué importancia puede tener. La preparación y manipulación inadecuadas en los hogares y establecimientos del servicio de alimentación siguen siendo las principales causas de los brotes ²¹.

Desarrollo

Las cepas de *Salmonella* spp son microorganismos resistentes que se adaptan fácilmente a las condiciones extremas del medio, su temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C aunque pueden crecer desde 6.7 °C hasta 45.6 °C. Su pH de crecimiento es de 6.5 a 7.5, valores inferiores o superiores limitan su crecimiento.

Alimentos relacionados

Se ha insistido bastante en la relación de *Salmonella* spp con los productos de origen avícola, especialmente el huevo y con los productos cárnicos, especialmente los de origen porcino, bovino y ovino; sin embargo, las frutas y hortalizas han adquirido notoriedad en los últimos años como vehículos de salmonelosis humana. La situación ha aparecido como consecuencia de la exportación global aumentada de frutas y hortalizas frescas y deshidratadas procedentes de lugares que gozan de climas tropicales y subtropicales. En estos países, las condiciones higiénicas predominantes durante la producción, recolección y distribución de los productos, no siempre satisfacen los patrones mínimos facilitando la contaminación de los mismos, hablando

más concretamente el abonado de cosechas con lodo no tratado o el riego de parcelas con efluentes de aguas residuales potencialmente contaminados con esta bacteria, y el lavado de las frutas y hortalizas con aguas contaminadas ha exacerbado la incidencia de este patógeno en las hortalizas, asimismo, en estos productos, se ha detectado una serie de serotipos de *Salmonella* spp, con los que ha habido brotes extensos atribuibles principalmente a lechuga ²³.

Epidemiología

Las especies de *Salmonella* spp figuran entre las principales bacterias de toxiinfecciones alimentarias. ²⁴. Anualmente, en el mundo hay al menos 16 millones de casos de fiebre tifoidea, resultando en 600,000 muertes. En México se han reportado alrededor de 15 mil casos al año de fiebre tifoidea.

Zaidi y cols., colectaron, entre 2003 y 2005, 2,893 muestras fecales de pacientes con diarrea y se aisló *Salmonella* no-*typhi* en 12.8 % de los pacientes.

Los estudios de Zaidi y cols. Indican que *Salmonella* entérica continua siendo una importante causa de morbimortalidad en México. *S. typhimurium* y *S. enteritidis* son las serovariedades más frecuentemente aislados de niños con diarrea; además, junto con *S. typhi*, han sido causa de sepsis y meningitis fatales ²⁵.

En México D.F. durante 1998 se presentó un brote de infección gastrointestinal por *S. enteritidis* en 155 trabajadores de un hospital, el cual probablemente se debió a la ingesta de tortas de carne.

4. MARCO DE REFERENCIA

En septiembre de 2006, el sistema INFOSAN (la OMS ayuda a los Estados Miembros a gestionar los riesgos relacionados con la inocuidad de los alimentos, garantizando el intercambio rápido de información en las situaciones de emergencia, a fin de impedir que los alimentos contaminados se dispersen por distintos países) registró en los Estados Unidos de América (EE.UU.) un brote de *E. coli* O157:H7 en espinacas frescas envasadas que ocasionó 205 casos de enfermedad, de los cuales 104 fueron hospitalizados, 31 sufrieron insuficiencia renal y 3 fallecieron. Se confirmó la distribución primaria del producto en tres países y posteriormente se descubrió que todas las espinacas contaminadas causantes del brote provenían de una empresa de California.

Los expertos del Centro Francés de Investigaciones Científicas (CNRS en sus siglas en francés) en el 2011, indicaron que la *Salmonella* spp accede también a las plantas por la superficie de las células vegetales, entrando por los poros de las hojas, asimismo revelaron que *Salmonella typhimurium*, no solo puede causar ETA's a las personas por el consumo de huevos y carne, sino también a través de frutas y verduras.

En México, en el estado de Querétaro, Arias y colaboradores en el año 2011, llevaron a cabo un estudio en el cual se trabajó con 10 empresas mexicanas productoras y exportadoras de seis tipos de hortalizas: de espárragos, pepinos, lechuga, brócoli, jitomate y de pimiento morrón, encontraron que los principales problemas de contaminación de las hortalizas radicaba en el agua de riego y en la presencia de ganado en los terrenos de siembra. De un total de 371 muestras de hortalizas, se encontró *Escherichia coli* en el 10.3% de lechuga, 8.3% de brócoli, 6.9% de pepino gourmet, 3.1% de pepino europeo y 1.3% de espárragos. De 300 muestras de hortalizas analizadas, *Salmonella* spp no fue encontrada en ninguna.

En México, en el estado de Querétaro, Esquivel y colaboradores, en el año 2012, de 46 muestras de germinado de alfalfa estudiadas, dos resultaron positivas a *Salmonella* spp con una concentración del patógeno de 0.12 NMP/g. Se llegó a la conclusión de que las cepas de *Salmonella* se multiplican activamente durante la obtención del germinado.

En México, en la Ciudad de Puebla, León Tello G y colaboradores, en el año 2013, llevaron a cabo el aislamiento e identificación de *Salmonella* spp y *Enterobacteriaceae* en hortalizas de mercados populares, obteniendo que de 40 muestras analizadas, únicamente una fue positiva a *Salmonella arizonae*, en general se reportó que el muestreo realizado en los Mercados Populares aparentemente no muestra alteración o presencia de microorganismos de importancia sanitaria en las hortalizas, nos indica que existen inadecuadas prácticas higiénicas al encontrar enterobacterias en Lechuga y Pepino.

En Buenos Aires Argentina, Ruboglio y colaboradores (2007), investigaron la presencia de *E. coli* O157 en 68 muestras de frutas y verduras, obteniendo 4 muestras positivas (5,88 %) y los aislamientos fueron en una cebolla de verdeo y tres muestras de verduras cortadas y preparadas en bandejas para su venta.

Un estudio llevado a cabo en el valle agrícola de Culiacán Sinaloa por Baird y colaboradores en 1998, evaluó la resistencia de *Salmonella* spp y *E. coli* (aisladas de agua de uso agrícola), a distintos antimicrobianos (ampicilina, ciprofloxacino, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, estreptomicina y gentamicina), obteniendo los siguientes resultados: de los antibióticos mencionados, *Salmonella typhimurium* únicamente fue resistente a la tetraciclina (12 muestras resistentes de 13 evaluadas; *Salmonella give*, *agona*, *infantis*, *oranienburg* y *minnesota* no fueron resistentes a ninguno de los antibióticos evaluados, en el caso de *Salmonella anatum* fue resistente a la estreptomicina (1 muestra resistente de 1 evaluada). Para *E. coli*, los antibióticos probados fueron tetraciclina (9 muestras resistentes de 46 analizadas), estreptomicina (38 muestras de 46 analizadas) y gentamicina 1 muestra de 46 analizadas.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La escasa calidad sanitaria en el regadío de hortalizas, el abono suministrado a las tierras con el afán de fertilizarlas, la presencia de ganado u otros animales en los sembradíos, aunado a las características de recolección, transporte y almacenamiento que tienen las hortalizas en nuestro país, representa un importante riesgo para la salud.

Los principales patógenos involucrados con esto pueden ser *Salmonella* y *Escherichia coli* O157:H7, que se encuentran relacionados con la prevalencia de las ETA's, quienes son las responsables de elevados costos para la Salud Pública, pérdida de productividad, de mercados, ingresos, etc.

En América Latina, las ETA's representan alrededor del 70 % de los casos de enfermedad diarreica aguda de acuerdo con las estimaciones de la OMS, ciertamente, se calcula que se presentan más de 16 millones de casos de fiebre tifoidea por año, con aproximadamente 6 millones de decesos, y 1,300 millones de casos de gastroenteritis con una mortalidad de 3 millones desde el año 2000 hasta el 2008 , sin embargo, debemos considerar que la incidencia ha incrementado hasta la fecha actual y que los estados en los que se ha reportado el mayor número de casos son: Tabasco, Chiapas, Coahuila, Sinaloa, y Veracruz, es por ello que la cuestión que se plantea en esta investigación es: ¿Hay hortalizas contaminadas con *Salmonella* spp y/o *E. coli* O157:H7 en los mercados y supermercados de la Ciudad de Puebla?

6. JUSTIFICACIÓN

En México, diversos factores entre ellos económicos, ambientales, de salubridad y socioculturales, hacen que las enfermedades gastrointestinales presenten alta prevalencia. Muchas de las enfermedades gastrointestinales son potencialmente ETA`s que causan anualmente pérdidas económicas, incapacidad de los enfermos, gastos en salud, reclamos y mala publicidad a la industria de alimentos y a los servicios de comedores. Se ha reportado que la población rural tiene un mayor riesgo de contraer estas enfermedades por diversos factores tales como: falta de agua potable, desnutrición, pobres condiciones salubres, entre otras.

Las enfermedades gastrointestinales son una de las primeras causas de consulta médica y también una de las primeras causas de muerte en México y en el mundo. Por ello, se las considera un problema de Salud Pública a nivel mundial, que afecta a personas de cualquier edad y condición social, aunque los grupos más vulnerables son los niños y los ancianos. Es por ello que en este trabajo se investiga la presencia de estos patógenos en productos muy consumidos en la Ciudad de Puebla como lo son algunas hortalizas, considerando que la mayoría de su consumo se lleva a cabo sin tratamiento térmico previo, es decir se consumen crudas y con esto, si es que se encuentran contaminadas, pueden llegar a causar ETA`s, afectando así, la salud del consumidor de manera individual o colectiva.

7. OBJETIVOS

7.1 General

Investigar la presencia de *Salmonella* spp y *Escherichia coli* O157:H7 en lechuga, cilantro, espinacas y perejil de venta en Mercados y Supermercados de la Ciudad de Puebla.

7.2 Particulares

- 1 .Determinar la presencia de contaminación fecal en hortalizas mediante la búsqueda de *Escherichia coli*
2. Investigación de *Echerichia coli* O157:H7 en estos productos.
3. Investigación de *Salmonella* spp en estos productos.
4. Determinar la multirresistencia a antibióticos de las cepas aisladas de *Echerichia coli* O157:H7 y *Salmonella* spp a partir de las muestras de hortalizas analizadas

8. DISEÑO DEL ESTUDIO

8.1 Tipo de estudio

Transversal, prospectivo, observacional y descriptivo.

8.2 Universo de estudio

Mercados (Col. San Bernabé Temoxtitla, San Ramón, Hidalgo, Zapata, La Curva, Independencia, Col. Agua Santa, Col. Guadalupe Hidalgo, Acocota; de diferentes puestos) y supermercados (Bodega Aurrera, Chedraui, Soriana, Walmart, Comercial Mexicana, Gran Bodega; de diferentes sucursales ubicadas en la zona Centro- Sur) de la Ciudad de Puebla.

8.3 Tamaño de muestra

Se analizó un total 104 muestras, que corresponden a: 26 de cilantro, 26 de espinacas, 26 de perejil y 26 de lechuga.

8.4 Sede y lugar de estudio

Laboratorio de Inocuidad Microbiana de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

8.5 Criterios de selección

8.5.1 Criterios de inclusión

- Muestras provenientes de mercados y supermercados incluidos en este estudio
- Muestras frescas

8.5.2 Criterios de exclusión

- Muestras que no provengan de mercados y supermercados incluidos en este estudio
- Muestras que vengan “listas para su consumo”.
- Muestras secas o envejecidas.

8.6 Recursos humanos

Director y asesor de tesis:

D. C. Fausto Tejeda Trujillo

Tesista:

p. QFB María de los Ángeles Rios Serrano

8.7 Recursos financieros

Proyecto financiado por el Laboratorio de Inocuidad Microbiana de los Alimentos de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

8.8 Diseño estadístico

Los resultados obtenidos fueron tratados mediante estadística paramétrica.

9. MATERIALES Y METODOLOGÍA

9.1 Materiales

- Cepa ATCC de *Salmonella montevideo* número 128387 proporcionada por la Universidad Autónoma de Querétaro.
- Cepa ATCC de *Escherichia coli* O157:H7 número 2592 proporcionada por Kimberly- Clark Puebla.
- Unidiscos- antimicrobianos: amikacina, ampicilina, bacitracina, ceftriaxona, ciprofloxacino, cloranfenicol, doxiciclina, gentamicina, nitrofurantoina y levofloxacino.
- Material y equipo presentes en un laboratorio de inocuidad microbiana de los alimentos para cada determinación.

9.2 Metodología

9.2. 1 *Escherichia coli* como indicador de contaminación fecal

9.2.1.1 Preenriquecimiento

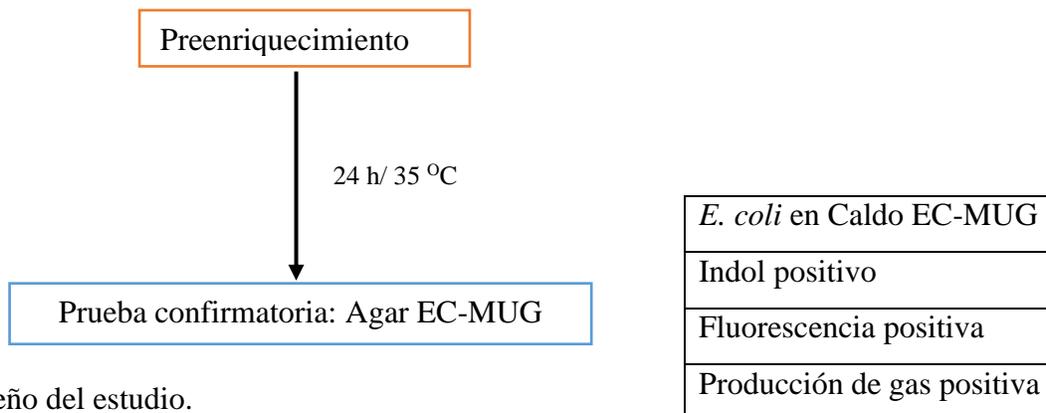
Primeramente se llevó a cabo la etapa de pre enriquecimiento con Caldo Lactosado.

Se pesaron asépticamente 20 g de la muestra en una bolsa estéril, a continuación se agregaron 180 mL de Caldo Lactosado y homogenizó en Stomacher durante 1 min, la mezcla homogeneizada fue transferida a un recipiente estéril de boca ancha con tapón de rosca y se incubó 24 h a 35 °C.

9.2.1.2 Prueba confirmatoria

Posteriormente fue inoculado en el medio EC-MUG, que fue incubado a 44.5 °C por 24 h; una vez transcurrido este tiempo, se examinaron para evaluar la presencia de formación de gas, producción de fluorescencia e indol positivo.

Determinación de *Escherichia coli* como indicador de contaminación fecal.



Fuente: Diseño del estudio.

9. 2. 2 *Escherichia coli* O157: H 7 (Diagrama 2)

Pre enriquecimiento.

El preenriquecimiento se lleva a cabo en un medio no selectivo (en este trabajo se utilizara Caldo Lactosado) que permite la recuperación de las bacterias, reparando las células que han sido dañadas por condiciones adversas ³⁷.

Se pesaron asépticamente 20 g de la muestra en una bolsa estéril, a continuación se agregaron 180 mL de Caldo Lactosado y homogenizó en Stomacher durante 1 min, la mezcla homogeneizada fue transferida a un recipiente estéril de boca ancha con tapón de rosca y se incubo 24 h a 35 °C.

Aislamiento

Posteriormente fue estriado en el agar Mac Conkey-sorbitol, que se incubó a 36 ± 2 °C durante 18 – 24 h; una vez transcurrido este tiempo, se examinaron las placas esperando colonias transparentes (debido a que *E. coli* O157: H 7 no fermenta el sorbitol).

E. coli O157: H 7 no fermenta el sorbitol dando colonias transparentes mientras que la mayoría de *E. coli* la fermenta, dando colonias rosadas.

Identificación bioquímica

A partir del medio Mac Conkey Sorbitol se llevaron a cabo las pruebas bioquímicas: TSI, LIA, MIO y Citrato siendo incubados a 35 °C/24 h.

El patrón de las pruebas bioquímicas para *Escherichia coli* O 157: H7 es:

Agar	TSI	LIA	M I O	Citrato
Resultado	A /A, g (+)	K / K	+ + +	-

Serotipificación

Se utilizó suero polivalente anti O.

Con un asa, se colocaron dos gotas separadas de solución salina estéril sobre un portaobjetos. Después se va a suspender en cada una de las gotas, una porción del cultivo desarrollado en LIA. Se agregó a una de ellas una gota del antisuero polivalente somático (O) y se mezcló con el canto del asa o empleando aplicadores de madera.

Hay que agitar inclinando la lámina hacia atrás y hacia adelante durante aproximadamente 1 min después hay que observar bajo buena iluminación sobre un fondo oscuro. Se considerara cualquier grado de aglutinación como positiva

La prueba positiva resulta cuando se presenta aglutinación en la gota con el cultivo y el antisuero y no aglutinación en la gota que contiene el cultivo y la solución salina.

9. 2. 3 *Salmonella* spp (Diagrama 3)

Pre enriquecimiento

Se pesaron asépticamente 20 g de la muestra en una bolsa estéril, a continuación se agregaron 180 mL de Caldo Lactosado y homogenizó en Stomacher durante 1 min, la mezcla homogeneizada fue transferida a un recipiente estéril de boca ancha con tapón de rosca y se incubo 24+2 h. a 35 °C.

Enriquecimiento selectivo.

En este trabajo, este paso se llevó a cabo en Caldo Tretationato y Caldo Rappaport- Vassidialis³⁷.

Se agitó suavemente y se transfirió 1 mL de la mezcla preenriquecida en Caldo Lactosado, a un tubo que contenía 10 mL de Caldo Tetracionato adicionado de 0.2 mL de yodo y a otro con 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis. Y se incubó de 18-24 h a 43 y 35 °C respectivamente.

Selección en medios selectivos y diferenciales

A partir de los medios de enriquecimiento selectivo se inocularon los medios XLD, Verde Brillante y Sulfito de Bismuto y las placas fueron incubadas por 24-48 h a 35 °C. Se tomaron como sospechosas aquellas colonias que:

Agar	Características de la colonia
XLD	Rojas- rosadas rodeadas por un halo rojo
Verde brillante	Rojas- rosadas rodeadas por un halo rojo
Sulfito de bismuto	Grisés o negras, con o sin brillo metálico, halo café a negro

Identificación bioquímica

A partir de los medios selectivos y diferenciales anteriormente mencionados, se llevaron a cabo las pruebas bioquímicas: TSI, LIA, MIO y Citrato siendo incubados a 35 °C/24 h. El patrón de las pruebas bioquímicas para *Salmonella* spp es:

Agar	TSI	LIA	M I O	Citrato
Resultado	K/ A, g (+), H ₂ S (+)	K/ K, g (+), H ₂ S (+)	+ - +	+/-

Serotipificación

Se llevara a cabo de la misma que con *E. coli* O 57:H7, procedimiento descrito en el apartado 9.2.2.

9.2.4 Evaluación de la multirresistencia a antibióticos (Diagrama 4)

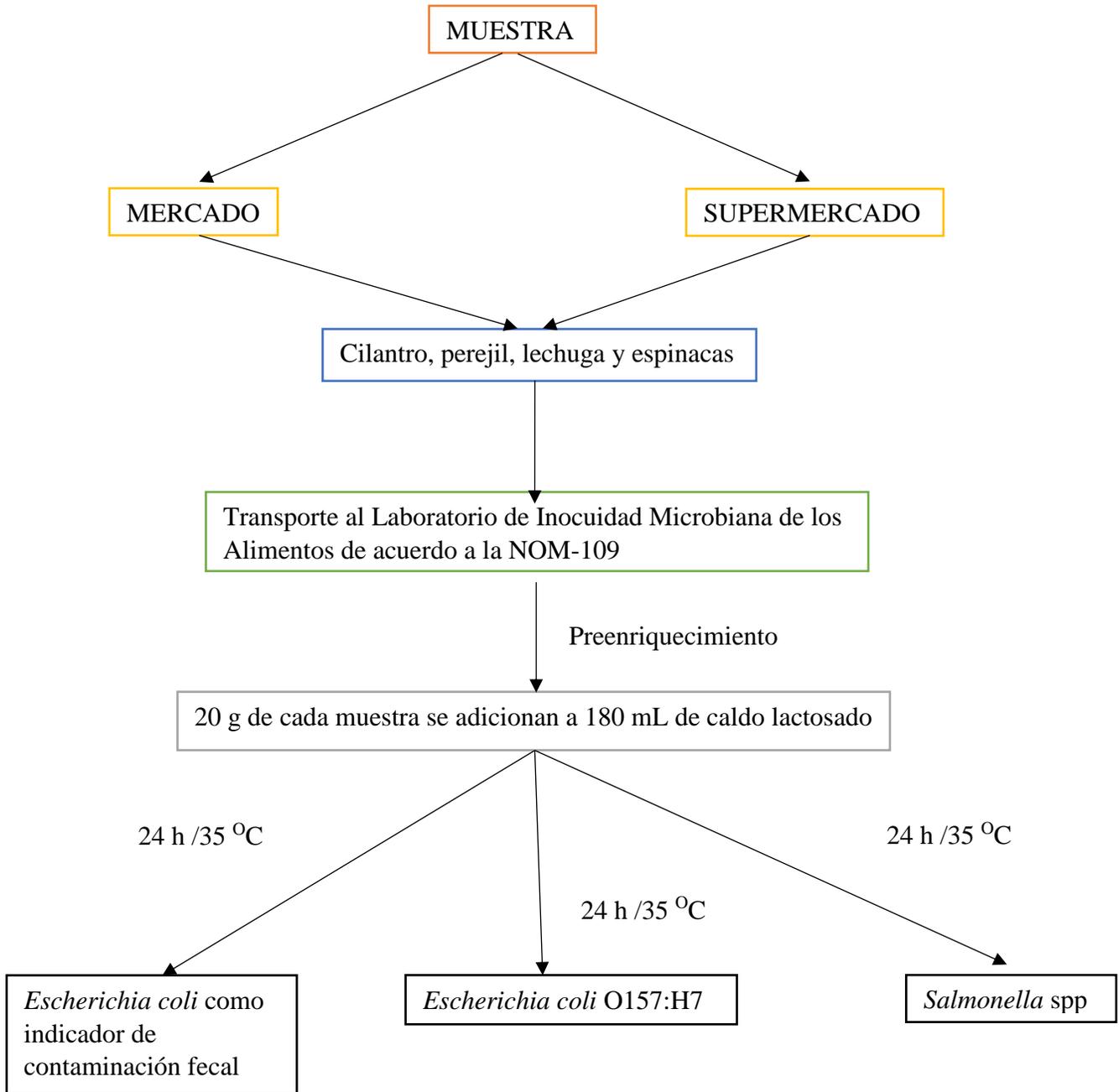
La cepa se inoculo en Caldo Soya Trypticasa, se agitó con el Vortex y se incubó por 24 h. a 35°C, posteriormente, con un hisopo se inoculó en agar Mueller Hinton y se colocaron los

sensidiscos, las placas fueron incubadas por 24 h. a 35 °C, los resultados se interpretaron con la medición de los halos que aparezcan alrededor de los sensidiscos (que indican que no hubo crecimiento bacteriano, es decir que la bacteria es sensible) o bien que no haya halos alrededor de los unidiscos (que indican resistencia al antibióticos, pues si hubo crecimiento bacteriano).

Los resultados se interpretaron como sensibles (S) o resistentes (R) de acuerdo a la medición de los halos, tomando como referencia lo reportado en el CLSI de Enero 2015 (Clinical Laboratory Standards Institute) y de acuerdo al inserto incluido en cada antimicrobiano.

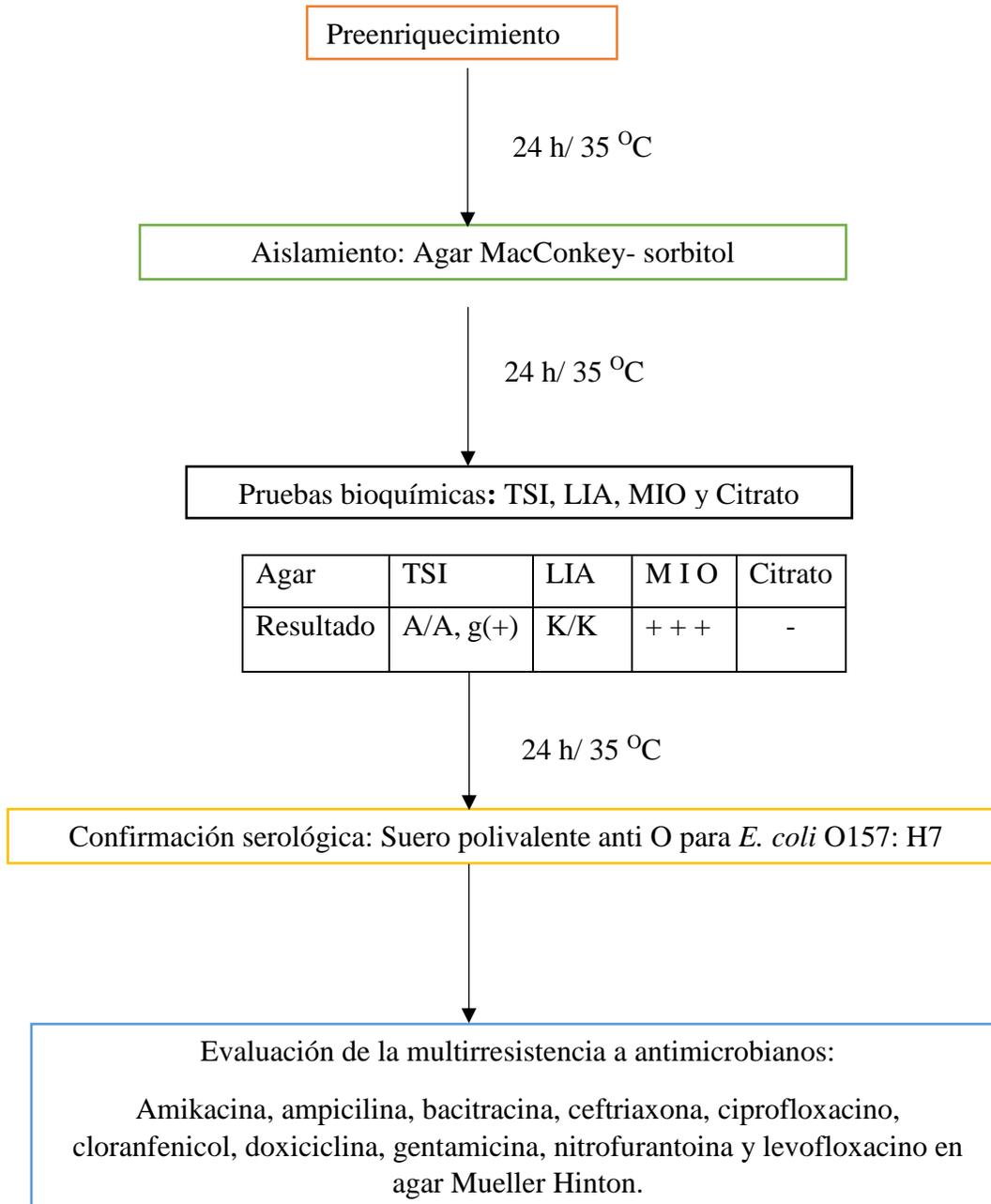
10. DIAGRAMAS DE TRABAJO

10.1 Diagrama 1: Diagrama general



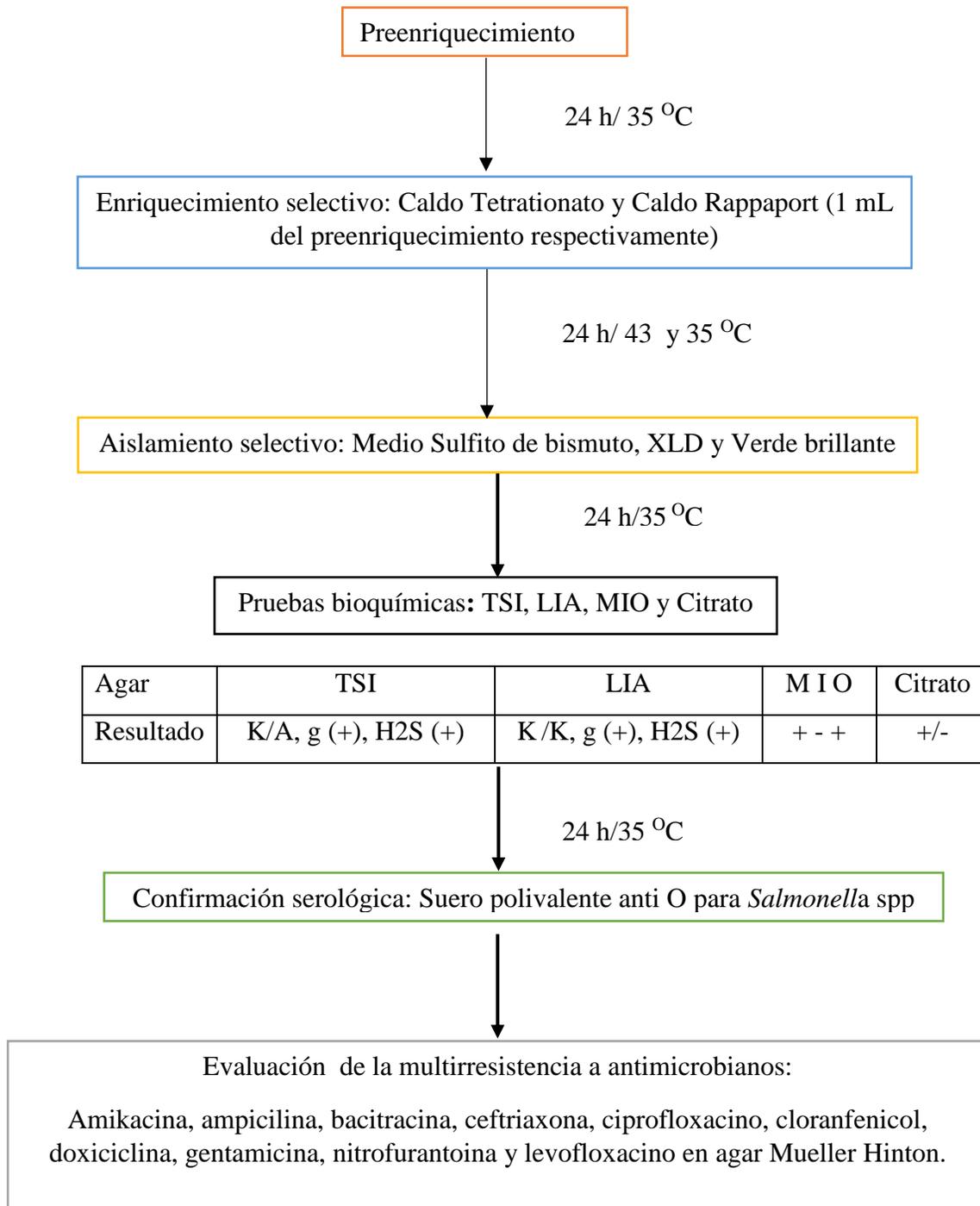
Fuente: Diseño del estudio

10.2 Diagrama 2: Búsqueda de *Escherichia coli* O 157: H7



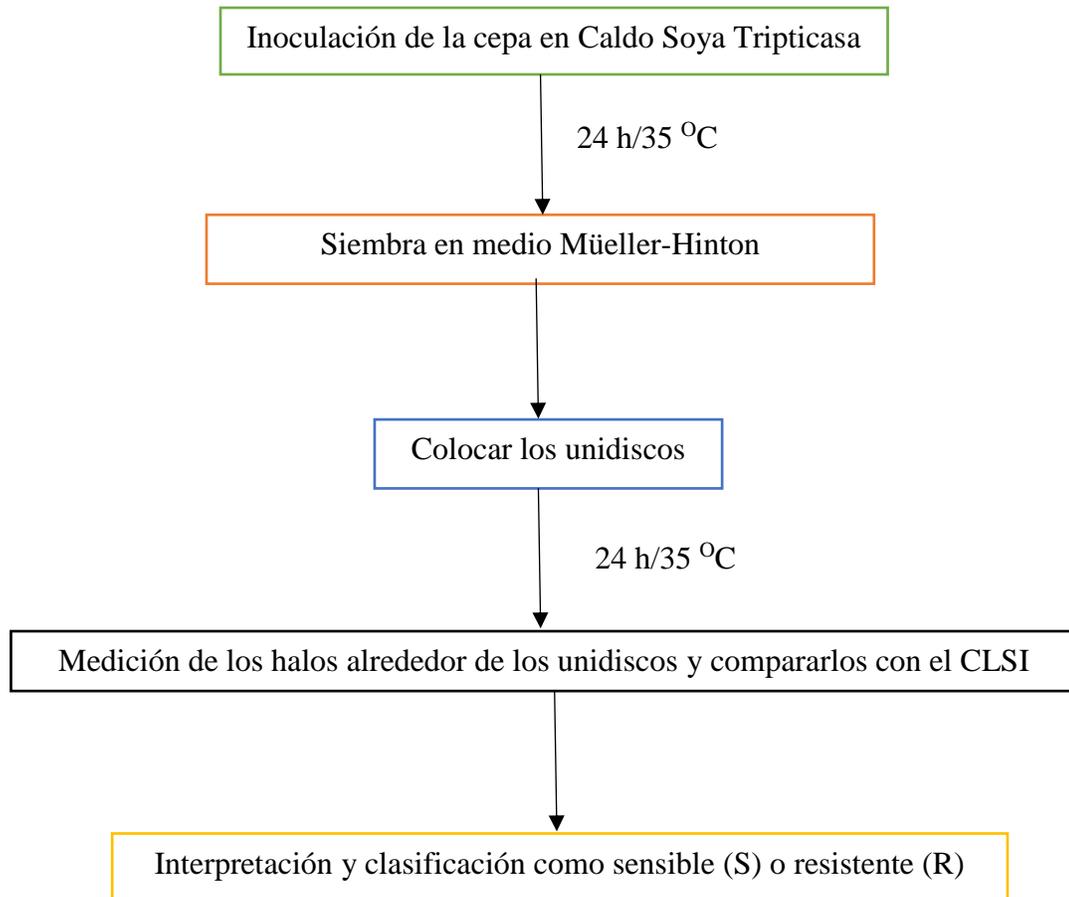
Fuente: Diseño del estudio.

10.3 Diagrama 3: Identificación de *Salmonella* spp



Fuente: NOM- 114.

Diagrama 4: Evaluación de la multirresistencia a antibióticos de las cepas de *Salmonella* spp y *Escherichia coli* O157: H7 aisladas



Fuente: Diseño del estudio.

11. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La producción mundial y comercio internacional de frutas y hortalizas frescas se ha incrementado rápidamente durante las últimas dos décadas. La producción en países desarrollados no siempre cubre la demanda, por lo que se recurre a la importación; asimismo, muchos de los exportadores tienen sistemas de control de inocuidad pobres, bajos estándares de calidad y deficientes prácticas sanitarias, de esta manera, los países que se encuentran en desarrollo son buenos competidores en el mercado mundial de productos agrícolas pues los productos exportados son producidos a menor costo y cosechados en diversas estaciones del año. Nuestro país es el principal exportador de frutas y verduras a Estados Unidos debido a su clima propicio, la cercanía geográfica y bajo costo. La calidad de las frutas y hortalizas puede valorarse en cierta medida a partir de sus características organolépticas, como lo son el color, aroma y turgencia, sin embargo, esto no es aplicable en cuestiones de inocuidad, pues la apariencia no es indicativo confiable de la presencia o ausencia de microorganismos patógenos, es bien sabido que la inocuidad de los alimentos es una cuestión fundamental de Salud Pública para cualquier país y, como la producción agrícola es el punto central de la economía de países en vías de desarrollo, las medidas de protección de alimentos revisten de importancia fundamental; debido a grandes brotes relacionados con *E. coli* y *Salmonella* spp se ha puesto de manifiesto la magnitud de los problemas de la inocuidad de los alimentos y también se ha la convicción de que los sistemas de explotación agrícola, las condiciones de cosecha, transporte, almacenamiento, comercialización y utilización de las hortalizas deben ser modificados, especialmente en los países en vías de desarrollo, un estudio de la FDA recopiló información epidemiológica para conocer el origen de las hortalizas que han sido las causantes de ETA's en el periodo de 1998-2002. De 34 brotes, 10 eran de hortalizas mexicanas y dos más, sospechosas³².

En los últimos años *E. coli* O 157: H7 ha tomado una gran relevancia en el ámbito de salud y economía, debido a que su aparición como patógeno ha traído como consecuencia enfermedades y pérdidas tanto económicas como humanas. Esta bacteria predomina en el medio urbano más comúnmente que en el rural, es más frecuente durante el verano afectando principalmente a niños, ancianos y personas inmunocomprometidas. En México no existen datos específicos pero

en Estados Unidos, de aproximadamente 76 millones de enfermedades causadas por bacterias patógenas cada año, más de 5.2 millones son atribuidos a bacterias como los serotipos de *Escherichia coli* y *Salmonella spp*⁴¹.

A lo largo de este estudio se llevó a cabo el análisis de 104 hortalizas, correspondiendo a cilantro, perejil, lechuga y espinaca; asimismo se realizó un muestreo de hortalizas expandidas en mercados y supermercados. En la siguiente tabla se especifican el número de muestras obtenidas para este estudio:

	Mercado (muestras)	Supermercado (muestras)	Total
Cilantro	13	13	26
Perejil	13	13	26
Lechuga	13	13	26
Espinacas	13	13	26

En los mercados muestreados se observaron condiciones higiénico- sanitarias deficientes, en algunos casos las hortalizas estaban en contacto con otras verduras, en el piso o en cubetas con agua. En los supermercados, se encontraban expuestas en los refrigeradores, clasificadas y separadas de otras verduras, sin embargo, la mayoría, estaban con tierra.

11.1 *Escherichia coli* como indicador de contaminación fecal

61 muestras (57.5 %) de un total de 104 analizadas estaban contaminadas con *Escherichia coli*, esto representa contaminación fecal, predominando en hortalizas compradas en supermercado, en mayor cantidad en perejil, seguida de espinacas y cilantro, en último lugar en lechuga

Tabla 1. Presencia de *Escherichia coli* en hortalizas

	Cantidad	Por ciento (%)
Perejil	18	29.5
Lechuga	9	14.7
Espinacas	17	27.9
Cilantro	17	27.9

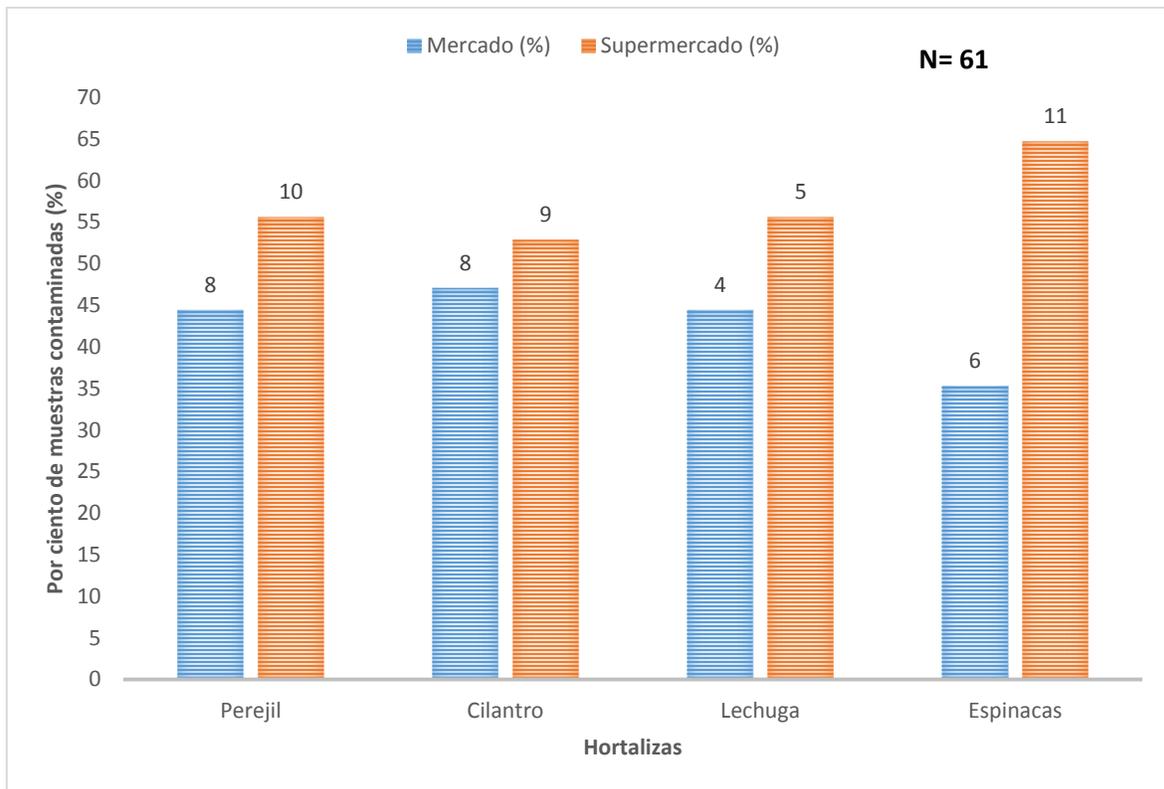


Gráfico 1. Presencia de *Escherichia coli* como indicador de contaminación fecal en hortalizas, de acuerdo a su origen (mercado (azul) o supermercado (naranja))

Se analizaron 26 muestras de cada hortaliza (13 muestras correspondientes a mercado y 13 de supermercado), empleando a *Escherichia coli* como indicador de contaminación fecal (tabla 1 y gráfico 1), obteniendo un total de 61 muestras contaminadas (58.65%), en el caso del cilantro 17 muestras contaminadas (27.8%), de las cuales, 8 (47.05%) fueron de mercado y 9 (52.9%) de supermercado. Con respecto al perejil se encontraron 18 muestras contaminadas (29.5 %), de las cuales 8 (44.4%) provenían de mercado y 10 (55%) son de supermercado. En el caso de la lechuga se encontraron 9 muestras contaminadas (14.7%) de las cuales, 4 (44.4%) son de mercado y 5 (55.6%) de supermercado; con la espinaca 17 muestras contaminadas (27.8 %) de las cuales, 6 (35.3%) son de mercado y 11 (64.7%) de supermercado; se observó que la mayoría de las muestras contaminadas con heces fecales provienen de supermercados, realmente es complicado establecer la causa a la que esto se debe, pues las hortalizas pudieron contaminarse en cualquiera de las fases de la cadena (que abarca desde la etapa de la precosecha hasta la

comercialización) a la que son sometidas hasta el momento de su utilización y diversos factores a los que se encuentran expuestas pudieron influir, sin embargo, podemos destacar factores como el proveedor , el manipuleo de las hortalizas por los trabajadores del supermercado cuando las acomodan en los refrigeradores , pero la más importante, el manipuleo por parte del consumidor, que tiene acceso directo a las hortalizas y libertad de tocarlas y dejarlas si no son de su agrado, sin mencionar el hecho de que aun cuando éstas estaban expuestas en refrigeradores, estaban llenas de tierra; asimismo, debemos considerar la generalidad de este estudio, por lo que no podríamos decir que es más confiable el consumo de hortalizas que provengan de los mercados. La contaminación fecal es un aspecto muy importante que debería ser determinado en todos los alimentos, pues nos habla del riesgo de contraer ETA`s por la posible presencia de microorganismos enteropatógenos.

11.3 *Escherichia coli* O157: H 7

Escherichia coli O 157: H 7 no se encontró en ninguna de las 104 muestras analizadas.

Una perspectiva importante es el aspecto de la Salud Pública asociado a brotes de enfermedades causadas por *E. coli* O 157:H7. Los Centros para el Control de Enfermedades de los E.U. ha estimado que 76 millones de personas sufren ETA`s y que anualmente 325 mil personas son admitidas en hospitales, de los cuales más de 5 mil mueren³¹.

11.2 *Salmonella* spp

16 muestras (15.4%) de un total de 104 analizadas se encontraron contaminadas con *Salmonella* spp, predominando en las hortalizas compradas en mercados, en mayor cantidad en el cilantro, seguido de espinacas, perejil y lechuga.

Tabla 2. Cantidad de muestras positivas para *Salmonella* spp de cada hortaliza

Hortaliza	Cantidad	Porcentaje (%)
Perejil	4	25
Lechuga	1	6.2
Espinacas	5	31.2
Cilantro	6	37.5

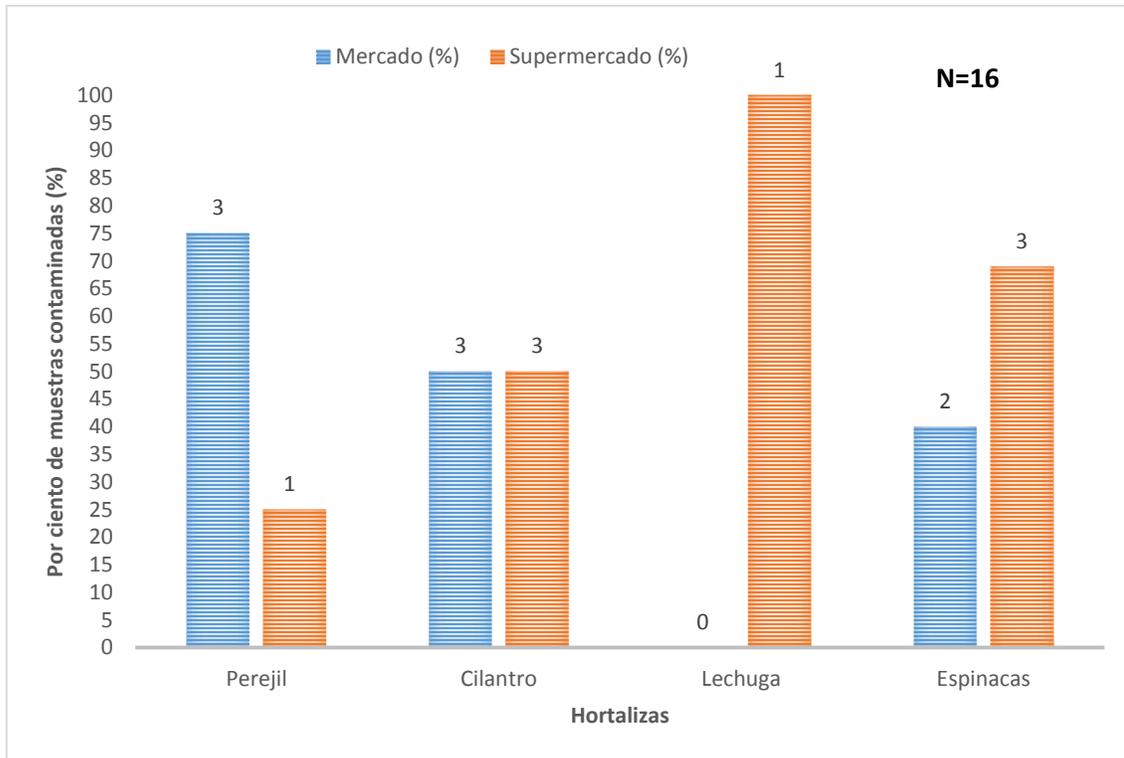


Gráfico 2. Presencia de *Salmonella* spp en hortalizas de acuerdo a su origen (mercado (azul) o supermercado (naranja))

Se analizaron 26 muestras de cada hortaliza (13 de mercado y 13 de supermercado), buscando a *Salmonella* spp, (tabla 2 y gráfico 2), obteniendo los siguientes resultados: con el cilantro se identificaron 6 muestras contaminadas (37.5%), 3 (50%) correspondientes a mercado y 3 (50%) de supermercado. En el caso del perejil 4 muestras positivas (25%), 3 (75%) de mercado y 1 (25%) de supermercado. Con la lechuga se encontró 1 muestra contaminada (6.25%) proveniente de supermercado (100%). Con respecto a las espinacas se hallaron 5 positivas (31.2%), 2 (40%) de mercado y 3 (60%) de supermercado. Se observa que la presencia de *Salmonella* spp se encontró en la misma proporción en las muestras que provenían de mercados y de supermercados y que, como se mencionó anteriormente, son innumerables las posibles fuentes y etapas en las que pueden llegar a contaminarse. Arias y cols. En el año 2011, en Querétaro, llegaron a la conclusión de que en los terrenos de cultivo en los que había animales silvestres, aves muertas y desapego a las Prácticas Sanitarias había una mayor incidencia de *Salmonella* spp y *Escherichia coli* ³².

Anualmente, se estima que unos 100 millones de personas resultan infectadas por salmonelosis, que es la primera causa de gastroenteritis y de fiebre tifoidea, según recordó el organismo francés⁹

Desde que las hortalizas se encuentran en el campo hasta su consumo, hay innumerables oportunidades de que estas sean contaminadas, se ha demostrado que determinados patógenos tienen la capacidad de persistir sobre las hortalizas el tiempo suficiente como para representar un peligro para el ser humano y de hecho se han reportado numerosos casos de enfermedades asociadas al consumo de frutas y hortalizas. Ciertamente, es bastante complejo resolver el problema de la contaminación microbiana y la única estrategia posible es la prevención de la contaminación del alimento a lo largo de las etapas de pre cosecha (cuando las hortalizas aún están el campo), cosecha, transporte, almacenamiento, venta y utilización. Un aspecto importante es el registro o la documentación de todas las acciones para poder ejecutar un sistema de rastreabilidad que permita detectar los puntos débiles y establecer medidas preventivas, es decir determinar los puntos críticos donde la seguridad alimentaria puede ser amenazada.

Durante la pre cosecha, la vía fecal o urinaria es la principal fuente de contaminación que llega a las frutas y hortalizas a través del agua usada en riego principalmente, asimismo, el uso de estiércol o fertilizantes orgánicos y la presencia de animales en el lote de producción es otra fuente de contaminación.

En la cosecha, las condiciones higiénicas en las que los operarios y trabajadores rurales están expuestos representan riesgo de contaminación.

Refiriéndonos a las características de almacenamiento y transporte, la higiene de los vehículos y de las zonas de almacenamiento, así como el almacenamiento y transporte con otros productos puede generar contaminación cruzada.

Con respecto a la venta y utilización, estas son las últimas dos etapas en las que el producto puede contaminarse, aquí se reitera lo referente a la higiene personal, evitar la presencia de animales domésticos cerca de las hortalizas y de preferencia mantenerlas refrigeradas. Desde el punto de vista microbiológico, la frutas y hortalizas son comparativamente más sanas que

carnes, leche, aves y otros alimentos; sin embargo, insistiendo en que son consumidas sin ningún tipo de cocción, son potencialmente peligrosas en caso de que exista contaminación, es complicado tener idea de la magnitud de los problemas, pues normalmente no son reportados a menos que sean graves. En años recientes, han aparecido grandes productores y proveedores de cadenas de supermercados que distribuyen producto de un mismo origen a una gran cantidad de sucursales en todo el país, debemos también, comprender la velocidad de la venta de estos productos, pues cuando se tiene informe de un brote, éstas ya fueron totalmente vendidas ⁴.

11.2 Multirresistencia a antimicrobianos

En los últimos años, diferentes estudios arrojan que el uso de antibióticos en animales y humanos genera cierta presión selectiva sobre la población bacteriana por lo que se seleccionan los microorganismos mejor adaptados (resistentes) ⁴⁰.

La resistencia a antimicrobianos ha alcanzado niveles alarmantes desde los años veinte y para contrarrestar los efectos de la resistencia constantemente salen al mercado nuevos antimicrobianos, pero las bacterias han sido capaces de desarrollar defensas contra éstos.

Cuando las bacterias desarrollan resistencia al antimicrobiano, son capaces de seguir viviendo y(o) multiplicarse incluso en presencia del agente antimicrobiano. La resistencia constituye un problema, ya que las infecciones producidas por bacterias resistentes son más difíciles de tratar, pueden provocar enfermedades largas y severas, así como costosas hospitalizaciones, uno de los factores que contribuyen a incrementar la resistencia a antimicrobianos es el mal uso y uso excesivo de antibióticos en humanos, animales y en la agricultura ⁴⁴.

En esta investigación se utilizaron 22 cepas de las 16 muestras a *Salmonella* spp aisladas a partir de hortalizas de mercados y supermercados de la Ciudad de Puebla, las cuales fueron ratificadas mediante pruebas bioquímicas y confirmadas serológicamente. Después de las pruebas antes mencionadas, las cepas fueron sometidas a pruebas de susceptibilidad microbiana, para determinar la resistencia o sensibilidad a antimicrobianos.

Los antibióticos evaluados fueron: amikacina, ampicilina, bacitracina, ceftriaxona, ciprofloxacino, cloranfenicol, doxiciclina, gentamicina, nitrofurantoina y levofloxacino.

De estos antibióticos aquellos en los que se presentó mayor resistencia fueron: bacitracina (100%), ampicilina (54.5%) y ciprofloxacino (13.6%). Los antibióticos en los que se presentó menor resistencia fueron: ceftriaxona (9%), doxiciclina (9%), amikacina (0%), cloranfenicol (0%), gentamicina (0%), nitrofurantoina (0%) y levofloxacino (0%) (Tabla 3 y grafico 3).

Tabla 3. Resistencia de las cepas de *Salmonella* spp aisladas de cilantro, perejil, lechuga y espinacas

Antimicrobiano	S	I	R
Bacitracina	-	-	22
Ampicilina	6	4	12
Ciprofloxacino	1	18	3
Ceftriaxona	14	6	2
Doxicilina	20	-	2
Nitrofurantoina	14	8	-
Amikacina	22	-	-
Cloranfenicol	22	-	-
Gentamicina	22	-	-
Levofloxacino	22	-	-



Fotografía 1. Evaluación de la multirresistencia a antimicrobianos de una cepa de *Salmonella* spp.

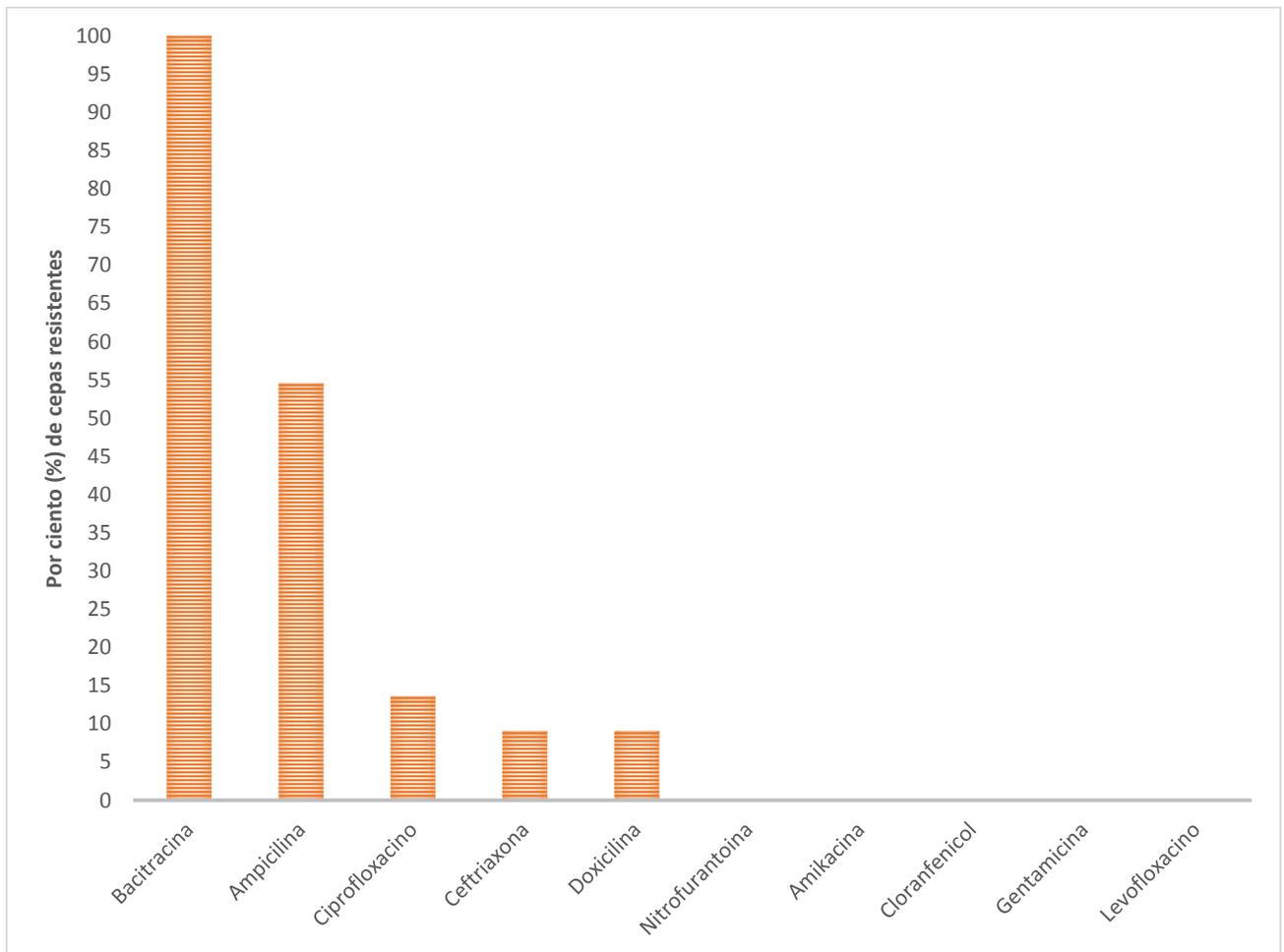


Gráfico 3. Por ciento de resistencia de 22 cepas de *Salmonella* spp aisladas de cilantro, perejil, lechuga y espinacas En Puebla, en septiembre de 2013, Espinal García y cols. Realizaron un estudio analizando 83 cepas de *Salmonella* spp aisladas de carne molida de cerdo, pollo y res; obtenidas de la Ciudad de Puebla y sus alrededores, evaluando la multirresistencia a antibióticos obteniendo 100% de resistencia a bacitracina, 100% a la gentamicina, 90.36% a la amikacina, 45.78% a la doxiciclina, 40.96 % al cloranfenicol, 39.7% a la ampicilina y 25.3% a ciprofloxacino ⁴⁰.

Diversos reportes han mostrado un incremento en la emergencia de *Salmonella* spp y *E. coli* con niveles significativos de resistencia a los antimicrobianos. En adición a la automedicación terapéutica, en veterinaria y agricultura se aplican antimicrobianos de manera indiscriminada. También, muchas veces los agricultores tienen grandes pérdidas debido a bacterias fitopatógenas (*Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Clavibacter*) en los cultivos, por lo que

constantemente se utilizan mezclas de antimicrobianos como tetraciclina, estreptomicina, gentamicina, de esta manera, el uso permanente de antimicrobianos en el sector agrícola hace suponer que pueden tener efectos sobre la resistencia de los microorganismos⁴³.

12. CONCLUSIONES

1. En el 58.65% de muestras (61 de 104), se detectaron evidencias bacterianas de contaminación fecal, siguiendo la siguiente frecuencia: perejil (29.5%), cilantro (27.8%), espinacas (27.8%) y lechuga (14.7%).Hubo mayor cantidad de muestras contaminadas con heces fecales provenientes de supermercado (35 muestras)
2. No se detectó *Escherichia coli* O157: H7 en ninguna de las muestras analizadas.
3. Se encontró 15 % de muestras positivas a *Salmonella* spp (16 de 104), siendo la frecuencia en orden decreciente: cilantro (37.5%), espinacas (31.2%), perejil (25%) y lechuga (6.25%).Hubo la misma cantidad de muestras contaminadas con *Salmonella* spp provenientes de mercado y supermercado. La mejor ruta para aislar *Salmonella* spp a partir de hortalizas fue: caldo lactosado, caldo tetrionato e indistintamente agar verde brillante o agar sulfito de bismuto.
4. De las cepas aisladas de *Salmonella* spp se encontró resistencia a los antimicrobianos: bacitracina (100%), ampicilina (54.5%) y ciprofloxacino (13.6%).

13. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Rozano V, Quiroz C, Acosta J, Pimentel L and Quiñones E. (2004). Hortalizas, las llaves de la energía. *Revista Digital Universitaria*. 5(7): 30.
- 2.- Doyle, M, Beuchat, L and Montville, T. (1997). *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*. Washington, D.C.: Acribia, S.A.
- 3.- Rivera M, Rodríguez C, López J. (2009). Contaminación fecal en hortalizas que se expenden en mercados de la ciudad de Cajamarca, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 26 (1).
- 4.- Chavarrías, M. (2012). *Salmonella y madurez de la fruta*. Febrero, 7, 2015. De Eroski consumer. Recuperado de: <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2012/05/02/209120.php>.
- 5.- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). El Sector Alimentario en México 2012.
- 6.- Ávila, Q; Sánchez, G; Muñoz, E; Martínez, L y Villalobos, E. (2008). Diagnóstico de la calidad microbiológica de frutas y hortalizas en Chihuahua, México. *Phyton (Buenos Aires)*. 77.
- 7.- Monge, R; Chinchilla, M y Reyes, L. (1996). Estacionalidad de parásitos y bacterias intestinales en hortalizas que se consumen crudas en Costa Rica. *Revista de Biología*. 44 (2): 369-375.
- 8.- 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.
- 9.- RPP noticias Salud. Septiembre, 9, 2011. La salmonela también está en frutas y verduras. Recuperado de: http://www.rpp.com.pe/2011-09-09-la-salmonela-tambien-esta-en-frutas-y-verduras-noticia_402322.html
- 10.- Dávila, J. (2003). *Crecimiento y Desarrollo del Cilantro Coriandrum sativum L por Efecto del Fotoperiodo y la Temperatura y su Control con Fitoreguladores*. (Tesis de Doctor en Ciencias Agrícolas). Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México.

- 10.- Insunza, M. & Soto, A. (1998). Salmonelosis: Una enfermedad que se transmite por alimentos. *Revista Tecno Vet.* 4 (2).
- 11.- García, P. (2003). Bacterial resistance to antimicrobial agents. *Revista chilena de Infectología.* 20:11-23.
- 12.- González, T & Rojas R. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud Pública de México.* 47 (5).
- 13.- Giménez, S. (2013). Medicina 21. *Resistencia a los antibióticos.* Marzo, 10, 2015. Recuperado de: http://www.medicina21.com/Articulos-V546-Resistencia_a_los_antibioticos.html
- 15.- García, F. (2001). Resistencia Bacteriana a Antibióticos. *Acta Médica Costarricense.* 43 (3): 102.
- 16.- Pérez, D. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud.* 22 (3):57-67.
- 17.- López, O; León, J; Jiménez, M y Chaidez, C. (2009). Detección y resistencia a Antibióticos de *Escherichia coli* y *Salmonella* en agua y suelo agrícola. *Revista Fitotecnia Mexicana.*
- 18.- Holt, J; Krieg, N; Sneath, P; Staley, J y Williams, S. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* USA: Williams and Wilkins, Sans Tache.
- 19.- Castillo, A, Paasch, L & Calderón, N. (2008). Salmonelosis y campilobacteriosis, las zoonosis emergentes de mayor expansión en el mundo. *Veterinaria México.*
- 20.- Figueroa, M & Verdugo, A. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella spp.* *Revista Latinoamericana de Microbiología.* 47 (1-2): 25-42.
- 21.- James M. Jay. (1992). *Microbiología Moderna de los Alimentos.* Estados Unidos: Acribia.
- 22.- Fernández, E. (1981). *Microbiología Sanitaria, agua y alimentos.* México: Universidad de Guadalajara

- 23.- Baird, A, Buchanan, R, Busta, F, Cole, M, Doyle, M, Eyles M, Farkas, J, Flowers, R, Jouve, L, Mendoza, S, Merican, Z, Quevedo, F, Sharpe, A, Teufel, P, Tompkin, R and Van Schothorts, M. (1998). *Microorganismos de los alimentos 6*. U.S.A.: Aspen Publishers, Inc.
- 24.- Abgrall B, Bardonechi G, Belin J, Bougraba G, Bourgeois C, Brossard J, De Buyser M, Cerf O, Dousset X, Dromigny E, Gledel J, Guyot A, Jouve J, Lahellec C, Labadie J, Larpent J, Leclerc H, Le Corre F, Mescle J, Moreau C, Pioto Y, Poumeyrol M, Raguenes N, Rosset R, Sebald M, Thapon J, Thouvenot D, Tirrilly Y, Venaille L, Vincent P & Zucca J. (1988). *Microbiologia Alimentaria, Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria*. España: Acribia, S.A.
- 25.- Zaidi M, López C & Calva E. (2006). Estudios mexicanos sobre Salmonella: epidemiología, vacunas y biología molecular. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 48 (2): 121-125.
- 26.- Thatcher, F & Clark, D. *Análisis Microbiológico de los Alimentos*. Canadá: University of Toronto Press.
- 27.- Murrell J, Badía M, Álvarez B, Hernández N & Pérez M. (2013). Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. *Revista CENIC (Ciencias Biológicas)*.44 (3).
- 28.- Fernández E. (2000). *Microbiología e Inocuidad de los Alimentos*. México: Universidad Autónoma de Querétaro.
- 29.- Rubeglio, E & Teson, S. (2007). *Escherichia coli* O157 H7: presencia en alimentos no cárnicos. *Archivos argentinos de pediatría*. 105 (3).
- 30.- Consejo para la Información sobre la Seguridad de los alimentos y Nutrición. Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en 2011.
- 31.- Deisingh, A & Thompson, M. (2003). Strategies for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. *Journal of Applied Microbiology*. 96:419–429.
- 32.- Arias Rios, Elba. *Enterobacteriaceae, Escherichia coli y Salmonella spp como parámetros en la verificación de las practicas sanitarias agrícolas durante el manejo poscosecha de hortalizas*

- en empresas exportadoras*. (Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos). , Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, México. (2011). 128p.
- 33.- Esquivel Hernández, Yajaira. Biocontrol de *Salmonella* durante la producción hidropónica de germinado de alfalfa. (Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos). Querétaro, México, Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química, 2012. 108 p.
- 34.- México Calidad Suprema, A.C. Sandoval R. Recuperado de: <http://www.infoaserca.gob.mx/mexbest/Ponencias/Esquemas-Certificacion.pdf>
- 35.- Gracia, Y; Arteaga, G; Yeverino, M y Campos, L. (2007). Prevalencia de enfermedades gastrointestinales en estudiantes de la carrera de químico farmacéutico biólogo. Laboratorio de Investigación en Ciencia de los Alimentos y Ambientales, Facultad de Ciencias Químicas, UANL. Recuperado de: file:///C:/Users/angie/Downloads/A3_Res._Extenso_Y._Gracia.pdf
- 36.- Secretaria de Salud NOM-114-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de salmonella en alimentos.
- 37.- León, G., Martínez, V., Cabrera, C., López, A. y Ruiz, A. Aislamiento e identificación de *Salmonella* sp de hortalizas obtenidas en expendios de mercados populares de la Ciudad de Puebla. (2013). *XV Congreso Internacional de Inocuidad de los Alimentos (XXX Reunión Nacional de Microbiología, higiene y toxicología de los Alimentos)*
- 38.- Red Internacional de Autoridades en materia de Inocuidad de los Alimentos (INFOSAN). *Brote de Escherichia coli O157:H7 en espinacas*. FAO. INFOSAN No. 01/2007.
- 39.- Fuentes, A; Campas, O y Meza, M. (2005). Calidad Sanitaria de alimentos disponibles al público de ciudad Obregón, Sonora, México. *RESPYN (Revista de Salud Pública y Nutrición)*. 6 (3).
- 40.- Espinal García, Elsinaithe y Díaz Guerrero, Sandra. Efecto del pH, temperatura y concentración del cloruro de sodio sobre el comportamiento de cepas multirresistentes de *Salmonella* spp (Licenciado en Químico Farmacobiólogo). Puebla, México, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ciencias Químicas, 2013. 74 p.

- 41.- Gutiérrez Pérez, Jazmín y Salgado Lobato, María. Aislamiento e identificación de *Salmonella* y *Escherichia coli* O 157: H7 en materia fecal de pacientes que asisten al hospital civil de Guadalajara Dr. Juan I. Menchaca y al hospital Siloé. (Licenciado en Químico Farmacobiologo). Puebla, México, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ciencias Químicas, 2010. 53 p.
- 42.- López, A. (2003). Manual para la preparación y venta de frutas y hortalizas del campo al mercado. Boletín de servicios agrícolas de la FAO. 151.
- 43.- López O, León J, Jiménez M, Chaidez C. Detección y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Salmonella* en agua y suelo agrícola. Revista fitotecnica mexicana.32 (2).
- 44.- Álvarez, E. Rotación de antibióticos: una estrategia para paliar la resistencia. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 37(1): 37-44