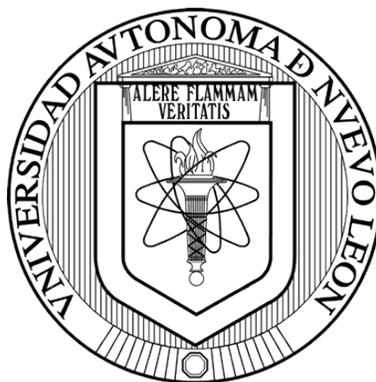


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**DETERMINACIÓN DE LOS PUNTOS SUSCEPTIBLES DE CONTAMINACIÓN EN
LA CADENA DE PRODUCCIÓN DE MELÓN CANTALOUPE (*Cucumis melo* L.)
CULTIVADO EN LA REGIÓN DE PARRAS, COAHUILA.**

Por:

CINDY JOANNA CABALLERO PRADO

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con acentuación en Microbiología

Diciembre, 2012

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	
DEDICATORIA	
LISTA DE TABLAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE SÍMBOLOS Y NOMENCLATURAS	
RESUMEN	
ABSTRACT	
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Enfermedades transmitidas por alimentos	3
2.2. Contaminación de melón	7
2.2.1. Fertilizantes orgánicos	7
2.2.2. Calidad del agua de riego	8
2.2.3. Suelo	10
2.3. Microorganismos patógenos en melón	11
2.3.1. <i>Escherichia coli</i>	16
2.3.1.1. <i>E. coli</i> enterotoxigénica	16
2.3.1.2. <i>E. coli</i> enteropatógena	17
2.3.1.3. <i>E. coli</i> enteroagregativa	17
2.3.1.4. <i>E. coli</i> enteroinvasiva	18
2.3.1.5. <i>E. coli</i> adherencia difusa	18
2.3.1.6. <i>E. coli</i> enterohemorrágica	19
2.4. <i>Salmonella spp</i>	21
2.5. El aumento de consumo de frutas y hortalizas frescas	22

2.5.1. Contaminación de frutas y hortalizas	23
2.6. Microorganismos indicadores	24
2.7. Colifagos	27
3. HIPÓTESIS	31
4. OBJETIVOS	32
4.1. Objetivo general	32
4.2. Objetivos particulares	32
5. MATERIAL Y MÉTODOS	33
5.1. Muestreo	33
5.2. Obtención de muestras	34
5.3.1. Producto (melón)	35
5.3.2. Suelo	36
5.3.3. Agua	37
5.3.4. Enjuague de manos manipuladores	38
5.4. Determinación de la carga microbiana presente en los diferentes constituyentes de la cadena de producción	39
5.4.1. Determinación de organismos indicadores de contaminación	39
5.4.1.1. Recuento de <i>Enterococcus</i>	40
5.4.1.2. Coliformes fecales y <i>Escherichia coli</i>	41
5.4.2. Colifagos DNA somáticos	43
5.4.3. Determinación de patógenos	44
5.4.3.1. <i>Escherichia coli</i> O157: H7	44
5.4.3.2. <i>Salmonella</i>	44
5.4.4. Confirmación de cepas positivas para <i>Salmonella</i> y <i>Escherichia coli</i> O157: H7 mediante PCR	45
5.4.4.1. Extracción de DNA	45
5.4.4.2. Condiciones de amplificación	46
5.4.4.3. Visualización	46
6. RESULTADOS	47
6.1. Microorganismos indicadores	48
6.1.1. Cuenta de coliformes	48

6.1.2. Recuento de <i>E. coli</i>	52
6.1.3. Cuenta de <i>Enterococcus</i>	56
6.1.4. Recuento de colifagos	58
6.2. Microorganismos patógenos	61
7. DISCUSIÓN	62
7.1 Microorganismos patógenos	65
8. CONCLUSIONES	66
9. APÉNDICES	68
9.1. Anexo 1	68
9.2. Anexo 2	69
10. LITERATURA CITADA	72
11. RESUMEN BIBLIOGRAFICO	88

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a Dios por darme la dicha de la vida, por permitirme estar en donde estoy y ser un mejor ser humano, gracias por no dárme lo todo, si no solo lo que necesito.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

A la Dra. Norma y el Dr. Santos por confiar en mí, darme la confianza y todas las oportunidades, de ellos solo eh recibido enseñanzas y buen trato, MUCHAS GRACIAS Doctores.

Al Dr. Juan León y la Dra. Faith Bartz por su apoyo en el proyecto, su tiempo, su ayuda y enseñanzas, pero sobre todo por el placer de conocerlos, Gracias.

A la Dra. Luisa que más que una maestra es una excelente amiga, eh aprendido muchísimo de ti Luisa, te agradezco todo tu apoyo y paciencia.

Al maestro Eduardo por que fue mi primer maestro en esta ciudad, que lo estimo muchísimo, le agradezco su amistad, confianza y consejos.

A todo el LABGEM que además de ser mí equipo de trabajo son como mi familia, Gracias por todo su apoyo, ayuda, y su amistad; maestra Sandra, Roberto, Alma, Aldo, Nere, Faby, Alam, Cristy, Rafael, Joel, Andrea y Diego.

A mis roomies Yadira y Mayra que han sido mis compañeras en esta etapa de mí vida, las quiero mucho, Gracias.

A mi amigas que sin ellas no hubiera podido, Gracias Jessy, Aralia, Cynthia, Mayra, Sarah.

A mis primeros alumnos Edgar, Fernando, Rosy, Miguel, sin ustedes no lo hubiera conseguido, Gracias por su amistad y toda la ayuda, aprendí muchísimo de ustedes.

A mis amigas de toda la vida Alexis, Adriana, Wendy, Yadira, Rocío, Lupita, Rubí, Monse, por estar conmigo siempre, que es un orgullo para mí ser su colega y amiga, que en cualquier parte del mundo que están ahora sé que son las mejores, las quiero muchísimo niñas.

A Brando Álvarez por estar conmigo y apoyarme, ser mi amigo, mi compañero, mi confidente, por que cuando sentía que ya no podía tu siempre me alentaste y me diste ánimos, confiaste en mi y me tuviste mucha paciencia, GRACIAS moshi siempre te llevé en mi corazón.

A mi familia que amo con todo mi corazón, por que a pesar de la distancia nunca me eh sentido sola, GRACIAS por todo lo que me dan, por confiar en mi, ser mi motivación, por que día a día me ayudan a ser un mejor ser humano.

A mis primos que quiero tanto Yus, Nadia, Rodrigo y Lalo, a mi abuelita Fa y mis tías Oli y Lupe por sus oraciones, que siempre que tengo que partir de casa me dan sus bendiciones y buenos deseos, Gracias por estar siempre apoyándome.

DEDICATORIA

A mis papas que amo con todo mi ser, a ellos les dedico todo lo que soy, siempre serán mi ejemplo a seguir, Gracias mami y papi.

A mis hermanos Ulises, Alexander, Paola, Kimberly y Brean, desde que llegue a este mundo me han cuidado, protegido y acompañado, que a pesar de la distancia siempre han estado junto a mí, los amo hermanos.

A mis sobrinos Alexander, Edwin, Ingrid, Patricio, Elias mis angelitos desde que nacieron y los tuve en mis brazos supe que los cuidaría y los guiaría a ser mejores personas, espero algún día ser un ejemplo para ustedes mis niños hermosos los AMO.

A Brando por estar conmigo todo este tiempo, que a pesar de la distancia siempre estuvo presente en todo lo que hice, siempre estarás presente en mi vida.

A Dios, a él le dedico todas mis acciones, Gracias por todo lo que me has enviado.... infinitas GRACIAS.

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
12. Secuencia de los iniciadores utilizados en la reacción	46
13. Total de muestras compuestas recolectadas durante la cadena de producción de melón	47
14. Muestras presuntivas de patógenos analizadas por PCR	61

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Melones antes de cosechar	35
2. Toma de muestra de suelo	36
3. Sistema de riego en huerta melonera	37
4. Sistema de filtración	39
5. Colonias de <i>Enterococcus</i> en agar KF	41
6. Colonias de <i>E. coli</i> genérica en agar Rapid <i>E. coli</i> 2	42
7. Coliformes fecales en agar Rapid <i>E. coli</i> 2	42

LISTA DE SIMBOLOS Y NOMENCLATURA

-	Menos
%	Porcentaje
/	Por
+	Más
+/-	Más menos
<	Menor que
>	Mayor que
°C	Grados Celsius
A/E	Adherencia y remoción
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
CDC	Centro de control y prevención de enfermedades
Cm	Centímetros
CRI	Intervalo de credibilidad
CSTEL	Caldo soya tripticaseína con extracto de levadura

DAEC	<i>E. coli</i> de adherencia difusa
dATP	Desoxyadenosin trifosfato
dCTP	Desoxycitosin trifosfato
dGTP	Desoxyguanosin trifosfato
dTTP	Desoxytimidin trifosfato
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EE. UU.	Estados Unidos
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatógena
ETAs	Enfermedades transmitidas por alimentos
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
FDA	Food and Drug Administration

G	Gramos
GPS	Sistema de posición global
h	Horas
HNV	Norovirus humanos
ICC	Caldo infusión cerebro corazón
INAFED	Instituto nacional para el federalismo y el desarrollo municipal
INEGI	Instituto nacional de estadística y geografía
L	Litros
log 10	Logaritmo base 10
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
Min	Minutos
ml	Mililitros
NCCLS	Comité nacional de normas de laboratorio clínico
NMP	Número más probable
OMS	Organización mundial de la salud

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
S	Segundos
SB	Sulfito de bismuto
SENASICA	Servicio nacional de sanidad, inocuidad y calidad agroalimentaria
STEC	<i>E. coli</i> productora de shiga toxina
SUH	Síndrome urémico hemolítico
UFC	Unidades formadoras de colonias
UFP	Unidades formadoras de placa
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
XLD	Xilosa lisina desoxicolato
μm	Micrómetros
μl	Microlitros

RESUMEN

Los productos frescos importados de México, incluyendo melones, tomates y jalapeños, han sido vinculados en el pasado a brotes asociados a enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs). Sin embargo, poco se sabe acerca de la contaminación del producto durante su cadena de producción que incluye: precosecha, cosecha y los procesos de distribución y empaque.

En este estudio se evaluó los niveles de microorganismos indicadores y patógenos en el proceso de producción del melón cantaloupe (*Cucumis melo* L.) producido en la región de Parras de la Fuente, Coahuila. Las muestras incluyeron el enjuague de melón, el enjuague de manos (en las etapas de precosecha, cosecha, distribución y empaque), agua de sitio/irrigación, agua de fuente y suelo.

Se analizaron un total de 276 muestras, que se colectaron durante el periodo de julio del 2011 a agosto del 2012. El primer periodo de muestreo (verano del 2011) las muestras colectadas fueron melones durante la precosecha (26), y cosecha (26), manos en la cosecha (26), agua sitio/irrigación (24), agua fuente (11), suelo (24), melón durante la distribución (9), manos en la distribución (9), melón en el empaque (5), manos en el empaque (5). Para el segundo periodo de muestreo en el verano del 2012 el número de muestras fue de melón en precosecha (14), y cosecha cosecha (14), manos en cosecha (14), agua sitio/irrigación (14), agua fuente (5), suelo (14), melón en la distribución (14), manos en ladistribución (14), melón en el empaque (4), y manos en el empaque (4).

En este estudio los rangos mayores obtenidos en cuanto a microorganismos indicadores correspondieron a coliformes fecales 10^{10} UFC, *E. coli* genérica 10^8 UFC, *Enterococcus faecalis* 10^{10} UFC y colifagos con 4000 UFP. La presencia de microorganismos patógenos fue negativa para las muestras tanto por microbiología convencional como utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

ABSTRACT

Fresh produce imported from Mexico, including melons, tomatoes and peppers have been historically linked to outbreaks associated with food-borne diseases (ETAs). Little is known about the contamination of the product during its production line which includes: pre-harvest, harvest, distribution and packing processes.

In this study levels of indicator microorganisms and pathogens were evaluated during the production process of melon cantaloupe (*Cucumis melo L.*) produced in the region of Parras de la Fuente, Coahuila. Samples included melon rinse (collected during preharvest , harvesting, packaging and distribution), hands rinse (collected during, harvest, packaging and distribution), water site / irrigation, water source and ground.

We analyzed a total of 276 composite samples, which were collected in two periods. The first sampling period occurred during the summer of 2011; samples collected were: pre-harvest product (26), harvest product (26), hand harvesting (26), site water / irrigation (24) Water supply (11), soil (24), product distribution (9), hand distribution (9), product packaging (5), hands gasket (5). For the second sampling in the summer of 2012 the number of samples was preharvest product (14), harvest product (14), hand harvesting (14), site water / irrigation (14), water source (5), soil (14) , product distribution (14), hand distribution (14), product packaging (4), hands gasket (4).

In this study higher levels of indicator microorganisms corresponded to fecal coliforms (10^{10} CFU), followed by generic *E. coli* (10^8 CFU), *Enterococcus faecalis* (10^{10} CFU) and coliphages4000 UFP. The presence of pathogenic microorganisms was negative for all samples analyzed.

INTRODUCCIÓN

El melón cantaloupe (*Cucumis melo* L.) precortado proveniente de algunos estados de México, se asoció con brotes de salmonelosis en Estados Unidos de América (EE. UU) y Canadá en el 2001. Debido a que estos brotes que fueron responsables de numerosas enfermedades y muertes de personas, las exportaciones del melón mexicano a EE. UU. se vieron comprometidas hasta el punto del cierre de fronteras, por sugerencia de la agencia Federal de Drogas y Alimentos (FDA) de ese país (FDA, 2002).

La comarca Lagunera, que comprende parte de los Estados de Coahuila y Durango, es la región melonera más importante del país en términos de superficie y producción. Siendo el cultivo del melón el más importante en términos de superficie, producción y valor (Espinoza *et al.*, 2003).

Salmonella es una bacteria patogénica que reside en el intestino de animales y humanos (Tortora *et al.*, 1995) y en las últimas dos décadas se ha relacionado con numerosos brotes asociados con el consumo de melón cantaloupe (*Cucumis melo* L), (Calvin, 2003).

Los patógenos microbianos pueden contaminar los productos frescos en cualquier punto en el camino de la granja a la mesa del consumidor, con las fuentes de contaminación en el campo, incluyendo las heces de los animales salvajes y domésticos, el agua de escorrentía de las operaciones ganaderas, abonos verdes o una mala composta, el aire (polvo), insectos y agua de riego (Buchholz *et al.*, 2012).

La posibilidad de que el fruto de melón se contamine por especies del género *Salmonella* o cualquier otro microorganismo patogénico para humanos, como *Shigella* spp.

o *Escherichia coli* O157:H7, puede ser debido a su exposición a una serie de factores durante el crecimiento, desarrollo, cosecha y manejo postcosecha. Sembrar en suelos contaminados y utilizar abonos orgánicos mal compostados o agua de uso agrícola contaminada así como la presencia de animales en el campo y la falta de higiene de los trabajadores, durante cualquier etapa de la cadena de producción, distribución y comercialización, son algunos de los factores que comprometen la calidad sanitaria del melón (FDA, 2003).

En el presente trabajo se analizaron los principales puntos de contaminación en la cadena de producción del melón de la región de Parras, Coahuila, se determinó la presencia de los microorganismos indicadores coliformes totales, *E. coli* genérica y colifagos, así como de los microorganismos patógenos *Salmonella* y *E. coli* O157: H7 en las diferentes etapas de producción. Se determinaron los puntos críticos donde posiblemente se produce un mayor riesgo de contaminación bacteriana, se analizaron muestras desde el personal que manipula el melón, hasta el mismo melón antes y después de cosecharlo, el agua y el suelo de cultivo.

ANTECEDENTES

2.1 Enfermedades transmitidas por alimentos

Las enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) son aquellas que se originan por la ingesta de alimentos contaminados con microorganismos tales como virus, parásitos, mohos y/o bacterias en cantidades suficientes para afectar la salud del consumidor. Los síntomas más comunes incluyen diarrea y vómito, aunque también se puede presentar dolor abdominal, cefalea y fiebre, entre otros. Entre las bacterias comúnmente reconocidas como causantes de ETAs en México y el mundo, se encuentran especies de los géneros *Campylobacter*, *Salmonella*, *Yersinia* enterocolítica, *Listeria monocytogenes*, así como el serotipo O157: H7 de la enterobacteria *Escherichia coli* (Blackburn *et al.*, 2002).

Las estimaciones de las enfermedades transmitidas por alimentos se pueden utilizar para ayudar a dirigir la política de seguridad alimentaria y planear intervenciones adecuadas. Un estudio reciente, ha estimado que cada año en los EUA 31 patógenos principales causan 9,4 millones de episodios de ETAs (90% intervalo de credibilidad (CRI) 6,6-12,7 millones), 55.961 hospitalizaciones (90% CRI 39,534-75,741), y 1.351 muertes (90% CRI 712-2,268) (Scallan *et al.*, 2011). La mayoría de las enfermedades (58%) fueron causados por norovirus, seguido por *Salmonella* spp. no tifoide (11%), *Clostridium perfringens* (10%), y *Campylobacter* spp. (9%). Las principales causas de hospitalización fueron por *Salmonella* spp. no tifoide (35%), norovirus (26%), *Campylobacter* spp. (15%), y *Toxoplasma gondii* (8%). En tanto que las principales causas de muerte fueron provocadas por *Salmonella* spp. no tifoide (28%), *T. gondii* (24%), *Listeria monocytogenes* (19%), y norovirus (11%) (Scallan *et al.*, 2011). Las estimaciones del número total de episodios de enfermedades transmitidas por alimentos son útiles para la asignación de recursos y priorización de intervenciones, así como el entender que los alimentos pueden ser contaminados por diversos agentes (por ejemplo, una variedad de bacterias, virus,

parásitos y sustancias químicas); que la transmisión puede ocurrir por mecanismos no alimenticios (por ejemplo, el contacto con animales o el consumo de agua contaminada), y que el entendimiento que la proporción de las ETAs es diferente por factores tales como el tipo de patógeno y los factores inherentes del huésped (por ejemplo la edad y la inmunidad, Scallan *et al.*, 2011).

En general, se ha reportado que en países industrializados el porcentaje de la población que sufre de ETAs es aún 30% mayor que los casos estimados (OMS, 2007). Debido a esto, la incidencia global de las ETAs es difícil de estimar, sin embargo, se ha calculado que tan solo en el 2005, 1.8 millones de personas murieron por causa de enfermedades con diarrea y donde una gran proporción de esos casos fueron atribuidos a la ingesta de agua y alimentos contaminados (OMS, 2007).

Muchos brotes de estas ETAs se asociaron con contaminación de los alimentos y/o agua con materia fecal humana que contenía *Salmonella entérica* serovariedad Typhi (Beuchat, L. R. 1998), aunque también, otras fuentes de patógenos como los abonos animales (Tauxe, R. V. 1997), se han visto implicadas.

En los Estados Unidos, la proporción de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos asociados con el consumo de frutas frescas (nacionales e importados) y verduras contaminadas se ha incrementado en las últimas décadas (Ailes *et al.*, 2008). El número de casos documentados de ETAs asociadas a su consumo ha ido en aumento. De todas estas, existen 10 brotes bien documentados en los últimos 13 años, donde los más graves implicaron al melón cantaloupe (FDA News, 2001) y microorganismos como *Salmonella*, *E. coli* O157: H7, *Campylobacter jejuni*, y/o un agente viral.

Los productos frescos se promueven como parte de una dieta saludable, y su consumo se ha incrementado en los últimos años. La International Fresh-cut Produce Association define a los productos frescos cortados como las frutas o verduras que han sido precortadas y/o peladas y/o cortadas en un producto 100% usable que es embolsado o preenvasado para ofrecer a los consumidores conveniencia, mantenimiento y frescura (Althaus *et al.*, 2012). Sin embargo, desde el momento que los productos frescos se consumen crudos, pueden suponer un riesgo para la salud pública. Patógenos transmitidos por los alimentos puede ser introducidos en verduras frescas en cualquier momento durante su línea de producción. En el nivel de la pre-cosecha con el contacto de agua de riego contaminada, tierra, estiércol o materia fecal de animales salvajes es posible la contaminación. Patógenos transmitidos por los alimentos se pueden unir a las hojas de plantas y/o ser internalizado a través de las hojas o el sistema de raíces endofítica (Gu *et al.*, 2011).

Históricamente las frutas frescas raramente han sido incriminadas como vectores de ETAs. Se ha determinado que poseen barreras naturales como la piel, la cáscara, así como un pH ácido, que previenen o retardan el crecimiento de bacterias patógenas. Sin embargo, algunos frutos completamente maduros tienen valores de pH cercanos a 7, y una vez cortada y expuesta la parte interna a la contaminación ambiental, pueden servir como sustratos para el crecimiento de bacterias, tales como el melón y la sandía (Madden, J. M., 1992).

Durante las últimas dos décadas, las frutas y verduras recién cortadas y listas para utilizar han ganado popularidad como alimentos de conveniencia saludables. Sin embargo, las preocupaciones de seguridad con respecto a las frutas y verduras han aumentado debido al aumento del número de brotes de ETAs relacionadas con su consumo (Madden, J. M., 1992).

Otro factor que incide directamente en la calidad microbiana de este tipo de productos es el aumento de las importaciones para satisfacer las expectativas de los consumidores para una amplia variedad de frutas exóticas y verduras durante todo el año. Como los estándares de higiene en la cosecha, durante el almacenamiento, y de agua de riego pueden variar ampliamente en diferentes países, el potencial de contaminación de los productos puede verse incrementado y los consumidores pueden estar expuestos a altos números y/o cepas diferentes de patógenos. Productos importados de México han demostrado ser de una calidad microbiológica equivalente a muestras nacionales en los EE. UU. (Johnston *et al.*, 2006), pero una serie de brotes se han relacionado con productos importados, por ejemplo, lechuga importada en el Reino Unido desde España en el año 2005 (Takkinen *et al.*, 2005).

El aumento de los brotes relacionados con los productos frescos puede, en parte, atribuirse a los cambios en los hábitos de consumo. Una encuesta de la Agencia de Seguridad Alimentaria de Londres, concluyó que en el Reino Unido se mostró que el 63% de las personas utilizan los grandes supermercados en la mayoría de las compras de alimentos, mientras que sólo el 2% utilizó tiendas locales especializadas (Anónimo, 2007).

Si los artículos contaminados entran en las instalaciones de producción a gran escala, tal como ocurre en los supermercados, los productos finales afectados pudieran llegar a un mayor número de consumidores provocando brotes documentados, ya que estos serían mas propensos a ser identificados que los casos esporádicos cuyo número es desconocido. Por lo que una mejor comprensión del comportamiento de las bacterias enteropatógenas en las verduras debe ayudar a prevenir tanto los eventos de contaminación microbiana inicial así como su persistencia hasta el punto de venta (Heaton and Jones, 2007).

2.2 Contaminación de melón

Los brotes de ETAs asociados con frutas y verduras frescas se han casi triplicado desde 1973, y las enfermedades se han duplicado (Tauxe *et al.*, 1997). En el caso particular de los brotes documentados que han involucrado a los melones (cantaloupe, honey dew y sandías) fueron reportados a partir de la década de los 50s (Centers for Disease Control, 1979).

A pesar de los esfuerzos para eliminar la contaminación por patógenos de este tipo de productos antes de su consumo, los patrones de brotes indican que más de la mitad de estos brotes involucraron melones que fueron cortados y no se consumieron rápidamente, y como resultado, crecieron patógenos latentes en la corteza y en el interior de la fruta que es rica en azúcares (Escartin *et al.*, 1989) (Madden, 1992) tales como fructosa, glucosa y sacarosa, que aunado con el pH casi neutro hace a este fruto un sustrato ideal para el crecimiento bacteriano (Gagliardi *et al.*, 2002).

2.2.1 Fertilizantes orgánicos

El uso de fertilizantes orgánicos, como el estiércol de animales y lodos (Natvig *et al.*, 2002), desechos del matadero (Avery *et al.*, 2005), y los lodos de depuradora (Al-Ghazali and Al-Azawi 1990) pueden introducir patógenos directamente al campo y la escorrentía puede contaminar el agua de riego.

Existen algunas directrices generales para los agricultores que apoyan sobre el tratamiento de los desechos y el momento correcto de aplicación, con el fin de limitar la contaminación de los cultivos. En el Reino Unido, estas directrices se establecen en el

código Safe Matrix (ADAS), y se pueden encontrar en los Códigos de Buenas Prácticas Agrícolas (Departamento de Medio Ambiente, Alimentación y Desarrollo Rural) (Anónimo, 2001).

2.2.2 Calidad del agua de riego

La materia fecal, el suelo y otros insumos, como desbordamiento de aguas residuales pueden introducir enteropatógenos directamente a los cursos de agua de donde se puede extraer agua de riego. En el Reino Unido, el 71% del agua de riego se obtiene a partir de las aguas superficiales, que reciben efluentes de aguas residuales tratadas (Tyrell *et al.*, 2006). La posibilidad de contaminación en el agua de riego es mayor en el mundo en desarrollo, ya que las aguas residuales no tratadas se utilizan para el riego de alrededor del 10% de los cultivos (Anónimo, 2003).

Las aguas residuales de regadío en cultivos muestran un aumento en la incidencia de enteropatógenos (Steele and Odemeru 2004) en los frutos. Se han desarrollado modelos cuantitativos de evaluación de riesgos para el uso de agua regenerada que muestran que el riesgo varía entre los cultivos, por ejemplo, con lechuga se encontró un riesgo más alto que con el cultivo de pepino, pero comparable al de brócoli y repollo (Hamilton *et al.*, 2006).

También se ha establecido que el intervalo entre el riego y la cosecha puede afectar la probabilidad de que bacterias patógenas sobrevivan hasta llegar al consumidor. Una encuesta realizada en el Reino Unido a los productos que son base en ensalada de verduras demostró que más del 50% de ellos se cosecharon dentro de las 24 h del último riego (Tyrell *et al.*, 2006).

Varios brotes han sido relacionados con el uso de agua de riego contaminada. Lechuga Iceberg importada al Reino Unido y Finlandia, proveniente de España en el 2005 produjo casos de *S. typhimurium*, y en donde se utilizaron aguas residuales para el riego de estos cultivos (Takkinen *et al.*, 2005).

Los casos ocurridos por consumo de lechuga contaminada con *E. coli* O157:H7 en Suecia en 2005 se debieron a que las hortalizas fueron irrigadas con agua de un arroyo cercano contaminado con heces de ganado (Söderstöm *et al.*, 2005).

Beuchat (1996) informó de un brote atípico de norovirus relacionado con el apio y el riego de aguas residuales contaminadas, que dió lugar a brotes de hepatitis A asociado con el consumo de lechuga (Seymour y Appleton 2001) y cebollitas de primavera (Josefson 2003).

Se describieron brotes en el 2001 y 2003, relacionados con el consumo de lechuga (Seymour and Appleton 2001) y cebollas de primavera (Josefson, 2003) respectivamente, contaminadas con *E. coli* O157: H7. Los brotes se atribuyeron a que las hortalizas fueron regadas con agua contaminada por el pastoreo de ganado de campos cercanos. Solomon *et al.*, (2002) demostraron que *E. coli* O157:H7 contenida en agua contaminada era capaz de entrar en el sistema vascular de la lechuga y llegar a la parte comestible de la planta, aunque los autores señalan que las concentraciones de inóculo que se utilizaron fueron poco realistas.

2.2.3 Suelo

Los patógenos presentes en el suelo pueden ser nativos, por ejemplo, *Listeria* spp., o incorporados en la matriz del suelo a partir de desechos orgánicos añadidos como fertilizante. Los patógenos dentro del suelo pueden contaminar los cultivos directamente por contacto o bien debido al riego con pistola de lluvia o salpicaduras de agua a las hojas (Nicholson *et al.*, 2005).

La capacidad del patógeno para sobrevivir en el medio ambiente tendrá un impacto sobre la probabilidad de contaminación de los cultivos y la viabilidad del patógeno en la cosecha y hasta el consumo. Inicialmente, el patógeno debe sobrevivir en el entorno de propagación hasta que los cultivos se plantan, o en los desechos orgánicos aplicados a la tierra (Kudva *et al.*, 1998).

Kudva *et al.*, 1988, demostraron que la aireación de estiércol ovino disminuyó la supervivencia de *E. coli* O157:H7 de 365 a 120 días. Además se ha demostrado que el método de aplicación utilizado para residuos orgánicos puede aumentar el tiempo de supervivencia: la aglutinación de material aplicado sobre el suelo, y la aplicación de inyección de purines que consisten en una mezcla de orina, la parte líquida que rezuma de todo tipo de estiércoles de animales y usualmente agua que se forma de reunir los desechos de animales domésticos, principalmente cerdos de criadero se utiliza en la producción de composta, pueden proteger a las bacterias de la desecación y altas temperaturas (Hutchison *et al.*, 2004).

Se ha reportado que algunos patógenos se desarrollan mejor en ciertas temporadas durante el año. Esto puede resultar en una mayor cantidad de contaminante que se espera en la materia fecal en ciertas temporadas, por ejemplo el riesgo de contaminación por

Campylobacter aumenta en primavera y otoño (Stanley and Jones, 2003), y los niveles de *E. coli* se ven incrementados durante la primavera y el verano (Chapman *et al.*, 1997).

Si se produce un incremento en la concentración de patógenos presentes en el suelo donde se cultivan las hortalizas, entonces, simplemente, los siguientes pasos de la cadena de producción pueden no ser suficientes para prevenir la contaminación de los productos.

2.3 Microorganismos patógenos en melón

La naturaleza siempre cambiante de los agentes patógenos, incluida la aparición de cepas nuevas, está contribuyendo a un aumento en las enfermedades transmitidas por los alimentos (Bloomfield *et al.*, 2007). *E. coli* enterotoxigénica ha sido implicada en uno de los mayores brotes de origen alimentario reportados en los Estados Unidos hasta la fecha (Beatty *et al.*, 2006). Según el Sistema de Vigilancia de las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos de los Estados Unidos (1998 a 2002), el 31% de los brotes son atribuidos a microorganismos que contaminan alimentos y de ellos el 41% de los casos con etiología conocida se puede atribuir a norovirus humanos (HVN) (Lynch *et al.*, 2006), quienes actualmente son reconocidos como la causa más importante de enfermedades gastrointestinales infecciosas, con un número creciente de cepas virulentas circulantes (Blanton *et al.*, 2006).

La mala higiene personal de los trabajadores de servicios de alimentos, especialmente el lavado de manos incorrecto, contribuye significativamente al riesgo de enfermedades transmitidas por los alimentos (Todd *et al.*, 2008). La mayoría de las infecciones por HNV se atribuyen a la contaminación de los alimentos a través de las manos sucias o lavado indebido de los manipuladores de alimentos (Center for Disease Control and Prevention, 2010). El HNV tienen una baja dosis infecciosa (Teunis *et al.*, 2008), persisten en el medio ambiente, y son resistentes a la cloración y la congelación (Liu

et al., 2009). Estos factores contribuyen a un mayor riesgo de transmisión de enfermedad por estos virus. Productos muy sucios que se encuentran con frecuencia en entornos de servicio de alimentos en la preparación de alimentos, y los agentes antimicrobianos se considera que son menos eficaces en la presencia de dichos productos (Boyce and Pittet, 2002). En los EEUU el Código de alimentos de la FDA exige que los trabajadores de servicio de alimentos se laven las manos con un compuesto de limpieza a base de alcohol y agua antes de usar las manos e la preparación de los alimentos (FDA, 2009).

El aumento en frecuencia de *Salmonella* en frutas y hortalizas frescas en los Estados Unidos se ha correlacionado con un mayor número de casos de ETAs (Center for Disease Control and Prevention, 2000).

Desde que se ha reportado la asociación de ETAs con productos frescos como frutas y verduras, los melones han sido ligados de manera consistente a los brotes de infecciones por *Salmonella* en los Estados Unidos y Canadá. La FDA realizó un estudio epidemiológico de melones importados, en donde se encontró que 8 de 1,003 (0.8%) muestras fueron positivas para *Salmonella*, lo cual representó la segunda materia prima más frecuentemente contaminada (NCCLS, 2000) por este patógeno.

Por lo menos 10 brotes de ETAs debidas al consumo de melones han sido reportados históricamente en los Estados Unidos. De estos brotes, nueve han sido causados por *Salmonella* (Centers for Disease Control and Prevention, 2002) y uno por *E. coli* O157:H7, aunque en este último caso, los melones y otros artículos de la barra de ensaladas probablemente fueron contaminados durante su corte por una contaminación cruzada (Feng, P. 1995). Sin embargo, aún con toda la documentación existente, las fuentes y mecanismos de contaminación del melón aún no están totalmente entendidos.

En 1990 en los EEUU, se describió un brote multiestatal de grandes magnitudes (25,000 casos) provocado por *S. enteritidis* var. Chester ligado al consumo de esta fruta (Castillo *et al.*, 2004) y otro brote se reportó por *Salmonella enteritidis* var. Oranienburg,

en Canadá, sin embargo en este último no se encontró un vínculo directo en donde se establecieran a los melones como el vehículo responsable. Un brote adicional a los anteriores causado por *Salmonella enteritidis* var. Anatum se produjo en 2002 (FDA, 2006) y recientemente se reportó un brote de salmonelosis donde 51 personas se infectaron con el serotipo Litchfield (Centers for Disease Control and Prevention, 2008) provenientes de melones cultivados y empaquetados en Honduras. Este brote produjo una gran alerta de importación de melones procedentes de una empresa hondureña (FDA, 2008).

Históricamente, dos brotes de salmonelosis se han relacionado con melones mexicanos. En 1991 se reportó un brote causado por *Salmonella enteritidis* var Poona (Centers for Disease Control, 1991), y posteriormente en el 2000, 2001 y 2002, hubo episodios en donde se vinculó a melones importados de México como los vehículos causantes del problema. Otros serotipos que han causado infecciones asociadas con el melón incluyen *Salmonella enteritidis* var. Saphra, que también fue relacionado con melones importados de México. En contraste con los frecuentes brotes de salmonelosis relacionados con el melón, la prevalencia de este patógeno en este producto parece ser relativamente baja (Centers for Disease Control, 1991).

En respuesta a estos brotes, la FDA de los EEUU realizó una investigación en granjas de México y concluyeron que en las granjas productoras de los melones problema no estaban implementadas completamente las buenas prácticas agrícolas y las buenas prácticas de manejo, por lo que existía el riesgo de contaminación microbiana desde el cultivo y la cosecha, hasta el empaque y la refrigeración de los melones. Se reportó que las posibles fuentes de contaminación incluyeron el agua de riego contaminada con aguas residuales, agua contaminada utilizada en el riego de productos, las malas prácticas de higiene de los trabajadores y la inadecuada limpieza y desinfección de los equipos que estuvieron en contacto con los melones (Centers for Disease Control and Prevention, 2002). Desafortunadamente, sólo en pocos de los brotes investigados de producto fresco se ha

identificado claramente el punto de contaminación, lo que subraya la necesidad de estudios que apoyen este aspecto (I. E. Espinoza *et al.*, 2006).

Tras la imposición de alerta de importación contra los melones de México en 2002, el Gobierno de los EEUU, recientemente la FDA y el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) de México firmaron un acuerdo que permite la importación de melones de México sobre la base del nivel de seguridad alimentaria de sus operaciones (Alvarado *et al.*, 2010). Por lo que se han desarrollado diferentes estrategias para minimizar la presencia de bacterias patógenas en melones frescos, así la industria del melón ha desarrollado directrices voluntarias que se aplican específicamente a estos productos durante toda su cadena de suministro.

En un estudio binacional, granjas de melón de México y Estados Unidos fueron investigadas a fin de determinar la prevalencia de *Salmonella* y *E. coli* como indicadores de operaciones sanitarias (Castillo *et al.*, 2004). Durante este estudio, la planta de empaque fue identificada como el sitio con las mejores oportunidades para la contaminación bacteriana, lo cual concordaba con estudios anteriores (Johnson, *et al.*, 2005, 2006).

Los patógenos microbianos pueden contaminar los productos frescos en cualquier punto de la granja a la mesa del consumidor, siendo el campo un sitio idóneo para que esto ocurra a diferentes niveles: heces de los animales salvajes y domésticos, agua de escorrentía de las operaciones ganaderas, abonos verdes o una mala composta, aire (polvo), insectos, y agua de riego (Buchholz *et al.*, 2012). Además, después de la cosecha, los patógenos pueden entrar en contacto con productos frescos a través de los trabajadores de campo, el equipo de cosecha, los manipuladores y el agua utilizada para el enfriamiento o lavado, así como cajas incorrectamente limpiadas, bolsas, y cajas de almacenamiento y los vehículos utilizados para el transporte (Beuchat, 1996).

Las cepas patógenas de *E. coli* y norovirus humanos (HNV) son los principales agentes etiológicos de las enfermedades transmitidas por los alimentos resultantes de prácticas inadecuadas de higiene de las manos por los trabajadores de servicio de alimentos (Edmonds *et al.*, 2012).

Mientras que la mayor contaminación por patógenos se produce en el campo, las condiciones durante el procesamiento post-cosecha puede intensificar y difundir lo que normalmente sería un evento pequeño, aislado de contaminación a cantidades mucho más grandes de producto, lo que puede conducir a brotes generalizados (Beuchat *et al.*, 1997, 2001). Este fue el caso de un brote en Australia 2001 por *Salmonella* var. Bovismorbificans en donde se determinó que la causa fue producto residual ubicado detrás de la llanta de la rueda de corte de una trituradora de lechuga (Stafford *et al.*, 2002). Del mismo modo, una planta holandesa de procesamiento de lechuga se vió implicada en un brote de *E. coli* O157 asociada con lechuga picada y envasada, que enfermó a los consumidores, tanto en los Países Bajos como en Finlandia (Friesema *et al.*, 2008); y en Texas, el consumo de lechuga rallada contaminada con *Shigella* causó que los clientes de un restaurante se enfermaran y el cual pudo deberse a contaminación durante el procesamiento y manipulación del vegetal (Davis *et al.*, 1988).

Pocas estrategias distintas a la irradiación puede garantizar la seguridad de verduras para ensaladas verdes frescas cortadas. Se ha determinado que las prácticas actuales de lavado y desinfección reducen a *E. coli* O157: H7, *Salmonella* y otros patógenos sólo de 1 a 2 log CFU/g (Sapers, 2006) ya que se ha establecido que son muchos los factores asociados con la fijación microbiana al vegetal lo cual contribuyen a la ineficacia de las estrategias de control. Fett (2000) sugirió que el biofilm natural en las semillas germinadas pueden proteger a *Salmonella* y *E. coli* O157: H7 de la inactivación por los desinfectantes químicos. Además se ha determinado que durante el transporte y lavado, *E. coli* puede penetrar en las grietas, hendiduras, superficies cortadas o heridas, y los espacios intercelulares de la lechuga (Seo and Frank, 1999), por lo que las estrategias de

desinfección o eliminación física son prácticamente imposibles. (Takeuchi and Frank, 2000).

2.3.1. *Escherichia coli*

E. coli, originalmente conocida como *Bacterium coli*, fue identificada en 1885 por Theodor Escherich. Esta bacteria se encuentra ampliamente distribuida en los intestinos de humanos y animales de sangre caliente; es una bacteria en forma de bacilo Gram-negativa típica de la familia *Enterobacteriaceae*. Los miembros de esta familia se caracterizan por tener un metabolismo anaerobio facultativo. En particular, *E. coli* metaboliza principalmente azúcares sencillos como la glucosa y lactosa, produciendo ácido a partir de estos. Además, algunas de las cepas son móviles y reaccionan positivamente a la prueba de indol. Esta bacteria es de naturaleza mesofílica, es decir, su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C (FDA, 2002).

E. coli normalmente se encuentran en el intestino de los humanos como comensales, sin embargo, algunas cepas pueden ser patógenas, las cuales se clasifican en seis grupos:

2.3.1.1. *E. coli* enterotoxigénica

Las cepas pertenecientes al tipo enterotoxigénico (ETEC) son consideradas como el prototipo de la cepa diarreica. Estos organismos colonizan la superficie de la mucosa del intestino delgado por medio de fimbrias. Estas fimbrias tienen una regulación compleja, ya que los genes estructurales (*cs1*, *cs2*, *cs3*) se encuentran en el cromosoma, sin embargo, su regulación depende del gen plasmídico *rms* (Caron *et al.*, 1989). Una vez adheridas al intestino, las cepas ETEC elaboran las toxinas termolábil (LT) y/o termoestable (ST), las

cuales son transportadas al interior de la célula del hospedero causando una diarrea profusa (Kenneth *et al.*, 2006).

2.3.1.2. *E. coli* enteropatógena

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

2.3.1.3 .*E. coli* enteroagregativa

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

2.3.1.4. *E. coli* enteroinvasiva

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

2.3.1.5. *E. coli* de adherencia difusa

E. coli adherente difusa (DAEC) es la cepa más difícil de clasificar. Este grupo causa estructuras como “dedos” en las células epiteliales del intestino, las cuales embeben a la bacteria, causando diarrea líquida, principalmente en niños (Beinke *et al.*, 1998). En cepas aisladas de pacientes en Brasil y Alemania se observó que secretaron homólogos a la señal de transducción *espB* observada en las cepas EPEC. El nombre de este grupo proviene del tipo característico de adherencia de estas bacterias a las células HEp-2 en cultivos de líneas celulares. Es la categoría menos definida de *E. coli* causante de diarrea. Los datos de varios estudios epidemiológicos sobre la diarrea pediátrica en países en desarrollo, han indicado que *E. coli* adherente difusa es mucho más frecuente en los niños con diarrea que en los niños sin diarrea de iguales características. Esta cepa no produce toxinas ST o LT, ni niveles elevados de toxinas Shiga (Doyle *et al.*, 2007).

2.3.1.6. *E. coli* enterohemorrágica

Estas cepas se consideran como la principal causa de colitis hemorrágica o diarrea con sangre y se caracterizan por la producción de verotoxinas o toxinas parecidas a Shiga (Stx). Las toxinas Stx1 y Stx2 son las que han estado más relacionadas en las ETAs humanas. El principal reservorio de EHEC es el ganado bovino y los primeros brotes causados por esta bacteria fueron asociados al consumo de carne de hamburguesa mal cocida. Posteriormente, consumo de agua contaminada y una gran variedad de alimentos se han relacionado con las enfermedades causadas por EHEC, incluyéndose salsas, leche no pasteurizada, lechuga, melón, sidra de manzana y rábanos. Este último producto, fue responsable de un brote que ocasionó 8,000 casos de infección en Japón (Nataro *et al.*, 1998). Se ha determinado que la transmisión puede darse de persona a persona y el serotipo O157:H7 es el más común en Norte América, Reino Unido y Japón, aunque muchos otros serotipos, particularmente aquellos como el O26 y O111, pueden causar también enfermedad, e incluso ser más prominentes que el O157:H7 en algunos países. Otra característica que diferencia al serotipo O157:H7 de otras *E. coli*, es que exhiben ausencia o poca fermentación del sorbitol y no tienen actividad glucuronidasa, por lo que estas características son usadas para aislar e identificar a este patógeno a partir de muestras biológicas (Nataro *et al.*, 1998).

Al ser ingerida la bacteria con el alimento contaminado, se puede causar gastroenteritis en humanos. Se ha estimado que la dosis infectiva puede ser tan baja como 10 células, aunque algunos estudios han reportado que generalmente es entre 10^3 y 10^4 UFC por gramo (Cornick and Helgerson, 2004). Su periodo de incubación puede ir desde doce horas hasta 10 días y los síntomas que genera incluyen diarrea, vómito y dolor abdominal. La gastroenteritis puede complicarse y causar colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH) (Doyle *et al.*, 2007).

Un gran brote de síndrome hemolítico-urémico causado por STEC O104:H4 fue vinculado a brotes ocurridos recientemente en Alemania (Buchholz *et al.*, 2011). Aunque hay algunos estudios sobre la calidad microbiológica de productos frescos listos para el consumo en la bibliografía (Abadias *et al.*, 2008), la mayoría de estos estudios se realizó en países donde a los productos mínimamente procesados frescos, los fabricantes los tratan con lavados a base de cloro como el procedimiento de descontaminación. Sin embargo, en Suiza, y en otros países de la Unión Europea, no se permite el uso de soluciones de cloro para desinfectar frutas y verduras en la industria recién cortada (Anónimo, 2004).

En septiembre de 2006, el consumo de espinacas contaminadas con *E. coli* O157:H7 provocó un brote en 26 estados de Canadá, dando como resultado cinco muertos y 205 enfermos (Jay *et al.*, 2007).

Se ha establecido que productos preparados como ensaladas embolsadas, pueden proporcionar las condiciones para la proliferación y supervivencia de patógenos humanos. Se ha demostrado que las superficies cortadas exudan nutrientes, que pueden ser utilizados para el crecimiento de patógenos como *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*, los cuales son capaces de unirse a las superficies de corte de las hojas de lechuga y penetrar en el tejido interno, lo que las hace muy resistentes a la acción de desinfectantes químicos (Takeuchi and Frank, 2000).

E. coli O157:H7 pueden ser aislados de las heces de ganado, por lo tanto, su presencia en el estiércol de animales y lodos es inevitable (Kudva *et al.*, 1998). Además de los animales de granja, *E. coli* O157:H7 pueden estar presentes en las heces de las aves silvestres, por ejemplo, estorninos (Moller *et al.*, 2004) y gaviotas (Wallace *et al.*, 1997).

2.4. *Salmonella* spp.

El género *Salmonella* fue denominado así en honor del microbiólogo estadounidense D. E. Salmón. Las salmonellas comprenden más de 2,200 serotipos descritos según el esquema de Kauffman-White (Koneman *et al.*, 1999).

En la actualidad, a la mayoría de las salmonellas se les clasifica en dos únicas especies: *S. entérica* y *S. bongori*. Y estas especies se agrupan en serovariedades, por ejemplo: *Salmonella entérica* serovariedad Typhi (Institute of Food Technologist, 2000).

Este género incluye bacilos gran negativos, móviles por medio de flagelos peritricos, anaerobios facultativos no formadores de esporas, que fermentan la glucosa generalmente con producción de gas, pero que normalmente no fermentan lactosa. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C. Según reportes, estos microorganismos se han aislado a partir de agua, suelo, insectos, superficies de cocina, carnes crudas y heces (Wallace *et al.*, 1998).

Estas bacterias producen principalmente cuadros gastrointestinales, fundamentalmente asociados a intoxicaciones alimentarias con una alta incidencia en los países desarrollados. También bacterias de este género son causantes de las fiebres tifoideas y paratifoideas (*S. var Typhi* y *S. var Paratyphi A, B y C* respectivamente) (Dorrnsoro Ibero, 2005).

Salmonella spp. es el agente etiológico más comúnmente identificado asociado con los productos frescos relacionados con infecciones; aislada en el 48% de los casos entre

1973 y 1997 en los EEUU (Sivapasingham *et al.*, 2004), y en el 41% de los casos durante 1992-2000 en el Reino Unido (Health Protection Agency Figures).

Durante el año 2006, dos brotes de *Salmonella* fueron relacionados con consumo de tomate de en los EEUU, lo cual representó el 23% de los casos reportados de *Salmonella* (CDC 2007) en ese año. Además del tomate, una gama de productos frescos de frutas y verduras han sido implicados en la infección por *Salmonella*, tales como lechuga, semillas germinadas y melón.

Los síntomas característicos de una enfermedad gastrointestinal causada por *Salmonella* incluyen náuseas, calambres abdominales, diarrea, fiebre y dolor de cabeza. El tiempo de incubación es generalmente 6 a 48 h y se ha reportado una dosis infecciosa de 10^5 hasta 10^9 UFC/ml dependiendo de la edad y la salud del huésped. Los síntomas pueden prolongarse hasta 2 meses dependiendo de los factores inmunológicos del huésped, la dosis ingerida y características de la cepa (Wallace *et al.*, 1998).

A pesar de que la *Salmonella* es la causa más común de brotes de enfermedad asociados con los productos frescos, incluyendo coles, melones, tomates y lechugas (Emberland *et al.*, 2007), hay otros patógenos (*L. monocytogenes*, *E. coli* [STEC] productor de toxina Shiga y norovirus) que se han descrito como peligros microbianos relevantes (Anónimo, 2012).

2.5 El aumento de consumo de frutas y hortalizas frescas

El consumo de productos frescos ha aumentado (Anónimo, 2007), principalmente debido a una mayor conciencia de los beneficios de una dieta saludable y el impacto de la 'Five a Day' y 'Nine a Day' (cinco al día y nueve al día respectivamente) de las campañas gubernamentales en el Reino Unido y EE.UU. Esto ha dado lugar a una creciente demanda

de frutas y verduras mínimamente procesadas, envasadas y listas para su consumo (Everis 2004), así como la disponibilidad de los productos fuera de temporada.

2.5.1 Contaminación de frutas y hortalizas

El consumo de frutas y hortalizas es comúnmente visto como un factor de riesgo potencial para la infección con enteropatógenos como *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 ya que los recientes brotes han ocurrido ligados a lechuga, espinacas y tomates. Las fuentes de contaminación son variadas, e incluyen la aplicación de desperdicios orgánicos a los suelos agrícolas como fertilizantes, contaminación de agua de riego con materia fecal de diversas fuentes, contaminación directa por ganado, animales silvestres y aves y cuestiones post-cosecha como es el caso de la higiene de los trabajadores (Heaton and Jones., 2007).

Dado el actual énfasis en los hábitos alimenticios saludables en los Estados Unidos, incluyendo el aumento del consumo de ensaladas, los brotes transmitidos por los alimentos asociados con verduras de hoja verde, lamentablemente son cada vez más frecuentes (USDA, 2005).

El consumo de verduras de hoja verde aumentó sólo el 9% de 1996 a 2005, en comparación con la década anterior, sin embargo, el número de brotes asociados a productos de hojas verdes se incrementó a un 38.6% durante el mismo período (Herman *et al.*, 2008). Por lo tanto, la confianza de los consumidores en la seguridad de vegetales de hojas verdes ha disminuido. En 2009, el Centro para la Ciencia en el Interés Público (Center for Science in the Public Interest. 2009), ocuparon las verduras de hoja verde, tales como espinacas, en la cima del Top Ten de la FDA como los alimentos más riesgosos.

Los cambios en las prácticas agrícolas, incluidos los de gran producción centralizada y las prácticas de recolección, son en parte responsables del aumento del

número de brotes relacionados con hojas verdes. Desde 1990, 19 brotes fueron asociados específicamente con el consumo de verduras de hoja verde (Center for Science in the Public Interest, 2008), muchas de las cuales se remontan a los productos cultivados en granjas de gran escala en el Valle de los Salinas en California.

Adak *et al.*, (2005) calcularon el riesgo de contraer enfermedades al consumir ciertos grupos de alimentos, y reportaron una tasa de riesgo bajo para las ensaladas de vegetales, aunque otros autores han reportado que los productos frescos tienen un impacto considerable en la incidencia de enfermedades en la población (Heaton and Jones, 2007).

2.6 Microorganismos indicadores

Durante los últimos años, el consumo de verduras frescas ha ido en aumento ya que los consumidores se esfuerzan por comer una dieta saludable, aunada a que la disponibilidad de estos productos, hasta hace poco considerados como estacionales, se ha extendido durante todo el año. Además, el consumo de "cuatro grupos" de verduras, un término que se refiere al envasado, limpieza, picado y, posiblemente, mezcla de verduras listas para ser sazonadas y consumidas, ha ganado popularidad entre los consumidores. Las verduras frescas normalmente llevan naturalmente microorganismos epífitos no patógenos, pero durante el crecimiento, cosecha, transporte y aún más el manejo del producto pueden contaminarse con patógenos de origen animal y humano (Aarestrup *et al.*, 2008).

Como con frecuencia muchos de estos productos se consumen sin un lavado adecuado, su contenido microbiano puede representar un factor de riesgo para la salud del consumidor y por lo tanto un problema de seguridad alimentaria. (Hamilton *et al.*, 2006).

La epidemiología de las enfermedades transmitidas por los alimentos ha cambiado rápidamente en las últimas décadas ya que algunos patógenos humanos importantes fueron reconocidos por haberse extendió a los reservorios animales, y vegetales frescos, por lo que estos se han convertido en nuevos vehículos para la transmisión de estas enfermedades infecciosas. La mayoría de los brotes notificados de enfermedades gastrointestinales relacionadas con los productos frescos se han asociado con la contaminación bacteriana, particularmente con los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Tyler and Triplett, 2008).

Además, la presencia de resistencia a los antibióticos, tanto en microorganismos de la flora normal y patógenos presentes en verduras frescas pueden contribuir a la difusión horizontal de la resistencia entre especies y géneros de microorganismos presentes. La presencia de genes de resistencia facilita la distribución de la resistencia y el uso indiscriminado de antibióticos permite la selección directa o co-selección de resistencia (De la Cruz and Davies, 2000).

Los hospitales y actividades ganaderas son las principales áreas de desarrollo de resistencia a los antibióticos. El uso de grandes cantidades de antibióticos en prácticas agrícolas podría conducir a la selección de bacterias resistentes, la aplicación de estiércol no tratado a los campos agrícolas o el uso de agua contaminada para el riego también pueden propagar bacterias resistentes. Estos microorganismos que sirven como reservorio de determinantes de resistencia pueden tener gran influencia en la transferencia de genes de resistencia en los hábitats naturales, tales como las superficies vegetales o del colon humano. Por lo tanto, la presencia de bacterias resistentes a antibióticos en vegetales frescos constituye una preocupación adicional para la seguridad del consumidor (Falomir *et al.*, 2010).

Algunos patógenos de origen fecal que han contaminado frutas y verduras son capaces de transmitir y desarrollar enfermedades. Pruebas de laboratorio indican que una amplia gama de patógenos (incluyendo virus, bacterias, protozoarios y helmintos) para humanos sobreviven y pueden transmitirse a través de frutas y hortalizas frescas. Debido a lo anterior, es indispensable estar monitoreando la presencia de microorganismos en estos productos de manera rutinaria (Beuchat 1996, Beuchat and Ryu 1997). Dado que el análisis rutinario de todos los patógenos en una misma muestra no son factibles, la inocuidad de las frutas y hortalizas procedentes de estos patógenos puede ser asegurada por la determinación de microorganismos indicadores. El sistema de indicadores más comúnmente utilizados para el estado sanitario de alimentos en general es el recuento de microorganismos coliformes.

En general se reconoce que la presencia de coliformes indica un mal estado sanitario y, por tanto, riesgo de que existan microorganismos patógenos. Además de los coliformes, los estreptococos fecales son habitantes comunes del tracto intestinal de humanos y animales inferiores, y por lo tanto pueden también ser utilizados como indicadores de contaminación fecal (Toranzos and McFeters 1997).

Antiguamente las esporas de *Clostridium perfringens* se consideraban buenos indicadores de contaminación fecal, así como un trazador de la contaminación pasada (Payment and Franco, 1993). Los colifagos se han sugerido como indicadores de contaminación en aguas naturales y como indicadores de virus entéricos principalmente en agua potable (Payment and Franco, 1993). Se ha investigado la distribución de colifagos en productos alimenticios como las verduras frescas, y se encontró una correlación entre las bacterias coliformes y los colifagos (Kennedy *et al.*, 1986). Sin embargo, más datos sobre la distribución e interrelación de los microorganismos indicadores en la superficie de los vegetales debe ser acumulada antes del establecimiento de normas para la importación/exportación de frutas y hortalizas mediante la evaluación de riesgos de estos indicadores (Hirotani *et al.*, 2001).

2.7 Colifagos

Los bacteriófagos (fagos) son virus que sólo utilizan bacterias como hospedadores para su replicación. Los colifagos utilizan *E. coli* y otras especies emparentadas próximamente con ella como hospedadores y, por lo tanto, pueden ser liberados por ellos a las heces humanas y de otros animales de sangre caliente. Los colifagos que se utilizan en la evaluación de la calidad del agua se dividen en dos grupos principales: colifagos somáticos y colifagos de ARN F-específicos (específicos para *E. Coli* F+). Una de las diferencias entre ambos grupos es la vía de infección (Mooijman *et al.*, 2001).

Los colifagos somáticos inician la infección uniéndose a receptores ubicados permanentemente en la pared celular de los hospedadores; suelen replicarse en el aparato digestivo de los animales de sangre caliente, pero también pueden hacerlo en medios acuáticos. Los colifagos somáticos incluyen una gran variedad de fagos (que pertenecen a las familias *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* y *Microviridae*) con diferentes tipos morfológicos (Storey and Ashbolt, 2001).

Los colifagos de ARN F-específicos inician la infección uniéndose a las fimbrias de fertilidad (fimbrias F- o sexuales) de las *E. coli* hospedadoras, que producen exclusivamente las bacterias portadoras del plásmido de fertilidad (F). Dado que las fimbrias F se producen únicamente en la fase de crecimiento logarítmico a temperaturas superiores a 30 °C, no es probable que los colifagos de ARN F-específicos sean capaces de replicarse en ambientes diferentes del aparato digestivo de los animales de sangre caliente (Ashbolt *et al.*, 2001).

Los colifagos de ARN F-específicos son un grupo reducido de fagos con un parentesco próximo que pertenecen a la familia *Leviviridae* y que comprenden un genoma

de ARN monocatenario y una cápside icosaédrica, con una morfología similar a la de los picornavirus. Se han clasificado en los tipos serológicos I-IV, cuyos genotipos pueden identificarse mediante técnicas moleculares como la hibridación con sondas genéticas. Hasta la fecha, los virus de los grupos I y IV se han encontrado exclusivamente en heces animales y los del grupo III en heces humanas. Los fagos del grupo II se han detectado en heces humanas pero no en heces de animales, excepto en aproximadamente el 28% de las heces porcinas. Esta especificidad, que aún no se entiende por completo, proporciona un posible instrumento para distinguir entre la contaminación fecal de origen humano y la de origen animal, bajo ciertas condiciones y con limitaciones (Ashbolt et al., 2001).

Los colifagos tienen muchas características en común con los virus humanos, como su composición, morfología, estructura y modo de replicación. Por lo tanto, los colifagos son sustitutos o modelos útiles para evaluar el comportamiento de los virus entéricos en medios acuáticos y su sensibilidad a los procesos de tratamiento y desinfección (Schaper M *et al.*, 2002). A este respecto, son más útiles que las bacterias fecales. Sin embargo, no hay correlación directa entre la concentración de colifagos y la de virus entéricos. Además, no se puede confiar completamente en los colifagos como índices de virus entéricos, como se ha confirmado mediante el aislamiento de virus entéricos en aguas de consumo tratadas y desinfectadas que habían dado resultados negativos en análisis convencionales de colifagos (Grabow, 2001).

Los colifagos de ARN F-específicos son indicadores de contaminación fecal más específicos que los colifagos somáticos. También son mejores indicadores del comportamiento de los virus entéricos en medios acuáticos y de su respuesta a los procesos de tratamiento y desinfección, según han confirmado estudios comparativos del comportamiento y la supervivencia de colifagos de ARN F-específicos, colifagos somáticos, bacterias fecales y virus entéricos. Los datos disponibles indican que la especificidad de los diferentes serogrupos (genotipos) de colifagos de ARN F-específicos en excrementos humanos y animales podría resultar útil para distinguir entre contaminación

fecal de origen humano y animal. Sin embargo, hay limitaciones y datos contradictorios que quedan por resolver, y todavía no se ha determinado claramente la posible aplicación práctica de este instrumento. Debido a las limitaciones de los colifagos, es mejor reservar su utilización para investigaciones de laboratorio, estudios preliminares y, posiblemente, pruebas de validación. Hasta este momento, no son adecuados para el monitoreo operativo o de verificación (incluida la vigilancia) (Mooijman *et al.*, 2001).

Las personas y animales excretan cantidades relativamente pequeñas de colifagos. Debido a sus diferentes modos de replicación y especificidad de hospedador, los colifagos somáticos son excretados, generalmente por la mayoría de las personas y animales, mientras que los colifagos de ARN F-específicos son excretados por una proporción variable y generalmente menor de personas y animales. Según los datos disponibles, en algunas poblaciones, pueden detectarse colifagos de ARN F-específicos en el 10% de las muestras fecales humanas, el 45% de las bovinas, el 60% de las porcinas y el 70% de las de aves de corral. Además, se ha comprobado que en los medios acuáticos hay generalmente unas 5 veces más colifagos somáticos que colifagos de ARN F-específicos, y unas 500 veces más que virus humanos citopatógenos, aunque estas proporciones varían considerablemente (Storey and Ashbolt, 2001).

Las aguas residuales contienen del orden de 10^6 a 10^8 colifagos somáticos por litro, y un estudio detectó hasta 10^{10} colifagos somáticos por litro en aguas residuales de mataderos. Hay indicios de que los colifagos somáticos pueden multiplicarse en aguas residuales, y también en medios acuáticos naturales utilizando hospedadores saprófitos. Se han detectado hasta 10^5 colifagos somáticos y colifagos de ARN F-específicos por litro en aguas de ríos y lagos (Schaper M *et al.*, 2002).

Dado que los colifagos se replican típicamente en el aparato digestivo de las personas y de otros animales de sangre caliente, su presencia en el agua de consumo es un

índice de contaminación fecal y, por lo tanto, de la posible presencia de virus entéricos y, posiblemente, de otros agentes patógenos. La presencia de colifagos en el agua de consumo también indica fallos en los procesos de tratamiento y desinfección diseñados para la eliminación de virus entéricos. (Storey and Ashbolt, 2001)

HIPOTESIS

El melón cantaloupe (*Cucumis melo* L.) que se produce en la región de Parras, Coahuila, es susceptible a contaminación en diferentes puntos de la cadena de producción.

OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

Determinar los puntos críticos en donde se puede producir contaminación durante el proceso de producción del melón cultivado en la región de Parras, Coahuila.

4.2 Objetivos particulares.

- Realizar muestreos en los diferentes puntos de la producción de melón (campo, distribución y empaque) cultivado en la región de Parras, Coahuila.
- Estimar los niveles de microorganismos indicadores y de los microorganismos patógenos *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7 que se encuentran en suelo, producto, agua de irrigación, de fuente y manos de pizcadores durante los diferentes niveles la producción de melón.
- Determinar los puntos que son más susceptibles de contaminación y que pueden afectar la calidad del melón producido en la región de Parras, Coahuila.

MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Muestreo

Las muestras se colectaron en la región de Parras de la Fuente, Coahuila durante los meses de junio a agosto del 2011 y 2012.



Ubicación: se localiza al sur del estado de Coahuila, un área compuesta por abundantes mantos freáticos que limitan con los municipios de Cuatro Ciénegas, Ramos Arizpe, Viesca, Saltillo, General Cepeda y San Pedro, dentro de la entidad, y al sur con el estado de Zacatecas (INEGI).



La mayor parte del año el clima es semiseco templado en el sur y suroeste del municipio, mientras que en el norte y noroeste es semicálido, aunque también se presentan lluvias escasas en los meses de noviembre a marzo (INAFED). En invierno, las bajas temperaturas que pueden presentarse favorecen las heladas y granizadas.

En este espacio geográfico, el milagro de la vida se da durante los meses de lluvia, de abril a octubre, gracias a la presencia de manantiales que emanan de las sierras vecinas de Parra, Hoja señal, Playa Madero y El Laurel, los cuales abastecen de agua a la región, convirtiéndola en un verdadero oasis en el desierto en donde abundan las vides y nogales (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática).

5.2. Obtención de muestras

Las muestras se tomaron en base a la cadena de producción. Se definió como cadena, todo el proceso que siguió la muestra, incluyendo su cultivo (precosecha y cosecha), el punto de distribución y de empaque.

Las muestras se obtuvieron por un modelo completamente aleatorio, en donde se utilizó una tabla de números al azar para tomar las muestras (Anexo 1). Las muestras se tomaron a lo largo de la cadena e incluyeron

15. Producto (melón): hasta 4 muestras por cadena (correspondientes a las tomadas en campo precosecha, en campo después de su cosecha, empaque y distribución).
16. Suelo: 1 muestra por cadena.
17. Enjuague de manos de manipuladores: hasta 3 muestras por cadena (en campo, empaque y distribución).
18. Agua: hasta 2 muestras por cadena (en sitio y fuente).

En todos los casos, se tomaron 3 muestras correspondientes a tres puntos de cada huerta, de acuerdo a la tabla de números al azar. Las tres muestras se combinaron para tener una muestra compuesta, la cual fue la que se utilizó para todas las determinaciones.

5.3.1 Producto (melón)

Se determinó que el tamaño de la muestra de producto correspondía a la superficie de dos melones.

Para cada uno de los puntos (pre cosecha, cosecha, empaque y distribución) se tomaron tres muestras de enjuague de 2 melones, cada uno de un sitio seleccionado al azar mediante la tabla de números referida anteriormente y se anotaron las coordenadas de los sitios con ayuda de un aparato GPS. Los melones fueron colectados por nosotros en el caso de pre cosecha, empaque y distribución, y se pidió a un manipulador de la huerta que colectara los melones en el caso de muestras de melón durante de cosecha. En todos los casos, estos se colocaron en una bolsa con 500 ml de agua peptonada al 0.1%. Posteriormente la bolsa se cerró y se agitó vigorosamente, a fin de arrastrar el material pegado en la superficie del melón, por espacio de 5 min. Esto se repitió en cada uno de los 3 puntos seleccionados, para finalmente mezclar los enjuagues y hacer la muestra compuesta. La muestra se guardó en una hilera con geles fríos.



Figura 1. Melones antes de cosechar

5.3.2. Suelo

Para la toma de muestra de suelo se seleccionó el sitio de donde se colectaron las muestras de los melones. Los cucharones utilizados para tomar la muestra se encontraban estériles y se utilizaron guantes de látex para colectar cada muestra, la cual se tomó de la siguiente manera: se insertó el cucharón estéril en el suelo a un ángulo de 45° y a una profundidad de 5 cm.

Se colectaron siete muestras de aproximadamente 30 g cada una en un perímetro circular dentro de 30 cm de donde se encontraba el melón analizado. Las muestras de suelo se colocaron en una bolsa estéril Nasco de 250 ml quedando de esta manera la muestra compuesta. Este mismo procedimiento se realizó en los tres puntos seleccionados donde se realizó el muestreo del melón. Finalmente las muestras de los tres puntos fueron combinadas para formar la muestra compuesta que consistió de un mínimo de 100g de suelo. La muestra se guardó en una hilera con geles fríos.



Figura 2. Toma de muestra de suelo.

5.3.3. Agua

Se determinó que el muestreo de agua sería de dos tipos: el agua de irrigación, que corresponde al agua que va del pozo/fuente por las cintillas localizados a lo largo de los campos para abastecer de agua a los melones, y el agua de la fuente que se refiere al agua de pozo que es la matriz de agua de las huertas. Para este caso se utilizaron recipientes de volúmenes 2 y 5 l respectivamente.

Se colectaron tres muestras de agua de irrigación, correspondiendo al punto más cercano de donde se colectó el fruto y suelo. Para ambos casos, se sanitizó el área exterior de la manguera, tubería, o llave con una torunda impregnada con hipoclorito de sodio al 10%. Se dejó correr el agua por aproximadamente 30 segundos y se colectó la muestra (1.5 l). Se etiquetó el recipiente y se mantuvo en hieleras con geles fríos.

Para el caso del agua de irrigación se obtuvo la mezcla compuesta al mezclar las muestras colectadas en los 3 puntos de la huerta.



Figura 3. Sistema de riego en huerta melonera.

5.3.4. Enjuague de manos manipuladores

Se seleccionó al empleado de la huerta que se encontraba trabajando en el punto más cercano al lugar en donde se tomaron las muestras de agua, suelo y melones de cada punto de la huerta. Se le leyó el consentimiento informado (Anexo 2) y en caso de que estuviera de acuerdo en colaborar en el estudio, se procedió con el proceso. Se le solicitó que se enjuagará ambas manos en una bolsa nasco con 750 ml de agua peptonada al 0.1%, para esto, se abrió la bolsa Nasco y el empleado metió las dos manos en el agua hasta las muñecas y se frotó las manos como simulando las estuviera lavando por 30 segundos, seguido de un masaje nuestro por fuera de la bolsa, asegurando masajear cada dedo, las dos palmas y las dos muñecas.

Una vez que el empleado realizó el enjuague de sus manos con cuidado se le ofreció un papel secante con el que se secó las manos y se le agradeció por su colaboración. Para este caso se obtuvo la mezcla compuesta al mezclar las muestras colectadas en los 3 puntos de la huerta, y se almacenó en una hielera con geles fríos.

5.4 Determinación de la carga microbiana presente en los diferentes constituyentes de la cadena de producción.

5.4.1 Determinación de organismos indicadores de contaminación

En este caso se utilizaron las muestras compuestas recolectadas en campo de enjuague de manos, melones, así como la de agua y suelo. En el caso de suelo, 25g de la muestra compuesta fue homogenizada en 225 ml de agua peptonada y después de dejar reposar 10 min la parte superior fue utilizada para las determinaciones posteriores.

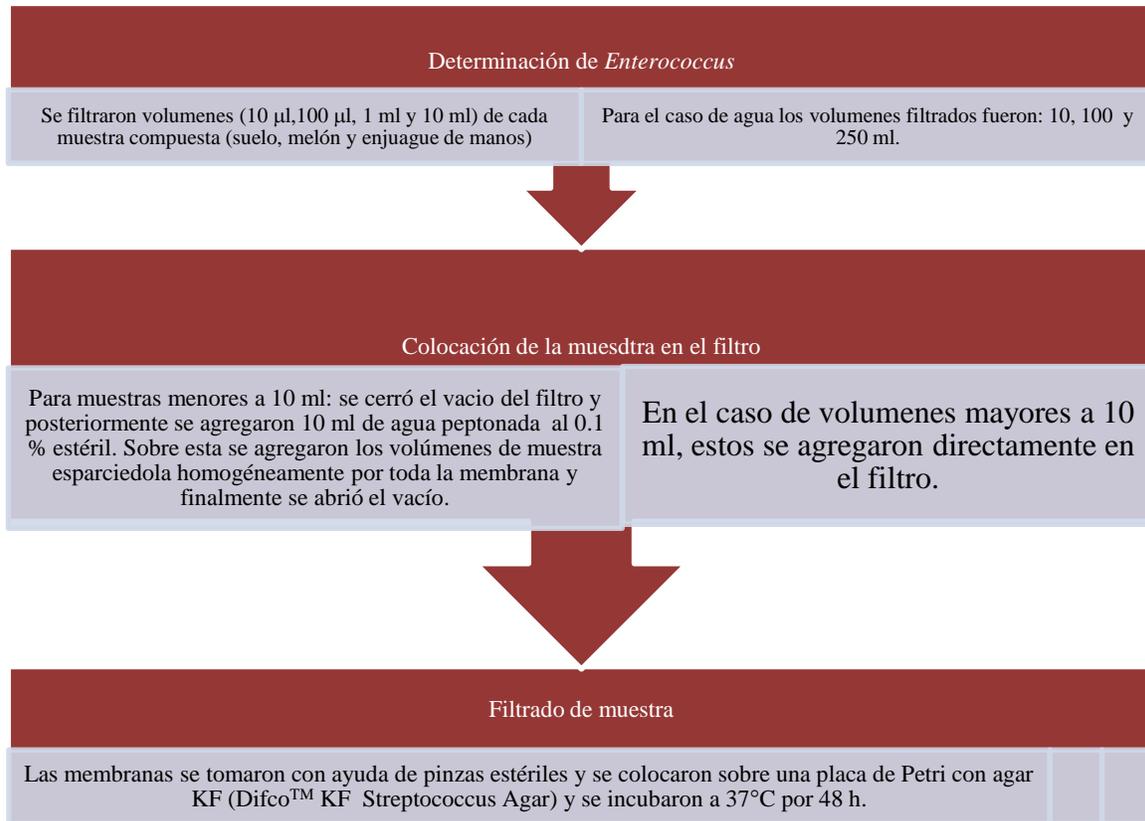
El análisis de microorganismos indicadores (*Enterococcus*, *E. coli* y coliformes) se realizó mediante un sistema de filtración con vacío, utilizando para esto el sistema de filtración Pall (Pall Corporation), y membranas de 0.45 μm de diámetro. En este caso se colocó el sistema tal y como se indica a continuación:



Figura 4. Sistema de filtración

5.4.1.1. Recuento de *Enterococcus*

Se realizó tal y como está especificado en el siguiente diagrama:



Todos los ensayos se hicieron por duplicado. Transcurrido el tiempo de incubación se contaron las colonias características (colonias pequeñas de 0.5 cm de diámetro, color marrón como se muestra en la figura 5) eligiendo las placas que contuvieran entre 25 a 250 colonias.



Figura 5. Colonias de *Enterococcus faecalis* en agar KF.

5.4.1.2. Coliformes fecales y *Escherichia coli*

Se realizó de la misma manera que para el recuento de *Enterococcus*, con la diferencia de que en este caso los volúmenes filtrados fueron 100 μ l, 1 ml, 10 ml y 50 ml para suelo, enjuagues de melón, y manos de trabajadores. En tanto que los volúmenes filtrados para el agua colectada fue de 10 ml, 100 ml y 250 ml. En esta determinación las membranas con los filtrados fueron colocados sobre placas con agar Rapid *E. coli* 2 e incubadas a 45°C/24 horas. Las colonias características (colonias verdes para coliformes fecales como se muestra en la figura 6 y colonias moradas para *E. coli* como se muestra en la figura 7), fueron contadas en aquellas placas que contenían entre 25 y 250 colonias. Todos los ensayos se hicieron por duplicado, eligiendo las placas que contuvieran entre 25 a 250 colonias.



Figura 6. Colonias de *E. coli* genérica en agar Rapid *E. coli* 2.



Figura 7. Coliformes fecales en agar Rapid *E. coli* 2

5.4.2. Colifagos DNA somáticos

Se utilizó el sistema comercial FastPhage™ NMP de la Compañía Charm Sciences, basado en una técnica miniaturizada de número más probable (NMP) siguiendo la metodología descrita por la compañía manufacturera:

- Se tomaron 100 ml de muestra de agua en un recipiente estéril, Se añadió el sobre del medio STEP-2 a la muestra, dejando que se disolviera y se dispersara. Se colocó la muestra a 37°C en baño de agua para precalentar la muestra por alrededor de 15 min.
- Mientras finalizó esta incubación, para cada muestra analizada, se le añadieron 5 ml de solución salina a tubos de ensaye, se agregó una tableta de *E. coli* previamente proporcionada en el Kit, se mezcló el contenido por 5 a 10 seg para disolver la tableta y posteriormente se dejó asentar y reposar por 10 min.
- Se vació el material no sedimentado en el medio rehidratado previamente que contenía la muestra.
- Después de agitar, se pasó a una microplantilla Quantitray^R 2000 de NMP y se incubo a 37°C durante 6 h.
- Con ayuda de una lámpara UV, se contaron las celdillas fluorescentes, que se consideraron positivas y se determinó de esta manera el número de colifagos presentes en la muestra mediante la comparación de estos números en la tabla correspondiente proporcionada por el proveedor.

5.4.3. Determinación de patógenos

Enriquecimiento

Se tomó un volumen de 300 ml de la muestra compuesta, la cual fue pre filtrada con papel filtro estéril (Whatman No. 1) y posteriormente en la membrana de filtración de 0.45 μm .

Tanto el papel filtro como la membrana de filtración se introdujeron a una bolsa con 225 ml de medio de enriquecimiento universal (Caldo Universal, DIFCO) y se incubaron a 37°C por 24 h.

5.4.3.1. *Escherichia coli* O157: H7

Para determinar *E. coli* O157:H7 se tomó una asada del medio de enriquecimiento universal y se sembró por estría en una placa con agar selectivo cromogénico *E. coli* O157:H7 (BioRad) y se incubó a 37°C por 24 h. Las colonias sugerentes (azules sin fluorescencia con luz UV) se pasaron a pico de flauta con agar ICC (Infusión Cerebro Corazón BD Bioxon), para realizarles posteriormente la confirmación mediante PCR.

5.4.3.2. *Salmonella*

Para determinar *Salmonella* se tomó una asada del medio de enriquecimiento universal y se sembró por estría sobre placas con agar Sulfito de Bismuto (Difco™ Bismuth Sulfite Agar) y Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD BD Bioxon), y se incubaron a 37°C/24h. Las colonias sugerentes (para agar SS: cafés, grises o negras con o sin brillo metálico con halo es café, tornándose posteriormente a negro, aunque algunas cepas producen colonias verdes si la formación de halo oscuro y para agar XLD: rosas o rojas, que podían ser transparentes con o sin centro negro e incluso aparecer complementemente negras). Fueron aisladas y se pasaron a pico de flauta en agar ICC (Infusión Cerebro Corazón BD Bioxon), para realizarles posteriormente la confirmación mediante PCR.

5.4.4. Confirmación de cepas positivas para *Salmonella* y *E. coli* O157: H7 mediante PCR

Para la confirmación de las cepas de *Salmonella* y *E. coli* O157: H7 se siguió la metodología propuesta por Wang and Cerniglia (1997) que consistió en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), donde se utilizaron oligonucleótidos para realizar la amplificación del gen *invA* para *Salmonella* y el gen *hlyA* para *E. coli* O157: H7.

5.4.4.1. Extracción de DNA

De las cepas que se aislaron, así y de las de referencia se tomó una asada y se inoculó en caldo soya tripticaseína con extracto de levadura 0.6% (CSTEL, Bioxon). Posteriormente se incubó a 37°C por 24 h. En un tubo Eppendorf se colocaron 0.5 ml del cultivo anterior y se homogenizó con 1 ml de amortiguador salino fosfatado (PBS, pH 7,4). Se centrifugó a 9000 x g/3 min y el precipitado se lavó con PBS. Finalmente se lavó una vez con agua miliQ. El precipitado se resuspendió con 50 µl de agua miliQ, se diluyó 1:10 con Triton X-100 (1%) y se calentó en agua a ebullición por 5 min, para inmediatamente después enfriarse en baño de hielo. Finalmente se usó el sobrenadante como templado para realizar la PCR.

5.4.4.2. Condiciones de amplificación

Para la amplificación, se mezclaron 2 μl de DNA extraído de las muestras presuntivas con 23 μl de la mezcla de reacción, la cual consistió de 16.185 μl de agua miliQ, 2.5 μl de buffer 10X, 1.5 μl MgCl_2 , 0.625 μl de cada uno de los cuatro desoxirribonucleótidostrifosfatados (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), 0.45 μl de *Taq* polimerasa y los iniciadores (primers) siguientes: 0.948 μl *Sal*-3, 0.792 μl *Sal*-4, 0.942 μl O157-3 y 0.65 μl O157-4 las secuencias utilizadas se presentan en la Tabla 1.

5.4.4.3. Visualización

Los productos de la amplificación (10 μl de cada uno) se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% con una corriente de 120 V, y finalmente fueron teñidos con bromuro de etidio (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para visualizarlos bajo luz UV.

Especie identificada	Gen Blanco	Secuencias de oligonucleótidos (5' - 3')	Tamaño del Producto	Referencia
<i>Salmonella</i>	<i>invA</i>	<i>Sal</i> -3, TATCGCCACGTTTCGGGCAA <i>Sal</i> -4, TCGCACCGTCAAAGGAACC	275 pb	(Rahnet <i>et al.</i> 1992)
<i>E. coli</i> O157: H7	<i>hlyA</i>	O157-3, GTAGGGAAGCGAACAGAG O157-4, AAGCTCCGTGTGCCTGAA	361 pb	(Wang <i>et al.</i> 1992)

Tabla 1. Secuencia de los iniciadores utilizados en la reacción.

RESULTADOS

Un total de 276 muestras compuestas fueron colectadas durante el periodo de Junio a Agosto del 2011 y de Junio a Septiembre del 2012, donde 165 muestras se tomaron en el año 2011 y 111 muestras en el año del 2012. Los tipos de muestras incluyeron enjuague de melón pre cosecha (40), enjuague de melón después de su cosecha (40), enjuague de manos durante la cosecha (40), agua de sitio/irrigación (38), agua de fuente (16), suelo (38), enjuague de melón en el punto de distribución (23), enjuague de manos en distribución (23), enjuague de melón durante el empaque (9) y enjuague de manos en empaque (9). Las 276 muestras se colectaron de 4 diferentes huertas meloneras de la región de Parras de la Fuente, Coahuila.

Tipo de muestra	2011	2012	Total de muestras compuestas
Melón precosecha	26	14	40
Melón cosecha	26	14	40
Manos cosecha	26	14	40
Agua sitio/irrigación	24	14	38
Agua fuente	11	5	16
Suelo	24	14	38
Melón distribución	9	14	23
Manos distribución	9	14	23
Melón empaque	5	4	9
Manos empaque	5	4	9
	165	111	276

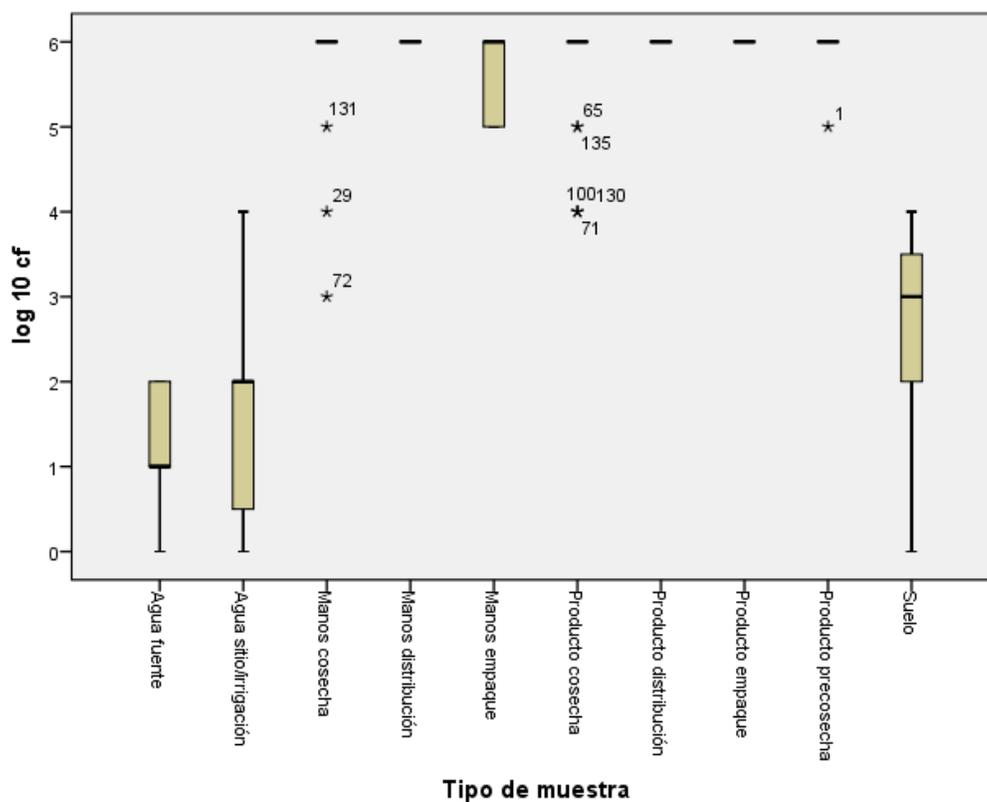
Tabla 2. Total de muestras compuestas recolectadas durante la cadena de producción de melón.

6.1 Microorganismos indicadores

Para su análisis realizamos el análisis estadístico utilizando el programa SPSS versión 20, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y posteriormente un análisis ANOVA de un factor con comparación múltiple por la prueba de Tukey, con un nivel de significancia de 0.05. Los resultados obtenidos son los siguientes.

6.1.1. Cuenta de coliformes fecales

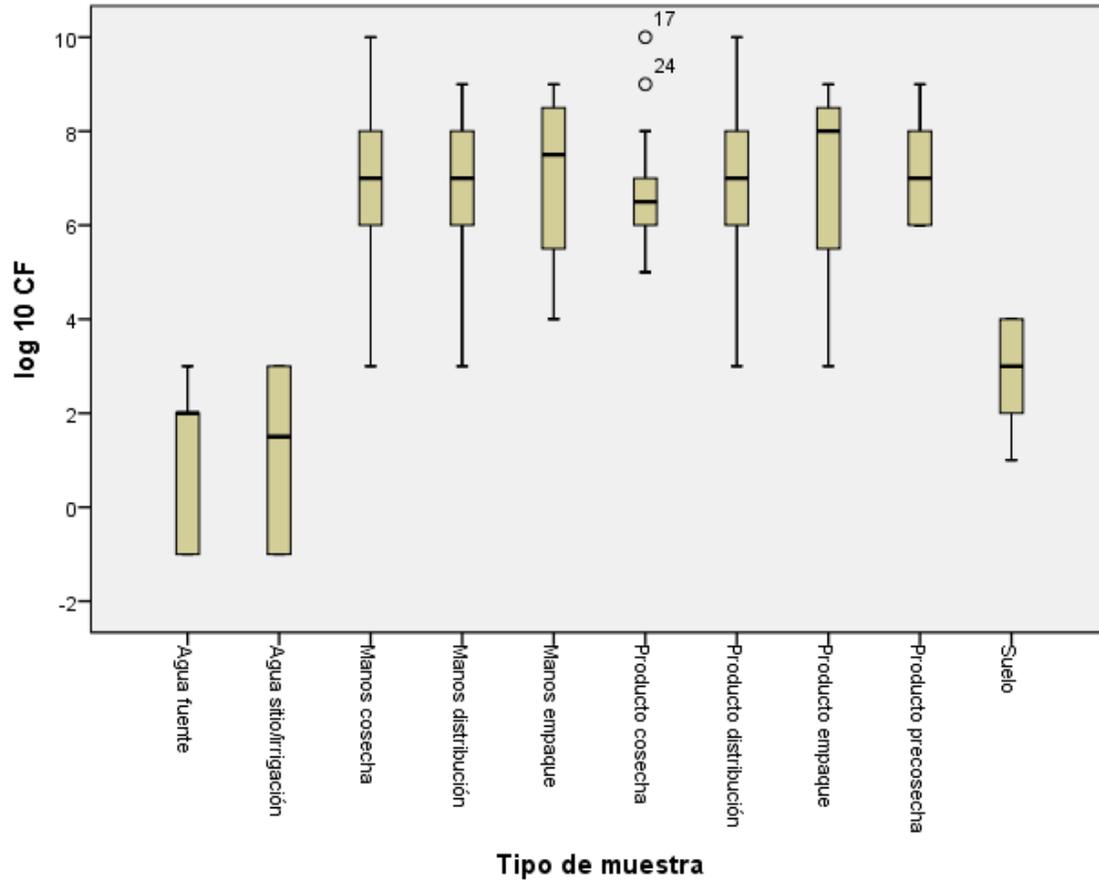
Los resultados que se muestran en la Gráfica 1 son los correspondientes al muestreo del verano del 2011, e indican la cuenta total de coliformes fecales en toda la cadena de producción que comprende las etapas de precosecha, cosecha, distribución y empaque.



Gráfica 1. Tendencias de niveles de coliformes fecales en diferentes puntos y muestras durante la cadena de producción. Muestras colectadas en el verano de 2011.

Observamos que los niveles altos de coliformes se relacionan ($P \leq 0.5$) en las muestras de enjuague de manos y de enjuague de melón en las etapas de precosecha, cosecha, distribución y empaque, teniendo cuentas de 10^6 UFC/mano y 10^6 UFC/melón respectivamente. También se observó que tanto el agua de fuente como el agua de sitio/irrigación presentaron valores muy bajos y diferentes estadísticamente a aquellos observados en las manos, el enjuague de melones y suelo. Pero que entre las muestras de agua no se observó diferencia significativa ($P \leq 0.5$) asumiendo debido a lo cual, que tienen una distribución muy similar aproximadamente de 10^1 y 10^2 UFC/100 ml de muestra. Con respecto al suelo y las muestras de manos (durante precosecha, cosecha, distribución y empaque), enjuague de melones (durante precosecha, cosecha, distribución y empaque) y agua (fuente y sitio/irrigación) existió diferencia significativa ya que la distribución de coliformes fecales en suelo fue de 10^3 UFC/g.

En la **Gráfica 2** se muestran los resultados de coliformes fecales obtenidos del muestreo que se realizó en el verano 2012 en la cadena de producción del melón que comprende las etapas de pre cosecha, cosecha, distribución y empaque.

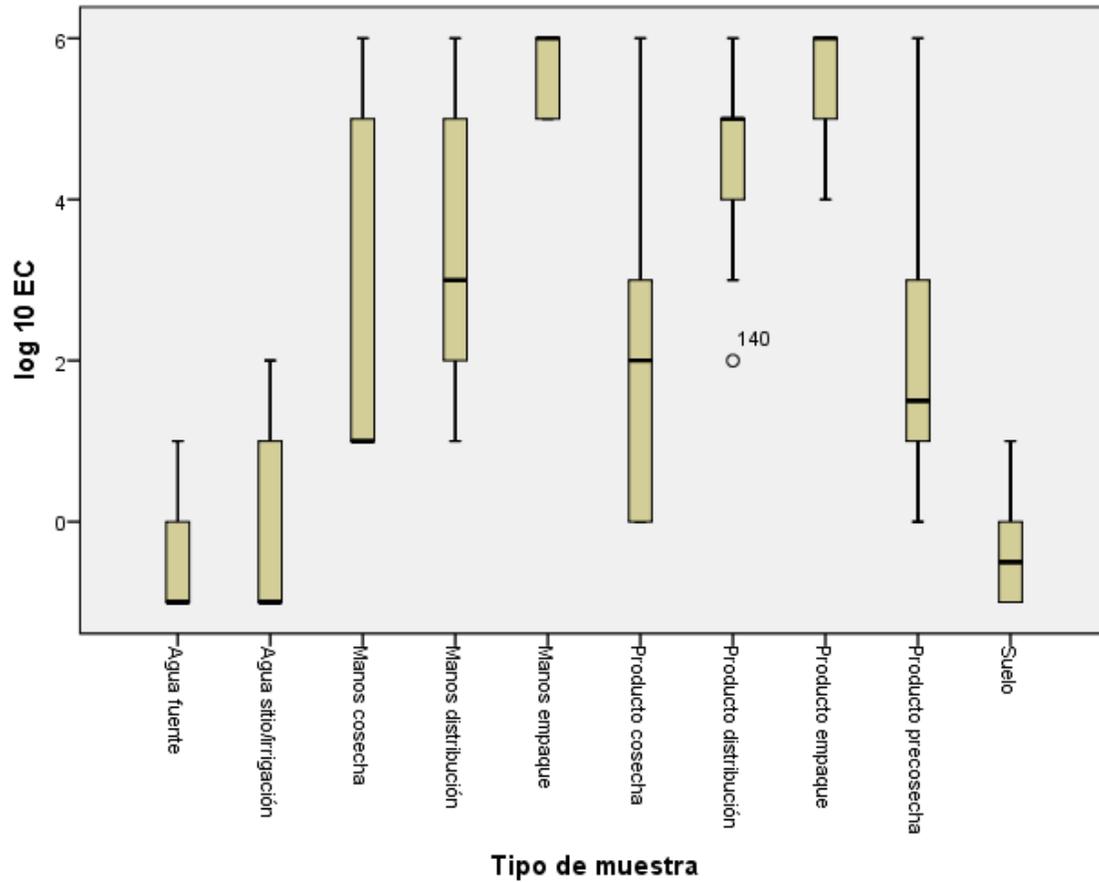


Gráfica 2. Tendencias de niveles de coliformes fecales en diferentes puntos y muestras durante la cadena de producción. Muestras colectadas en el verano de 2012.. Muestras del verano 2012.

Los resultados que se presentan en la Gráfica 2 muestran la misma tendencia en la cuenta de coliformes fecales que la observada por las muestras colectadas en el verano del 2011, y comprobado con el análisis estadístico realizado, se encontró, como en el año anterior, que las muestras de manos y enjuague de melones (durante precosecha, cosecha, distribución y empaque) no mostraron diferencia significativa entre ellas, teniendo cuentas de entre 10^6 a 10^8 UFC/mano o melón. De igual manera, las muestras de agua de fuente y agua de sitio/irrigación no mostraron diferencia significativa entre ellas por lo que su distribución de coliformes fecales fue muy similar, oscilando entre 10^1 y 10^3 UFC/100 ml de muestra. En cuanto al suelo, que mostró cuentas de 10^3 UFC/g en la mayoría de sus muestras, se observó diferencia significativa ($P \leq 0.5$) con respecto a las cuentas observadas en manos (colectadas durante precosecha, cosecha, distribución y empaque), enjuague de melón (durante precosecha, cosecha, distribución y empaque) y agua (fuente y sitio/irrigación).

6.1.2. Recuento de *E. coli*

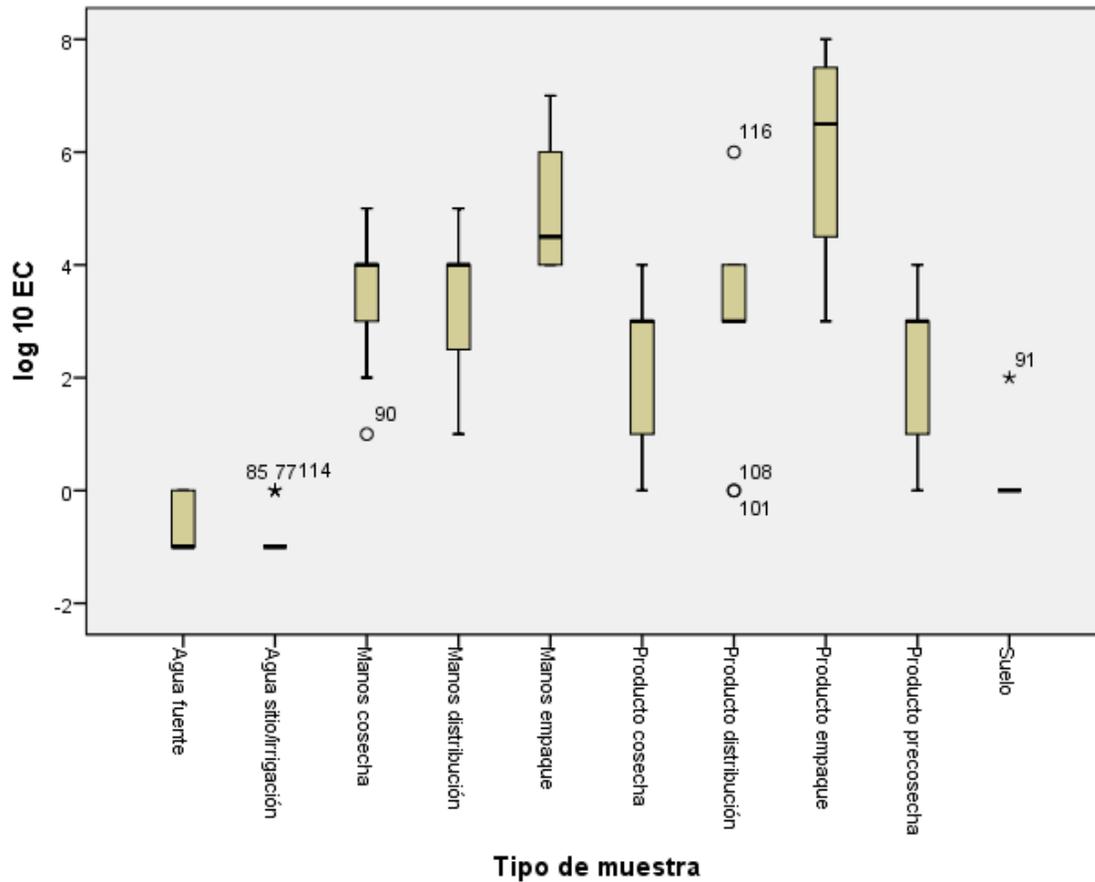
Los resultados que se muestran en la Gráfica 3 representan a las muestras tomadas en el verano del 2011, en la cadena de producción de melón en las etapas de precosecha, cosecha, distribución y empaque.



Gráfica 3. Distribución de *E. coli* genérica en la cadena de producción de melón en las etapas de precosecha, cosecha, distribución y empaque.. Las muestras fueron tomadas en el verano 2011.

De acuerdo con los resultados del análisis estadístico las muestras de manos y enjuague de melón (colectadas durante precosecha, cosecha, distribución y empaque), así como los tipos de agua (fuente y sitio/irrigación) no mostraron diferencia significativa ($P \leq 0.5$) en la distribución de *E. coli* genérica, teniendo niveles en las muestras de enjuague de manos de entre 10^1 a 10^6 UCF/mano y en el enjuague de melón de entre 1 a 10^6 UFC/melón. En este caso, las muestras de suelo mostraron niveles muy bajos 1 a 10^1 UFC/g y fueron diferentes ($P \leq 0.5$) a las cuentas obtenidas en el enjuague de manos, enjuague de melones y las muestras de agua (fuente y sitio/irrigación).

La Gráfica 4 muestra los resultados obtenidos del muestreo del verano del 2012 de la cadena de producción de melón, en cuanto a la distribución de *E. coli* genérica.

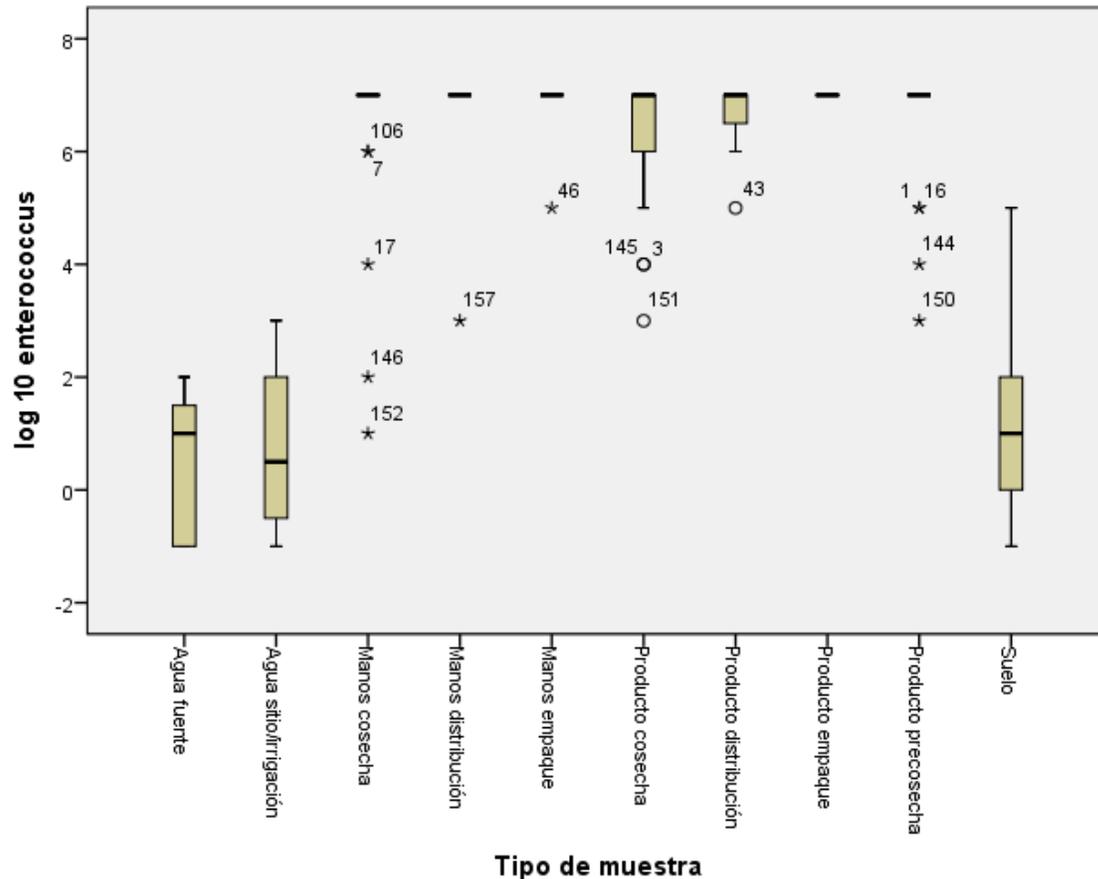


Gráfica 4. Distribución de *E. coli* genérica en la cadena de producción en las etapas de precosecha, cosecha, distribución y empaque. Los tipos de muestras son enjuague de melón, enjuague de manos, suelo y agua. Las muestras fueron tomadas en el verano 2012.

Al analizar los resultados se observó que los niveles de *E. coli* obtenidas de las muestras de enjuague de manos y enjuague de producto no presentaron diferencia significativa ($P \leq 0.5$), mostrando niveles que fueron entre 10^2 a 10^6 UFC/mano o melón. De igual manera, las muestras de agua (fuente y sitio/irrigación) no mostraron diferencia significativa ($P \leq 0.5$) entre ellas, mostrando niveles muy bajos (10^0 y 10^1 UFC/100 ml). Las muestras de suelo nuevamente presentaron diferencia significativa ($P \leq 0.5$) al compararas con las muestras de enjuague de manos y enjuague de melón, pero resultaon semejantes a las muestras de agua.

6.1.3. Cuenta de *Enterococcus*

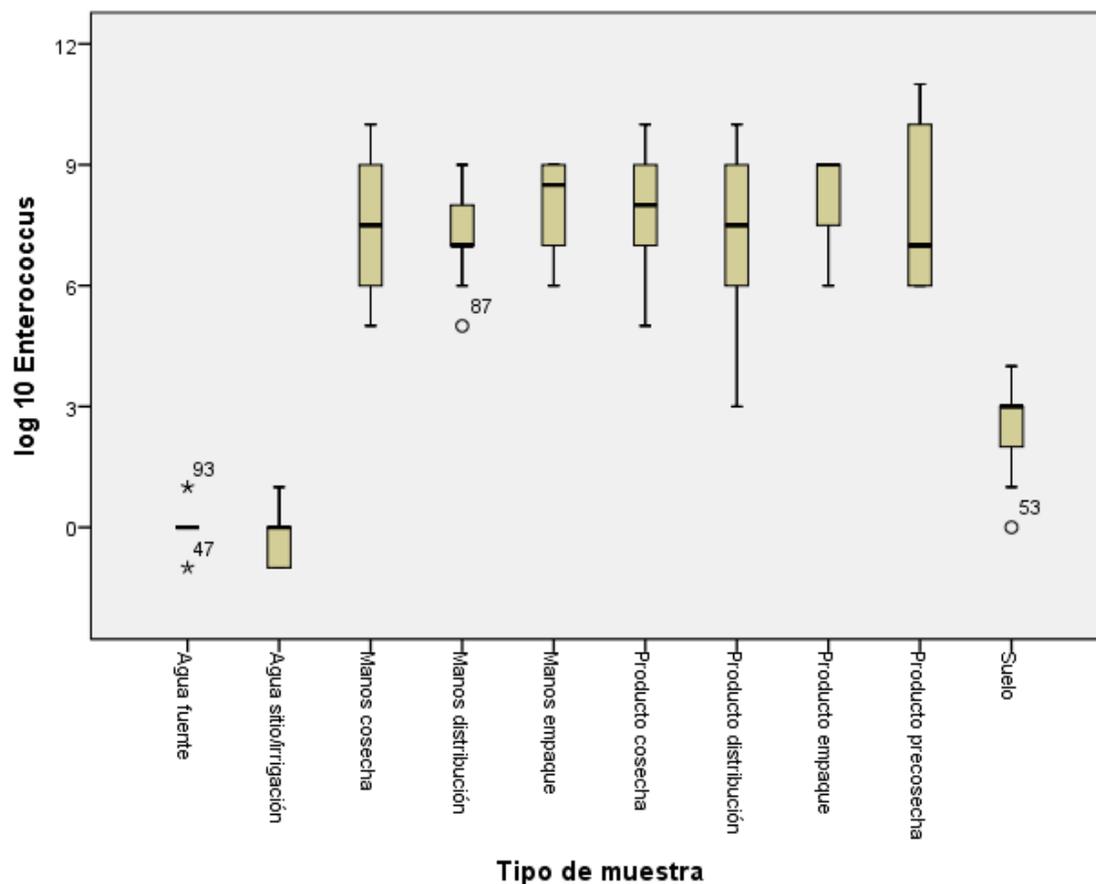
Los resultados obtenidos para la cuenta de *Enterococcus* de las muestras que fueron recolectadas en el verano del 2011, y 2012 se muestran en las Gráficas 5 y 6 respectivamente. ,



Gráfica 5. Distribución de *Enterococcus* en la cadena de producción de melón en las etapas de precosecha, cosecha, distribución y empaque. Los tipos de muestras son enjuague de producto, enjuague de manos, suelo y agua. Las muestras fueron tomadas en el verano 2011.

Cuando se realizó la colecta de muestras en el verano del 2011, encontramos que *Enterococcus* estuvo presente en las diferentes etapas de producción (precosecha, cosecha, distribución y empaque), observándose niveles muy parecidos a los demás microorganismos indicadores analizados. Se observaron altos niveles de estos microorganismos presentes en las muestras procedentes de enjuague de manos y melones (10^7 UFC/por mano o melón), resultando no haber diferencia significativa ($P \leq 0.5$) entre

ellas. Al igual que para *E. coli*, las muestras de agua de fuente y de sitio/irrigación, así como las muestras de suelo tampoco presentaron diferencia significativa entre ellas en relación a los niveles de *Enterococcus*, mostrando niveles muy bajos (1 a 10^2 UFC/100 ml de muestra o g de suelo) en estas muestras.

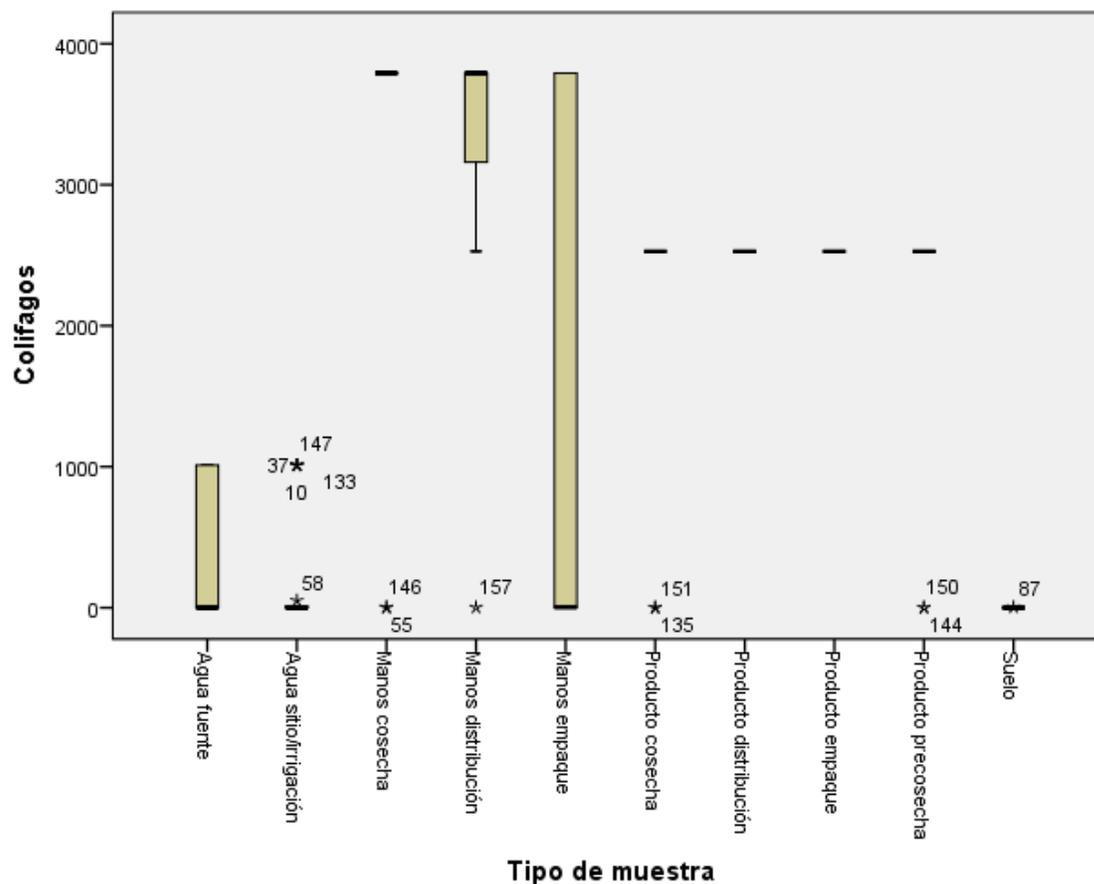


Gráfica 6. Distribución de *Enterococcus* en la cadena de producción de melón en las etapas de precosecha, cosecha, distribución y empaque. Las muestras fueron tomadas en el verano 2012.

Cuando analizamos las muestras colectadas en el verano de 2012, se observaron niveles altos (10^7 UFC/mano o melón) de estos microorganismos en manos y enjuague de melones, no encontrando diferencia significativa ($P \leq 0.5$) entre ellos. Al igual que lo observado en el año anterior, las muestras de agua de fuente y agua de sitio/irrigación mostraron cuentas bajas (1 a 10^2 UCF/100 ml); sin embargo, en este caso las muestras de suelo mostraron niveles mas elevados (10^2 a 10^4 UFC/g) que los del año anterior, encontrando diferencia significativa ($P \leq 0.5$) al compararlos con los niveles encontrados en las muestras de agua.

6.1.4. Recuento de colifagos

Los resultados de las concentraciones de colifagos encontrados en las muestras analizadas se muestran en las Gráficas 7 y 8 correspondientes a la colecta de los años 2011 y 2012 respectivamente.

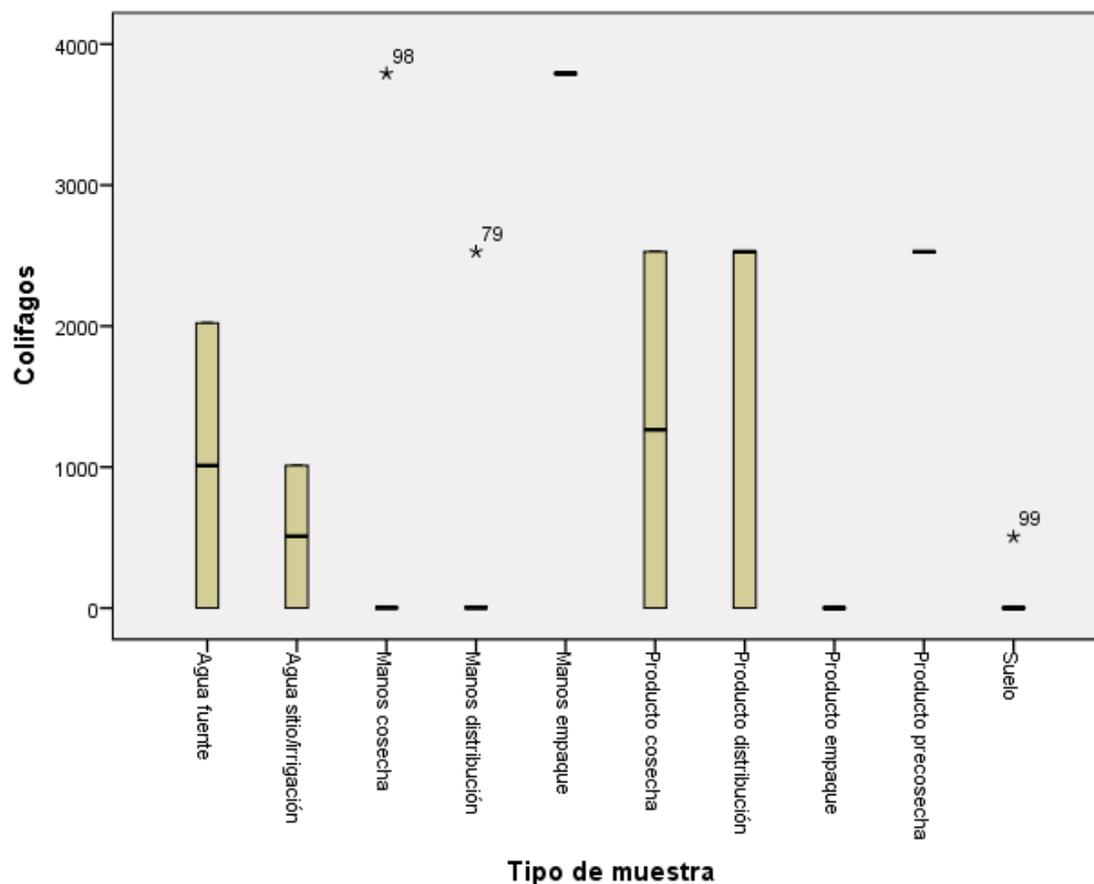


Gráfica 7. Distribución de *Colifagos* en la cadena de producción de melón en las etapas de precosecha, cosecha, distribución y empaque.. Las muestras fueron colectadas en el verano 2011.

Durante la colecta realizada en el verano 2011, las muestras de enjuague de manos (precosecha, cosecha, distribución y empaque) fueron las que mostraron la mayor concentración de colifagos con cuentas en promedio de 4000 UFP/mano; en tanto que los enjuagues de melón (precosecha, cosecha, distribución y empaque) presentaron concentraciones de entre 2500 a 3000 UFP/melón. Los niveles fueron mas bajos en las muestras de agua (fuente y sitio/irrigación) en donde se encontraron entre 0 y 1000

UFP/100 ml y en el suelo, los valores encontrados fueron de 0.5 UFP/g. El análisis estadístico señaló que existía diferencia significativa ($P \leq 0.5$) entre los cuatro tipos de muestra analizadas.

Sin embargo, al analizar las muestras de agua de fuente y de sitio/irrigación la mayoría de las muestras mostraron concentraciones entre 1.8 a 0.5 UFP/100 ml de muestra por lo que no existió diferencia significativa entre ellas.



Gráfica 8. Muestra la distribución de *Colifagos* en la cadena de producción de melón en las etapas de precosecha, cosecha, distribución y empaque. Los tipos de muestras son enjuague de producto, enjuague de manos, suelo y agua. Las muestras fueron colectadas tomadas en el verano 2012.

Cuando se recolectaron muestras en el verano de 2012, de las 111 muestras compuestas que se colectaron en ese periodo, solo 46 muestras se procesaron para recuento de colifagos, por esta razón hay un mayor sesgo en la gráfica. Esto se debió a causas totalmente ajenas a nuestra investigación y versaron con problemas con el kit utilizado.

Obtuvimos que las muestras de enjuague de manos en empaque mostraron la mayor concentración de colifagos presentando una diferencia significativa con las otras muestras de manos en precosecha y distribución. Los enjuagues de melones tanto en precosecha, cosecha, y distribución, mostraron una concentración entre 2500 a 1.25 UFP/melón, y no se encontró diferencia significativa ($P \leq 0.5$) entre ellos. Las muestras de enjuague de manos en cosecha y distribución, enjuague de melones en empaque y el suelo mostraron concentraciones semejantes ($P \leq 0.5$) de 1.5 a 0.25 UFP/mano/melón/g. En tanto que las muestras de agua de fuente y sitio/irrigación mostraron diferencia significativa ($P \leq 0.5$) entre ellas, con rangos que fueron de 0.5 a 2000 UFP/100 ml para fuente y de 0.5 a 1000 UFP/100 ml para sitio/irrigación.

6.2. Microorganismos patógenos

De las 165 muestras compuestas que fueron tomadas y procesadas en el verano 2011 se obtuvieron 28 cepas presuntivas para *Salmonella* y 7 cepas presuntivas para *E. coli* O157:H7, las cuales después de realizarles la PCR confirmatoria resultaron negativas.

De las 111 muestras compuestas tomadas y procesadas en el verano del 2012 se obtuvieron 12 cepas presuntivas para *Salmonella* y 1 cepa presuntiva para *E. coli* O157:H7. A las cuales después de realizarles la PCR resultaron negativas.

Año	Total de muestras colectadas	<i>Salmonella</i>	<i>E. coli</i> O157: H7
2011	165	28	7
2012	111	12	1

Tabla 3. Muestras presuntivas de patógenos analizadas por PCR.

DISCUSIÓN

Las frutas y vegetales son importantes para la salud y bienestar de los consumidores en el mundo (FDA and USDA, 1998), quienes esperan disfrutar los suministros de productos agrícolas frescos lo más seguros posibles; sin embargo durante los últimos años se ha detectado un mayor número de enfermedades transmitidas tanto por las frutas y vegetales importadas, así como por las producidas en nuestro país (CDC, 1998).

El número de casos documentados de ETAs asociadas a consumo de productos agrícolas ha ido en aumento (FDA, 2001), sin embargo, existen 10 brotes bien documentados en los últimos 13 años, donde los más graves implicaron al melón cantaloupe (FDA News, 2001) y microorganismos como *Salmonella*, *E. coli* O157: H7, *Campylobacter jejuni*, y/o un agente viral.

Históricamente, dos brotes de salmonelosis se han relacionado epidemiológicamente con melones mexicanos. En 1991 se reportó un brote causado por *Salmonella enteritidis* variedad Poona (Centers for Disease Control, 1991), y posteriormente en el 2000, 2001 y 2002, hubo episodios en donde se vinculó a melones importados de México como los vehículos causantes del problema. Otros serotipos que han causado infecciones asociadas con el melón incluyen *Salmonella enteritidis* variedad Saphra, la cual que fue asociada con melones importados de México.

Debido a que tanto en México como en los Estados Unidos no existen límites mínimos y máximos permisibles para microorganismos indicadores presentes en productos agrícolas como frutas y hortalizas, nuestros resultados no pueden ser comparados con normativas vigentes. Sin embargo, existen estudios donde se realizaron análisis semejantes al nuestro en melones y donde se analizaron las concentraciones microbianas de productos frescos y como estos se ven afectados por el procesamiento postcosecha, importación, y temporada de colecta (Ailes *et al.*, 2008).

De las 276 muestras analizadas en nuestra investigación, observamos que de acuerdo al análisis estadístico realizado existía diferencia significativa entre los diferentes tipos de muestras para el caso de microorganismos indicadores (coliformes fecales, *E. coli*, *Enterococcus*, colifagos). Las muestras que presentaron mayor contaminación fueron las de enjuague de manos (con rangos de 10^3 a 10^{10} UFC/ mano). Las muestras de enjuague de melón fueron las que siguieron en niveles con microorganismos encontrados (con rangos entre 10^1 a 10^8 UFC/melón). Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Gagliardi *et al.*, (2003) donde encontraron que el procesamiento y el lavado de melones, era un punto muy susceptible de contaminación. En un estudio realizado por Millán, *et al.*, (2001) se demostró que los microorganismos indicadores presentes en las frutas pueden ser tan altas como 10^7 UFC si no se aplican prácticas adecuadas de manejo post-cosecha, lo que coincidió con nuestros resultados de microorganismos indicadores en manos y producto.

Las muestras de agua en general mostraron niveles muy variables de microorganismos indicadores (1 a 10^4 UFC/100 ml), en tanto que las muestras de suelo mostraron los niveles mas bajos de microorganismos indicadores (1 a 10^2 UFC/g). En un estudio realizado por Ailes *et al.*, (2008) analizaron la concentración de *E. coli*, coliformes y *Enterococcus* en muestras de melón, cilantro, espinaca, repollo, hojas de mostaza, perejil, coles y apio. Los valores promedio de *E. coli* fueron de 10^3 UFC, coliformes de 10^5 UFC y *Enterococcus* de 10^5 UFC. Estos valores coinciden con los recuperados en este trabajo.

De la misma forma, en un estudio realizado en el sur de Estados Unidos en noviembre de 2000, en donde se analizaron diferentes vegetales (de melón, cilantro, espinacas, coles y perejil) procedentes de 13 huertas en las etapas de campo, cosecha y punto de empaque. La carga microbiana que presentó el melón fue para *Enterococcus* 4.1 ± 1.2 log UFC/g, coliformes 3.0 ± 1.3 log UFC/g y *E. coli* de 1.5 ± 1.1 log UFC/g. Se reportó además que la etapa de empaque se observaron los niveles mas elevados de microorganismos indicadores (Johnston *et, at.*, 2005). Estos resultados difieren parcialmente con los valores encontrados en este trabajo en donde encontramos que el mayor punto de contaminación fue durante la cosecha de los melones y durante el empaque. Sin embargo, coincide totalmente con lo reportado por Beuchat (1998) quien

estableció que la práctica del lavado de melones después de la cosecha aumentaba las posibilidades de contaminación por microorganismos coliformes fecales, ya que si un par de unidades de producto están contaminadas, esta contaminación puede extenderse por todo el lote durante inmersiones en agua comúnmente aplicadas en el embalaje de todos los productos.

Con respecto a las temporadas de colecta de muestras en este trabajo (verano del 2011 y verano del 2012), observamos diferencia significativa entre una temporada y otra, encontrando en el verano de 2011 valores menores de microorganismos indicadores que los obtenidos en el verano del 2012. Estas diferencias principalmente fueron debidas a que en el primer año se analizó la muestra completa y no se realizaron diluciones de los enjuagues a fin de tener un valor más aproximado, tal como se realizó en el muestreo del 2012, encontrándose como consecuencia niveles mayores en este último año analizado. Nuestros resultados se asemejan a los estudios realizados por Gagliardi *et al.*, (2003), quienes analizaron en la primavera de 1999, los puntos de control a fin de prevenir contaminación de la cascara de melón, tanto en la cosecha y postcosecha. En ese trabajo se reportan cuentas de coliformes de 10^4 a 10^5 UFC/g y de *Enterococcus* de 10^3 a 10^4 UFC/g cuando se analizó el periodo de primavera, en tanto que cuando se analizó el periodo de otoño, los niveles de indicadores aumentaron un logaritmo para cada indicador. Demostrando variaciones que pueden ocurrir dependiendo de la temporada de muestreo, y las condiciones climatológicas imperantes.

Las altas cuentas que se presentaron principalmente en las muestras de manos y producto obtenidas en este estudio, pudieran deberse a la relación que tiene la manipulación de las personas en la cosecha, distribución y empaque con el melón, sin embargo, lo que no podemos deducir es quien contamina a quien. Ya que la contaminación también puede venir por el aire, el agua, los animales, etc. Como lo establece Gu *et al.*, (2011) quienes mencionaron que algunos patógenos transmitidos por los alimentos puede ser introducidos en verduras frescas en cualquier momento durante su línea de producción. En el nivel de la pre-cosecha con el contacto de agua de riego contaminada, tierra, estiércol o materia fecal de animales salvajes es posible que ocurra la contaminación.

7.1 Microorganismos patógenos

En esta investigación también se analizaron microorganismos patógenos. De las 276 muestras compuestas analizadas solo se aislaron de 40 de ellas microorganismos presuntivos para *Salmonella* spp., y 8 muestras presuntivas para *E. coli* O157:H7, sin embargo, cuando se realizaron las pruebas confirmatorias, todas fueron negativas. Esta baja prevalencia de microorganismos patógenos coincide con otros estudios publicados en otras partes del mundo, por ejemplo, la FDA (2000) en estudios realizados a productos importados a EUA, encontró que el 99% (de 1028) de las muestras de melón cantaloupe estuvieron libres de *Shigella*, *Salmonella* y *E. coli* O157:H7. También en 1999 se evaluaron 1000 muestras de vegetales (brócoli, melón cantaloupe, apio, cilantro, lechuga, perejil, cebolla cambray, fresa y tomates) procedentes de México de las cuales el 96% estuvieron libres de patógenos, y solo 44 (4%) muestras estuvieron contaminadas con *Salmonella* y *Shigella* (Johnston, *et al.*, 2006).

En un estudio realizado por Bohaychuk, *et al.*, (2009), no detectaron microorganismos patógenos en los productos vegetales analizados (lechuga, espinacas, tomates, zanahoria, cebolla cambray y fresas) en Ontario, Canadá. En ese mismo sitio (Ontario, Canadá), se analizaron frutas y hortalizas (lechuga, melón [*Cucumis melo* L.], cebollín, cebolla cambray, perejil, cilantro y tomate fresco) recolectados en centros de distribución y mercados, en el verano del 2004, encontrándose que el 0.17% de las muestras fueron positivas para *Salmonella* spp., sin embargo no se detectó *E. coli* verotoxigénica en ninguna de ellas (Arthur, *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES

1. Las muestras de enjuague de manos y enjuague de melón son las que tienen mayor concentración de microorganismos indicadores en la cadena de producción del melón.
2. Las muestras que presentaron mayor contaminación por coliformes fecales fueron las muestras de enjuague de manos en cosecha y en empaque con niveles de 10^8 a 10^{10} UFC/mano.
3. Las muestras que presentaron mayor contaminación por *E. coli* genérica fueron las colectadas en el empaque tanto de las manos de los manipuladores como el producto, con cuentas de 10^7 UFC/mano y 10^7 UFC/melón.
4. Las muestras que presentaron mayor contaminación por *Enterococcus* fueron las muestras tanto de enjuague de manos como las de producto.
5. Existe una relación entre los microorganismos indicadores presentes en las muestras de enjuague de melón y manos
6. Las muestras que presentaron la menor contaminación por microorganismos indicadores fueron las muestras de agua de fuente, agua de sitio/irrigación y el suelo.
7. Las muestras de enjuague de manos son las que presentaron mayor concentración de colifagos mientras que las muestras de suelo y agua fueron las que tuvieron la menor concentración.
8. No se encontró a *Salmonella* y *E. coli* O157: H7 en ninguna de las muestras analizadas.

9. Se observaron diferencias significativas entre los muestreos realizados en el verano del 2011 y el verano del 2012.

APENDICES

9.1 ANEXO 1

Tabla de 1000 números aleatorios dentro de la gama de 0 a 500, con duplicaciones

165 320 356 383 302 042 189 117 465 290 313 010 285 329 463 429 264 393 137 138 401 483 103 374 062 363 094
 267 015 269 377 318 495 333 052 395 499 055 017 130 294 436 009 023 114 342 292 074 092 406 467 151 229 128
 433 387 392 376 424 280 345 415 073 331 324 479 381 408 328 068 347 142 122 449 338 035 443 355 488 087 422
 419 296 297 058 140 262 031 221 021 253 425 041 427 403 344 019 492 210 053 157 213 176 288 452 462 167 181
 272 500 317 100 251 064 124 310 388 286 090 044 049 033 082 438 371 440 231 490 349 003 039 066 486 226 005
 301 148 106 497 194 101 012 146 245 080 076 454 322 084 299 420 057 379 046 411 451 199 085 060 001 178 149
 369 078 315 372 334 447 478 119 326 340 431 025 476 258 409 089 283 468 413 312 116 203 208 192 240 096 028
 098 390 014 007 162 197 224 144 385 030 460 306 132 154 352 126 171 304 404 105 235 112 481 242 457 445 215
 037 205 069 108 358 110 219 160 336 308 026 237 474 397 360 472 135 278 484 365 456 183 133 417 435 247 441
 494 071 470 274 361 367 350 399 121 187 256 047 173 165 320 356 383 302 042 189 117 465 290 313 010 285 329
 463 429 264 393 137 138 401 483 103 374 062 363 094 267 015 269 377 318 495 333 052 395 499 055 017 130 294
 436 009 023 114 342 292 074 092 406 467 151 229 128 433 387 392 376 424 280 345 415 073 331 324 479 381 408
 328 068 347 142 122 449 338 035 443 355 488 087 422 419 296 297 058 140 262 031 221 021 253 425 041 427 403
 344 019 492 210 053 157 213 176 288 452 462 167 181 272 500 317 100 251 064 124 310 388 286 090 044 049 033
 082 438 371 440 231 490 349 003 039 066 486 226 005 301 148 106 497 194 101 012 146 245 080 076 454 322 084
 299 420 057 379 046 411 451 199 085 060 001 178 149 369 078 315 372 334 447 478 119 326 340 431 025 476 258
 409 089 283 468 413 312 116 203 208 192 240 096 028 098 390 014 007 162 197 224 144 385 030 460 306 132 154
 352 126 171 304 404 105 235 112 481 242 457 445 215 037 205 069 108 358 110 219 160 336 308 026 237 474 397
 360 472 135 278 484 365 456 183 133 417 435 247 441 494 071 470 274 361 367 350 399 121 187 256 047 173 165
 320 356 383 302 042 189 117 465 290 313 010 285 329 463 429 264 393 137 138 401 483 103 374 062 363 094 267
 015 269 377 318 495 333 052 395 499 055 017 130 294 436 009 023 114 342 292 074 092 406 467 151 229 128 433
 387 392 376 424 280 345 415 073 331 324 479 381 408 328 068 347 142 122 449 338 035 443 355 488 087 422 419
 296 297 058 140 262 031 221 021 253 425 041 427 403 344 019 492 210 053 157 213 176 288 452 462 167 181 272
 500 317 100 251 064 124 310 388 286 090 044 049 033 082 438 371 440 231 490 349 003 039 066 486 226 005 301
 148 106 497 194 101 012 146 245 080 076 454 322 084 299 420 057 379 046 411 451 199 085 060 001 178 149 369
 078 315 372 334 447 478 119 326 340 431 025 476 258 409 089 283 468 413 312 116 203 208 192 240 096 028 098
 390 014 007 162 197 224 144 385 030 460 306 132 154 352 126 171 304 404 105 235 112 481 242 457 445 215 037
 205 069 108 358 110 219 160 336 308 026 237 474 397 360 472 135 278 484 365 456 183 133 417 435 247 441 494
 071 470 274 361 367 350 399 121 187 256 047 173 165 320 356 383 302 042 189 117 465 290 313 010 285 329 463
 429 264 393 137 138 401 483 103 374 062 363 094 267 015 269 377 318 495 333 052 395 499 055 017 130 294 436
 009 023 114 342 292 074 092 406 467 151 229 128 433 387 392 376 424 280 345 415 073 331 324 479 381 408 328
 068 347 142 122 449 338 035 443 355 488 087 422 419 296 297 058 140 262 031 221 021 253 425 041 427 403 344
 019 492 210 053 157 213 176 288 452 462 167 181 272 500 317 100 251 064 124 310 388 286 090 044 049 033 082
 438 371 440 231 490 349 003 039 066 486 226 005 301 148 106 497 194 101 012 146 245 080 076 454 322 084 299
 420 057 379 046 411 451 199 085 060 001 178 149 369 078 315 372 334 447 478 119 326 340 431 025 476 258 409
 089 283 468 413 312 116 203 208 192 240 096 028 098 390 014 007 162 197 224 144 385 030 460 306 132 154 352
 126 171 304 404 105 235 112 481 242 457 445 215 037 205 069 108 358 110 219 160 336 308 026 237 474 397
 360 472

9.2 ANEXO 2

GUIÓN ORAL PARA OBTENER CONSENTIMIENTO ESCRITO PARA LA ENCUESTA

Hola. Me llamo _____. Trabajo en la Universidad Autónoma de Nuevo León, en Monterrey, en colaboración con las universidades estadounidenses: Universidad Emory y la Universidad Estatal de Carolina del Norte. Estamos haciendo un estudio para entender mejor cómo afectan las prácticas de producción y la calidad del agua a la inocuidad de los alimentos. Queremos invitarlo a participar en nuestro estudio porque es el dueño/encargado de una huerta que produce uno o más de los tres tipos de vegetales que nos interesan: 1) chile, 2) melón y 3) tomate. Este estudio analizará estos tres tipos de vegetales y se determinará si llegan a ser contaminados con microorganismos durante la temporada de cosecha o empaclado. Los resultados de este estudio se utilizarán para aconsejarlos a ustedes como agricultores sobre la mejor forma de cultivar productos sanos.

Para poder participar, es necesario que usted tenga por lo menos 18 años y que sea el dueño/encargado de las operaciones de esta huerta.

Si usted participa, nos ayudará con **cuatro** cosas:

- En esta visita le preguntaremos sobre el manejo de la huerta le pediremos nos dé un recorrido por las instalaciones y nos permita tomar algunas fotografías. Esto solamente le tomará aproximadamente 20 minutos.
- En una visita posterior, le pediremos que conteste preguntas sobre los tipos de cultivo producidos y las técnicas de producción propias de la huerta. Muchas preguntas tratarán temas sobre la fuente de agua, instalaciones sanitarias y aguas residuales; las actividades y técnicas de irrigación, cosecha y empaque. Otras preguntas tratarán aspectos sobre la presencia de animales en la huerta y cómo se utilizan el estiércol y otros fertilizantes. Le tomará alrededor de 45 minutos contestar esta encuesta.
- Ya que estemos familiarizados con la huerta le pediremos nos permita realizar otro recorrido y tomar algunas fotografías que nos ayudarán a identificar las oportunidades para futuras intervenciones para mejorar la calidad del producto.

- Visitaremos la huerta las veces que sean necesarias durante la temporada del cultivo. Durante cada visita tomaremos de 8-50 muestras de agua y suelo, así como enjuague de vegetales y de manos de trabajadores elegidos al azar solicitando su permiso previamente. Mandaremos las muestras a un laboratorio para hacer análisis microbiológicos.

Para las muestras de enjuague de manos pediremos al trabajador/a meter su mano en una bolsa plástica grande con 400 mililitros de agua estéril y mezclar el agua por 30 segundos. Después, repetirá el proceso con la otra mano en la misma bolsa de agua. Esto solamente llevará 10 minutos de su tiempo aproximadamente. No le pediremos ninguna información personal como el nombre. La única información personal que se anotará será si es hombre o mujer y la edad aproximada (niño, adolescente, adulto, adulto mayor).

No hay riesgos para su salud ni la de sus trabajadores, ni beneficios directos por su participación en este estudio. No tiene ningún costo económico ser parte de este estudio y tampoco recibirá pago económico. Sin embargo, este estudio proporcionará datos para ayudarle a tomar mejores decisiones sobre cómo producir vegetales sanos.

Este estudio se manejará con suma confidencialidad, por lo que haremos todo lo posible para proteger la identidad de su huerta y los participantes. No se compartirán nombres de huertas ni de individuos que participen en este estudio en futuros eventos o publicaciones. Como participante, usted puede pedir una copia de la información relacionada al estudio en cualquier momento.

Su participación es voluntaria. Aun si usted acepta contestar nuestras preguntas, puede negarse a contestar a cualquier pregunta o retirarse del estudio en cualquier momento.

Si tiene cualquier pregunta o si quiere retirarse del estudio, por favor llamar al coordinador de la investigación Dr. José Santos García Alvarado y él le atenderá al (81) 83763044 o al correo electrónico: santos@microbiosymas.com. También puede contactar a la Dra. Raquel Benavides Torres al correo electrónico: rabenavi@gmail.com, Presidente de la Comisión de Ética de la Facultad de Enfermería, UANL, quien supervisa la protección de derechos humanos para participantes en el proyecto. Se adjunta una hoja informativa con los datos para contactarlos e información del estudio.

¿Tiene alguna pregunta?

¿Me puede explicar por favor lo que vamos a hacer?

¿Tenemos su permiso para realizar la encuesta y tomar fotografías de la huerta?

(Si responde que sí) A continuación leerá el acuerdo de participación y firmaremos para confirmar lo que hemos hablado.

Acuerdo de participación

La descripción del estudio me fue leída por _____ (nombre del entrevistador/a). Si no entendí algo me fue explicado por _____ (nombre del entrevistador/a) y cualquier pregunta que tuve fue contestada por _____ (nombre del entrevistador/a).

Yo acepto voluntariamente participar en este estudio

Nombre y firma de la persona que da el consentimiento

Fecha _____

Nombre y firma de la persona que obtuvo el consentimiento

Fecha _____

LITERATURA CITADA

Aarestrup FM, Wegener HC, Collignon P. 2008. Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. *Exp. Rev. Anti-Infec. Ther.* 6:733-750.

Abadias, M., J. Usall, M. Anguera, C. Solsona, and I. Vin~as. 2008. Microbiological quality of fresh, minimally processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *Int. J. Food Microbiol.* 123:121–129.

Al-Ghazali, M.R. and Al-Azawi, S.K. 1990. *Listeria monocytogenes* contamination of crops grown on soil treated with sewage sludge cake. *J Appl. Bacteriol.* 69:642–647.

Alvarado, C. S., L. S. Ibarra, N. E. Martínez, M. O. Rodríguez, and A. Castillo. 2010. Validation of a washing and sanitizing procedure for cantaloupes at a Mexican Packing Facility. *J. Food Prot.* 73:362-365.

Althaus D., Hofer E., Corti S., Julmi A., and Stephan R. 2012. Bacteriological Survey of Ready-to-Eat Lettuce, Fresh-Cut Fruit, and Sprouts Collected the Swiss Market. *J. Food Prot.* 75:1338–1341.

Ailes E. C., Leon J. S., Jaykus L. A., Johnston L. M., Clayton H. A., Blanding S., Kleinbaum D. G., Backer L. C., and Moe C. 2008. Microbial Concentrations on Fresh Produce Are Affected by Postharvest Processing, Importation, and Season. *J. Food Prot.* 71:2389–2397.

Anónimo 2001. *The Safe Sludge Matrix*, 3rd edn. Wolverhampton, UK: ADAS. http://www.adas.co.uk/media_files/Publications/SSM.pdf, Accesado: 18/10/12.

Anónimo. 2004. Regulation (EC) No 853/2004 of the European parliament and of the council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for on the hygiene of foodstuffs. Disponible en: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri~CELEX:32004R0853:DE:NOT>.

Accesado: 20/02/12.

Anónimo 2007. Consumer Attitudes to Food Standards Report, Wave 7. London, UK: Food Standards Agency. [http:// www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/cas07uk.pdf](http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/cas07uk.pdf)
Accesado: 24/04/07.

Anónimo. 2011. Multistate outbreak of listeriosis linked to whole cantaloupes from Jensen Farms, Colorado. Centers for Disease Control and Prevention Atlanta. Available at: <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/120811/index.html>.
Accesado: 06/01/12.

Arthur L, Jones S, Fabri M, Odumeru J. 2007. Microbial Survey of selected Ontario-Grown Fresh Fruits and Vegetables. *J. Food Prot.* 70: 2864-2867.

Ashbolt NJ, Grabow WOK y Snozzi M, 2001: Indicators of microbial water quality. En: Fewtrell L, Bartram J, (eds.) *Water quality: Guidelines, standards and health – Assessment of risk and risk management for water-related infectious disease. Serie de monografías de la OMS sobre el agua (Water Series)*. Londres (Reino Unido), IWA Publishing, págs. 289–315.

Avery, L.M., Killham, K. and Jones, D.L. 2005. Survival of *E. coli* O157: H7 in organic wastes destined for land application. *J Appl Microbiol* 98: 814–822.

Barker, J., Humphrey, T.J. and Brown, M.W.R. 1999. Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoon: implications for disease. *FEMS Microbiol Lett* 173:291–295.

Beatty, M. E., P. M. Adcock, S. W. Smith, K. Quinlan, L. A. Kamimoto, S. Y. Rowe, K. Scott, C. Conover, T. Varchmin, C. A. Bopp, K. D. Greene, B. Bibb, L. Slutsker, and E. D. Mintz. 2006. Epidemic diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin. Infect. Dis.* 42:329–334.

- Beinke, Ch., S. Laarmann, C. Wachter, H. Karch, L. Greune y M. A. Schmidt. 1998. Diffusely adhering *Escherichia coli* strain induce attaching and effacing phenotypes and secrete homologs of esp proteins. *Infect. Immun.* 66:528-539.
- Berger, C. N., S. V. Sodha, R. K. Shaw Griffin, P. M. Pink, P. Hand, and G. Frankel. 2010. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ. Microbiol.* 12:2385– 2397.
- Beuchat, L. R. 1996. *Listeria monocytogenes*: incidence on vegetables. *Food Control* 7: 223-228.
- Beuchat, L. R. 1996. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *J. Food Prot.* 59:204-216.
- Beuchat LR, Ryu JH. 1997. Produce handling and processing practices. *Emerg Infect Dis* 3:459-465.
- Beuchat, L. R. 1998. Food safety issues. Surface decontamination of fruit and vegetables eaten raw: a review. Food safety unit WHO/FSF/FOS/98.2. World Health Organization, Geneva.
- Beuchat, L. R. 1998. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. Food Safety Issues, World Health Organization. WHO/FSF/FOS/98.2.
- Beuchat L. R., and Burnett S. L., 2001. Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 27:104–110.
- Blackburn, C., P. McClure. In. En: Blackburn, C y P. McClure. *Foodborne pathogens. Hazards, risk analysis and control.* Boca Raton, FL: CRC Press; 2002: 3-12.
- Bohaychuck VM, Bradburry RW, Dimock R, Feher M, Gensler GE, King RK, Rieve R, Romero P. 2009. A microbial survey of selected alberta-grown fresh produce from farmers' markets in Alberta, Canada. *J. Food Prot.* 72:415-420.

Boyce, J. M., and D. Pittet. 2002. Guideline for hand hygiene in health-care settings; recommendations of the healthcare infection control practices advisory committee and the HICPAC/SHEA/ APIC/IDSA hand hygiene task force. *Morb. Mortal Wkly. Rep.* 51: 1–45.

Breuer, T., D. H. Benkel, R. L. Shapiro, W. N. Hall, M. M. Winnett, M. J. Linn, J. Neimann, T. J. Barrett, S. Dietrich, F. P. Downes, D. M. Toney, J. L. Pearson, H. Rolka, L. Slutsker, P. M. Griffin, and the investigation team. 2001. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections linked to alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *Emerg. Infect. Dis.* 7:977-982.

Bloomfield, S., A. Aiello, B. Cookson, C. O'Boyle, and E. Larson. 2007. The effectiveness of hand hygiene procedures in reducing the risks of infections in home and community settings including handwashing and alcohol-based hand sanitizers. *Am. J. Infect. Control* 35:S27–S64.

Buchholz, U., H. Bernard, D. Werber, M. M. Böhmer, C. Renschmidt, H. Wilking, Y. Delere', M. an der Heiden, C. Adlhoch, J. Dreesman, J. Ehlers, S. Ethelberg, M. Faber, C. Frank, G. Fricke, M. Greiner, M. Höhle, S. Ivarsson, U. Jark, M. Kirchner, J. Koch, G. Krause, P. Lubert, B. Rosner, K. Stark, and M. Kühne. 2011. German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. *N. Engl. J. Med.* 365:1763–1770.

Buchholz Annemarie L., Gordon R. Davidson, Bradley P. Marks, Ewen C. D. Todd, and Elliot T. Ryser. 2012. Quantitative Transfer of *Escherichia coli* O157:H7 to Equipment during Small-Scale Production of Fresh-Cut Leafy Greens. *J. Food Prot.* 75:1303–1309.

Buswell, C.M., Herlihy, Y.M., Lawrence, L.M., McGuiggan, J.T.M., Marsh, P.D., Keevil, C.W. and Leach, S.A. 1998. Extended survival and persistence of *Campylobacter* spp. In water and aquatic biofilms and their detection by immunofluorescent-antibody and-rRNA staining. *Appl Environ Microbiol* 64:733–741.

Calvin L (2003) Produce, food safety, and international trade: Respose to US foodborne illness outbreaks associated with imported produce. In: International Trade of Food Safety, AER-828. Economic Research Service/USDA. J Buzby (ed). U.S. <http://www.ers.usda.gov/publications/aer828/aer828g.pdf>. (Julio, 2007). Caron, J., L. M. Coffield y J. R. Scott. 1989. A plasmid-encoded regulatory gene, rns, required for expression of the CS1 and CS2 adhesins of enterotoxigénica Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci-Biol. 86:963-967.

Castillo, A., I. Mercado, L. M. Lucia, Y. Martínez-Ruíz, J. Ponce de León, E. A. Murano, and G. R. Acuff. 2004. Salmonella contamination during production of cantaloupe: a binational study. J. Food Prot. 67:713-720.

Centers for Disease Control. 1979. Salmonella oranienburg gastroenteritis associated with consumption of precut watermelons-Illinois. MMWR November 9: 522-523.

Centers for Disease Control. 1991. Multi-state outbreak of Salmonella poona infections- United States and Canada. MMWR. 549-552.

Centers for Disease Control. 2005. Enfermedades transmitidas por alimentos. Disponible en: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/foodborneinfections_g_sp.htm.

Accesado: 10/11/12.

Centers for Disease Control and Prevention. 2008. Investigation update: outbreak of Salmonella Litchfield infections, 2008. Available at: <http://www.cdc.gov/Salmonella/litchfield/>. Acesado: 17/08/09.

Center for Science in the Public Interest. 2008. CSPI outbreak alert data: info on produce outbreaks. Available at: http://www.cspinet.org/new/pdf/cspi_outbreak_alert.pdf. Accesado: 26/05/11.

Center for Science in the Public Interest. 2009. The ten riskiest foods regulated by the US Food and Drug Administration. Available at: http://cspinet.org/new/pdf/cspi_top_10_fda.pdf. Accesado 26/05/11.

Centers for Disease Control and Prevention, 2000. Surveillance for foodborne disease outbreaks—United States, 1993-1997. MMWR. 49:1-51.

Centers for Disease Control and Prevention, 2002. Multistate outbreak of Salmonella serotype Poona infections associated with eating cantaloupe from Mexico—United States and Canada, 2000-2002. MMWR. 51:1044-1047.

Centers for Disease Control and Prevention 2007. Preliminary Foodnet Data on the Incidence of Pathogens Transmitted Commonly Through Food, 10 States, 2006. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention.

http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5614a4.htm?s_cid=mm5614a4_e.

Accesado: 15/10/08.

Centers for Disease Control and Prevention. 2010. Surveillance for foodborne disease outbreaks—United States, 2007. Morb. Mortal. Wkly. Rep. 59:973–979. Available at: http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5931a1.htm?s_cid=mm5931a1_w.

Accesado: 07/08/11.

Chapman, P.A., Siddons, C.A., Cerdan Malo, A.T. and Harkin, M.A. 1997. A 1-year study of *E. coli* O157:H7 in cattle, sheep, pigs and poultry. Epidemiol Infect 119: 254–250.

Charm Sciences INC, Disponible en: <http://www.charm.com/products/pathogens/fast-phage-mpn.html> Accesado: 13/08/11.

Cornick, N. A. y A. F. Helgerson. 2004. Transmission and Infectious of *Escherichia coli* O157: H7 in Swine. Appl. Environ. Microb. 70:5331-5335.

Cravioto, A., A. Tello, A. Navarro, J. Ruiz, H. Villafan, F. Uribe y C. Eslava. 1991. Association of *Escherichia coli* Hep-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. *Lancet* 337: 262- 264.

Davis, H., J. P. Taylor, J. N. Perdue, G. N. Stelma, Jr., J. M. Humphreys, Jr., R. Rowntree III, and K. D. Greene. 1988. A shigellosis outbreak traced to commercially distributed, shredded lettuce. *Am. J. Epidemiol.* 128:1312–1321.

De la Cruz F, Davies J. 2000. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol.* 8:128-133.

Del Rosario Brenda A., Beuchat Larry R. 1994. Survival and Growth of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Cantaloupe and Watermelon. *J. Food Prot.* 58: 105-107.

Dorronsolbero, Inés. 2005. *Salmonella* enteritis Food Poisoning. *Rev. Esp. Salud Publica.* 79:415-417.

Doyle M. P. and Beuchat L. R. 2007. Food Microbiology. Año. Fundamentals and Frontiers, In J. Meng, Michael P. Doley, Tong Zhao and Shaohua Zhao (ed), Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. ASM Press, Washington, D. C. p. 254.

Edmonds, S. L., McCormack, R. R., Stevezhou, S., Macinga, D. R., and Fricker, C. M. 2012. Hand Hygiene Regimens for the Reduction of Risk in Food Service Environments. *J. Food Prot.* 75:1303–1309.

Emberland, K. E., S. Ethelberg, M. Kuusi, L. Vold, L. Jensvoll, B. A. Lindstedt, K. Nygard, C. Kjelsø, M. Torpdahl, G. Sørensen, T. Jensen, S. Lukinmaa, T. Niskanen, and G. Kapperud. 2007. Outbreak of *Salmonella* Weltevreden infections in Norway, Denmark and Finland associated with alfalfa sprouts, July–October 2007.

Escartin, F. E., A. C. Ayala, and J. S. Lozano. 1989. Survival and growth *Salmonella* and *Shigella* on sliced fresh fruit. *J. Food Prot.* 52:471-472.

Everis, L. 2004. Risks of pathogens in ready-to-eat fruits, vegetables, and salads through the production process. chipping campden, UK: Review no. 44, Campden and Chorleywood Food Research Association Group.

Falomir M.P., Gozalbo D. and Rico H. 2010. Coliform bacteria in fresh vegetables: from cultivated lands to consumers. *Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Formatex 2010.

Feng, P. 1995. *Escherichia coli* serotype O157: H7: novel vehicles of infection and emergence of phenotypic variants. *Emerg. Infect. Dis.* 1:47-52.

Fett, W. F. 2000. Naturally occurring biofilms on alfalfa and other types of sprouts. *J. Food Prot.* 63:625–632.

Food and Drug Administration News, 1998. Direcciones para la Industria Guía para Reducir al Mínimo el Riesgo Microbiano en los Alimentos, en el Caso de Frutas y Vegetales Frescos. Food Safety Initiative Staff, HFS-32.

Food and Drug Administration News. 2001. FDA warns consumers about Viva brand imported cantaloupe. *FDA News*. 25 May 2001. FDA P-01-11.

Food and Drug Administration (FDA). 2002. La FDA anuncia importante alerta sobre cantaloupes mexicanos. Disponible en: <http://www.fda.gov/bbs/topics/ANSWERS/SPANISH/span01167.html> Accesado: 13/06/05.

Food and Drug Administration (FDA). 2003. Memoria: entrenamiento para capacitadores sobre buenas prácticas agrícolas y de manejo de frutas y hortalizas. 17-21 de marzo, Culiacán, Sinaloa.

Food and Drug Administration (FDA). 2006. Detention without physical examination of cantaloupes from Mexico. IA 22-01, 4 May 2006. Attachment A, 31 March 2009. Attachment B, 5 May 2009. Available at: http://www.accessdata.fda.gov/ImportAlerts/ora_import_ia220.html. Accesado: 17/08/09.

Food and Drug Administration (FDA). 2008. FDA warns of Salmonella risk with cantaloupes from Agropecuaria Montelibano. FDA News, 22 March 2008. Available at:<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2008/ucm116869.htm>. Acceso: 17/08/09.

Food and Drug Administration. 2009. Food Code 2009. Available at: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/RetailFoodProtection/FoodCode/FoodCode2009>. Accessed 02/08/11.

Friesema, I., G. Sigmundsdottir, K. van der Zwaluw, A. Heuvelink, B. Schimmer, C. de Jager, B. Rump, H. Briem, H. Hardardottir, A. Atladottir, E. Gudmundsdottir, and W. van Pelt. 2008. An international outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 infection due to lettuce, September–October 2007.

Grabow WOK, 2001: Bacteriophages: Update on application as models for viruses in water. Department of Medical Virology, University of Pretoria, PO Box 2034, Pretoria 0001, South Africa. 27:251–268.

Gu, G., J. Hu, J. M. Cevallos-Cevallos, S. M. Richardson, J. A. Bartz, and A. H. van Bruggen. 2011. Internal colonization of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium in tomato plants. PLoS One 6: e27340.

Hamilton AJ, Stagnitti F, Premier R, Boland AM, Hale G. 2006; Quantitative microbial risk assessment models for consumption of raw vegetables irrigated with reclaimed water. Aoppl. Environ. Microbiol. . 72:3284-3290.

Hartke, A., Bouche, S., Laplace, J.M., Benachour, A., Boutibonnes, P. and Auffray, Y. 1995. UV-inducible proteins and UV induced cross-protection against acid, ethanol, H₂O₂ or heat-treatments in *Lactococcus-lactis* subsp *lactis*. Arch Microbiol 163:329–336.

Heaton J. C. and K. Jones. 2007. Microbial contamination of fruits and vegetables and behavior of enteropathogens in the phyllosphere: a review. J. Appl. Microbiol. 104:613-626.

Hirotsu H., Naranjo J., Moroyoqui P.G., AND Gerba C.P. 2001. Demonstration of indicator microorganisms on surface of vegetables on the market in the United States and México. *J. Food Sci.* 67:1847-1850.

Hutchison, M.L., Walters, L.D., Moore, A., Crookes, K.M. and Avery, S.M. 2004. Effect of length of time before incorporation on survival of pathogenic bacteria present in livestock wastes applied to agricultural soil. *Appl Environ Microbiol* 70:5111–5118.

I. E. Espinoza-Medina, F. J. Rodríguez-Leyva, I. Vargas-Arispuro, M.A. Islas-Osuna, E. Acedo-Félix, and M. A. Martínez-Téllez. 2006. PCR Identification of Salmonella: Potential Contamination Sources from Production and Postharvest Handling of Cantaloupes. *J. Food Prot.* 69: 1422-1425.

INEGI. Marco Geoestadístico, 2000. INEGI-DGG. Superficie de la República Mexicana por Estados. 1999. Disponible en: http://mapserver.inegi.org.mx/geografia/espanol/datosgeogra/basicos/estados/coah_geo.cfm. Accesado: 16/06/10.

Jay, M. T., M. Cooley, D. Carychao, G. W. Wiscomb, R. A. Sweitzer, L. Crawford-Miksza, J. A. Farrar, D. K. Lau, J. O'Connell, A. Millington, R. V. Asmundson, E. R. Atwill, and R. E. Mandrell. 2007. *Escherichia coli* O157:H7 in feral swine near spinach fields and cattle, central California coast. *Emerg. Infect. Dis.* 13:1908–1911.

Johnston, L. M., L. A. Jaykus, D. Moll, M.C. Martínez, J. Anciso, B. Mora, and C. L. Moe. 2005. A field study of the microbiological quality of fresh produce. *J. Food Prot.* 68:1840-1847.

Johnston, L. M., L. A. Jaykus, D. Moll, J. Anciso, B. Mora, and C. L. Moe. 2006. A field study of the microbiological quality of fresh produce of domestic and Mexican origin. *Int. J. Food Microbiol.* 112: 83-95.

Jones, K. 2001. Campylobacters in water, sewage and the environment. *J. Appl. Microbiol.* 90:68S–79S.

José de Jesús Espinoza Arellano, Pedro Cano Ríos, Ignacio Omna Castillo. 2003. Utilización de tecnologías de producción modernas para obtener ventajas de mercado: Los casos del acolchado plástico y semillas híbridas en melón en la Comarca Lagunera. *Rev. Mex. Agronegocios* 12:582-595.

Josefson, D. 2003. Three die in US outbreak of hepatitis. *BMJ* 327:7425.1188.

J. V. Gagliardi, P.D. Millner, G. Lester, D. Ingram. 2002. On-Farm and postharvest processing sources of bacterial contamination to melon rinds. *J. Food Prot.* 66:82-87.

Kennedy JE Jr, Wei CI, Oblinger JL. 1986. Distribution of coliphages in various foods. *J Food Protect* 49(12):944-951.

Kenneth P. A., R. M. Mildred, y J. M. Fleckenstein. 2006. Importance of heat-labile enterotoxin in colonization of the adult mouse small intestine by human enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Infect. Immun.* 74:869-875.

Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda W. M., Schreckenberger P.C., Winn. W. C. 1999. *Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas a color*. Buenos Aires Argentina. 5a Ed. Panamericana, p. 200-204.

Kudva, I.T., Blanch, K. and Hovde, C.J. 1998. Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. *Appl Environ Microbiol* 64:3166–3174.

Leyer, G.J. and Johnson, E.A. 1993. Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella* Typhimurium. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1842–1847.

Liu, P., Y. W. Chien, E. Papafragkou, H. M. Hsiao, L. A. Jaykus, and C. Moe. 2009. Persistence of human noroviruses on food preparation surfaces and human hands. *Food Environ. Virol.* 1:141–147.

Lynch, M., J. Painter, R. Woodruff, and C. Braden. 2006. Surveillance for foodborne-disease outbreaks—United States, 1998–2002. *MMWR.* 55:1–41.

Lynch, M. F., R. V. Tauxe, and C. W. Hedberg. 2009. The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. *Epidemiol. Infect.* 137:307–315.

Madden, J. M. 1992. Microbial pathogens in fresh produce-the regulatory perspective. *J. Food Prot.* 55:821-823.

Millán F. R., Tavera S, L., Tapia M, S., Cava R., 2001. Estudio de la estabilidad microbiológica del melón (*Cucumis melo L*) mínimamente procesado por impregnación al vacío. *Arch. Latinoamer. Nut.* 51:2.

Mohle-Boetani, J.C., R. Reporter, S.B. Werner, S. Abbott, J. Farrar, S.H. Waterman, and D. J. Vugia. 1999. An outbreak of *Salmonella* serogroup Saphra due to cantaloupes from Mexico. *J. Infect. Dis.* 180:1361-1364.

Moller N., E., Skov, M.N., Madsen, J.J., Lodal, J., Brochner Jespersen, J. and Baggesen, D.L. 2004. Verocytotoxin- producing *Escherichia coli* in wild birds and rodents in close proximity to farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:6944–6947.

Mooijman K. A., 2001: Optimisation of the ISO-method on enumeration of somatic coliphages (draft ISO 10705–2). *Water Sci.Technol.* 43:205–208.

Nataro, J. P. y J. B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol.* 11:142-201.

Natvig, E.E., Ingham, S.C., Ingham, B.H., Cooperband, L.R. and Roper, T.R. 2002. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli* contamination of root and leaf vegetables grown in soils with incorporated bovine manure. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2737–2744.

NCCLS. 2000. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard, 7th ed. NCCLS document M2-A7. NCCLS, Wayne, Pa.

Nicholson, F.A., Groves, S.J. and Chambers, B.J. 2005. Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Biores. Tech.* 96:135–143.

Payment P, Franco E. 1993. *Clostridium perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking water treatment for viruses and protozoan cysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2418-2424.

Rodgers Stephanie L., Cash Jerry N., Siddiq Mohammad, and Ryser Elliot T. 2004. A comparison of Different Chemical Sanitizers for Inactivating *Escherichia Coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in Solution and on Apples, Lettuce, Strawberries, and Cantaloupe. *J. Food Prot.* 67:721-731.

Sapers, G. M. 2006. Washing and sanitizing treatments for fruits and vegetables,. In G. M. Sapers, J. R. Gorny, and A. E. Yousef (ed.), *Microbiology of fruits and vegetables*. CRC Press, Boca Raton, FL. p. 375–400

Scallan Elaine, Robert M. Hoekstra, Frederick J. Angulo, Robert V. Tauxe, Marc-Alain Widdowson, Sharon L. Roy, Jeffery L. Jones, and Patricia M. Griffin. 2011. *Foodborne Illnes Acquired in the United States-Major Pathogens*.

Schaper M et al., 2002: Distribution of genotypes of F-specific RNA bacteriophages in human and non-human sources of faecal pollution in South Africa and Spain. *J. Appl. Microbiol.* 92:657–667.

Seo, K. H., and J. F. Frank. 1999. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to lettuce leaf surface and bacterial viability in response to chlorine treatment as demonstrated by using confocal scanning laser microscopy. *J. Food Prot.* 62:3–9.

Seymour, I.J. and Appleton, H. 2001. A review, foodborne viruses and fresh produce. *J. Appl. Microbiol.* 91:759–773.

Sivapasingham, S., Friedman, C.R., Cohen, L. and Tauxe, R.V. 2004. Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *J. Food Prot.* 67:2342–2353.

Solomon, E.B., Yaron, S. and Matthews, K.R. 2002. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalisation. *Appl. Environ Microbiol.* 68:397–400.

Stafford, R. J, B. J. McCall, A. S. Neill, D. S. Leon, G. J. Dorricott, C. D. Towner, and G. R. Micalizzi. 2002. A statewide outbreak of *Salmonella* Bovismorbificans phage type 32 infection in Queensland. *Commun. Dis. Intell.* 26:568–573.

Stanley, K. and Jones, K. 2003. Cattle and sheep farms as a reservoir of *Campylobacter*. *J Appl Microbiol* 94, 104s–113s.

53. Storey MV, Ashbolt NJ, 2001: Persistence of two model enteric viruses (B40-8 and MS-2 bacteriophages) in water distribution pipe biofilms. *Water Sci.Technol.* 43:133–138.

Takeuchi, K., and J. F. Frank. 2000. Penetration of *Escherichia coli* O157:H7 into lettuce tissues as affected by inoculum size and temperature and the effect of chlorine treatment on cell viability. *J. Food Prot.* 63:434–440.

Takkinen, J., Nakari, U-M., Johansson, T., Niskanen, T., Siitonen, A. and Kuusi, M. (2005) A nationwide outbreak of multiresistant *Salmonella* Typhimurium var. Copenhagen DT104B infection in Finland due to contaminated lettuce from Spain, May 2005. *Eurosurveillance* Weekly 10, <http://www.eurosurveillance.org/ew/2005/050630.asp> Accessed: 16/01/07.

Tauxe, R., H. Kruse, C. Hedberg, M. Potter, J. Madden, and K. Wachsmuth. 1997. Microbial hazards and emerging issues associated with produce. A preliminary report to the national advisory committee on microbiologic criteria for food. *J. Food. Prot.* 60:1400-1408.

Tauxe, R. V. 1997. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. *Emerg. Infect. Dis.* 3:425-434.

Teunis, P. F., C. L. Moe, P. Liu, S. E. Miller, L. Lindesmith, R. S. Baric, J. Le Pendu, and R. L. Calderon. 2008. Norwalk virus: how infectious is it? *J. Med. Virol.* 80:1468–1476.

Todd, E. C. D., J. D. Greig, C. A. Bartleson, and B. S. Michaels. 2008. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 5. Sources of contamination and pathogen excretion from infected persons. *J. Food Prot.* 71:2582–2595.

Toranzos GA, McFeters GA. 1997. Detection of indicator microorganisms in environmental freshwaters and drinking waters. In: Hurst CJ, Knudsen GR, McInerney MJ, Stetzenbach LD, Walter MV, editors. *Manual of Environmental Microbiology*. Washington DC: ASM Press. P 184-194.

Tortora, G. J.; Funke, B. R. and Case, C. L. 1995. *Microbiology: an introduction*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, INC. USA.

Tyler HL, Triplett EW. 2008. Plants as a habitat for beneficial and/or human pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 46:53-63.

U.S. Department of Agriculture and U.S. Department of Health and Human Services, 2005. *Dietary guidelines for Americans*, 6th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, DC.

Wallace, J.S., Cheasty, T. and Jones, K. 1997. Isolation of verocytotoxigenic producing *Escherichia coli* O157 from wild birds. *J Appl Microbiol* 82:399–404.

Wallace H. Andrew and Hammack S. Thomas. 1998. *Salmonella*, In FDA bacteriological analytical manual, 8th edition, AOAC int., Inc., Gaithersburg, Md . <http://911emg.com/Ref%20Library%20ERG/FDA%20Bacteriological%20Analysis.pdf> . 28/11/12.

Walsh C, Fanning S. 2008. Antimicrobial resistance in foodborne pathogens: a cause of concern? *Curr. Drugs Targets*. 9:808-815.

Wang, R. F., W. W. Cao, and Cerniglia, 1997. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *J. Appl. Microbiol.* 83:727: 736.

Wonderling, L.D., Wilkinson, B.J. and Bayles, D.O. 2004. The *htrA* (*degP*) gene of *Listeria monocytogenes* 10403S is essential for optimal growth under stress conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1935–1943.

Zhao, T., M. P. Doyle, and R. E. Besser, 1993. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 in apple cider with and without preservatives. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2526-2530.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Cindy Joanna Caballero Prado

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Acentuación en Microbiología

Tesis: **DETERMINACIÓN DE LOS PUNTOS SUSCEPTIBLES DE CONTAMINACIÓN EN LA CADENA DE PRODUCCIÓN DE MELÓN CANTALOUPE (*Cucumis melo* L.) CULTIVADO EN LA REGIÓN DE PARRAS, COAHUILA**

Campo de Estudio: Inocuidad Alimentaria

Datos Personales: Nacida en Morelia, Michoacán, el 2 de Marzo de 1985, hija de María Yolanda Prado Andrade y Elias Caballero Ayala.

Educación: Egresada de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, de Morelia, Michoacán, grado obtenido en 2010.