



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE HIDALGO**

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

CORRELACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE
MICROORGANISMOS INDICADORES DE HIGIENE Y
GRUPOS PATÓGENOS DE *E. coli* DETERMINADOS
POR PCR EN ENSALADAS DE VERDURAS CRUDAS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO EN ALIMENTOS
P R E S E N T A
ELIGIO MÉNDEZ REYES

DIRECTOR DE TESIS: DR. JAVIER CASTRO ROSAS



PACHUCA DE SOTO, HIDALGO

2008

INDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS	i
INDICE	iii
INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS	vii
INDICE DE ANEXOS	viii
ABREVIATURAS	ix
GLOSARIO	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Enfermedades Transmitidas por alimentos	3
2.2 Riesgos asociados con el consumo de verduras	4
2.3 Fuentes y mecanismos de contaminación de frutas y verduras	5
2.4 Brotes de enfermedad por el consumo de frutas y verduras crudas	6
2.5 Indicadores de higiene	10
2.6 Organismos coliformes	11
2.6.1 Características generales	11
2.6.2 Significado en los alimentos	11
2.7 Coliformes fecales	12
2.7.1 Características	12
2.8 <i>Escherichia coli</i>	12

2.8.1 <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC)	14
2.8.2 <i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	15
2.8.3 <i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	16
2.8.4 <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC)	16
2.8.5 <i>E. coli</i> Shiga-like toxin (STEC)	18
2.9 Incidencia de <i>E. coli</i> en alimentos	29
2.9.1 Identificación de <i>E. coli</i>	22
2.9.1.1 Reacción en cadena de la polimerasa	22
2.9.1.2 Ventajas y aplicaciones de la PCR	23
2.9.1.3 Aplicación de PCR en alimentos	25
III. JUSTIFICACIÓN	27
IV. OBJETIVOS	29
4.1 Objetivo general	29
4.2 Objetivos específicos	29
V. METODOLOGÍA	30
5.1 Equipo	30
5.2 Material de laboratorio	30
5.3 Medios de cultivo	30
5.4 Reactivos	31
5.5 Procedimientos	32
5.5.1 Recolección de las muestras	32
5.5.2 Análisis microbiológico	33
5.5.2.1 Preparación de las muestras	33
5.5.2.2 Recuento de organismos coliformes	35

5.5.2.3 Recuento de coliformes termotolerantes	35
5.5.2.4 Cuantificación de <i>Escherichia coli</i>	37
5.5.2.5 Identificación de <i>E. coli</i> patógena por PCR	37
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
VII. CONCLUSIONES	60
VIII. BIBLIOGRAFÍA	62
IX. ANEXOS	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No.	Página
1. Consumo per capita de frutas y verduras crudas en los E. U. A.	8
2. Grupos y genes de <i>E. coli</i> patógenos	14
3. Brotes de colitis hemorrágica y síndrome hemolítico urémico más relevantes en los EEUU hasta 1994, causados por cepas de <i>E. coli</i> O157:H7	21
4. Características de las ensaladas y de los sitios de Recolección	35
5. Mínimos, medianas, máximos y frecuencia de coliformes termotolerantes y <i>E. coli</i> no patógena y patógena en ensaladas de verduras crudas de restaurantes con nivel aparente de higiene Alta (A), Media (M) y Baja (B).	43
6. Diferencia estadística en el nivel de microorganismos indicadores entre los distintos restaurantes	48
7. Concentración y tipo de <i>E. coli</i> patógena detectada en las ensaladas según tipo de restaurante.	52
8. Correlaciones entre los grupos microbianos obtenidas mediante la ecuación no paramétrica de Spearman Rank Order	57

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexos No.	Página
1. Ensalada de espinacas Vip`s	73
2. Ensaladas de espinacas Sanborn's	74
3. Ensaladas de espinacas Ciro`s	75
4. Ensaladas mixtas La Blanca	76
5. Ensaladas mixtas de fondas	77
6. Ensaladas mixtas de puestos de mercado	78
7. Iniciadores para <i>E. coli</i> patógena	79
8. Cálculos para resuspender iniciadores	80
9. Preparación de dNTP's	82

INDICE DE FIGURAS

Figura No	Página
1. Cuantificación de coliformes termotolerantes, <i>E. coli</i> y grupos patógenos de <i>E. coli</i>	36
2. Esquema general para identificación de patogenicidad de <i>E. coli</i>	40
3. Productos de PCR múltiple de <i>E. coli</i> patógenas	51
4. Producto de PCR de <i>E. coli</i> enteroagregativas	52

ABREVIATURAS

A/E	adherencia agregativa
ADN	ácido desoxirribonucleico
Ah	aparente alta higiene
AP	agua peptonada
APHA	American Public Health Association
AST	agar soya tripticaseína
BAM	Bacteriological Analytic Manual
Bh	aparente baja higiene
CDC	Centro para el control de enfermedades
CT	coliformes termotolerantes
CFA	colonization factor antigens
CL	caldo lactosado
CLF	caldo lactosado florocult
EAEC	<i>E. coli</i> Enteroagregativa
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogena
ETAs	Enfermedades transmitidas por los alimentos
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigenica
FAO	Food and Agriculture organization
FDA	Food and Drug Administration EEUU.
HUS	Hemolytic Uremic síndrome
Mh	aparente media higiene
NMP	numero más probable
OPS	Organización Panamericana de la Salud

PCR	reacción en cadena de la polimerasa
STEC	<i>E. coli shiga like</i> toxin
UFC	unidades formadoras de colonias

GLOSARIO

Bacilos: Son bacterias que tienen forma de bastón cuando se observan al microscopio

Colonización: Capacidad de llegar a la superficie del huésped por una puerta de entrada (piel o mucosa) formar o establecer una colonia en el epitelio y resistir los sistemas de defensa locales.

Efecto citopático: Visualización de cambios morfológicos más o menos característicos en células inoculadas producidas por acción de un virus.

Endocitosis: Proceso celular que consiste en la invaginación de la membrana citoplasmática, formando una vesícula con contenido diverso que es así transportado del exterior de la célula al interior.

Enteritis: Inflamación de la membrana mucosa de los intestinos, que puede ser originada por bacterias, o por alimentos en mal estado.

Enterotoxina: Toxina producida por ciertas bacterias, la cual es liberada en los intestinos , ocasionando problemas estomacales tales como cólicos y diarreas.

Esfacelamiento: Destrucción de microvellosidades, formando lesiones características al epitelio intestinal

Exotoxina: Toxina producida por una bacteria y que es liberada por la célula bacteriana en un medio de cultivo (o huésped) y por lo cual se encuentra en el filtrado de las células libres y de cultivos de bacterias intactas.

Gangliosidos: Subgrupo de esfingolípidos que contienen ácido siálico y están concentrados en células ganglionares del sistema nervioso.

Pilis o fimbrias: Estructuras filamentosas carentes de movilidad, tienen como función la absorción de líquidos.

Serotipos: Es una población antigénicamente distinta de una especie de microorganismo infeccioso que se diferencia de otras subpoblaciones

Transposones: Secuencias repetitivas, que integran en el ADN celular en lugares bien determinados.

Trombocitopenia: Trastorno en el cual existe una cantidad insuficiente de plaquetas (células producidas en la médula ósea que son necesarias para la coagulación).

Virulencia: Capacidad de un microorganismo para causar enfermedad letal.

I. INTRODUCCIÓN

El consumo de frutas y verduras ha incrementado de manera considerable en todo el mundo en los últimos años. Tan sólo en los Estados Unidos de Norte América (EE.UU.) se ha considerado que el mercado de los productos frescos podría representar hasta el 35% del total de ventas para el año 2004. No obstante, junto con este incremento también en todo el mundo ha ocurrido incremento en los brotes de enfermedad asociados al consumo de frutas y hortalizas. La demanda de frutas y hortalizas frescas de alta calidad, vida de anaquel prolongada y "listas para ser consumidas" se ha incrementado tanto en América como en Europa; esto ha generado mayor atención en el aspecto de inocuidad de las frutas y verduras (USDA, 2004). Sin embargo, obtener frutas y verduras con alto grado de inocuidad no es una tarea fácil. Numerosas son las fuentes de contaminación que entran en contacto con las frutas y verduras desde su cultivo, cosecha, procesamiento, transporte, almacenamiento y comercialización, por lo que con frecuencia las frutas y verduras se contaminan con microorganismos patógenos (Fernández, 2000). Además, a excepción de la irradiación, en éste momento no existe un procedimiento confiable de desinfección de frutas o verduras que asegure la eliminación o reducción de la concentración de microorganismos patógenos a niveles que no representen riesgo sin efecto en la calidad de alimento. Aunado a esto, los recientes y numerosos brotes ocurridos en diferentes países, como los EE.UU., provocados por patógenos como *E. coli* O157:H7 debido al consumo de frutas o verduras crudas que habían sido cultivadas bajo el sistema HACCP, ejemplifican la dificultad de obtener verduras crudas listas para el consumo con alto grado de inocuidad. Una forma de contribuir a la solución del problema de la

inocuidad en las frutas y verduras es conocer el tipo y frecuencia de microorganismos patógenos potencialmente presente en ellas (OPS, 1996). Con esta información será posible entonces detectar o identificar las potenciales fuentes de contaminación de las frutas y verduras con microorganismos patógenos para eliminarlas. Para investigar la frecuencia de microorganismos patógenos en alimentos, comúnmente se emplean técnicas que involucran en la parte final del estudio la identificación de los microorganismos mediante pruebas bioquímicas. Sin embargo, estas pruebas por lo general son numerosas y se requiere en ocasiones hasta 10 días para finalizar la investigación (Barrera, 1998). La utilización de novedosas técnicas en la identificación de microorganismos como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha utilizado con éxito en la identificación rápido y preciso de bacterias, hongos y virus (Palomares, 1992). En México, se ha reportado que los grupos patógenos de *E. coli* se encuentran dentro de los principales agente patógenos que se aíslan de pacientes con cuadros de gastroenteritis en la mayoría de hospitales. Esto es un indicativo de la importancia que se les debe tener a estos agentes como causa de enfermedad, y que se les debe considerar en la epidemiología de las enfermedades transmitidas por los alimentos, al menos en nuestro país (López-Saucedo y col., 2003) . Por desgracia, existe limitada información sobre la frecuencia de estos agentes patógenos en los alimentos que consumimos en México o en aquellos que se exportan. Como consecuencia, el objetivo de este trabajo, entre otras cosas, fue determinar la frecuencia de grupos patógenos de *E. coli* e identificar por PCR cepas patógenas en ensaladas de verduras crudas listas para su consumo obtenidas de restaurantes.

II. ANTECEDENTES

2.1 Enfermedades Transmitidas por alimentos

Los alimentos aparte de cumplir con la función de satisfacer una necesidad fisiológica en el humano, pueden contener un riesgo inherente de enfermedad (Fernández, 2000). En México como en todo el mundo, anualmente se presenta un número elevado de casos de enfermedad asociadas al consumo de alimentos (SSA, 1994; Fernández, 2000). Diferentes agentes patógenos pueden estar presentes en los alimentos; dentro de estos encontramos a los microorganismos. Los alimentos se contaminan con patógenos microbianos debido a las malas prácticas higiénicas que se aplican durante la obtención, transporte, almacenamiento y comercialización de los alimentos. Esta falta de higiene aparte de afectar la salud del consumidor, tiene impacto en la economía de un país. Sin embargo, el impacto real de ETAs en la salud y en la economía apenas se empieza estimar en los países industrializados, mientras que en los países en vías de desarrollo prácticamente se desconoce su situación y se carece en general de estadísticas (OPS, 1996). Como ejemplo, se estima que tan solo en los Estados Unidos de Norte América (EE.UU.) las enfermedades transmitidas por alimentos afectan aproximadamente a 76 millones de personas, ocurren 325,000 hospitalizaciones, 5,000 muertes y un costo aproximado de 5 billones de dólares (Mead y col., 1999). El Centro de Control de enfermedades (CDC) de EEUU estima que en ese país ocurren al año entre 300 a 600 brotes de enfermedades transmitidas por alimentos.

En México se notifican aproximadamente 20 brotes al año con unos 1,000 afectados. En nuestro país, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica solo

distingue una categoría en relación a enfermedades transmitidas por alimentos, la de Intoxicación bacteriana, sin embargo, específicamente no están reportadas las enfermedades transmitidas por alimentos, ninguna de las otras enfermedades gastrointestinales, ni las enfermedades que producen otros cuadros clínicos cuyo vehículo de transmisión son los alimentos (Fernández, 2000). Considerando que se estima que existen unas 400 enfermedades distintas que pueden ser transmitidas por alimentos es evidente que el impacto de estas enfermedades en la salud pública en nuestro país se desconoce, además se sabe que estas enfermedades pueden producir secuelas importantes como son la artritis reactiva por *Salmonellosis*, el síndrome urémico hemolítico por *Escherichia coli* enterohemorrágica o el síndrome de Guillain-Barre por *Campylobacter* (Fernández, 2000).

2.2 Riesgos asociados con el consumo de verduras

Debido a que los patógenos bacterianos forman parte del medio ambiente, las frutas y verduras pueden contaminarse fácilmente si no se manipulan adecuadamente antes del consumo. Diversos microorganismos pueden ser aislados de una gran diversidad de frutas y verduras, algunas veces en concentraciones relativamente altas, con frecuencia estos microorganismos son patógenos. Se han registrado diversos brotes de enfermedad asociadas al consumo de frutas y hortalizas cuya etiología ha sido microbiana (Bryan, 1977).

2.3 Fuentes y mecanismos de contaminación de frutas y verduras

La naturaleza y abundancia de la flora contaminante (bacterias, virus, hongos, levaduras y parásitos) es muy variable entre los diferentes productos. Dependen de su cercanía a la tierra cuando desarrollan, las condiciones de humedad y viento, la estación del año, la proximidad de animales y el tipo de agua usada en la irrigación (Webb y col, 1978). En aquellas que se ofrecen al público, los microorganismos pueden provenir de una gran diversidad de fuentes de contaminación (Acevedo y col., 2002).

En gran medida la flora microbiana de frutas y verduras refleja el ambiente en el cual se desarrollaron. Es de esperar, por tanto, mayor carga microbiana en aquellas que se cultivan en contacto con la tierra (zanahorias, por ejemplo) que en las que se producen alejadas (aguacates por ejemplo). La lluvia afecta la carga microbiana disminuyendo su número por arrastre mecánico, pero contribuye a su crecimiento; propicia la actividad microbiana al elevar la humedad relativa (Webb y col., 1978).

La presencia de bacterias patógenas afecta la inocuidad de frutas y hortalizas frescas y se constituye en problemas de salud humana. La falta de inocuidad se refleja en una alta incidencia de brotes de gastroenteritis e implicaciones clínicas de mayor importancia en quienes consumen estos productos. Se ha reportado que la frecuencia de infecciones asociadas al consumo de frutas y hortalizas frescas es mayor en restaurantes establecidos y de comida rápida que en los hogares, con frecuencia esto es resultado de la inadecuada manipulación de los productos

frescos, además de la contaminación por parte de las superficies donde se preparan los alimentos (Webb y col., 1978). La alta incidencia de brotes en estos lugares, pone de manifiesto la necesidad de inculcar e instruir acciones adecuadas de higiene a todos los involucrados en el procesamiento de los alimentos para evitar la contaminación, sobrevivencia o el desarrollo microbiano (Ukuku y Col., 2001). Existen diversas etapas en las que se puede afectar la inocuidad de los alimentos. Los brotes por *S. aureus* y *E. coli* han sido asociados en su gran mayoría al manejo deficiente de los alimentos por las personas que realizan la preparación de los productos frescos (Díaz y col., 1993). La temperatura de almacenamiento constituye el factor principal para el desarrollo de bacterias en los alimentos como las verduras. Algunas bacterias como *Salmonella*, poseen dosis infecciosas bajas y con frecuencia necesitan de un ligero desarrollo en el alimento para alcanzar tal concentración infectante (Parrilla, 1993). *E. coli* patógena y *S. aureus* pueden causar implicaciones clínicamente severas. La intoxicación por *S. aureus* se debe a la ingestión de exotoxinas que provocan náuseas, vómito, dolores abdominales y diarrea. Las cepas patógenas de *E. coli* causan severos desórdenes gastrointestinales (Castro del Campo y col., 2004).

2.4 Brotes de enfermedad por el consumo de frutas y verduras

El número de brotes relacionados con enfermedades están relacionados con el consumo de productos frescos (Bean and Griffin, 1990; CDC 1990; CDC 2000). Diferentes razones se ha propuesto para explicar el continuo incremento de las enfermedades por consumo de frutas y verduras por ejemplo: desde los años 70s

Tabla 1. Consumo per capita de frutas y verduras crudas en los E. U. A .

ha ocurrido un aumento significativo en frutas y verduras como parte importante de una dieta sana. A partir de 1990 al 2004, el consumo *per capita* de frutas y verduras aumento de 91.6 a 121.1 kg, un incremento de el 32% (tabla 1), durante estos periodos, ha habido una gran tendencia hacia alimentos no preparados en el hogar y un aumento en el consumo de ensaladas y comidas buffets. Cada vez se han requerido mayores volúmenes de frutas y verduras picadas y preparadas y un excedente en la distribución en áreas geográficas mucho más grande. Esto, en conjunción con el comercio global creciente, potencialmente aumenta la exposición humana a una variedad amplia de patógenos producidos por los alimentos y también aumenta las ocasiones de un brote (USDA, 2004).

Años	% de consumo de Frutas	% de consumo de verduras
1990	40.2	55.8
1991	39.3	57.5
1992	42.1	57
1993	44.1	60.1
1994	44.1	61.5
1995	43.7	64.7
1996	41.6	60.9
1997	40.7	60.9
1998	44.5	64.2
1999	45.3	66.4
2000	45.6	69.6
2002	44.4	67.7
2003	44.8	70.8
2004	46.7	74.4

*Fruit and Tree Nut Situation and Outlook Report (USDA, 2004).

Entre los vegetales a partir de los cuales han sido aislados microorganismos patógenos se encuentran espárrago, germinados de soya y alfalfa, brócoli, col, coliflor, lechuga, cilantro, perejil, zanahoria, espinaca, tomate, pepino, entre otros (Arce y col., 2002). Entre las bacterias patógenas aisladas a partir de vegetales se encuentran: *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolítica* y *Aeromonas spp.* (Acevedo y col., 2002). Los miembros del género

Aeromonas son bacilos Gram-negativo ubicuos en ambientes naturales como suelos, ríos, lagos y mares; se ha documentado su presencia en aguas potables, aguas residuales y en una variedad de alimentos frescos incluyendo vegetales (alfalfa, brócoli, coliflor, lechuga, cilantro, perejil, espinacas), carne (de res, cerdo, pollo y oveja), productos marinos y lácteos, entre otros (Beuchat L., 1998).

El consumo de vegetales crudos ha sido asociado a numerosos casos de brotes de enfermedades por microorganismos patógenos. Se han reportado infecciones alimentarias relacionadas con el consumo de vegetales. *L. monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *E. coli* enterohemorrágica y *Vibrio cholera*, han sido asociado a infecciones por el consumo de vegetales crudos, ensaladas de repollo y champiñones salados (Gillian y col., 1999). *E. coli* también ha sido relacionada a brotes de infecciones alimentarias por el consumo de vegetales y ensaladas (Doyle, 1997). Las estadísticas epidemiológicas indican que el apio, los tomates, lechuga cruda, col, zanahoria y cilantro son los vegetales más implicados en brotes de gastroenteritis (Adams y col., 1998). En Venezuela se han realizado varios estudios sobre la calidad microbiológica de algunos vegetales y de ensaladas crudas comerciales listas para su consumo, donde se determinó la incidencia de microorganismos como: *Listeria spp.*, *L. monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*, *Bacillus spp.* *B. cereus* y *E. coli* (Moreno, 1997). Los vegetales frescos albergan una población diversa de microorganismos, son frecuentes cantidades de 10^5 - 10^7 UFC/g. Normalmente las hortalizas no deberían ser causa de problemas de salud pública, ya que son más resistentes a infecciones microbianas que los productos de origen animal (Adams, 1998). Sin

embargo es posible la transmisión de bacterias patógenas por contaminación directa con heces de animales, por el uso de estiércol como abono, agua residuales, o por el uso de aguas contaminadas para regar (Whitfield, 1998). Otra fuente de contaminación es la inadecuada manipulación de los alimentos, aspecto que ha sido muy relacionado con los expendios de comida rápida y/o lista para llevar. La FAO señala que los alimentos que se venden en la vía pública constituyen una fuente importante de alimentos nutritivos y de bajo costo, especialmente para los sectores pobres de la población urbana; sin embargo, resalta que los mismos han demostrado ser un potencial para causar brotes de intoxicación alimentarios por contaminación microbiológica y por utilización de aditivos no permitidos (FAO, 1990).

2.5 Indicadores de higiene

Los microorganismos indicadores dan una idea de las condiciones higiénicas bajo las cuales se ha elaborado un alimento. La presencia en los alimentos de algunos como *E. coli*, sugiere que el alimento se contaminó con heces. Los coliformes son microorganismos indicadores, ya que su presencia en el alimento sugiere falta de higiene (Fernández, 2000).

Los grupos microbianos indicadores de mayor uso en los alimentos son: bacterias mesófilas aerobias, organismos coliformes totales, coliformes termotolerantes (fecales), *E. coli*, *Enterococos*, la familia *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, así como hongos y levaduras (Fernández, 2000).

Para evaluar el riesgo de un alimento a la población, con frecuencia se recurre al uso de microorganismo indicadores y no al uso de patógenos, ya que a menudo es difícil aislar bacterias patógenas en los alimentos (Fernández, 2000).

2.6 Organismos coliformes

2.6.1 Características generales

Los organismos coliformes son bacilos gram negativos, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos que producen gas y ácido a partir de lactosa dentro de 24-48 horas de incubación a 35°C. Se trata de una definición totalmente convencional que pretende involucrar bacterias de hábitat típicamente intestinal, no obstante existen microorganismos que satisfacen la definición pero que tienen hábitat extraintestinal (APHA, 1992; Fernández, 1981).

2.6.2 Significado en los alimentos

Los organismos coliformes son el grupo indicador de mayor tradición en la microbiología sanitaria. Es importante destacar que los organismos coliformes únicamente se relacionan con contaminación fecal reciente cuando se encuentran en agua limpia. Esto, se fundamenta en el hecho de encontrarse en el intestino de los animales de sangre caliente en mayor número que las bacterias patógenas, siendo incapaces de multiplicarse en aguas limpias. Sin embargo, su presencia en el agua no indica siempre la existencia de un patógeno. La presencia de coliformes en muchos alimentos, especialmente en aquellos que han recibido tratamiento térmico, sugiere contacto con materiales sucios y no necesariamente implica un riesgo a la salud (APHA, 1992; Fernández, 1981).

2.7 Coliformes termotolerantes

2.7.1 Características

Los coliformes termotolerantes forman un grupo microbiano más reducido que el de los organismos coliformes totales al cual pertenecen los termotolerantes. Este grupo esta formado por aquellos microorganismos con semejantes características que los organismos coliformes totales la única diferencia que los termotolerantes fermentan lactosa con producción de gas a 44-45°C dentro de las 24-48 horas de incubación. Dentro de los coliformes termotolerantes se encuentra *E. coli* (Fernández, 1981).

Los coliformes termotolerantes se aíslan con frecuencia de la materia fecal pero no son exclusivos de ella; un porcentaje considerable de éstos tienen como hábitat el agua, el suelo y las plantas

2.8 *Escherichia coli*

Este microorganismo fue aislado por primera vez en heces de niños y fue descrito por el bacteriólogo alemán Theodor Escherich. *E. coli* es una bacteria que habita normalmente en el intestino del hombre y animales de sangre caliente, y desempeña un importante papel en la fisiología del intestino. La distribución en el ambiente esta determinada por su presencia en el intestino. Por ser un habitante regular y normal del intestino se usa desde hace un siglo como "el mejor" indicador de contaminación de los alimentos con materia fecal (Mossel y col., 1990).

El primer serogrupo patógeno se denominó como *E. coli enteropatógena* clásica (EPEC clásica). Posteriormente, se descubrió un grupo de cepas de *E. coli* de serotipos diferentes que causan enteritis por un mecanismo invasor rigurosamente idéntico al de las *shigellas* (*E. coli* enteroinvasora: EIEC). Desde finales de los 60's también se conocen otros serotipos que producen enteritis por liberación de enterotoxinas de dos tipos, termoestable (*st*) y termolábil (*lt*), que reciben el nombre de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC). Estos microorganismos son poco frecuentes en nuestro medio pero causan diarrea entre los viajeros a países exóticos. Otro grupo importante es EAEC que también son causantes de problemas de enteritis por la liberación de 3 tipos de toxinas (*aap*, *aggR* y *AA*) provocando diarreas persistentes. A estos grupos de *E. coli* patógenos (EPEC clásica, EIEC y ETEC) se añadió otro grupo que causa enteritis por producción de una toxina denominada verotoxina (VT), que posteriormente también se ha denominado Shiga-like toxin (*stx*) y es diferente de las toxinas *st* y *lt* conocidas hasta entonces. La importancia de esta bacteria enteropatógena puede deducirse a partir del hecho que diversos organismos internacionales de salud han recomendado su vigilancia, que consideran objetivo prioritario (tabla 2).

Tabla 2. Grupos y genes de *E. coli* patógena

Grupo de <i>E. coli</i>	Gen o fragmento
EPEC	<i>eaeA</i> , <i>bfpA</i>
EIEC	<i>ial</i>
ETEC	<i>lt</i> y <i>st</i>
EAEC	<i>aap</i> , <i>aggR</i> y <i>AA</i>

*Cerna y col.,2003

2.8.1 *E. coli* enteropatógena (EPEC)

EPEC fue el primer grupo que se identificó serológicamente y se asoció con casos de diarrea en infantes, siendo la adherencia su principal factor de patogenicidad. El proceso de adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de las células del epitelio intestinal, seguida de la destrucción de la microvellosidad, con polimerización de actina, que lleva a la alteración del citoesqueleto en el sitio de la unión de la bacteria, debido al aumento de los niveles de calcio intracelular y de proteína cinasa C, ha sido denominado adherencia y esfacelamiento (A/E). La adherencia está mediada por pilis o fimbrias rizadas que se llaman Bfp (bundle-forming pilus) cuya información genética está codificada en un plásmido de 50 70MDa denominado EAF (EPEC adherente factor) y de algunos genes cromosomales. En la adherencia es necesaria la síntesis de una proteína de membrana externa de 94 kDa llamada intimina, codificada por el gene cromosomal *eae* y que sirve como señal en A/E. En ensayos in vitro las cepas EPEC se caracterizan por formar microcolonias en el citoplasma de las células Hep-2 y su estudio incluye factores de patogenicidad

como el efecto A/E, presencia de plásmidos y fimbrias. Las cepas EPEC se consideran típicas cuando tienen los genes eae para la intimina, que participa en A/E, y el plásmido EAF que codifica para el *Bfp*; se dice que son atípicas cuando sólo presentan los genes eae pero no el plásmido EAF. EPEC puede ocasionar brotes o casos aislados de diarrea. Este grupo afecta principalmente a niños menores de seis meses y a los de dos años. También puede aislarse en adultos enfermos y sanos, principalmente cuando hay un factor predisponente como diabetes. La forma de transmisión de la enfermedad es fecal-oral por manos contaminadas de manipuladores de alimentos. Los reservorios de EPEC pueden ser niños y adultos con o sin síntomas. El cuadro clínico que produce EPEC se manifiesta con diarrea aguda, la cual puede ser leve o grave, con vómito, fiebre baja y mala absorción (Rodríguez-Ángeles G., 2002).

2.8.2 *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

El grupo EIEC y *Shigella spp* están relacionados genética y bioquímicamente ya que son descarboxilasa negativas, no móviles y lactosa negativas. El mecanismo de patogenicidad de EIEC es la invasión del epitelio del colon; para ello el primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa requiriendo de mucinasa y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la célula, y posterior multiplicación de la EIEC dentro de la célula y diseminación a células sanas adyacentes. La información genética para este mecanismo está en el gen del cromosoma y del plásmido, además de tener la capacidad de elaborar una o más enterotoxinas que pudieran ser importantes en la producción de diarrea. Los genes necesarios para la invasión se encuentran en un plásmido de 140 MDa

llamado *pInv*, que codifica para proteínas. Los síntomas característicos en personas infectadas por EIEC son diarrea acuosa, con sangre y moco, pero algunos casos sólo presentan diarrea, ésta en ocasiones es indistinguible de la que produce ETEC. Las cepas EIEC se asocian más con brotes que con casos aislados, en los cuales la transmisión puede ser de persona a persona, por ingestión de alimentos y agua contaminada, convirtiéndose en un patógeno importante en niños mayores de seis meses (Rodríguez-Ángeles G., 2002).

2.8.3 *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)

Las ETEC colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias que tienen diversas formas denominadas CFA (colonization factor antigens), siendo su principal mecanismo de patogenicidad la síntesis de alguna o ambas enterotoxinas llamadas toxina termolábil (lt) y toxina termoestable (st). Sus genes están en un plásmido que también puede tener información genética para los CFA's, aunque algunos genes de st se han encontrado en transposones. Las toxinas lt y st aumentan el nivel intracelular de cAMP y cGMP respectivamente, que se encuentran en la membrana de las células intestinales, provocando la salida de agua y iones. Las ETEC son importantes en lactantes, principalmente en niños menores de dos años, y en particular durante los primeros seis meses de vida (Rodríguez-Ángeles G., 2002)

2.8.4 *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

Scaletsky y Nataro (1998) encontraron cepas aisladas de pacientes con diarrea, las cuales por serología no correspondían al grupo EPEC pero si presentaban un

patrón característico de adherencia diferente a EPEC y que además eran negativas a la prueba de EAF. En estudios posteriores se encontró el fenotipo de adherencia agregativa, caracterizada por autoaglutinación de las bacterias entre sí y por ser inespecífica, porque las bacterias se adhieren a la superficie de las células Hep-2 y a la superficie del cubreobjetos libre de células Hep-2. La adherencia a células Hep-2 y la hemoaglutinación de eritrocitos humanos se debe a la presencia de una fimbria o adhesina flexible llamada fimbria I de adherencia agregativa (AAF/I), codificada por el gen *aggA* que se encuentra en un plásmido de 60 MDa. También se ha descrito la fimbria AAF/II inmunológicamente diferente a AAF/I y que está codificada por el gene *aafA*; sin embargo, no todas las EAEC presentan estas fimbrias. En el mecanismo de patogenicidad de EAEC están implicadas la bacteria y diversas moléculas que ella produce; también se sabe que las cepas EAEC tienen la capacidad de incrementar en la mucosa la producción y secreción de moco que atrapa a las bacterias que se autoaglutinan en una fina película en el epitelio intestinal. La producción de moco puede estar relacionada con la capacidad de EAEC para colonizar persistentemente el intestino y causar diarrea. En el plásmido de 60 MDa de EAEC también se encuentran los genes que codifican para la toxina EASTI. Eslava y colaboradores identificaron dos proteínas de alto peso molecular de cepas EAEC, aisladas de niños que murieron de diarrea persistente. Estas proteínas fueron probadas en asa ligada de rata observándose vellosidades cortas, hemorragia y necrosis. El gen para una de estas proteínas se encontró en un plásmido de 65 MDa y a la proteína se le dio el nombre de Pet (plasmid-encoded toxin) la cual tiene la capacidad de producir efecto citopático en células Hep-2, caracterizado por arredondamiento y desprendimiento de las

células así como contracción del citoesqueleto y pérdida de fibras de actina. En EAEC se ha descrito también la proteína Pic que está codificada en el genoma y que tiene actividad de proteasa. El sitio blanco de daño de EAEC puede ser la mucosa del intestino grueso y delgado, con un periodo de incubación de menos de ocho horas y puede durar hasta 18 o 20 días. Esta bacteria puede causar brotes o casos aislados de diarrea persistente (Rodríguez-Ángeles G., 2002)

2.8.5 *E. coli* Shiga-like toxin (STEC)

La toxina shiga es una enterotoxina (citotoxina) producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1, que causa una de las formas mas graves de la disentería bacilar (*shigelosis*). Las cepas enterohemorrágicas de *E. coli* (STEC) producen toxinas semejantes, llamadas SLT (*stx1*, *stx2*) *shiga-like* toxina.

Su organización estructural es igual a las toxinas coléricas (ct) y termolábil It de *E. coli*, su mecanismo de acción es distinto. Las subunidades B se unen a los gangliosidos Gb3 y Gb4 de las células de la mucosa intestinal (enterocitos), y la toxina penetra a través de varios procesos:

- 1) Fijación a receptores
- 2) Penetración de las subunidad activa
- 3) Endocitosis. Se ha documentado que la interacción de las STEC con el enterocito especialmente O157:H7 trae también como en el caso de EPEC esfacelamiento de las vellosidades intestinales. Además el efecto citotóxico de las STEC agrava la disentería, pero también es responsable de una complicación de la enfermedad, el llamado Síndrome Urémico Hemolítico

(Hemolytic Uremic Síndrome, HUS), que se presenta principalmente en niños. El HUS se caracteriza por una tríada constituida por anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda, este mecanismo es debido a la traslocación de la toxina a la sangre, donde producen daños vasculares y lesiones en los capilares del riñón puesto que existen receptores Gb3 en este endotelio que son la causa de la insuficiencia renal aguda que caracteriza esta complicación. STEC puede causar diarrea, colitis hemorrágica y HUS siendo el principal serotipo O157. Ha estado asociado a brotes en países industrializados y se ha observado que el principal vehículo de transmisión ocurre a través de alimentos contaminados, principalmente carne de bovinos y otros vegetales. Basado en los datos epidemiológicos se ha estimado que la dosis infectiva es de 100 a 200 microorganismos.

Los principales genes involucrados en la patogenia de STEC son:

- 1) *stx1, stx2* o ambos que resultan en la producción de las toxinas *Shiga-like*.
- 2) El *eae* que codifica para la intimina que participa en la unión estrecha entre el enterocito y la bacteria y el gen.
- 3) *hlyA* que codifica para una enteromolisina (Nataro JP, 1998)

2.9 Incidencia de *E. coli* en alimentos

Desde principios de la década de los 40s, se han ido describiendo cepas de este microorganismo con capacidad enteropatógena, al observar que cepas de *E. coli*

de determinados serotipos se asociaban a brotes epidémicos de enteritis grave en lactantes y población en general.

La transmisión de *E. coli* es más común por vía fecal-oral y el vehículo más frecuente de infección humana es la carne de bovino, fundamentalmente las hamburguesas poco cocidas.

También se ha documentado la infección asociada a consumo de carne de pavo, salami, leche, yogurt, mayonesa, ensalada, vegetales crudos y agua. Los brotes epidémicos son frecuentes (tabla 3). La transmisión de persona a persona también ha sido demostrada. *E. coli* O157:H7 es resistente a las temperaturas extremas y a los ácidos débiles. La dosis infectante mínima es baja; entre 10^3 y 10^2 bacterias (Griffin, 1991).

Tabla 3. Brotes de colitis hemorrágica y síndrome hemolítico-urémico más relevantes en los EEUU hasta 1994, causados por cepas de E. coli O157:H7

Localización geográfica	Año	Nº casos	Nº pacientes hospitalizados	Nº pacientes que desarrollaron HUS	Mortalidad	Emplazamiento	Fuente de infección
Oregón (EEUU)	1982	26	18	0	0	Comunidad	Hamburguesas
Michigan (EEUU)	1982	21	14	0	0	Comunidad	Hamburguesas
Nebraska (EEUU)	1984	34	13	1	4 (12%)	Residencia 3ª edad	Hamburguesas
Ontario (Canadá)	1985	73	--	12	19 (35%)	Residencia 3ª edad	Bocadillos de carne
Inglaterra	1985	24	11	--	1 (4.1%)	Comunidad	Manipulación vegetales
Washington (EEUU)	1986	37	17	3	2 (5%)	Restaurante	Hamburguesas
Birmingham (RU)	1987	26	6	1	0	Comunidad	Bocadillos de pavo
Cabool, Missouri.	1990	243	32	2	4 (1.6%)	Comunidad	Agua
Portland, Oregón. USA	1990	21	7	3	0	Parque recreativo	Baño en lago ¹
Massachussets. USA	1991	23	6	4	0	Comunidad	Sidra
Reino Unido	1991	16	13	5	--	Comunidad	Yogur
Maine (USA)	1992	4	--	1	1 (25%)	Comunidad	Vegetales mal lavados

Fuente: Carolina Frías. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma. Barcelona 1996

2.9.1 Identificación de *E. coli*

2.9.1.1 Reacción en cadena de la polimerasa

Esta técnica fue ideada en 1985 por Karry B. Mullis. El término “reacción en cadena de la polimerasa” (PCR) se aplica al proceso bioquímico in vitro, mediante el cual las cadenas individuales de ADN blanco son duplicadas por la ADN polimerasa en cada uno de los ciclos (generalmente entre 20 y 30) que integra la reacción, al final de cada uno de los cuales las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, lográndose una producción exponencial de millones de copias del gen o segmento de ADN específico sometido al proceso. Los componentes requeridos para la PCR son: ADN; iniciadores (oligonucleótidos) específicos que flanquean el gen o segmento que actúa como blanco para la amplificación; mezcla de desoxinucleotidos (dNTP’S); solución amortiguadora de reacción y ADN polimerasa (Barrera y col., 1998).

Cada uno de los ciclos de reacción consta de tres pasos determinados por temperaturas y tiempos específicos, que son:

- 1) Desnaturalización (92-98°C a 30 a 90 segundos), en el cual se separan o desnaturalizan las dos cadenas complementarias del ADN blanco.
- 2) Alineamiento (50-60°C, 30-90 segundos) en el que se realiza el apareamiento específico entre los iniciadores y las cadenas simples del segmento de ADN blanco desnaturalizado.
- 3) Extensión (70-74 °C, 30-90 segundos), en el que el ADN polimerasa extiende la longitud de los iniciadores apareados al ADN blanco, al ir polimerizando los desoxinucleótidos libres, resultado en nuevas cadenas

complementarias a las dos cadenas sencillas de ADN blanco presentes al inicio de la reacción.

El ciclo siguiente se inicia en el mismo tubo, con los mismos componentes de la mezcla de reacción, pero contiene ahora el doble de cadenas sencillas de ADN blanco que el anterior y finaliza convirtiendo estas en cadenas dobles.

Con la sucesión de ciclos se logra una síntesis exponencial (2^{17}) del segmento del segmento de ADN blanco, cuyo tamaño se define desde los primeros ciclos de la reacción. La longitud del segmento amplificado por la PCR es el resultado de la suma de la longitud de los iniciadores mas la distancia del ADN blanco flanqueado por éstos (Barrera, 1998).

2.9.1.2 Ventajas y aplicaciones de la PCR

Recientemente, se han desarrollado varios procedimientos alternativos para la tipificación y la identificación de bacterias. Uno de ellos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que consiste en la amplificación selectiva de una secuencia blanco flanqueada por secuencias cortas de polinucleótidos (usualmente de entre 10 y 30 nucleótidos) llamadas iniciadores o cebadores. El éxito en la implementación de la PCR para la identificación de microorganismos causantes de ETA's depende, entre otros factores, de la elección correcta de la secuencia blanco, la cual debe permitir la identificación del microorganismo de interés, independientemente de la presencia de otras fuentes de ADN procedente de microorganismos concomitantes o de la muestra misma. Las regiones

genómicas más comúnmente empleadas en el diseño de cebadores para la identificación de microorganismos patógenos son las relacionadas con los genes que codifican para toxinas y proteínas antigénicas específicas. En la detección y el diagnóstico de *E. coli*, por ejemplo, las secuencias blanco por excelencia han sido los genes que codifican para las dos variantes de la toxina *Shiga*, *stx1* y *stx2*, aunque también se han utilizado genes que codifican para proteínas de virulencia accesorias como el *eaeA* (Barrera y col. 2005).

Entre las nuevas ventajas que aporta esta nueva tecnología, destacan: rapidez, pues en sólo tres horas pueden detectarse la presencia de cualquier microorganismo buscado en la muestra; especificidad, pues unos cebadores bien elegidos hibridarán exclusivamente con la secuencia del ácido nucleico, la ampliarán y facilitarán su detección, y sensibilidad, ya que bastaría una sola molécula del ácido nucleico para obtener millones en apenas dos horas de amplificación. Estas tres propiedades hacen de la PCR una técnica rápida, fiable y segura para la detección de microorganismos.

Otras ventajas que cabe citar son las siguientes: no requiere ningún tipo de respuesta por parte del huésped; los microorganismos a detectar no tienen que estar multiplicándose, ni tan siquiera ser viables o infecciosos. Mediante esta técnica también se puede cuantificar el número inicial de microorganismos existentes en las muestras y a medida que se vaya mejorando, se llegara a la automatización de su realización y lectura. Todos estos puntos permiten predecir que la razón costo beneficio de la aplicación de esta tecnología al diagnóstico, por lo que podrá sustituir a muchas técnicas tradicionales.

Muchos microorganismos requieren para su identificación técnicas de larga duración, bien sea por su complejidad o por su lento crecimiento. Además, muchas veces estas técnicas no poseen suficiente capacidad discriminadora, por lo que la identificación final queda cuestionada. La amplificación del ADN, por su alta especificidad y rapidez, pueden resolver ambos problemas de forma definitiva (Palomares, 1992).

2.9.1.3 Aplicación de PCR en alimentos

Una aplicación importante de la reacción en cadena de la polimerasa es la rápida verificación, la cual ha sido de gran utilidad en la detección de salmonelosis en huevos y pollitos que se comercializan entre distintos países, dado que son materiales que requieren un diagnóstico rápido y preciso en las aduanas. Recientemente, se efectuó un estudio en el que se analizaron salsas y mariscos que se venden en la vía pública en la Ciudad de México. En estos alimentos se aisló *E. coli* genérica en numero considerables lo que indica contaminación fecal reciente; se identificaron además los grupos patógenos STEC y EPEC. Los resultados sugieren que este tipo de alimentos de la vía pública debe ser considerados como importantes vehículos de ETAs. En estudios realizados con anterioridad a alimentos vendidos en los alrededores de la Basílica de Guadalupe en la Ciudad de México tales como; salsas, frutas y tortillas, se encontró contaminación por *E. coli* genérica en un 67% del total de muestras analizadas, mientras que el resto de las muestras se determino la presencia de *E. coli*

enterotoxigenica, indicando la gran contaminación y el riesgo sobre el consumo de estos alimentos (López-Saucedo y col., 2003)

Los estudios anteriores nos muestran además la gran utilidad de la técnica de PCR pues en tan solo 24 horas brinda resultados y al hacerse como prueba múltiple, es decir que se puede utilizar más de un gen a identificar mediante la mezcla de varios genes, puede ser de gran utilidad en la identificación de varios patógenos en una sola reacción (López-Saucedo y col., 2003)

Debido a la expansión del comercio internacional es necesario fortalecer las medidas de control sanitario para de este modo evitar la diseminación de numerosos agentes infecciosos entre distintas regiones. Dentro del área de la microbiología de los alimentos, la técnica de PCR puede hacerse extensible a cualquier matriz de alimentos que se desee analizar, tales como muestras de leche y carne vacuna entre muchas otras (Velilla y col., 2004).

III. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos son un importante problema para la salud pública en el mundo. Se estima que tan solo en Estados Unidos las ETAS son responsables de aproximadamente 36 millones de casos, 325,000 hospitalizaciones y 5000 muertes al año. En México no existen estadísticas al respecto, por lo que es importante generar información sobre la identificación de microorganismos patógenos en alimentos, es base fundamental para la prevención y control de las enfermedades especialmente las gastrointestinales.

Existe una creciente demanda de hortalizas de alta calidad y productos vegetales minimamente procesados, hay una gran tendencia, ya se consideran más nutritivos, naturales, menos procesados y sin aditivos, también han ido creciendo aquellos sitios en los que se venden este tipo de productos, La FAO señala que los alimentos que se venden en la vía pública (callejeros) constituyen una fuente importante de alimentos nutritivos y de bajo costo, especialmente para los sectores pobres de la población urbana, pero no obstante quedan excluidos los establecimientos cerrados donde se satisfacen leyes sanitaria,, ya que existe diversas fuentes de contaminación que pueden llegar a producir brotes dependiendo de factores tales como el desarrollo y sobrevivencia de microorganismos patógenos o la manipulación del personal en la preparación de dichos alimentos, provocando errores aunque cuenten con un alto grado de higiene

La investigación de grupos microorganismos patógenos en verduras crudas es poca y en algunos casos nula. Por lo que es necesario utilizar novedosas técnicas como la PCR para la identificación rápida que permita prevenir y controlar enfermedades gastrointestinales principalmente.

En base en lo anterior, este trabajo se investigó la correlación de microorganismos indicadores de higiene y grupos patógenos de *E. coli* determinados por PCR en ensaladas de verduras crudas.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general:

Determinar la correlación entre la frecuencia de microorganismos indicadores y grupos patógenos de *E. coli* determinadas por PCR en ensaladas de verduras crudas listas para su consumo obtenidas de restaurantes.

4.2 Objetivos específicos

- 1) Determinar la frecuencia y concentración de coliformes termotolerantes y *Escherichia coli* en ensaladas de verduras crudas listas para su consumo.
- 2) Determinar la frecuencia y concentración de grupos patógenos de *E. coli* (ETEC, EIEC, EPEC, STEC, EAEC) por PCR en ensaladas de verduras crudas listas para su consumo

V. METODOLOGÍA

5.1 Equipo

Agitador vortex 2-genie Scientific Industries

Autoclave eléctrica SM 200 Yamato Scientific®

Balanza analítica PPC 2000 Metler®

Baño maria con circulación Riosa (0-120°C)

Cámara de electroforesis Sunrise

Campana de flujo laminar

Fuente de poder de 80 V, 400mA Bio-rad®

Incubadora bacteriológica Blue M®

Lámpara de luz UV ENF-240C, Spectroline®

Micropipetas de diferentes volúmenes Eppendorf®

Refrigerador Lab line4 Environees inc.

Stomacher 400 Circulator Seward®

Termociclador bio-Rad®

Tansiluminador Kodak®

5.2 Material de laboratorio

Asa bacteriológica, Bolsas de polietileno, Cajas petri, Espátulas, Gradillas, Matraces Erlenmeyer diferentes volúmenes, Mecheros, Puntas de diferentes volúmenes, Tubos de ensaye diferentes volúmenes, Tubos Eppendorf.

5.3 Medios de cultivo

Agar Soya Trypticaseína (AST) BD Bioxon®

Caldo Soya Trypticaseína (CST) Bioxon®

Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) Bioxon®

Agar Verde Brillante (AVB) Bioxon®

Agua Peptonada (AP) Bioxon®

Caldo Lactosado (CL) Bioxon®

Caldo Verde Brillante Fluorocult (CVL) Bioxon®

Agar Base Sangre (ABS) Bioxon®

5.4 Reactivos

Peptona de caseína

Reactivo Kovac

NaCl Sigma Chemical

Agua destilada

Agarosa Gibco

TAE 1X Gibco

Bromuro de Etidio

Marcadores de peso molecular Gibco

Oligonucleotidos (dTTP, dATP, dGTP y DCTP)

Taq polimerasa (Invitro gen®)

Buffer (Invitro gen®)

MgCl₂ (Invitro gen®)

Iniciadores (ial, It,eaea, Bfpa, stx1, stx2, st, aAt, aggR y aap) Gibco

5.5 Procedimientos

5.5.1 Recolección de las muestras

Las ensaladas fueron compradas en diferentes restaurantes de la ciudad de Pachuca, Hidalgo, con 3 niveles de higiene aparente a las cuales se les denominó: Alta (Ah), Media (Mh) y Baja (Bh). La clasificación de los restaurantes se dio en función del número de personas que trabajan en el área de preparación y de la capacitación que reciben sobre el manejo higiénico de los alimentos. Así se incluyó, en los de higiene aparente alta, a aquéllos que a simple vista cuentan con instalaciones que cumplen con todas las disposiciones que establece la legislación sanitaria (NOM-093-SSA1-1994) y que son publicitados en medios impresos o electrónicos para su difusión y que pertenecen a cadenas de restaurantes. En los restaurantes de higiene aparente media se incluyó a aquéllos que a simple vista cuentan con instalaciones que cumplen con todas las disposiciones que establece la legislación sanitaria, publicitados en medios impresos o electrónicos y que no pertenecen a cadenas de restaurantes. Finalmente, en los de higiene aparente baja, fondas y cocinas de mercados públicos: estos establecimientos a simple vista no cumplen con todas las disposiciones que establece la legislación sanitaria, no son publicitados en medios impresos o electrónicos.

En el estudio se incluyeron 2 restaurantes de higiene aparente alta: (HA A₁ y HA A₂); 1 de higiene aparente Media: (HA M) y de baja se incluyeron 3 fondas y 2 locales de mercados públicos.

La recolección de las muestras se realizó en un periodo de 9 meses (Enero-septiembre). En general, las ensaladas estuvieron compuestas por diferentes verduras crudas. En la tabla 4 se describe la composición de cada tipo de

ensalada analizada por tipo de restaurante. Las ensaladas fueron compradas en todos los restaurantes y fueron transportadas (en el empaque de venta) bajo condiciones asépticas y en refrigeración según lo establecido por la NOM-109-SSA1-1994. Las ensaladas se analizaron dentro de las 2 primeras horas después de su compra. La cuantificación de organismos coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli* se realizó de acuerdo a los manuales especializados de la Administración de medicamentos y alimentos de los Estados Unidos de América (FDA/JFSAN, por sus siglas en Inglés), 2001; y de acuerdo con los protocolos de la legislación mexicana vigente (NOM-092-SSA1-1994; NOM-110-SSA1-1994; NOM-112-SSA1-1994 y NOM-113-SSA1-1994).

5.5.2 Análisis microbiológico

5.5.2.1 Preparación de las muestras

De cada muestra individual se analizó toda la porción de ensalada tal cual se compró en los sitios de venta. El peso de las ensaladas fue de 80, 120, 150 ó 170 g. Las muestras fueron divididas en dos porciones y cada porción se colocó en una bolsa de plástico estéril; según el peso de la ensalada contenida en cada bolsa, se le agregó caldo lactosado (CL) en una proporción 1:10 (dilución decimal), por ejemplo: 40 g de ensalada y 360 mL de CL. Las muestras se dividieron para facilitar su manejo y manipulación. Las bolsas se homogeneizaron por 2 minutos empleando un Stomacher® a una velocidad de 260 rpm. Finalmente, después de la homogeneización se mezclaron en una sola bolsa las porciones originales (por ejemplo: 40g + 40g de ensalada más 360 mL + 360 mL de CL = 80g de ensalada

en 720 mL de CL). Esta mezcla inicial se consideró como la dilución 10^{-1} tal como se establece en los protocolos correspondientes de análisis microbiológico.

Tabla 4. Características de las ensaladas y de los sitios de recolección

Nivel de higiene	Restaurante	Ensalada/No de muestras	Composición
Alta	A1	Espinacas/20	Espinacas, jitomate y champiñones
		mixta/20	Aguacate, cebolla, espinaca, jitomate, lechuga, pepino y zanahoria
	A2	Espinacas/20	Espinacas, jitomate y champiñones
		Lechuga/20	Lechuga orejona
Media	B	Espinacas/30	Espinacas, jitomate y champiñones
		Mixta/30	Aguacate, cebolla, espinaca, jitomate, lechuga, pepino y zanahoria
	Fondas (3)	Mixta/10	Aguacate, berros, germen de trigo, jitomate, lechuga, pepino, rábano y zanahoria
Baja	Mercado 1	Mixta/10	Aguacate, cebolla, germen de trigo, jitomate, lechuga, pepino, rábano y zanahoria
	Mercado 2	Mixta/10	Aguacate, cebolla, germen de trigo, jitomate, lechuga, pepino, rábano y zanahoria

5.5.2.2 Recuento de organismos coliformes

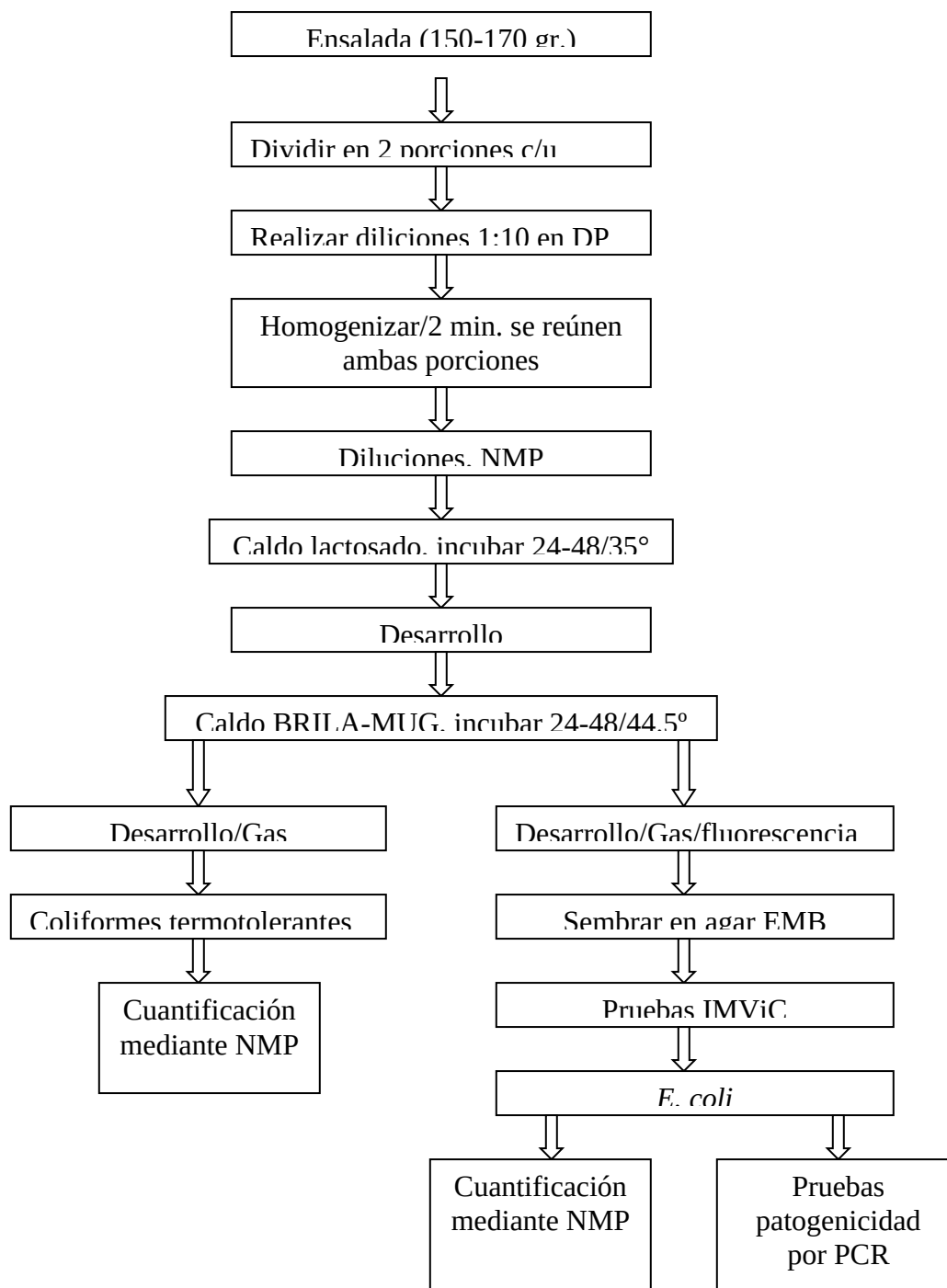
La cuantificación de organismos coliformes, se realizó con base en lo descrito por la técnica de FDA/JFSAN y la de la norma oficial mexicana: NOM-113-SSA1-1994. A partir de la muestra homogenizada se realizaron diluciones decimales y se inocularon cajas vacías a las que se les adicionó posteriormente agar de bilis y rojo violeta (ABRV). Las cajas se incubaron a 35°C durante 24 h y se contaron las colonias rojo oscuras con un diámetro mayor de 0.5 mm con o sin halo de precipitación de sales biliares. El cálculo de la concentración de organismos coliformes en las muestras analizadas se realizó de acuerdo a como se describe en las técnicas señaladas en los manuales correspondientes. La concentración obtenida se expresó como unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (UFC/g).

5.5.2.3 Recuento de coliformes termotolerantes (Ct)

A partir de las muestras de ensaladas de verduras homogenizadas en Stomacher, se prepararon diluciones decimales en tubos con 9 mL de caldo lactosado (CL) con campana de Durham. La incubación se realizó a 35°C / 24 - 48 h. Los tubos en los que se observó la presencia de gas en la campana Durham se tomaron como presuntivos. Estos tubos se resembraron en caldo lactosado bilis verde brillante fluorocult (CLF) con campana Durham y se incubaron a 44.5°C durante 24 a 48 h, se consideraron positivos a Ct aquellos tubos en los que se observó la producción de gas. El cálculo de los Ct por gramo de muestra se realizó de acuerdo a como se describe en las técnicas señaladas en los manuales

correspondientes. El valor obtenido se expresó como NMP/g de Ct presentes en ensaladas de verduras.

Figura 1. Cuantificación de coliformes termotolerantes, *E. coli* y grupos patógenos de *E. coli*



5.5.2.4 Cuantificación de *Escherichia coli*

Para la investigación y cuantificación de *E. coli*, se emplearon los tubos que resultaron positivos a CF y se realizaron dos pruebas más del comportamiento metabólico de *E. coli*: producción de fluorescencia en caldo lactosado fluorocult y producción de indol (FDA/JFSAN, 2001; Castro-Rosas y Escartín, 1999). El cálculo de *E. coli* por gramo de muestra, se realiza de igual manera que para los coliformes fecales. El valor obtenido se expresó como NMP/g de *E. coli* presente en las ensaladas de verduras. Todos los tubos positivos a *E. coli* por esta técnica fueron confirmados mediante siembra en agar Eosina y Azul de Metileno y las pruebas del IMViC (FDA/JFSAN, 1998). Todas las cepas de *E. coli* aisladas se resembraron en agar base sangre en tubo inclinado y se almacenaron en refrigeración para los estudios de patogenicidad.

5.5.2.5 Identificación de *E. coli* patógena

Para la identificación de *E. coli* patógena se utilizaron 321 cepas positivas de *E. coli* genérica aisladas con anterioridad, para dicho estudio se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En estos estudios se incluyeron también cepas lactosa negativas aisladas a partir colonias que desarrollaron en agar Eosina azul de metileno (EMB). Para la extracción del ADN se tomaron al menos tres colonias (de la cepa de interés) que habían desarrollado en agar EMB; por separado, cada colonia se resuspendió en 1 mL de agua desionizada contenida en tubos tipo eppendorf y se agitó vigorosamente con un vortex por 10 s. Los tubos se colocaron en un baño de agua y se calentó hasta ebullición durante un minuto para eliminar las DNAsas presentes. Finalmente, los tubos se llevaron a

temperatura ambiente y se mantuvieron en congelación hasta su uso. Para efectuar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se emplearon “iniciadores” comerciales (invitrogen®), éstos son porciones de oligonucleótidos con secuencia específicas correspondientes a los genes de virulencia para cada grupo patógenos de *E. coli*. En total se emplearon 20 iniciadores con las secuencias descritas en el anexo 7. Todos los cálculos y concentraciones finales de los reactivos para las mezclas de reacción del PCR se encuentran detallados en el Anexo 8.

La amplificación de estas secuencias se realizó con ayuda de un termociclador (Cycler, Biorad, Hércules, CA, USA). Para cada cepa problema se realizó un PCR múltiple es decir, en un solo tubo se mezclaron los 14 iniciadores para *E. coli* diarrogénicas (EPEC, EIEC, ETEC, EAEC y STEC), de igual manera un PCR convencional o simple para cada cepa problema para la identificación de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) mediante la utilización de 6 iniciadores para dicho grupo patógeno (ver anexo 7) con 2 µl del ADN problema, los DNTps correspondientes, agua desionizada, búfer, MgCl₂, la Taq polimerasa para llevar acabo dicha reacción (ver anexo 9). Para cada grupo patógeno se utilizó una concentración diferente de los reactivos anteriores ya que las proporciones de cada reactivo dependen del tipo de gen a identificar. Las concentraciones específicas para cada gen se describen en el anexo 8. Cabe mencionar la utilización de un control negativo en el cual solo se utilizó la mezcla de reacción sin ADN problema para descartar contaminación de reactivos y un control positivo que consiste en la mezcla de ADN de cepas positivas de cada grupo patógeno, el cual se utilizó para confirmar y comparar la amplificación de ADN problema.

Para la amplificación se utilizaron las siguientes condiciones (ciclos de calentamiento-enfriamiento y tiempo) en el Termociclador según los grupos patógenos a identificar:

a) *E. coli* diarrogénica se utilizó PCR múltiple; 50°C (2 minutos, 1 ciclo), 95°C (5 minutos, 1 ciclo), 95°C, 50°C y 72°C (45 segundos cada temperatura, 40 ciclos) y un paso de extensión final de 10 min. a 72°C.

b) *E. coli* enteroagregativa se utilizó PCR simple; 50°C (2 minutos, 1 ciclo), 95°C (5 minutos, 1 ciclo), 95°C, 55°C y 72°C (45 segundos cada temperatura, 40 ciclos) y un paso de extensión final de 10 min. a 72°C

El producto de PCR, se colocó en un gel de agarosa al 2%; en regulador TAE 1X y se corrió en una cámara para electroforesis a 80 volts, 400 amperes por una hora y se revela con bromuro de etidio. La identificación se realizó con la ayuda de un Tansiluminador Kodak® que emite luz UV resaltando la amplificación de las bandas las cuales se comparan con el control positivo y un marcador de peso molecular de acuerdo al peso molecular de cada gen amplificado (ver figura 3 y 4)

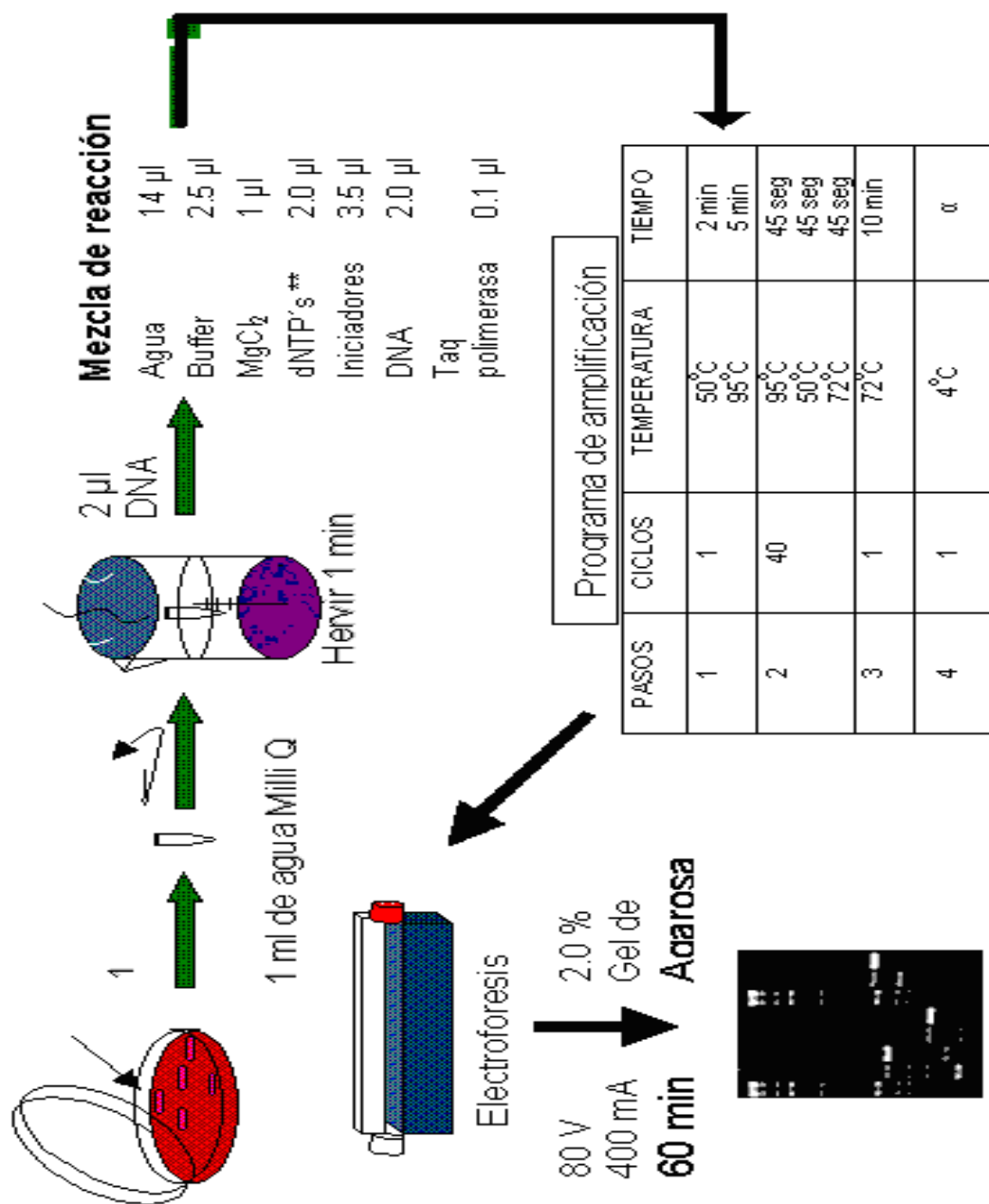


Figura 2. Esquema general para identificación de patogenicidad de *E. coli*

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante la preparación de ensaladas de verduras crudas, estas suelen someterse a pelado, rebanado, picado y/o troceado; estas maniobras pueden favorecer la contaminación con microorganismos patógenos. Debido a que las ensaladas de verduras crudas son consumidas sin un tratamiento térmico adicional, es de gran importancia que las verduras sean sometidas a un proceso efectivo de desinfección para minimizar los peligros microbianos que pudieran estar presentes. Los desinfectantes pueden ser aplicados para reducir el número de microorganismos en los alimentos siempre y cuando por si solos no representen un peligro químico en el producto terminado. Como se ha mencionado, los grupo patógenos de *E. coli* son un problema importante de salud publica (Fernández, 1981). Para prevenir de manera eficaz las enfermedades que estos grupos patógenos provocan por el consumo de alimentos, es necesario, entre otras cosas, conocer su frecuencia en los alimentos involucrados.

Se analizaron un total de 130 ensaladas de verduras crudas listas para su consumo, las cuales se obtuvieron de los 3 tipos de establecimientos. Los valores específicos de Ct, y *E. coli* patógena y no patógena de cada ensalada proveniente de los diferentes restaurantes reencuentran descritos en los anexos 1-5.

En general, todas las ensaladas mostraron niveles elevados de Ct la menor frecuencia fue de 90% y correspondió al restaurante A1 (Tabla 5). Los límites de Ct de todos los restaurantes estuvo entre <3 a 1100. El restaurante A2 presentó los mayores niveles de Ct; y la menor mediana de este grupo microbiano se

observó en el restaurante C2. Cabe recordar que la mediana es un parámetro matemático definido como el valor de la variable que deja el mismo número de datos antes y después de él. De acuerdo con esta definición el conjunto de datos menores o iguales que la mediana representarán el 50% de los datos, y los que sean mayores que la mediana representarán el otro 50% del total de datos de la muestra. En otras palabras, refiriéndonos a nuestros resultados para el restaurante A1, por ejemplo, más de la mitad de ensaladas de este restaurante tenían niveles de Ct superiores de 640 NMP/g.

De los restaurantes tipo A1 y A2 se analizaron 50 muestras en su mayoría de espinacas y mixtas; éstas presentaron niveles altos de Ct A1 con frecuencia de 90%, mientras para A2 con un frecuencia de 100% y en ambos casos hasta 1100 NMP/g (Tabla 5). *E. coli* también se aisló de las ensaladas provenientes de los dos tipos de restaurantes A (Tabla 5). Y en las del A2 incluso se aislaron grupos patógenos de *E. coli* con una relativa alta frecuencia (Tabla 5).

De los establecimientos denominados B1 y B2 con nivel de higiene aparentemente media, se analizaron también 50 muestras de ensaladas. En todas las ensaladas de ambos tipos de restaurantes se detectaron Ct (Tabla 5); el restaurante B2 presentó una mediana de Ct más baja incluso que la encontrada en los restaurantes A. *E. coli* se aisló con una frecuencia de 80% en ambos restaurantes B. En ninguna de las muestras de ensaladas de estos restaurantes se aisló *E. coli* patógena.

Tabla 5. Mínimos, medianas, máximos y frecuencia de coliformes termotolerantes y *E. coli* no patógena y patógena en ensaladas de verduras crudas de restaurantes con nivel aparente de higiene Alta (A), Media (M) y Baja (B).

Tipo de restaurante	Microorganismo o grupo microbiano	Mínimo	Mediana	Máximo	Frecuencia (%)
A1	Ct (a)	< 3	477	< 3	90
	<i>E. coli</i> (a)	< 3	25	210	75
	<i>E. coli</i> -P (a) ¹	< 3	< 3	< 3	0
A2	Ct	75	707	>1100	100
	<i>E. coli</i>	< 3	87	>1100	100
	<i>E. coli</i> -P	< 3	3.5	75	10
B1	Ct	38	677	>1100	100
	<i>E. coli</i>	< 3	70	>1100	80
	<i>E. coli</i> -P	< 3	< 3	< 3	0
B2	Ct	43	620	>1100	100
	<i>E. coli</i>	< 3	30	290	80
	<i>E. coli</i> -P	< 3	< 3	< 3	0
C1	Ct	43	564	>1100	100
	<i>E. coli</i>	< 3	114	>1100	75
	<i>E. coli</i> -P (b)	< 3	< 3	75	24
C2	Ct	3.6	383	>1100	100
	<i>E. coli</i>	< 3	51	< 3	90
	<i>E. coli</i> -P (b)	460	>1100	< 3	8

(a) NMP/g

¹ *E. coli* patógena.

Cabe recordar que como se mencionó en la metodología, para la identificación de los grupos patógenos de *E. coli* empleamos las cepas de *E. coli* genéricas que provenían de las muestras de ensaladas y que se habían identificado y cuantificado mediante la metodología convencional; ésta metodología incluye la cuantificación mediante la técnica del numero más probable (NMP). Debido a esto fue posible no solo conocer cuales ensaladas fueron positivas a los grupos patógenos, si no también determinar la concentración de los grupos patógenos por

gramo de ensalada. En párrafos más adelante se mostrarán cuales fueron los grupos patógenos encontrados, su concentración calculada por gramo de ensalada y se discutirán estos hallazgos; para facilitar la discusión de resultados en ésta sección sólo se discutirán como grupos patógenos de *E. coli* si especificar a cual corresponde (Tabla 5).

Para el caso de los restaurantes denominados C, se analizaron sólo 30 muestras. Al igual que el caso anterior, en todas las ensaladas se encontró Ct, sin embargo, contrario a lo que se esperaba, en la mayoría de las ensaladas se observó un valor de mediana baja de Ct, más baja incluso que la registrada en las ensaladas de los restaurantes A y B (Tabla 5). Además, a diferencia de lo observado en los restaurantes B o en el A2, en los restaurantes C hubo ensaladas en las que no se encontró *E. coli*. No obstante, se encontraron grupos patógenos de *E. coli* en las ensaladas de los dos establecimiento.

La frecuencia y nivel de los microorganismos encontrados en las ensaladas provenientes de los dos establecimientos que clasificamos al inicio dentro de un nivel de aparente higiene alta (A) y media (B), muestran que el nivel real de higiene de estas ensaladas es bajo.

Según la normativa de nuestro país (NOM-093-SSA1-1994) las ensaladas verdes o crudas no deben exceder de 100 UFC/g de coliformes fecales (coliformes termotolerantes) y aunque no se especifica en la norma, las ensaladas no deben contener bacterias patógenas. Basándonos en ésta norma el 90.3 % (116 de 130 muestras) de todas las ensaladas estuvieron por arriba del límite establecido.

Cabe señalar que la NOM-093-SSA1-1994 no incluye como grupo indicador de higiene de ensaladas de verduras crudas a *E. coli*, no obstante, desde nuestro punto de vista se debería de incluir en la norma ya que éste microorganismos es el indicador más confiable de contaminación fecal en los alimentos. Para el caso de las verduras que analizamos, si además de los Ct y los patógenos consideramos que *E. coli* no debería de existir en la ensaladas que analizamos, el porcentaje de ensaladas rechazadas sería de 96.2 %.

En otros países como por ejemplo EEUU o Francia, por el contrario, su la normativa sí incluye a *E. coli* como indicador del grado de higiene o peligrosidad de las verduras crudas y ensaladas de verduras crudas listas para el consumo; en la mayoría de tales normas no se acepta la presencia de *E. coli* (CRUSCPS SF, 2005).

Diferentes investigadores ha señalado la conveniencia de usar *E. coli* como indicador de higiene en verduras crudas en lugar de los coliformes fecales ó Ct (Doyle y Erickson, 2006). Es sabido que números considerables de *E. coli* en alimentos sugiere en general carencia de higiene y de manipulación inadecuada así como de una mal almacenamiento. La detección de *E. coli* en los alimentos es esencial por que su presencia se asocia ordinariamente con una contaminación fecal; su hallazgo, implica la posibilidad de que un patógeno pueda estar presente (Fernández, 1981). En una gran variedad de alimentos, se ha encontrado una buena correlación de la presencia de *E. coli* con la de bacterias enteropatógenas (Fernández, 1981).

Sin embargo, los resultados que hemos encontrado, contrastan con los reportados por otros investigadores; por ejemplo Sagoo y col. (2003a, 2003b), en dos

estudios realizados en Londres, Inglaterra en el 2003, encontraron que el 99.3 y el 97% de las ensaladas de verduras crudas que analizaron presentaban una calidad higiénica aceptable; los investigadores señalaron que las ensaladas estudiadas fueron producidas bajo rigurosas prácticas agrícolas, de higiene, cosecha y distribución. En otro estudio realizado en Japón se detectó muy baja contaminación bacteriana en vegetales crudos mínimamente procesados listos para consumo; sólo en 3 de 238 muestras se encontraron coliformes termotolerantes (Kaneko y col., 1999).

No obstante, también se han encontrado niveles elevados de microorganismos indicadores e incluso bacterias patógenas en ensaladas de verduras crudas. Monge y col. (1993), y Copes (2002), encontraron niveles elevados de Ct en ensaladas de verduras crudas con una frecuencia de 88% y 96%, en productos provenientes de Argentina y Costa Rica, respectivamente. También, Pingulkar y col. (2001), encontraron niveles importantes de Ct en ensalada de verduras crudas con límites de 11 a 460 NMP/g, en ensaladas de la India. En un estudio realizado en Japón en 1999, se aislaron OC hasta en un 50% en verduras sin manipulación y en un 67% a partir de ensaladas de verduras crudas listas para consumo; en éste estudio *E. coli* solamente se detectó en las ensaladas. Estos valores demuestran una contaminación más abundante en los alimentos que son extensamente manipulados como es el caso de las ensaladas (Kaneko y col., 1999). Copes (2002), observó que el 64% de las ensaladas de verduras frescas compradas en mercados de Argentina contenía *E. coli*. En un estudio realizado por Thompson y col. (2000), en ensaladas que se venden en vía pública en la ciudad

de México, encontraron *E. coli* en ensaladas de lechuga (8.2×10^4 UFC/g), rábano (4.8×10^5) y col (2.6×10^5).

En nuestro caso, los niveles tan altos de Ct que encontramos en las ensaladas pueden ser el resultado de tres eventos: a) abundante exposición a las fuentes de contaminación durante la cosecha, recolección, transporte, procesamiento y comercialización sin posterior desarrollo; a) empleo de verduras que no fueron sometidas a lavado y desinfección o inadecuado procedimiento de desinfección; ó c) una baja contaminación o baja sobrevivencia después del tratamiento de desinfección y en función de riqueza en nutrientes de la ensalada, alta humedad y temperatura ambiente, se favoreció la multiplicación de los microorganismos. Este desarrollo puede ser tan activo que en poco tiempo alcanzó su concentración máxima en el alimento. La segunda opción parecería la más viable; no obstante, debido a las deficientes condiciones de higiene que con frecuencia se aplican durante la producción, preparación y comercialización de las ensaladas, es posible la ocurrencia de ambas. Cualquiera que haya sido el caso, el alto número de Ct que se detectó en las ensaladas es posible relacionarlo directamente con malas prácticas higiénicas durante la preparación de dichos alimentos.

Es importante destacar la elevada frecuencia con la que se encontró *E. coli* en las ensaladas de los restaurantes clasificados como A; en A1 75 % y en A2 100%. Estos resultados son preocupantes ya que nos sugiere alta probabilidad de la presencia de microorganismos enteropatógenos. Una situación semejante podemos argumentar para los demás restaurantes.

De hecho el análisis estadístico de los datos mostró que no existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$) en el nivel de microorganismos indicadores

entre las ensaladas independientemente del sitio de compra (Tabla 6). Se observó diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia y concentración de *E. coli* en la ensaladas del restaurante A1 con respecto al A2 y a las del C2. Es decir, la diferencia muestra que el restaurante A2 y C2 contiene mayor cantidad de *E. coli* que el restaurante A1. Sin embargo, a pesar de esta diferencia en el nivel de *E. coli*, no se presentó diferencia estadísticamente significativa entre los tres restaurantes con respecto a la frecuencia y concentración de coliformes termotolerantes. Estos últimos resultados son importante ya que si nos basamos en la Norma Oficial Mexicana, NOM-093-SSA1-1994 (que no toma en cuenta a *E. coli* pero si a los coliformes termotolerantes), para evaluar el grado de higiene y/o el riesgo de las ensaladas, podemos señalar que los resultados del análisis estadístico muestran que el nivel de higiene o riesgo de las ensaladas es el mismo. En otras palabras, podemos afirmar que en función de los niveles de Ct y *E. coli* encontrados, el grado de higiene en las ensaladas de verduras entre los restaurantes es el mismo; las diferencias entre las ensaladas, por tanto, solo serían el lugar de origen y el costo.

Tabla 6. Diferencia estadística en el nivel de microorganismos indicadores entre los distintos restaurantes

Tipos de restaurantes	Coliformes Termotolerantes (Ct)	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> patógena
A1 vs A2	0.726*	0.005	0.005
A1 vs B1	0.132	0.260	1.000
A1 vs B2	0.294	0.433	0.307
A1 vs C1	0.775	0.069	0.319
A1 vs C2	0.379	0.002	0.022
A2 vs B1	0.809	0.086	0.153
A2 vs B2	0.457	0.011	0.153
A2 vs C1	0.272	0.584	0.307
A2 vs C2	0.023	0.430	0.319
B1 vs B2	0.680	0.452	1.000
B1 vs C1	0.343	0.416	0.022
B1 vs C2	0.037	0.030	0.022
B2 vs C1	0.603	0.188	0.022
B2 vs C2	0.099	0.002	0.022
C1 vs C2	0.364	0.278	0.976

* p-value

Muchos consumidores prefieren comprar los alimentos en sitios bien establecidos ya que los perciben como sitios que venden alimentos seguros y de bajo riesgo microbiológico; mayor confianza existe si los sitios son restaurantes de renombre nacional o internacional como son los de las cadenas de restaurantes. A diferencia de lo anterior, los alimentos que se venden en mercados o en la vía pública, son considerados de baja calidad higiénica y de alto riesgo de enfermedad. No obstante, los resultados de nuestro estudio muestran que al menos para las ensaladas de verduras crudas esta percepción no aplicó, ya que el nivel de riesgo

de enfermedad estadísticamente fue el mismo independientemente del restaurante donde se compraron las ensaladas (Tabla 2).

En estudios semejante al reportado en esta tesis fue realizado recientemente por Noguera (2005), en ese estudios también se obtuvieron ensaladas de los mismos establecimientos; se determinó la concentración de organismos coliformes, *Ct*, *E. coli* no patógena y *Salmonella* en ensaladas. La frecuencia y concentración de *Ct* y *E. coli* que se reporta en tal investigación fue semejante a la que nosotros encontramos en este segundo estudio. Estas evidencias son preocupantes ya que muestran que los restaurantes, al menos en el periodo del segundo estudio, continuaron con malas prácticas de higiene y lo más importantes, que el riesgo de enfermedad es latente.

Como se indicó en antecedentes de esta tesis, aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* que naturalmente se encuentran diseminadas en los animales y el medio ambiente son no patógenas, existen algunas cepas que causan enfermedad, tal es el caso de *E. coli* O157:H7 cuya dosis mínima infectante es muy baja (10-100 células). En nuestro estudio, encontramos también la presencia de *E. coli* patógena en la ensaladas de verduras crudas con una elevada frecuencia en restaurante C1 (Tabla 5); hasta cierto punto, la presencia de los patógenos en las ensaladas provenientes de las fondas o mercados públicos no es de extrañar, ya que es sabido que en estos sitios la probabilidad de contaminación de los alimentos es mayor que en restaurantes bien establecidos. Sin embargo *E. coli* patógena también fue aislada a partir de las ensaladas del restaurante A2 (Tabla 5).

La investigación de los grupos patógenos de *E. coli* en las ensaladas, se realizó utilizando iniciadores específicos para determinar la presencia de *E. coli* Diarrogénicas y/o Enteroagregativas (Cerna y col., 2000). Es importante señalar que se realizaron dos ensayos de PCR separados con todas las cepas: uno para la búsqueda de las *E. coli* Diarrogénicas (enterotoxigenica, enteropatogena, enteroinvasiva, enteroadherente y enterohemorrágica) y el otro para la búsqueda de la *E. coli* enteroagregativa. Para el primer caso se empleó un PCR múltiple es decir en una misma reacción de PCR se mezclaron todos los iniciadores para la búsqueda de las diarrogénicas (Cerna y col., 2000), y para el segundo, un PCR sencillo en el que únicamente se emplearon los iniciadores para las enteroagregativas. La técnica del PCR involucra electroforesis en gel y revelación de las bandas mediante luz ultra violeta; al compararlas las bandas generadas con un control o marcados de peso molecular, es posible identificar el grupo al cual pertenecen las *E. coli* bajo estudio (Figura 3).



Figura 3. Productos de PCR múltiple de *E. coli* patógenas. Carril 1 tamaño de los siete productos PCR de cada gen en pares de bases, obtenido al usar una mezcla de ADN de las cuatro cepas de referencia y los iniciadores a mezclar. PCR los productos obtenidos mediante el uso de ADN de cepas de *E. coli* enterotoxigénicas, productoras de toxinas Shiga, enteropatógena, e enteroinvasivas, (carriles 2-5, respectivamente). Carril 6–15: productos obtenidos de ADN de ensaladas de verduras crudas y los iniciadores mezclar. Carril 16: 1 kb marcador de peso molecular en pares de bases.

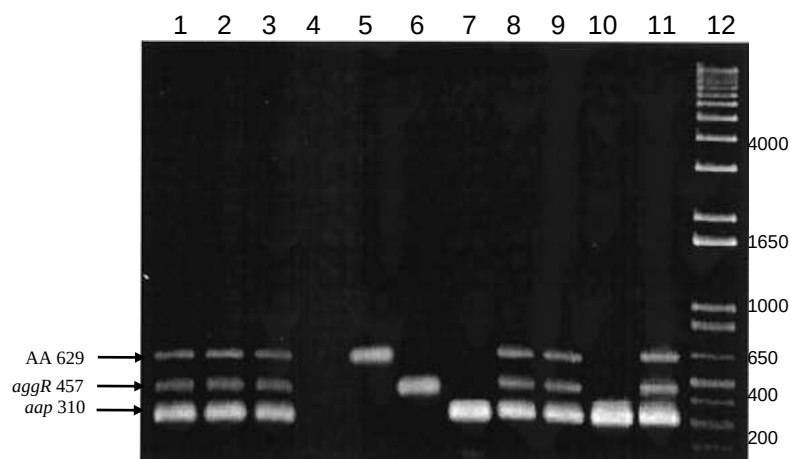


Figura 4. Producto de PCR de *E. coli* enteroagregativas, carril 1-3, producto de PCR obtenido con DNA de cepas de referencia (control positivo) respectivamente para cada gen en pares de bases, carril 4 control negativo, carril 5-7 genes obtenidos de acuerdo a cada iniciador AA, *aggR* y *aap* para cada gen respectivamente, carril 8-11 DNA obtenido de verduras crudas, carril 12 marcador de peso molecular (1-kb).

Al inicio de la investigación de *E. coli* patógena realizamos una corrida de 40 cepas positivas a *E. coli* genérica en las cuales no se logró amplificar ninguna banda que nos sugiriera la presencia de *E. coli* patógena; incluso no se logró la amplificación de los controles positivos. Esto nos hizo sospechar de los reactivos y de las enzimas; después de revisar y analizar cada uno de los reactivos nos percatamos que la enzima Taq polimerasa era la que no funcionaba. Con esta experiencia previa antes de continuar realizamos la estandarización de la técnica para descartar falsos positivos o negativos durante el corrimiento de las muestras y posibles contaminaciones.

Una vez estandarizada la técnica, se analizaron por PCR 321 cepas de *E. coli* genérica aisladas de las ensaladas de verduras crudas; de éstas se identificó a tres grupos patógenos (Tabla 7). Es importante señalar que en la Tabla 7 el tipo de *E. coli* nombrado como “*E. coli* productora de toxina *Shiga*” (STEC, por sus siglas en ingles) corresponde a una variante de la *E. coli* enterohemorrágica (EHEC, por sus siglas en ingles), de hecho la EHEC es una STEC. La diferencia que existe entre estos dos tipos es el antígeno O somático: cuando la STEC es del tipo O157 comúnmente se emplea el nombre EHEC para designarla; cuando no son del tipo O157 únicamente se refiere a estas cepas como STEC ó también como STEC no O157 (Hussein y Sakuma, 2005). Es importante denotar también, que una vez que se ha identificado a una cepa STEC mediante PCR (u otro método molecular), debe realizarse serología para determinar si estas cepas no son del tipo O157. En nuestro caso, la reacción serológica al antígeno O157 fue negativa en todas las cepas STEC que aislamos de las ensaladas de verduras.

Tabla 7 Concentración y tipo de *E. coli* patógena detectada en las ensaladas según tipo de restaurante

Nivel de Higiene	No. de Muestra	ETEC	STEC	EIEC
A2	23	11a	-	-
A2	24	.*	75	-
C1	12	-	3.6	3.6
C1	13	-	3.6	3.6
C1	14	-	3.6	-
C1	15	-	75	-
C2	16	-	-	3.6
C2	17	-	-	43

* Negativo

^a Numero más probable / g

Como se mencionó (párrafos a arriba), para la identificación de los grupos patógenos empleamos las cepas de *E. coli* genéricas que se habían identificado y cuantificado mediante la metodología convencional; ésta incluye la cuantificación mediante la técnica del numero más probable (NMP). Debido a esto fue posible no solo conocer cuales ensaladas fueron positivas a los grupos patógenos, si no también determinar la concentración de los grupos patógenos por gramo de ensalada (Tabla 7). Así, *E. coli* enterotoxigénica se aisló sólo en una ensalada del restaurante A2 en una concentración de 11 NMP/g, la enteroinvasiva en cuatro ensaladas provenientes de los restaurantes C, y la STEC a partir de 5 ensaladas de los restaurantes A2 y C con un nivel máximo de 75 NMP/g (Tabla 7). Es

interesante observar que en dos ensaladas del restaurante C1 se aisló simultáneamente dos grupos patógenos de una misma ensalada.

La presencia de STEC en las ensaladas sugiere contaminación de origen de alguno de los vegetales seguido de una inadecuada desinfección. Es sabido que los principales reservorios de STEC son los rumiantes (Hussein y Sakuma, 2005) por lo que es más probable que la contaminación haya ocurrido en el campo. A diferencia, ETEC y EIEC tienen como principal reservorio al humano (De Las Casas y col, 1999). En consecuencia su presencia en las ensaladas sugiere contaminación por los manipuladores de alimentos o bien contaminación humana de las verduras previas a su llegada a los sitios de preparación con una posterior deficiencia o nula desinfección. No obstante, la presencia simultanea de STEC y EIEC en dos ensaladas sugiere más bien contaminación de origen al menos de alguna de las verduras con las que se prepararon tales ensaladas.

Según los datos del NMP/g de cada grupo patógeno de *E. coli* que identificamos para cada ensalada que resulto contaminada, la concentración de cada grupo por porción de ensalada (290 g en promedio) fue de: ETEC 3.2×10^3 , EIEC 1×10^3 y 1.3×10^4 y STEC 1×10^3 y 1.3×10^4 . Aunque en general la dosis mínima infectante que se estima para estos tres grupos patógenos es alta (10^6 - 10^8 células), a la concentración en la que encontramos a los tres patógenos en las ensaladas, deben considerarse como un peligro para el consumidor; un inadecuado almacenamiento de las ensaladas de verduras, podría favorecer el desarrollo de estos patógenos incrementando su número hasta niveles iguales o superiores a la dosis mínima infectante. De hecho varios estudios realizados recientemente

muestran el potencial que tiene estos grupos patógenos para multiplicarse en las verduras crudas (Rojas, 2005; Moreno, 2006; Ramírez, 2006; De la Rosa, 2007).

Por otro lado, es muy importante señalar que el análisis estadístico de todos los datos mostró que **no existió correlación** entre la presencia y concentración de Ct con la presencia y concentración *E. coli* patógena. A diferencia, **sí se observó una excelente correlación** entre la presencia de *E. coli* genérica con la presencia y concentración de *E. coli* patógena (Tabla 8). Estos datos muestran que los Ct no son indicadores de la posible presencia de *E. coli* patógena; a diferencia, *E. coli* genérica sí lo es.

Tabla 8. Correlaciones entre los grupos microbianos obtenidas mediante la ecuación no paramétrica de Spearman Rank Order

Pares de Variables	Valid N	Spearman R	t(N-2)	p-level*
Ct & <i>E. coli</i>	130	0.417698	5.201181	0.000001
Ct & <i>E. coli</i> patógena	130	-0.069831	-0.791984	0.429835
<i>E. coli</i> & <i>E. coli</i> patógena	130	0.313599	3.736457	0.000280

p < 0.01

Este hallazgo es de importancia relevante ya que, como mencionamos con anterioridad, la norma oficial mexicana (y las de varios países) considera únicamente a los Ct para evaluar el nivel de riesgo de las ensaladas o como grupo índice de la posible presencia de enteropatógenos (como las *E. coli* patógenas).

Sin embargo, nuestros datos muestran que los Ct no guardan relación con la presencia de un enteropatógeno y en consecuencia, no deberían de emplearse como indicadores de riesgo. A este respecto, varios investigadores han argumentado con evidencias científicas, la inconveniencia de emplear a los Ct para evaluar el nivel de riesgo de enfermedad por el consumo de alimentos (Doyle y Erickson, 2006). Algunos incluso sostiene que se debería de excluir a los Ct del grupo de microorganismos indicadores (Doyle y Erickson, 2006). El hecho es que, cada vez más en todo el mundo las evidencias científicas que sustentan la búsqueda de *E. coli* en todos los alimentos como herramienta para evaluar la peligrosidad de un alimento, son más sólidas. Y en consecuencia, la normativa de los países debería cambiar dejando fuera a los Ct como indicadores de riesgo e incluir a *E. coli*.

La realidad es que, aun con todas la evidencias científicas que se han publicado sobre la necesidad de establecer microorganismos indicadores mas adecuados para evaluar la higiene o peligrosidad de las verduras crudas, y pesar también del aumento en el número de brotes de enfermedad asociados al consumo de verduras crudas, prácticamente no existen criterios o normas relacionadas con la inocuidad microbiana para verduras frescas-cortadas (CRUSCPS SF, 2005).

Existen diversos criterios internacionales que comúnmente se aplican para evaluar los productos crudos (CRUSCPS SF, 2005). Sin embargo, hay una serie de cuestiones que hacen que el valor de estos criterios sea limitado ya que en ocasiones los criterios son difíciles de interpretar o aplicar. Más aun, algunos de estos criterios son aplicados de forma inadecuada (CRUSCPS SF, 2005).

La utilidad y la base científica de algunos de estos criterios, para contribuir a la prevención de enfermedades y de esta manera tener un impacto en la salud pública, a veces puede ser cuestionada (CRUSCPS SF, 2005). Por ejemplo, en Irlanda hay criterios para *Vibrio parahaemolyticus* en frutos secos y hortalizas y de *Campylobacter* en col, mientras que España tiene un criterios para *L. monocytogenes* en vegetales crudos enlatados (CRUSCPS SF, 2005). Otros ejemplos de criterios microbiológicos cuestionables o con bajo impacto real en la salud publica es el limite de 200 UFC/g para *Listeria* spp (no patógena) en la col, y un límite de 10^6 UFC/g de bacterias mesófilas aerobias para evaluar la peligrosidad de ensaladas mixta preparadas a 30°C (CRUSCPS SF, 2005).

En otros países los criterios para evaluar la higiene o peligrosidad de ensaladas crudas incluyen la investigación de *E. coli* o de coliformes termotolerantes o sólo coliformes totales (CRUSCPS SF, 2005). Incluso, en algunos de estos criterios se especifica el nivel de los microorganismos indicadores que debe contener el producto, pero en otros no se especifica. En algunos países los criterios son de carácter general y no se especifica un criterio particular para los microorganismos patógenos. Por ejemplo, en México los criterios para ensaladas crudas son 150000 UFC de bacterias aerobias/g y 100 NMP coliformes termotolerantes por g, y este criterio no especifica si debe o no haber patógenos (NOM-093-SSA1-1994). Estos ejemplos ponen de manifiesto la necesidad de llevar acabo esfuerzos organizados con la finalidad de armonizar las normas o criterios microbiológicos entre las naciones y/o entre de las organizaciones internacionales. Por otro lado, es necesario también establecer criterios de microorganismos

patógenos específicamente para ensaladas de verduras crudas crudos listos para consumo humano.

En general este estudio que realizamos, pone de manifiesto el nivel de higiene con que se manejan las ensaladas de verduras crudas en todos los establecimientos estudiados. Es importante precisar que aunque el estudio abarcó pocos establecimientos y de una sola ciudad, los resultados dan una idea del nivel de higiene en estos tipos de restaurantes y además sugieren la posibilidad de que el nivel de higiene que se encontró en las ensaladas, se mantenga en otros establecimientos, no sólo de la ciudad donde se desarrollo el estudio, sino también en restaurantes de otras ciudades o estados de México. En tal caso es necesario realizar mayores estudios para confirmar esta hipótesis. Por otro lado, sería adecuado realizar mayores estudios en los establecimientos donde se obtuvieron las ensaladas con la finalidad de determinar el origen de los problemas. La información derivada de estos estudios permitirá atender con eficiencia los problemas higiénicos en estos restaurantes y, en lo sucesivo, prevenirlos; disminuyendo con ello los brotes de enfermedades por consumo de ensaladas de verduras crudas.

VII. CONCLUSIONES

1. En general todas las ensaladas presentaron mala calidad microbiológica
2. *E. coli* se aisló del 75-100 % de las ensaladas.
3. Todas las ensaladas del restaurante A2 estuvieron contaminadas con *E. coli*.
4. En las ensaladas provenientes de A2 y de C1 y C2 se aislaron ETEC, EIEC y STEC.
5. En dos ensaladas provenientes de C1 se aislaron simultáneamente EIEC y STEC.
6. No se observó diferencia estadísticamente significativa entre la calidad microbiológica de las ensaladas por su lugar de origen, es decir, el grado de riesgo de enfermedad por consumir ensaladas de verduras crudas es el mismo independientemente si estas son compradas o consumidas en restaurantes bien establecidos pertenezcan ó no a cadenas ó provengan de fondas ó de la vía pública.
7. No se encontró correlación entre la presencia de coliformes fecales (termotolerantes) con la de grupos patógenos de *E. coli*; por el contrario, se

observó una alta correlación entre la presencia de *E. coli* genérica con la de los grupos patógenos.

8. Este estudio sugiere que la manipulación de las ensaladas en los sitios examinados requieren de estrictas medidas de higiene que eviten, hasta donde sea posible, la contaminación de las ensaladas desde su preparación hasta su consumo.
9. De acuerdo a los resultados obtenidos, las ensaladas adquiridas de los restaurantes examinados, resultaron ser alimentos de alto riesgo para la salud del consumidor. Es conveniente llevar acabo una vigilancia más estricta de las ensaladas de verduras desde la recepción de las materias primas hasta el producto terminado tanto de las autoridades como de los productores, esto con la finalidad de prevenir y controlar posibles brotes de enfermedad por consumo de ensaladas de verduras crudas.

VIII. BIBLIOGRAFIA

Abdul-Raouf UM, Beuchat LR, Ammar MS. 2006. Survival and Growth of *Escherichia coli* O157:H7 on Salad Vegetables. Applied and Environmental Microbiology. 19;59-995.

Acevedo L., Mendoza C. y Oyon R. 2001. Coliformes totales, fecales y algunas enterobacterias, *Staphylococcus spp* y hongos en ensaladas para perros calientes en la ciudad de Maracay, Venezuela. ALAN; 51(4): 20-30.

Acevedo, Laura, Mendoza, Clever y Oyon, Rafael. 2001. Coliformes totales, fecales y algunas enterobacterias, *Staphylococcus spp.* y hongos en ensaladas para perro calientes expandidas en la ciudad de Maracay, Venezuela. ALAN., vol.51, no.4, p.366-370. ISSN 0004-0622.

Adams A. y Moss M. Microbiología de los alimentos. 1997. Editorial Acribia, S. A. España.

Ahuenainen, R. 1996. New approaches in improving The shelf life minimally processed fruit and vegetables. Trends in food Sciences and Technology. 7, 179-187.

A.P.H.A. American Public Health Association. 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Water Works Association, Water Environment Federation. 18a. ed. Washington, D. C., pp. 9-48.

Arce G., Ávalos M., Giusti S., Miranda G., Tuhay N. 2002. Consumo de vegetales crudos en la Ciudad de Corrientes en relación con las enfermedades transmitidas por alimentos. Revista de Postgrado de Vía Cátedra de Medicina, p.10-11.

FDA/JFSAN. Bacteriological Analytical Manual Online, Equivalente a Bacteriological Analytical Manual, 1988, 8ª ed. AOAC Inter. USA.

Baldwin, E. A. Nisperos- Carriedo, M. O. and Baker R. A. 1995. Use of Edible Coatings to Preserve Quality of Lightly (and Slightly) Processed products. Critical Reviews in food Sciences and Nutrition, 35 (6), 509-524.

Bean NH, Griffin PM. 1990. Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987: pathogens, vehicles, and trends. J Food Prot 53(9):804-17.

Beauchat, L. R. 1990. Pathogenic microorganism associated with fresh produce. J. Food Prot. 59:204-216.

Beuchat L. 1998. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. Food Safety Unit, WHO. Series: Report WHO/FSF/FOS 198.2.

Barrera Hugo A. Saldaña, Rocío Ortiz, Augusto Rojas y Diana Resendez. 1998. Reacción en cadena de la polimerasa, una nueva época dorada en la biología molecular. Departamento de bioquímica de la facultad de medicina.

Bryan, F. L. 1977. Diseases transmitted by foods contaminated by wastewater. J. Food Prot. 60:567-578.

Castro Del Campo, Nohelia, Chaidez Quiroz, Cristóbal, Rubio Carrasco, Werner. 2004. Sobrevivencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en frutos mínimamente procesados. Rev Cubana Salud Pública, vol.30, no.1, p.0-0. ISSN 0864-3466.

Castro, R. J. 1998. Algunos Factores que afectan la inocuidad microbiana del germinado de alfalfa. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro.

López-Saucedo C, F. Cerna Jorge, Villegas-Sepúlveda Nicolás, Thompson Rocío, F. Raul Velázquez, Torres Javier , Phillip I. Tarr and Teresa Estrada-García. 2003. Single Multiplex Polymerase Chain Reaction to detect diverse loci, associated with diarrheagenic *E. coli*. Emerging Infectious Disease, vol 9; 127-131.

Contaminación microbiana de los alimentos vendidos en la vía pública en Ciudades de América Latina. 1996. Organización Panamericana de la Salud (OPS).

Copes, J. 2002. Análisis de las condiciones de higiene y seguridad en ensaladas listas para consumo. Tecnología y sanidad de los alimentos. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de la Plata. Argentina.

CRUSCPS SF (Committee on the Review of the Use of Scientific Criteria and Performance Standards for Safe Food). 2003. Scientific criteria and performance standards to control hazards in produce and related products: fresh fruits and vegetables and fresh-cut products in Scientific Criteria to Ensure Safe Food. THE NATIONAL ACADEMIES PRESS Washington, D.C. 197-223.

Mossel/B. Moreno García. 1990. microbiología de los alimentos, fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos.

De la Rosa, H. M. C. 2007. Comportamiento de microorganismos indicadores de higiene y *Escherichia coli* patógena en germinado de alfalfa y evaluación de la eficiencia de tres desinfectantes sobre germinado de alfalfa contaminado con *E. coli* patógena. Tesis de Licenciatura. Centro de Investigaciones Químicas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.

De Las Casas*, C. Adachi J. y Dupont H. 1999. Review article: travellers' diarrhoea. Aliment Pharmacol Ther. 13: 1373±1378.

Díaz SR. y Vernon CJ. 1999. Inocuidad Microbiológica de Frutas Frescas y Mínimamente Procesadas. Ciencia y Tecnología de Alimentos. 2:133-136.

Diagnostico y tratamiento, Reacción de la polimerasa en cadena. ¿Debe incorporarse en los laboratorios de microbiología clínica. 1992. Med Clin. 99: 265-268.

Doyle M. Beuchat L. y Montville T. 1997. Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. Editorial ASM press. Washington D.C. USA.

Doyle.P.M y Erickson, M.C. 2006 The fecal *coliform* assay, the results of which have led to numerous misinterpretations over the years, may have outlived its usefulness. Microbe. <http://www.asm.org/microbe/index.asp?bid=41848>.

F.A.O. Food and Agriculture organization. 1990. La venta de los alimentos en las calles, informe de una consulta a expertos de F.A.O. Roma, Italia.

F.D.A. Food and Drug Administration, Department of Health and Human services. 1999. Title 21 Food and Drug. Part 110 Current Good MAnufacturing, Packing, or holding Humans Food. Sec. 110.

Fernández, E. E. 1981. Microbiología Sanitaria. Agua y Alimentos. Universidad de Guadalajara, México. Pp. 209-349.

Fernández, E. E. 2001. Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro.

Frías C. 1996. Estudio de los factores de patogenicidad en *Escherichia Coli* enterohemorrágica. [Tesis Doctoral]. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona.

Gillian A, Cristopher T y David O. 1999. The microbiological safety of minimally processed vegetables. International J Food Science and Technology Vol 34:1-22.

Griffin PM y Tauxe RV. 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. Epidemiol Rev. 13:60-98.

Hussein, H. S. y Sakuma T. 2005. Invited Review: Prevalence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Dairy Cattle and Their Products. J. Dairy Sci. 88:450–465.

Palomares J. C., Rodríguez Iglesias M. J. y Torres R. J., 1992, Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina, Reacción en Cadena de la Polimerasa, Medicina Clínica Vol. 99: 262-263.

Cerna J. F., James P. Nataro y Estrada-Garcia T. 2003. Multiplex PCR for detection of three Plasmid-Borne Genes of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Strains. Journal of Clinical Microbiology. Vol 41;2138-2140.

Kanabel S. 2003. Enfermedades transmitidas a través de alimentos. The world of food science.1-14.

Kaneko, K.I., Hayashidani, H., Ohtomo, Y., Kosuge, J. y Kato, M. 1999. Bacterial contamination of ready-to-eat foods and fresh products in retail shop and food factories. *J. Food Prot.*, 62 : 644-649.

King G. A. y O'Donoghue E. M. 1995. Unravelling senescence: New Opportunities for delaying the inevitable in harvested fruit and vegetables. *Trends in Food Science and Technology* 6, 385-389.

Manual para el control de las enfermedades transmisibles. 1997. Organización Panamericana de la Salud. 80-88.

Mead PS. y Slutsker L, Dietz. 1999. Food-Related and Death in the United States. *Rev Emerging Infectious Diseases* Vol. 5: 607-25.

Medina M, Hernández P, Kalustian T y Mendoza C. 1998. Prevalence of *Plesiomonas shigelloides* in cabbage and lettuce samples from Venezuela. *World Congress Foodborne Infections and Intoxications*. Vol. 2: 960-963.

Microbiología Sanitaria y Clínica. 1997. Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. España. Pp. 697-701.

Monge, R., Arias, M. L., Antillon, F., y Utzinger, D. 1993. Microbiological Quality of Street Sold Fruits in San José, Costa Rica. Facultad de Microbiología. Universidad de Costa Rica.

Moreno I. Comportamiento de *Aeromonas hydrophila* en ensaladas con mínimo procesamiento almacenadas a 5°C. 1997. Tesis de Grado. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Moreno M. L. 2006. Frecuencia y comportamiento de *Salmonella*, *Escherichia coli* y organismos coliformes en chile serrano y jalapeño. Tesis de licenciatura. Centro de Investigaciones Químicas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.

Nataro JP. y Kaper JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Rev. Clini. Microbiol. Jan:142-01.

Noguera U. Y. 2005. Frecuencia de *salmonella*, *E. coli* y organismos coniformes en ensaladas listas para su consumo de Tesis de licenciatura. Centro de Investigaciones Químicas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.

Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA-1994, Bienes y Servicios. Métodos. Práctica de Higiene y Sanidad en la Preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos.

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. Secretaría de Salud. México.

Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnicas del Número más Probable. Secretaría de salud. México.

Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de organismos coliformes totales en placa. Secretaría de salud. México.

Parrilla CC, Vázquez CL, Saldate CO. y Nava FM. 1993. Brotes de Toxiinfecciones Alimentarias de Origen Microbiano y parasitario. Salud Pública de México. Vol. 35:456-463.

Pingulkar, K., Kamat, A. y Bongirwar, D. 2001. Microbiological quality of fresh leafly vegetables, salad components and ready-to-eat salads: an evidence of inhibition of *Listeria monocytogenes* in tomatoes. Int. J. Food Sci. Nutr., 52: 15-23.

Ramírez T. L. A. 2006. Frecuencia y comportamiento de organismos indicadores de higiene y *Salmonella* en jugo de betabel. Tesis de Licenciatura.

Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh-Cut Produce, U. S. Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition September 30, 2001.

Rodríguez-Ángeles G. 2002. Principales características y diagnostico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud pública Méx. 464-475.

Rojas O. M. 2005. Comportamiento de grupos patógenos de *Escherichia coli* en verduras crudas. Tesis de licenciatura. Centro de Investigaciones Químicas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.

Sagoo, S. K., Little, C. L. y Mitchell, R. T. 2003a. Microbiological Study of Ready-to-Eat Salad Vegetables from Retail Establishments Uncovers a National Outbreak of Salmonellosis. J. Food Prot., 66: 403-409.

Sagoo, S. K., Little, C. L. y Mitchell, R. T. 2003b. Microbiological quality of open ready-to-eat salad vegetables: Effectiveness of food hygiene training of management. J. Food Prot., 66: 1581–1586.

SSA. Secretaria de Salubridad y Asistencia. 1994. Diagnóstico de laboratorio de Infecciones gastrointestinales. Instituto Nacional de Diagnostico y Referencia Epidemiológicos. México. III-3:219-34.

Thompson R. 2002. Utilización de *E. coli* y *E. coli* enterotoxigenica (ETEC) como indicadores de contaminación fecal y de un patógeno humano respectivamente en alimentos de venta callejera. Tesis de licenciatura. Centro de Investigaciones Avanzadas. Instituto Politécnico Nacional.

Ukuku OD. y Sapers G.M. 2001. Effect of Sanitizer Treatments on Salmonella Stanley Attached to the Surface of Cantaloupe and Cell Transfer to Fresh-cut Tissues during Cutting Practices. Journal Food Protection. Vol. 64:1286-1291

USDA. United States Department of Agriculture. 2004. Fruit and Tree Nut Situation and Outlook Report, 'Agricultural Research'.

Webb, T. A. y Mundt, J. O. 1978. Molds on vegetables at time of harvest. Appl. Environ. Microbiol. 35: 655-658.

Whitfield F. 1998. Microbiology of food taints. International Journal of Food Science and Technology. 1998. 33: 31-51.

IX. ANEXOS

Anexo 1

Lugar: Vip's

Tipo de restaurante: aparente alta higiene (Ah)

Ensalada: espinacas (cruda)

Composición: espinacas, jitomate y champiñones

	Ct	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> patógena
	460	11	< 3
	210	3.6	< 3
	460	38	< 3
	460	75	< 3
	1100	3.6	< 3
	120	< 3	< 3
	1100	43	< 3
	460	15	< 3
	460	75	< 3
	75	15	< 3
	160	< 3	< 3
	120	3.6	< 3
	290	11	< 3
	1100	210	< 3
	210	< 3	< 3
	1100	43	< 3
	210	< 3	< 3
	1100	< 3	< 3
	1100	11	< 3
	210	3.6	< 3
	< 3	< 3	< 3
	1100	38	< 3
	120	< 3	< 3
	120	3.6	< 3
	75	11	< 3
Mediana	477	25	< 3
Mínimo	< 3	< 3	< 3
Máximo	>1100	210	< 3

Anexo 2

Lugar: Sanborn's

Tipo de restaurante: aparente alta higiene (Ah)

Ensalada: espinacas (cruda)

Composición: espinacas, jitomate y champiñones

	Ct	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> patógena
	1100	75	< 3
	1100	93	< 3
	75	43	< 3
	93	21	< 3
	210	11	< 3
	1100	43	< 3
	1100	3.6	< 3
	1100	210	< 3
	460	7.4	< 3
	460	36	< 3
	120	43	< 3
	1100	38	< 3
	1100	1100	< 3
	1100	75	< 3
	460	75	< 3
	1100	21	< 3
	1100	28	< 3
	460	38	< 3
	210	3	< 3
	1100	< 3	< 3
	75	43	< 3
	290	3.6	< 3
	1100	75	11 ETEC
	460	75	75 STEC
	1100	15	< 3
Mediana	707	87	3.5
Mínimo	75	<3	< 3
Máximo	>1100	>1100	75

Anexo 3

Lugar: Ciro's

Tipo de restaurante: aparente media higiene (Mh)

Ensalada: espinacas (cruda). Composición: espinacas, jitomate y champiñones

	Ct	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> patógena
	1100	< 3	< 3
	160	< 3	< 3
	160	< 3	< 3
	150	6.1	< 3
	210	3.6	< 3
	290	< 3	< 3
	35	< 3	< 3
	460	20	< 3
	1100	64	< 3
	290	9.2	< 3
	1100	75	< 3
	1100	36	< 3
	1100	43	< 3
	1100	3.6	< 3
	150	21	< 3
	1100	75	< 3
	1100	1100	< 3
	1100	75	< 3
	120	11	< 3
	1100	36	< 3
	1100	64	< 3
	1100	21	< 3
	460	3.6	< 3
	1100	36	< 3
	150	38	< 3
Mediana	677	70	< 3
Mínimo	35	<3	< 3
Máximo	>1100	>1100	< 3

Anexo 4

Lugar: la blanca

Tipo de restaurante: aparente media higiene (Mh)

Ensalada: mixta (cruda). Composición: aguacate, cebolla, espinaca, jitomate, lechuga, pepino y zanahoria

	Ct	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> patógena
	290	< 3	< 3
	43	6.1	< 3
	1100	16	< 3
	210	27	< 3
	1100	6.2	< 3
	1100	21	< 3
	75	23	< 3
	460	6.1	< 3
	160	3.6	< 3
	120	< 3	< 3
	460	21	< 3
	1100	28	< 3
	460	11	< 3
	1100	64	< 3
	210	< 3	< 3
	460	< 3	< 3
	120	< 3	< 3
	290	75	< 3
	1100	290	< 3
	1100	20	< 3
	1100	21	< 3
	1100	64	< 3
	1100	21	< 3
	1100	7.4	< 3
	43	3.6	< 3
Mediana	620	30	< 3
Mínimo	43	< 3	< 3
Máximo	>1100	290	< 3

Anexo 5

Lugar: Fonda

Tipo de restaurante: aparente baja higiene (Bh)

Ensalada: mixta (cruda). Composición: aguacate, berros, cebolla, germen de trigo, jitomate, lechuga, pepino, rábano, zanahoria.

	Ct	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> patógena
	460	75	< 3
	1100	38	< 3
	1100	43	< 3
	75	3.6	< 3
	460	6.1	< 3
	290	< 3	< 3
	120	27	< 3
	210	3.6	< 3
	1100	21	< 3
	120	15	< 3
	1100	1100	3.6 STEC 3.6 EIEC
	75	43	3.6 STEC 3.6 EIEC
	1100	120	75 STEC
	43	3	< 3
	1100	210	< 3
Mediana	564	114	< 3
Mínimo	43	< 3	< 3
Máximo	>1100	>1100	75

Anexo 6

Lugar: Puestos del mercado

Tipo de restaurante: aparente baja higiene (Bh)

Ensalada: mixta (cruda). Composición: aguacate, berros, cebolla, germen de trigo, jitomate, lechuga, pepino, rábano, zanahoria.

	Ct	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> patógena
	1100	460	< 3
	460	21	< 3
	160	15	< 3
	1100	20	< 3
	93	93	3.6 STEC
	210	11	< 3
	460	15	< 3
	3.6	< 3	< 3
	120	11	< 3
	75	43	43 EIEC
	460	7.4	< 3
	1100	23	< 3
	210	28	< 3
	75	3.6	< 3
	120	15	3.6 EIEC
Mediana	383	51	3.4
Mínimo	3.6	< 3	< 3
Máximo	1100	460	43

Anexo 7

Iniciadores para *E. coli* patógena diarrogénicas y enteroagregativa

Genero	Gen	Orientación	Secuencia	PM (bp)
ETEC	<i>lt</i>	F*	5'-GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC-3'	450
		R**	5'-CAC CCG GTA CAA GCA GGA TT3'	
	<i>st</i>	F	5'-ATT TTT CTT TCT GTA TTG TCT T-3'	190
		R	5'-CAC CCG GTA CAA GCA GGA TT-3'	
EPEC	<i>bfpa</i>	F	5'-AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC-3'	324
		R	5'-GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA-3'	
	<i>eaeA</i>	F	5'-GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC-3'	384
		R	5'-CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG-3'	
STEC	<i>stx1</i>	F	5'-CTGGAT TTA ATG TCG CAT AGT-3'	150
		R	5'-AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC-3'	
	<i>stx2</i>	F	5'-GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC-3'	255
		R	5'-TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G-3'	
EIEC	<i>ial</i>	F	5'-GGT ATG ATG ATG ATG ATG CCA-3'	650
		R	5'-GGA GGC CAA CAA TTA TTT CC-3'	
EAEC	<i>aap</i>	F*	5'-CTT GGG TAT CAG CCT GAA TG-3'	310
		R**	5'-AAC CCA TTC GGT TAG AGC AC-3'	
	<i>aggR</i>	F	5'-CTA ATT GTA CAA TCG ATG TA-3'	427
		R	5'-AGA GTC CAT CTC TTT GAT AAG-3'	
	<i>AA</i>	F	5'-CTG GCG AAA GAC TGT ATC AT-3'	629
		R	5'-CAA TGT ATA GAA ATC CGC TGT T-3'	

F Foward *

R reverse **

ANEXO 8

Cálculos para resuspender iniciadores:

Ejemplo:

- Se requiere una concentración de 100 μM
- Concentración de proveedor 194.18 μM (la concentración de cada iniciador depende del fabricante y de acuerdo al tipo de iniciador)

194.18 nmol $\longrightarrow$ 1 mL equivalente a [194.18 μM]

Entonces:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$(194.18 \mu\text{M}) (1 \text{ mL}) = (100 \mu\text{M}) (X)$$

$$X = \frac{(194.18 \mu\text{M}) (1 \text{ mL})}{100 \mu\text{M}} = V_2 = 1.9418 \text{ mL de H}_2\text{O}$$

$$100 \mu\text{M}$$

Una vez resuspendidos se utilizan en una dilución 1:10 por lo tanto se tomara un volumen de 100 μL por iniciador (Forward y reverse) y se diluirán en 800 μL de agua desionizada de acuerdo al gen de interés.

Para la realización de PCR múltiplex se utilizó una mezcla de iniciadores ya resuspendidos, de acuerdo a las cantidades descritas en las siguientes tablas llegando a un volumen total de 1000 μL para la identificación de *E. coli* diarrogenica y enteroagregativa (López-Saucedo y col), cabe señalar que el

volumen utilizado para cada iniciador depende del peso molecular del gen a identificar.

Mezcla iniciadores *E. coli* diarrogénicas

Gen	Volumen
<i>lt</i>	148 µl
<i>st</i>	185 µl
<i>stx1</i>	74 µl
<i>stx2</i>	111 µl
<i>eaeA</i>	111 µl
<i>bfpA</i>	74 µl
<i>ial</i>	296 µl
volumen total	1000 µl

Mezcla iniciadores *E. coli* enteroagregativa

Gen	volumen
<i>aAt</i>	498 µl
<i>aggR</i>	332 µl
<i>aap</i>	166 µl
volumen total	1000 µl

Anexo 9

Preparación de dNTP's:

Para la preparación de dNTP's se toman 25 µl de cada uno de los oligonucleótidos y se mezclan en un tubo de eppendorff para obtener 100 µl y se utilizan en una dilución 1:10 en agua desionizada (tabla X), la concentración de cada dNTP's de acuerdo a las indicaciones es 100 µM, una concentración 1x tiene 1.25 µM de cada dNTP's, 2x sea 2.5 µM para 1 mL tenemos (la concentración dependerá del fabricante)

$$C1 V1 = C2 V2$$

$$(100 \mu\text{M}) (V1) = (25 \mu\text{M}) (1000 \mu\text{M})$$

$$v1 = 25 \mu\text{M de cada iniciador}$$

Preparación de dNTP's	
Oligonucleotidos	Volumen
dATP	25 µl
dCTP	25 µl
dTTP	25 µl
dGTP	25 µl
volumen total	100 µl

Cabe mencionar que se utilizo un kit de la Taq polimerasa (in vitro gen) que incluye el regulador o buffer y el cloruro de magnesio, el cual se mencionan para señalar su concentración.

Regulador o Buffer

2.5 μ l $\longrightarrow$ 25 μ l

con dilución final 1:10

cloruro de magnesio

50 Mm 1 μ l

x= $\longleftarrow$ 25 μ l

X= 2 mM entonces la concentración final es 2 mM