

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**IDENTIFICACIÓN DE FUENTES DE CONTAMINACIÓN DURANTE LA
PRODUCCIÓN DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill.) EN EL ESTADO
DE NUEVO LEÓN, MÉXICO**

Por

Q.F.B. MA. DEL CARMEN CARDENAS CARDENAS

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

Agosto 2012

**IDENTIFICACIÓN DE FUENTES DE CONTAMINACIÓN DURANTE LA
PRODUCCIÓN DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill.) EN EL ESTADO
DE NUEVO LEÓN, MÉXICO**

Comité de tesis

Dr. José Santos García Alvarado / Director de Tesis

PhD. Juan León / Secretario

Dra. Norma Laura Heredia Rojas / Primer Vocal

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero / Segundo Vocal

Dra. Luisa Yolanda Solís Soto / Tercer Vocal

M.C. Eduardo Sánchez García / Suplente Vocal

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, bajo la dirección del Dr. José Santos García Alvarado y la codirección de la Dra. Norma Laura Heredia Rojas y la Dra. Luisa Yolanda Solís Soto. Este proyecto fue realizado mediante el apoyo del United States Department of Agriculture (USDA).

AGRADECIMIENTOS

A DIOS, por ser mi apoyo, inspiración y fortaleza, mi todo. Por escucharme y responder siempre. Por Él he llegado hasta aquí y con Él seguiré adelante en la vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por otorgarme una beca para la realización de mis estudios de Posgrado.

Al United States Department of Agriculture (USDA), por el apoyo proporcionado para la realización de esta investigación.

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL por permitirme realizar mis estudios en esta Institución.

Al Dr. Santos García y la Dra. Noma Heredia, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme formar parte de su equipo de investigación, además por la asesoría brindada en la realización de esta tesis.

Al PhD. Juan León, por formar parte de mi comité de tesis y por su valiosa asesoría en el desarrollo de los protocolos de muestreo y de análisis.

A la Dra. Luisa Solís, por su asesoría en la realización de este trabajo y por el apoyo proporcionado durante los muestreos.

A la MSPH Anna Fabiszewski y a la PhD. Faith Bartz, por su valioso apoyo en el desarrollo técnico de los protocolos de muestreo y de análisis. Por brindar su amistad y su tiempo durante su estancia en Monterrey.

Al Dr. Roberto Mercado, por toda la asesoría brindada en el análisis estadístico de los datos obtenidos en la investigación.

Al Dr. Eduardo Fernández Escartín, por la asesoría técnica.

A mis padres, por ser mi inspiración y mi apoyo en cada decisión y en cada paso de mi vida. A mi papá quien es el mejor padre y maestro. A mi mamá, quien es mi maestra, consejera, confidente y amiga. Por ustedes estoy aquí y salgo cada día a dar lo máximo. ¡Los quiero muchísimo!

A mis hermanos, Felipe y Danny, por escucharme en los momentos buenos y malos. Son mi apoyo en la vida y por ustedes salgo adelante.

A mi abuelita Petrita Herrera, por inspirarme y ser un ejemplo de vida. Por estar siempre ahí para mí. A mi tía Nora Rdz., mi segunda madre, por sus oraciones y cariño. A Mónica González, mi comadre, amiga y casi hermana, a su esposo y sus tres bebés, por su cariño y consejos.

Al M.C. Eduardo Sánchez, por toda la ayuda brindada durante mi estancia en el laboratorio, por su amistad, por sus consejos, sus ocurrencias y por escucharme en momentos difíciles.

A la M.C. Sandra Castillo, por su amistad, sus consejos y su ayuda, por contagiarme con su alegría y optimismo en los momentos de estrés.

A la IBQ Karina Molina, por su amistad, apoyo y compañía en todo este largo y difícil recorrido. Después de interminables horas de trabajo... ¡lo logramos! ☺

A la QFB Teresa Guízar, por su amistad, sus consejos y sus atinadas ocurrencias cuando más se necesitaba.

A la QBP Bárbara Guevara, por su amistad y su valioso y oportuno apoyo durante el trabajo de laboratorio.

A Don Esteban (†), por escucharme y aconsejarme siempre.

A todos ellos, por hacer más agradable mi estancia en el LABGEM. Los llevaré siempre en mi corazón y doy gracias a Dios por ponerlos en mi vida.

A la M.C. Fabiola Venegas, QBP Aldo Galván, Roberto Blancas y QBP Nereida, por su asesoría técnica y su valioso apoyo durante los muestreos.

A todos aquellos que de una u otra forma tocaron mi vida, porque de ellos aprendí algo. Espero que tengan Éxito en lo que emprendan y que Dios los bendiga en sus vidas.

DEDICATORIA

A Dios

A mis Padres:

Felipe Cárdenas G. y Carmen Cárdenas H.

Las pruebas pueden ser más duras de lo que esperamos. Pero son necesarias para el aprendizaje. Y cada una de ellas nos aproxima más a nuestros sueños.

Manual del Guerrero de la Luz

Podemos creer que todo lo que la vida nos ofrecerá mañana es repetir lo que hicimos ayer y hoy. Pero, si prestamos atención, nos daremos cuenta de que ningún día es igual a otro. Cada mañana trae una bendición escondida; una bendición que solo sirve para ese día y que no puede guardarse ni desaprovecharse. Si no usamos este milagro hoy, se perderá. Este milagro está en los detalles de lo cotidiano; es preciso vivir cada minuto porque allí encontramos la salida de nuestras confusiones, la alegría de nuestros buenos momentos, la pista correcta para la decisión que ha de ser tomada. No podemos dejar nunca que cada día parezca igual al anterior porque todos los días son diferentes. Presta atención a todos los momentos, porque la oportunidad, el “instante mágico”, está a nuestro alcance.

Paulo Coelho

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.	iv
DEDICATORIA.	vi
TABLA DE CONTENIDO.	viii
LISTA DE TABLAS.	xii
LISTA DE FIGURAS.	xiii
NOMENCLATURA.	xv
1. RESUMEN Y ABSTRACT.	1
2. INTRODUCCIÓN.	3
3. HIPÓTESIS.	5
4. OBJETIVOS.	6
4.1 Objetivo general.	6
4.2 Objetivos particulares.	6
5. ANTECEDENTES.	7
5.1 Tomate.	7
5.1.1 Origen.	8
5.1.2 Taxonomía y morfología.	10
5.1.3 Índices de cosecha y de calidad.	13
5.1.4 Importancia económica.	14
5.1.5 Principales estados productores.	15
5.1.6 Producción de riego y temporal.	15
5.2 Microorganismos indicadores de contaminación fecal en frutas y hortalizas frescas.	17
5.2.1 <i>Escherichia coli</i>	18
5.2.2 <i>Enterococcus</i> spp.	21

5.2.3	Coliformes.	23
5.3	Microorganismos patógenos en frutas y hortalizas frescas.	23
5.3.1	<i>E. coli</i> O157:H7.	25
5.3.2	<i>Salmonella</i> spp.	27
5.4	Inocuidad alimentaria en frutas y hortalizas frescas.	29
5.5	Brotos de enfermedades transmitidas por alimentos asociados al consumo de frutas y hortalizas.	32
5.6	Fuentes de contaminación de frutas y hortalizas.	36
5.6.1	Precosecha.	36
5.6.2	Cosecha.	43
5.6.3	Poscosecha.	46
5.6.4	Punto de venta y manipulación del consumidor.	50
6.	MATERIAL Y MÉTODOS.	53
Parte 1: Microorganismos indicadores y patógenos en tomate de punto de venta del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León		
6.1	Zona geográfica de muestreo.	53
6.2	Muestreo.	54
6.3	Cepas bacterianas.	55
6.4	Determinación de microorganismos indicadores.	55
6.4.1	Preparación de la muestra.	56
6.4.2	Mesófilos aerobios.	56
6.4.3	Coliformes totales.	56
6.4.4	Coliformes fecales.	57
6.5	Microorganismos patógenos.	58
6.5.1	Determinación de <i>Salmonella</i> spp.	58
6.5.1.1	Identificación bioquímica.	59
6.5.2	Determinación de <i>E. coli</i> O157:H7.	60
6.5.3	Confirmación de <i>Salmonella</i> spp. y <i>E. coli</i> O157:H7 por la técnica de PCR.	60
6.5.3.1	Extracción de DNA.	61
6.5.3.2	Amplificación.	61
6.5.3.3	Visualización.	61
Parte 2: Microorganismos indicadores y patógenos en la cadena de producción en campo de tomate de la región de Cadereyta Jiménez, Nuevo León, México		
6.6	Zona geográfica de muestreo.	62
6.7	Muestreo.	63
6.7.1	Determinación de puntos de muestreo.	65
6.7.2	Tipos de muestra.	65
6.7.2.1	Tomate.	65
6.7.2.2	Suelo.	66
6.7.2.3	Agua de irrigación.	66

6.7.2.4	Agua de fuente.	66
6.7.2.5	Enjuague de manos.	67
6.8	Muestras compuestas.	67
6.9	Cuantificación de microorganismos indicadores.	68
6.9.1	<i>E. coli</i> y coliformes.	69
6.9.1.1	Tomate y enjuague de manos.	69
6.9.1.2	Agua de irrigación.	71
6.9.1.3	Suelo.	71
6.9.2	Enterococos totales.	71
6.9.2.1	Tomate y enjuague de manos.	71
6.9.2.2	Suelo.	72
6.9.2.3	Agua de irrigación.	72
6.10	Microorganismos patógenos.	73
6.10.1	Tomate y enjuague de manos.	73
6.10.2	Agua de irrigación.	74
6.10.3	Suelo.	74
6.11	Análisis estadístico.	74
7.	RESULTADOS.	77
<p>Parte 1: Microorganismos indicadores y patógenos en tomate de punto de venta del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León</p>		
7.1	Microorganismos indicadores.	77
7.1.1	Mesófilos aerobios (MA).	77
7.1.2	Coliformes totales (CT).	79
7.1.3	Coliformes fecales (CF).	82
7.2	Microorganismos patógenos.	87
<p>Parte 2: Microorganismos indicadores y patógenos en la cadena de producción en campo de tomate de la región de Cadereyta Jiménez, Nuevo León, México</p>		
7.3	Microorganismos indicadores.	87
7.3.1	<i>E. coli</i>	87
7.3.2	Coliformes totales.	88
7.3.3	Coliformes fecales.	90
7.3.4	Enterococos totales.	91
7.4	Microorganismos patógenos.	92
8.	DISCUSIÓN.	93
<p>Parte 1: Microorganismos indicadores y patógenos en tomate de punto de venta del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León</p>		
8.1	Microorganismos indicadores.	93
8.2	Microorganismos patógenos.	96

Parte 2: Microorganismos indicadores y patógenos en la cadena de
producción en campo de tomate de la región de Cadereyta Jiménez,
Nuevo León, México

8.3 Microorganismos indicadores.	99
8.4 Microorganismos patógenos.	104
9. CONCLUSIONES.	106
10. LITERATURA CITADA.	108
11. APÉNDICE	
Tabla de números aleatorios de muestreo.	128
12. RESUMEN CURRICULAR.	129

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Composición nutricional por 100 g de tomate fresco.....	8
2. Iniciadores utilizados en PCR.....	62
3. Variables dependientes e independientes.....	75

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Hojas de una planta de tomate.....	11
2. Floración del tomate.....	12
3. Fruto inmaduro de una planta de tomate.....	12
4. Tabla patrón de color utilizada por USDA, que indica los diferentes estados de madurez del tomate.....	13
5. Formas del tomate.....	14
6. Riego por goteo.....	16
7. Mapa de Nuevo León y su área metropolitana.....	54
8. Vista aérea de algunos cultivos en los que se obtuvieron muestras de una de las huertas de estudio, Cadereyta, N. L.....	63
9. Esquema de una cadena.....	64
10. Sistema de filtración por membrana para cuantificación de microorganismos indicadores y detección de patógenos.....	69
11. Placa de agar RAPID' <i>E.coli</i> 2.....	70
12. Placa de agar KF Streptococcus.....	72
13. Cuentas de mesófilos aerobios (MA) en muestras de tomate bola y huaje en punto de venta expendidos en supermercados y mercados en el área metropolitana de Monterrey, N. L.....	78
14. Cuentas de mesófilos aerobios (MA) en dos variedades de tomate obtenidos de supermercados y mercados del área metropolitana de Monterrey, N. L.....	79
15. Cuentas de coliformes totales (CT) de muestras de tomate que se	

expenden en los diferentes municipios de Monterrey, N. L. y su área metropolitana.....	80
16. Cuentas de coliformes totales (CT) en dos variedades de tomate.....	81
17. Cuentas de coliformes totales (CT) en muestras de tomate según los tipos de establecimiento de Monterrey y su área metropolitana.....	82
18. Cuenta de coliformes fecales en muestras de tomate expendidos en supermercados del área metropolitana de Monterrey, N. L.....	84
19. Cuenta de coliformes fecales en muestras de tomate expendidos en mercados del área metropolitana de Monterrey, N. L.....	85
20. Cuenta de coliformes fecales en muestras de tomate bola expendidos en el área metropolitana de Monterrey, N. L.....	86
21. Cuenta de coliformes fecales en muestras de tomate huaje expendidos en el área metropolitana de Monterrey, N. L.....	86
22. Cuentas de <i>E. coli</i> en huertas de Nuevo León.....	88
23. Cuentas de coliformes totales en huertas de Nuevo León.....	89
24. Cuentas de coliformes fecales en huertas de Nuevo León.....	90
25. Cuentas de enterococos totales en huertas de Nuevo León.....	91

NOMENCLATURA

°	Grados
° C	Grados Celsius
=	Igual
™	Marca no registrada (unregistered trademark)
®	Marga registrada (registered trademark)
±	Más/menos
	Mayor o igual que
>	Mayor que
	Menor o igual que
<	Menor que
	Minutos
-	Negativo
\$	Pesos
/	Por
%	Por ciento
+	Positivo
ANOVA	Análisis de varianza
ATCC	American Type Culture Collection
ACP	Cuenta aerobia en placa (Aerobic Count Plate, siglas en inglés)
BPA	Buenas Prácticas Agrícolas (GAP, siglas en inglés)
BPF	Buenas Prácticas de Fabricación (GMP, siglas en inglés)
BPH	Buenas Prácticas de Higiene (GHP, siglas en inglés)
BPM	Buenas Prácticas de Manufactura (GMP, siglas en inglés)
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CF	Coliformes fecales
CFSAN	Center for Food Safety and Applied Nutrition

cm	Centímetros
CT	Coliformes totales
DAEC	<i>E. coli</i> de adherencia difusa
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitosina trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
E	Escobedo
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
EFSA	European Food Safety Authority
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogénica
ETAs	Enfermedades transmitidas por alimentos
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
E.U.A.	Estados Unidos de Norteamérica
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA	Food and Drug Administration
FDA-BAM	Manual de Análisis Bacteriológico (Food and Drug Administration – Bacteriological Analytical Manual, siglas en inglés)
Fig.	Figura
g	Gramo(s)
GAL	-D-galactosidasa
GAP	Good Agricultural Practices
GHP	Good Hygiene Practices
GLUC	-D-glucuronidasa
GMP	Good Manufacturing Practices
Gpe	Guadalupe
h	Hora(s)

ha	Hectárea(s)
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points
HCl	Ácido clorhídrico
HUS	Síndrome urémico hemolítico
ICC	Infusión Cerebro Corazón
IFSE/UA	Institute of Food Science and Engineering, University of Arkansas
JIFSAN	Joint Institute for Food Safety and Applied Nutrition
KCl	Cloruro de potasio
Kg	Kilogramo(s)
km	Kilómetro(s)
km ²	Kilómetros cuadrados
L	Litro(s)
LIA	Agar de hierro y lisina
log	Logaritmo
log UFC/g	Logaritmo de unidades formadoras de colonias por g
log UFC/ml	Logaritmo de unidades formadoras de colonias por mililitro
M	Concentración Molar
MA	Mesófilos aerobios
mg	Miligramo (s)
μg	Microgramo (s)
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
mg/l	Miligramo por litro
μg/ml	Microgramo por mililitro
min	Minuto (s)
ml	Mililitro (s)
μl	Microlitro (s)
mm	Milímetro (s)
μm	Micrómetro (s)
mmol/l	Milimolar por litro
μmol/l	Micromolar por litro
Mty	Monterrey

MUG	4-metilumbeliferil- -D-glucurónido
NaCl	Cloruro de sodio
NaClO	Hipoclorito de sodio
nm	Nanómetros
NMP	Número más probable
NMP/g	Número más probable por gramo
NOM	Norma Oficial Mexicana
oz.	Onza (s)
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de Hidrógeno
ppm	Partes por millón
RV	Caldo Vassiliadis-Rappaport
RVBA	Agar Bilis Rojo Violeta
s	Segundos
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SB	Agar sulfito bismuto
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
SMAC	Agar MacConkey con sorbitol
SMAC-CT	Agar MacConkey con sorbitol suplementado con telurito de potasio y cefixima
SN	San Nicolás de los Garza
SP	San Pedro Garza García
SS	Agar para <i>Salmonella-Shigella</i>
STEC	<i>E. coli</i> productora de toxina Shiga
ton	Tonelada(s)
ton/ha	Tonelada por hectárea
TSI	Agar de triple azúcar y hierro
U	Unidad de actividad enzimática

UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UFC/g	Unidades Formadoras de Colonias por gramo
UFC/ml	Unidades Formadoras de Colonias por mililitro
USDA	United States Department of Agriculture
V	Voltios
VB	Agar verde brillante
VTEC	<i>E. coli</i> productora de verocitotoxina
WHO	World Health Organization of the United Nations
xg	Gravedad
XLD	Agar xilosa lisina desoxicolato

RESUMEN

Las frutas y hortalizas son responsables de una amplia y creciente proporción de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs). Estos productos pueden contaminarse en cualquier punto de la cadena “de la granja a la mesa”. En el presente trabajo se identificaron fuentes de contaminación fecal, se cuantificaron microorganismos indicadores (mesófilos aerobios, *E. coli*, coliformes totales y fecales, *Enterococcus* spp.) y se investigó la presencia de patógenos bacterianos (*Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7) durante la producción de tomate en la región de Cadereyta Jiménez en el estado de Nuevo León, México, incluyendo el análisis microbiológico del producto, agua de irrigación, suelo y enjuague de manos de manipuladores. Se emplearon metodologías descritas en las Normas Oficiales Mexicanas y en el Bacteriological Analytical Manual (FDA-BAM). Además, se analizaron 80 muestras de tomate bola y huaje adquiridas en supermercados y mercados populares de Monterrey, N. L. y su área metropolitana, en donde encontramos que las cuentas de indicadores fueron bajas, se encontró *Salmonella* spp. (1.25%) y ausencia de *E. coli* y *E. coli* O157:H7. A nivel de campo, se analizaron 136 muestras de tomate, suelo, agua de irrigación y enjuague de manos de manipuladores. Las cuentas de indicadores en el agua de irrigación y el producto fueron bajas. Se encontró *E. coli* en todos los tipos de muestra y ausencia de *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7. Las fuentes de contaminación principales en la producción de tomate fueron el suelo y las manos de los manipuladores. Para minimizar la contaminación del tomate producido en Nuevo León, se recomienda el cumplimiento de prácticas agrícolas y de manufactura y la continua capacitación del personal.

ABSTRACT

Produce is responsible for an increasingly larger proportion of foodborne disease outbreaks. These products may be contaminated at any stage of the farm-to-fork chain. At this study, we identified fecal contamination sources, we also sought and enumerate indicator microorganisms (total aerobic bacteria, *E. coli*, total and fecal coliforms, and *Enterococcus* spp.) and presence of bacterial pathogens (*Salmonella* spp. and *E. coli* O157:H7) was investigated, throughout the tomato production in Cadereyta Jiménez, Nuevo León, Mexico. Microbiological analysis of tomato, irrigation water, soil, and workers hand-rinse was performed. Methodologies set in Mexican standards and Bacteriological Analytical Manual (FDA-BAM) were used. A total of 80 samples of round and pear (Roma) tomato were collected from supermarkets and popular markets in Monterrey, N. L. and its metropolitan area. Indicator counts were low, *Salmonella* spp. (1.25%) was found and no *E. coli* and *E. coli* O157:H7 were detected. At the field, a total of 136 tomato, soil, irrigation water, and hand-rinse samples were assayed. Indicator counts in water and tomato samples were low. *E. coli* was found in all sample types and no *Salmonella* spp. and *E. coli* O157:H7 were detected. Main contamination sources in tomato production were soil and workers hands. To reduce microbial contamination in Nuevo Leon-produced tomato, we recommend the implementation of agricultural practices and manufacturing practices besides continuous staff training.

INTRODUCCIÓN

En los países en vías de desarrollo, las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) representan uno de los problemas de salud pública más importantes, con repercusiones que afectan los ámbitos económico, político y social (Castro *et al.*, 2006). En los países desarrollados, como Estados Unidos, estas enfermedades son un problema importante de salud pública, ya que en las últimas décadas su presencia ha ido en aumento y se han presentado gran cantidad de brotes de ETAs que involucran todo tipo de alimentos, entre ellos los productos vegetales.

La industria de frutas y hortalizas frescas ha evolucionado rápidamente durante las últimas tres décadas, esto debido al creciente comercio internacional, el suministro de alimentos fuera de temporada y el aumento en la demanda de estos productos por el interés de consumir alimentos no sólo saludables, sino inocuos, lo que constituye para la industria de alimentos un reto a vencer (Johnston *et al.*, 2005).

Sin embargo, en México la información respecto a los peligros microbianos y la incidencia de enfermedades asociadas al consumo de productos hortofrutícolas es muy limitada o nula. Esta información es indispensable, ya que permitirá desarrollar medidas objetivas destinadas a disminuir o controlar las enfermedades transmitidas por el consumo de frutas y hortalizas (Castro *et al.*, 2006).

Por tal motivo, en este proyecto se pretende investigar la presencia y cuantificación de algunos microorganismos indicadores de contaminación fecal en tomate, además de identificar las posibles fuentes de contaminación al cuantificar dichos microorganismos en el entorno donde se produce el tomate antes, durante y después de su cosecha, tomando muestras de suelo, agua y las manos de los manipuladores; con esto se pudiera conocer si hay asociación entre la contaminación del producto y la de su ambiente.

En México, el tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es la segunda hortaliza en importancia después del chile, debido al valor de su producción y a la demanda de mano de obra que genera (Ramos *et al.*, 2006). La superficie total sembrada en el 2010 fue de unas 58,300 ha dando una producción de 2.2 millones de toneladas. El producto no sólo se consume en México, sino que se exporta a países de Centroamérica y principalmente a Estados Unidos (SAGARPA, 2008; SAGARPA, 2011; Valdés, 2011).

Por la importancia económica y agrícola del tomate, se eligió ésta como hortaliza de estudio.

HIPÓTESIS

El tomate que se produce y se vende en el estado de Nuevo León está contaminado con microorganismos indicadores fecales, pero no con microorganismos patógenos. Los microorganismos indicadores y/o patógenos presentes en el tomate y sus niveles están asociados con aquéllos presentes en agua de irrigación, en suelo o en manos de manipuladores.

OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles de microorganismos indicadores y patógenos en tomate en punto de venta e identificar fuentes de contaminación fecal, cuantificar los microorganismos indicadores de contaminación fecal e investigar la presencia de microorganismos patógenos bacterianos durante la producción de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), incluyendo el análisis microbiológico del producto, agua de irrigación, suelo y enjuague de manos de manipuladores.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Cuantificar los microorganismos indicadores (mesófilos aerobios, *E. coli*, coliformes totales y fecales) y determinar la presencia de microorganismos patógenos (*Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7) en el tomate en punto de venta del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León.
- 2) Analizar microbiológicamente muestras de tomate, suelo, agua de irrigación y lavado de manos de manipuladores recolectadas en 2 huertas de Nuevo León, México para identificación y cuantificación de microorganismos indicadores (*E. coli*, coliformes totales y fecales y *Enterococcus* spp.) y patógenos como *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7.
- 3) Identificar posibles fuentes de contaminación del producto.

ANTECEDENTES

5.1 TOMATE

En México, el tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es la segunda hortaliza en importancia después del chile, su valor radica en la magnitud y rendimiento de producción y en la demanda de mano de obra que genera, aunado a que posee cualidades y facilidades para adecuarse a la dieta alimenticia ya que su consumo puede ser en fresco o procesado (Ramos *et al.*, 2006).

El *tomate rojo* o *jitomate* es un alimento bajo en calorías, cuyos principales componentes son agua y carbohidratos; los azúcares y ácidos orgánicos presentes le dan un sabor característico y demandado por los consumidores mexicanos y de otros países (SAGARPA, 2011).

Este alimento es fuente de vitaminas A, B1, B2, B6, C y E, y de minerales como fósforo, potasio, magnesio, manganeso, zinc, cobre, sodio, hierro y calcio. Tiene un importante valor nutricional ya que incluye proteínas, hidratos de carbono, fibra, ácido fólico, ácido tartárico, ácido succínico y ácido salicílico (Tabla 1) (Jaramillo *et al.*, 2007).

Además, este producto es rico en licopeno, pigmento que le proporciona su característico color rojo, y su consumo proporciona el 90% del necesario para el organismo. El licopeno es el más potente de los antioxidantes y se ha demostrado que esta sustancia puede prevenir e incluso combatir el cáncer al proteger a las células de los efectos nocivos de la oxidación celular. El tomate también posee el antioxidante glutatión que ayuda a depurar el organismo de productos tóxicos e impide la acumulación de metales pesados como cadmio (Cd), plomo (Pb) y mercurio (Hg) (Jaramillo *et al.*, 2007; Agros, 2011).

Elemento	Cantidad
Agua	93.5%
Proteína	0.9 g
Grasa	0.1 g
Calorías	23
Carbohidratos	3.3 g
Fibra	0.8 g
Fósforo	19 mg
Calcio	7 mg
Hierro	0.7 mg
Vitamina A	1,100 UI
Vitamina B1	0.05 mg
Vitamina B2	0.02 mg
Vitamina C	20 mg
Niacina	0.6 mg

Tabla 1. Composición nutricional por 100 g de tomate fresco (Jaramillo *et al.*, 2007; Agros, 2011).

5.1.1 Origen

Casi todos los tomates comúnmente conocidos caen dentro de la especie *L. esculentum*. A pesar de las diferencias que existen entre la mayoría de estos tomates, no se separan en variedades botánicas únicas debido a que comparten un origen, de modo que los tomates encontrados en supermercados y aquellos que son procesados se

encuentran en esta categoría. Ambos tipos se originan de un solo tipo silvestre de tomate proveniente de Perú, el tomate cherry, *L. esculentum* var. *cerasiforme* (Mueller, 2004).

El origen del género *Lycopersicon* se localiza en la región andina que se extiende desde el sur de Colombia al norte de Chile, migrando a través de Ecuador, Colombia, Panamá y América Central hasta llegar a México, donde fue domesticado por el hombre, y eventualmente se esparció a Europa. En la lengua náhuatl de México era llamado *tomatl*, que sin lugar a dudas, dio origen a su nombre actual. A partir de entonces se originaron variedades más grandes por selección (Infoagro Systems, 2003; Jaramillo *et al.*, 2007).

Durante el siglo XVI se consumían en México tomates de distintas formas y tamaños e incluso rojos y amarillos, para entonces ya habían sido llevados a España e Italia donde servían como alimento. En otros países europeos, como Alemania, sólo se utilizaban en farmacia y así se mantuvieron hasta comienzos del siglo XIX. Los españoles y portugueses difundieron el tomate a Oriente Medio y África, y de allí a otros países asiáticos. De Europa también se difundió a Estados Unidos y Canadá (Infoagro Systems, 2003).

El tomate, después de haber llegado a Inglaterra, fue llevado a Estados Unidos alrededor del año 1711, donde fue cultivado como planta ornamental; aproximadamente en 1850 ocurrió el consumo de tomate como fuente de alimento en ese país y sólo a partir de esta fecha comenzó a crecer el interés científico y agronómico en esta hortaliza. Sólo a partir del siglo XIX adquirió gran importancia económica mundial, hasta llegar a ser, junto con la papa, la hortaliza más difundida y predominante del mundo (Jaramillo *et al.*, 2007).

Existen muchas otras variedades botánicas de tomate: *L. esculentum* var. *esculentum*, *L. esculentum* var. *cerasiforme* (tomate cherry), *L. esculentum* var. *pyriforme* (tomate pera), *L. esculentum* var. *grandifolium*, *L. esculentum* var. *validium* entre otras (Mueller, 2004).

5.1.2 Taxonomía y morfología

El tomate es una planta dicotiledónea, perteneciente a la familia *Solanaceae* y al género *Lycopersicon*. *L. esculentum* es la especie más cultivada y posee un gran número de especies silvestres relacionadas (Jaramillo *et al.*, 2007). A continuación se muestra la clasificación taxonómica de esta hortaliza (Agros, 2011):

Orden: Scrophulariales

Suborden: Solanineae

Familia: *Solanaceae*

Tribu: Solaneae

Género: *Lycopersicon*

Subgénero: *Eulycopersicon*

Especie: *Lycopersicon esculentum*

Descriptor (1788): Miller (Jaramillo *et al.*, 2007).

El tomate es una planta de clima cálido y se puede sembrar todo el año, sin embargo en el período de lluvias, la incidencia de enfermedades en este cultivo es mayor, mientras que durante la época seca, las plagas son el principal problema; estos problemas son superables mediante la implementación de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) de lo cual depende el éxito de una buena cosecha (Corpeño, 2004).

A continuación se describe la morfología general de la planta de tomate (Infoagro Systems, 2003; Jaramillo *et al.*, 2007; SIAP, 2010):

Planta:

La planta de tomate es perenne de porte arbustivo y se cultiva anualmente, aunque en ocasiones dura más de un año en el terreno. Puede desarrollarse de forma rastrera, semierecta o erecta. Existen variedades de crecimiento limitado (determinadas) y otras de crecimiento ilimitado (indeterminadas).

El sistema radicular del tomate es superficial y está constituido por una raíz principal (corta y débil), raíces secundarias (numerosas y potentes) y raíces adventicias.

El tallo principal tiene un diámetro que oscila entre 2 y 4 cm en la base, sobre el que se desarrollan hojas, tallos secundarios e inflorescencias.

Las hojas son lobuladas con los bordes dentados, se encuentran en número de 7 a 9, están recubiertas de pelos glandulares y se disponen de forma alternativa sobre el tallo (Fig. 1).



Figura 1. Hojas de una planta de tomate (Jaramillo *et al.*, 2007).

Flor:

Consta de cinco o más sépalos y de seis o más pétalos dispuestos de forma helicoidal. El color de las flores es amarillo y son normalmente pequeñas (uno a dos cm de diámetro). Se agrupan en ramilletes compuestos de 4 a 20 flores, dependiendo de la variedad cultivada y las condiciones de desarrollo de la planta (Fig. 2).



Figura 2. Floración del tomate (Jaramillo *et al.*, 2007).

Fruto:

El fruto del tomate es una baya generalmente redondeada y achatada, aunque también existen algunas variedades de fruto alargado o en forma de pera. Está constituido por el pericarpo, el tejido placentario y las semillas. La epidermis es delgada y resistente, color rojo al madurar. La pulpa posee una consistencia gelatinosa y está dividida en lóculos que alojan a las semillas. El fruto puede alcanzar un peso que oscila entre unos pocos miligramos y 600 gramos (Fig. 3).



Figura 3. Fruto inmaduro de una planta de tomate.

El cambio de color del jitomate de verde (inmaduro) a rojo (maduro) se debe a la degradación de clorofila en los cromoplastos de las células y formación de pigmentos

carotenoides (amarillo-anaranjados) y licopeno, un pigmento rojo que pertenece a la familia de los carotenoides.

5.1.3 Índices de cosecha y de calidad

El mínimo estado de madurez aceptable para cosecha se define en términos de la estructura interna del fruto: semillas completamente desarrolladas y no se cortan al rebanar el fruto; el material gelatinoso está presente en al menos un lóculo y se está formando en otros. Este estado se denomina *Verde Maduro 2* (Mature Green 2) (Suslow and Cantwell, 2011).

Generalmente, la mínima madurez de cosecha corresponde a la clase *Rosa* (Pink) (Figura 4) del patrón de color utilizado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (United States Department of Agriculture, USDA). Los tomates de esta clase son de vida de anaquel larga (USDA, 1975; Suslow and Cantwell, 2011).

En cuanto a la calidad del tomate, se basa principalmente en su uniformidad y en la ausencia de defectos de crecimiento y manejo. El tamaño no es un factor del grado de calidad sin embargo puede influir en las expectativas de calidad comercial (Suslow and Cantwell, 2011).

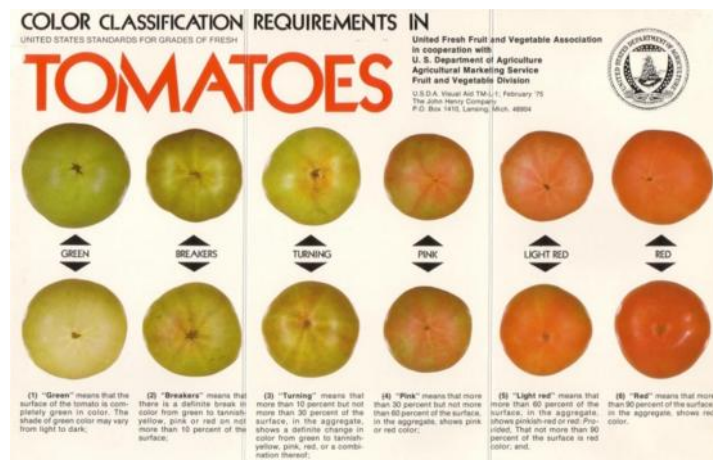


Figura 4. Tabla patrón de color utilizada por USDA, que indica los diferentes estados de madurez del tomate. El estado 4 (Pink) corresponde a la mínima madurez de cosecha.

La forma del tomate debe ser la esperada dependiendo el tipo del que se trate: redondo, forma globosa, globosa aplanada u ovalada (Fig. 5). El color debe ser uniforme y no debe presentar hombros verdes, pudiendo ser anaranjado-rojo a rojo intenso u amarillo claro. La apariencia debe ser lisa y se aceptan cicatrices pequeñas que correspondan a la punta floral y al pedúnculo; ausencia de grietas de crecimiento, quemaduras de sol, daños por insectos y daño mecánico o magulladuras. El tomate debe ser firme al tacto y no se debe deformar fácilmente debido a sobremadurez (Suslow and Cantwell, 2011).

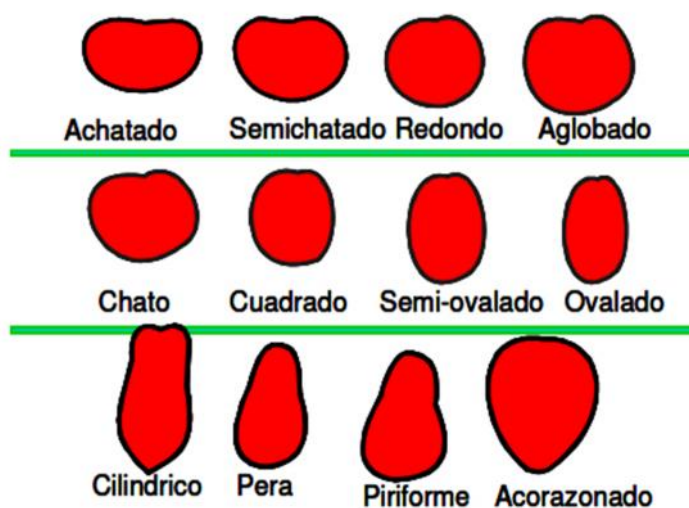


Figura 5. Formas del tomate. El fruto puede adoptar diferentes formas, dependiendo de la variedad que se trate (Jaramillo *et al.*, 2007).

5.1.4 Importancia económica

El tomate es una hortaliza cuyo cultivo, cosecha y comercialización genera 72 mil empleos directos y aproximadamente 10.7 millones de empleos indirectos en México. En el 2009, la superficie total sembrada de tomate ascendió a 53,572.62 hectáreas, mientras que en el 2010 fue de unas 58,300 ha (SAGARPA, 2011; Valdés, 2011).

En el año 2009, la producción nacional para abastecer el consumo se ubicó en 2,043,814 toneladas, cantidad suficiente para repartir 25 Kg de tomate a cada habitante del país; el valor económico de tal producción fue de \$12,233,405,880.00 pesos (SAGARPA, 2011). Se estima una producción de 2.2 millones de toneladas para la temporada 2010/11, asumiendo condiciones meteorológicas favorables y buenos precios internacionales (Valdés, 2011).

Los rendimientos promedio de producción se han incrementado debido a los avances tecnológicos agrícolas y al empleo de técnicas de agricultura protegida, pasando de 23 ton/ha en 1990 a 39 ton/ha en 2010 (Valdés, 2011).

En cuanto a la modalidad de siembra, en invernadero se logran cosechar hasta 350 ton/ha, siendo la modalidad que proporciona el mayor rendimiento; en la siembra de malla sombra el volumen de cosecha es hasta 160 ton en tanto que a cielo abierto se cosechan de 30 a 40 ton/ha (SIAP, 2010).

Los principales tipos de tomate rojo que se producen en México son: Saladette, Bola y Cherry (SAGARPA, 2011).

5.1.5 Principales estados productores

Una tercera parte del tomate rojo se produce en Sinaloa, esta entidad junto con Baja California Norte, Michoacán, Jalisco, San Luis Potosí y Baja California Sur aportan el 65.7% del volumen de producción de esta variedad de tomate a nivel nacional (SAGARPA, 2011).

5.1.6 Producción de riego y temporal

Existen diversos sistemas de riego (gravedad, aspersión y goteo), su uso depende de la disponibilidad de recursos, pendiente del terreno, textura de suelo, abastecimiento y calidad de agua. Independientemente del sistema seleccionado, se debe evitar someter el

cultivo a deficiencias o excesos de agua. Además, es importante la buena distribución del riego durante todo el ciclo del cultivo, principalmente antes de la formación de frutos (Corpeño, 2004).

El consumo diario de agua por una planta adulta de tomate es de 1.5 a 2 l/día aproximadamente, cantidad que varía en función de la zona, las condiciones climáticas, la época del año y el tipo de suelo. Por lo general, en el riego por goteo se aplican entre 30 y 40 m³ de agua/manzana/día, dependiendo del tamaño de la planta, zona geográfica y época del año (Corpeño, 2004).

El sistema de riego más eficiente, en términos de productividad y calidad, es el riego por goteo, ya que es el que permite menos pérdidas de agua (Corpeño, 2004) con un aprovechamiento de la misma entre 90 y 95% (Jaramillo *et al.*, 2007). En este sistema de riego, el agua se aplica gota a gota en la proximidad de las plantas mediante cintillas o mangueras (Fig. 6), sin necesidad de humedecer toda la superficie del suelo, sino sólo el sitio donde se desarrolla gran parte del sistema radical, y con elevada frecuencia de aplicación. Este sistema garantiza que por lo menos el 80% del agua se quede en el sitio donde se requiere (Jaramillo *et al.*, 2007).



Figura 6. Riego por goteo (Jaramillo *et al.*, 2007).

Entre las ventajas del riego por goteo se encuentran: mejor distribución y mayor uniformidad en la aplicación de fertilizantes a consecuencia de suministrarse disueltos en el agua de riego, aplicación exacta y localizada del agua, equilibrio apropiado entre el

aire y el agua en el suelo, reducción al mínimo de pérdida de agua por evaporación, disminución de malezas, aplicación integrada de agua y nutrientes, no se ve afectada por el viento, reducción de incidencia de enfermedades del follaje y los frutos y ahorro de mano de obra (Jaramillo *et al.*, 2007).

5.2 MICROORGANISMOS INDICADORES DE CONTAMINACIÓN FECAL EN FRUTAS Y HORTALIZAS FRESCAS

La obtención de alimentos microbiológicamente seguros e inocuos, requiere de técnicas analíticas capaces de detectar microorganismos patógenos aun en bajos niveles. Sin embargo, los alimentos seguros sólo pueden ser producidos mediante el empleo de prácticas higiénicas adecuadas, lo que puede evaluarse monitoreando los microorganismos indicadores (Smoot and Pierson, 1997).

Debido a que no es factible realizar pruebas de detección para todos los microorganismos patógenos, la seguridad microbiológica de frutas y hortalizas sólo puede asegurarse por la ausencia de indicadores (Hirotni *et al.*, 2001).

En las frutas y hortalizas frescas la detección de patógenos se dificulta por muchas razones, entre ellas el prolongado tiempo de detección, la metodología complicada y el elevado costo. La presencia de indicadores microbiológicos en los alimentos a menudo resulta de la contaminación fecal directa o indirecta y por consiguiente sirve como un “marcador” de que ha ocurrido contaminación fecal, y por lo tanto indica la presencia potencial de microorganismos patógenos (León *et al.*, 2009).

Actualmente, se estima que los microorganismos indicadores de calidad microbiológica o vida útil de los alimentos son aquellos microorganismos y/o sus productos metabólicos cuya presencia en alimentos específicos en cantidades determinadas permite evaluar la calidad existente y predecir la vida útil de dichos alimentos (Zucca *et al.*, 1998).

Algunos criterios esenciales para un microorganismo indicador “ideal” incluyen: detecciones y cuantificaciones sencillas y rápidas; fácilmente distinguible de la microflora comensal; asociación consistente (presencia, concentración y ausencia) con el patógeno cuya presencia se intenta indicar; tasa de crecimiento similar o mayor a patógenos; y tasa de inactivación ligeramente más lenta que el patógeno de interés. Aún no se ha identificado un microorganismo indicador que cumpla con todos estos criterios (León *et al.*, 2009).

Algunos de los organismos indicadores que son más comúnmente usados para asegurar la inocuidad alimentaria incluyen bacterias coliformes, *E. coli*, *Enterococcus* spp. totales y el recuento de placas aerobias (APC) o microorganismos mesófilos aeróbicos. Los colifagos han sido propuestos como alternativa de indicadores de contaminación con patógenos virales (León *et al.*, 2009), y se ha encontrado correlación entre bacterias coliformes y colifagos (Hirovani *et al.*, 2001).

5.2.1 *Escherichia coli*

E. coli es una bacteria Gram-negativa, anaerobia facultativa que se encuentra naturalmente presente en el tracto intestinal de humanos y animales, como parte de la microflora. Sin embargo, algunas cepas son capaces de causar enfermedades desde una diarrea leve hasta una similar a la del cólera y puede desencadenar complicaciones potencialmente fatales como el síndrome urémico hemolítico (HUS) (García and Heredia, 2009).

E. coli también puede causar otras infecciones, tales como sepsis, infecciones del tracto urinario, neumonía en pacientes inmunocomprometidos y meningitis (Adams and Moss, 1995; Deisingh and Thompson, 2004).

Esta bacteria fue aislada por primera vez en 1885 a partir de heces de niños por el bacteriólogo alemán Theodor Escherich (Deisingh and Thompson, 2004).

En base a sus características patogénicas, *E. coli* se clasifica en 6 grupos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), que es la más común y es la principal causante de diarrea infantil; *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), que produce enterotoxinas; *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), también conocida como *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC), que causa dolor abdominal severo, diarrea hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (HUS); *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), caracterizada por la invasión del epitelio del colon; *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) y *E. coli* enteroagregativa (EAEC), que se distingue por autoaglutinación de células bacterianas (Nataro and Kaper, 1998; Muniesa *et al.*, 2006). De estos grupos, los primeros cinco han sido implicados en enfermedades transmitidas por alimentos o agua (Feng and Weagant, 2002; García and Heredia, 2009).

EPEC es la más ampliamente distribuida de las *E. coli* diarreicas y es la principal causa de diarrea humana infantil predominantemente en países menos desarrollados, su frecuencia ha ido en aumento en las áreas industrializadas. La infección por EPEC consiste en una diarrea aguda acuosa, no sanguinolenta ni mucoide, a menudo acompañada por fiebre y vómito. Las bacterias colonizan el intestino delgado, inducen la degeneración de las microvellosidades epiteliales y se adhieren a la célula hospedadora, causando lesiones que resultan en la reducción de la capacidad absorbente de la mucosa intestinal. La presentación de la enfermedad va desde una diarrea fulminante hasta una infección subclínica, dependiendo del hospedador (Nataro and Kaper, 1998; Muniesa *et al.*, 2006; García and Heredia, 2009).

EHEC es responsable de serias infecciones en humanos, tales como diarrea, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (HUS). También es conocida como *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) porque sus cepas producen toxina Shiga 1 (Stx1) y toxina Shiga 2 (Stx2) que asemejan a las producidas por *Shigella dysenteriae* (Betts, 2000; Feng and Weagant, 2002). Estas toxinas son los principales factores de virulencia de este microorganismo (Muniesa *et al.*, 2006).

Las cepas de EHEC tienen muy baja dosis infectiva ($1 - 10^2$ UFC) (Paton and Paton, 1998; Muniesa *et al.*, 2006) y coloniza el intestino por adhesión a las células epiteliales. Karmali *et al.* (1983) fueron los primeros que reportaron, en 1983, casos aislados de HUS posterior a infección gastrointestinal por *E. coli* productora de toxina Shiga. El HUS se define por una triada de características: falla renal aguda (principalmente en niños), trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática que se presenta entre el 2 al 15 % de los casos, con elevada mortalidad (Griffin and Tauxe, 1991).

Existen más de 100 serotipos de STEC conocidos por causar enfermedades en humanos, de estos, el serotipo O157:H7 es el más frecuentemente involucrado en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en todo el mundo (Betts, 2000; Feng and Weagant, 2002; García and Heredia, 2009). Otros serotipos patógenos importantes son O18, O26, O103, O111 y O128 (Paton and Paton, 1998).

Las cepas de EIEC son bioquímica, genética y patogenéticamente relacionadas a *Shigella* spp. (Nataro and Kaper, 1998). EIEC consiste en 11 serotipos conocidos (O28a, O28c, O29, O112, O124, O136, O143, O144, O152, O164 y O167) que causan diarrea acuosa o disentería, ésta última con manifestación de heces sanguinolentas, mucosas y con presencia de leucocitos, tenesmo y fiebre. La dosis infectiva en humanos sanos es de 10^6 células o más (Nataro and Kaper, 1998; García and Heredia, 2009).

ETEC es uno de los principales agentes etiológicos causantes de diarrea en infantes y viajeros (García and Heredia, 2009). Se ha encontrado evidencia que sugiere que los vegetales frescos contaminados son una causa común de diarrea del viajero (Beuchat, 1995). Las cepas de ETEC tienen la capacidad de producir enterotoxinas: termolábil (LT es muy similar a la toxina del cólera en tamaño, secuencia, antigenicidad y función) y termoestable (ST), o ambas, y adhesinas de superficie que son factores de colonización. La enfermedad se caracteriza por causar diarrea acuosa con o sin fiebre ligera. La dosis infectiva para ETEC en adultos sanos se estima en al menos 10^8 UFC y menor para grupos de la población susceptibles (García and Heredia, 2009).

De manera general, *E. coli* tiene la capacidad de sobrevivir a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y de crecer a una temperatura mínima de $6.5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las cepas de *E. coli* patógenas y no patógenas poseen resistencia notable a condiciones extremadamente ácidas (García and Heredia, 2009).

Esta bacteria normalmente vive en el tracto intestinal de los animales de sangre caliente y puede contaminar una amplia variedad de alimentos en diferentes formas, incluyendo manipulación con manos contaminadas, insectos contaminados que actúan como vehículos, ruptura de los intestinos durante la evisceración de animales después del sacrificio y contaminación indirecta con agua contaminada. Alimentos como queso, salmón, yogurt, ensaladas, melón, pasteles, vegetales, salami y cárnicos han estado involucrados en brotes por esta bacteria (García and Heredia, 2009).

Para reducir la presencia de este microorganismo se han implementado estrategias de saneamiento (García and Heredia, 2009) y programas de control de calidad, como las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA o GAP), Buenas Prácticas de Higiene (BPH o GHP), Buenas Prácticas de Manufactura (BPM o GMP), así como el sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP).

5.2.2 *Enterococcus* spp.

Los estreptococos fecales están presentes en el tracto gastrointestinal de humanos y animales de sangre caliente, por lo que han sido considerados como buenos indicadores de contaminación fecal (Méndez, 2004).

Los estreptococos fecales comprenden microorganismos del género *Enterococcus* y algunas especies de estreptococos: *Streptococcus bovis* y *S. equinus*. Todos pertenecen al grupo D propuesto por Rebeca Lancefield (Méndez, 2004).

El grupo de los enterococos es un subgrupo de los estreptococos fecales que incluye *Streptococcus faecalis*, *S. faecium*, *S. gallinarum* y *S. avium*. Los enterococos se

diferencian de otros estreptococos por su habilidad para crecer en cloruro de sodio al 6.5%, a pH 9.6 y a 10 °C y 45 °C (Greenberg, 1992).

Los enterococos son Gram-positivos, catalasa negativo, anaerobios facultativos, cuya temperatura de crecimiento oscila entre 10 °C y 45 °C, siendo óptimo a 35 °C. Algunos son móviles (Méndez 2004). Han sido aislados de fuentes ambientales como suelo, aguas superficiales y productos vegetales y/o animales crudos (Johnston *et al.*, 2005).

La porción de enterococos del grupo de estreptococos fecales es un valioso indicador bacteriano para determinar la presencia de contaminación fecal en alimentos y agua; siendo los enterococos el indicador bacteriano de calidad del agua más eficiente (Greenberg, 1992); en el caso de los alimentos, los enterococos comúnmente se encuentran contaminando productos cárnicos y avícolas (Fluckey *et al.*, 2009).

Algunas características que les dan ventajas como indicadores microbianos de contaminación fecal son: los enterococos son más persistentes en el ambiente que *E. coli* y los coliformes termotolerantes, por lo que pueden ser utilizados como buenos indicadores de la calidad microbiológica de agua para consumo humano y el monitoreo de la eficacia de los tratamientos de desinfección utilizados para garantizar la potabilidad, también como los principales microorganismos indicadores en aguas recreacionales dulces y marinas. Otra ventaja es que los métodos utilizados para su detección y enumeración no presentan alto grado de complejidad, ni se necesita infraestructura, material o equipo de gran especialización, como es requerido para identificar a otros microorganismos indicadores tales como colifagos o clostridios y otras bacterias anaerobias (Méndez, 2004).

Durante las últimas décadas, *Enterococcus* ha surgido como una de las más importantes causas bacterianas de infecciones nosocomiales. Durante este periodo, las especies de *Enterococcus* han adquirido mecanismos de resistencia específicos que han dificultado el tratamiento de las infecciones enterococcicas (Fluckey *et al.*, 2009).

5.2.3 Coliformes

En conjunto, los coliformes están representados por cuatro géneros de la familia *Enterobacteriaceae*: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella* (Seymour and Appleton, 2001). Según la NOM-113-SSA1-1994 son bacilos Gram-negativos, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos que a 35 °C fermentan la lactosa con formación de ácido y producción de gas; se les denomina generalmente *coliformes totales*. El grupo de los *coliformes fecales* incluye a los coliformes capaces de crecer a temperaturas elevadas (45 ± 0.5 °C) (Madigan *et al.*, 2004).

Sin embargo, la denominación “coliforme” y “coliforme fecal” no tiene validez taxonómica, estos términos sólo sirven para designar a grupos de bacterias capaces de crecer en condiciones experimentales específicas. No todos los coliformes son de origen fecal, por lo que fue necesario desarrollar pruebas para diferenciarlos a efecto de emplearlos como indicadores de contaminación. Así, se distinguen los coliformes totales, que comprenden la totalidad del grupo y los coliformes fecales como aquellos de origen intestinal (Madigan *et al.*, 2004).

5.3 MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN FRUTAS Y HORTALIZAS FRESCAS

Las frutas y hortalizas son responsables de una amplia y creciente proporción de brotes de ETAs. En particular, debido a la globalización del suministro de alimentos, que introduce nuevos riesgos de seguridad alimentaria y permite la dispersión de alimentos contaminados, particularmente los productos vegetales del campo (Johnston *et al.*, 2005). Las fuentes de contaminación bacteriana en los productos agrícolas se han atribuido a cambios en las prácticas de cosecha, de distribución, de procesamiento y de consumo (Materon *et al.*, 2007).

Las ensaladas y los platillos de frutas y hortalizas frescos son los vehículos de contaminación reconocidos como los más importantes que se han encontrado asociados

con brotes de enfermedades producidas por alimentos (León *et al.*, 2009). Los causantes de estos brotes son los microorganismos patógenos indebidamente presentes en estos alimentos.

Cabe mencionar que un microorganismo patógeno es aquel que al establecerse en un tejido es capaz de causar daño celular, lo que resulta en una manifestación de síntomas y signos clínicos, que tienen como consecuencia morbilidad (enfermedad) o mortalidad. Se caracterizan por su capacidad para replicarse en un hospedero, por su continua persistencia de destruir barreras celulares o humorales que lo restringen y por la expresión de determinantes de virulencia específicos que permiten al microorganismo establecerse dentro de un hospedero y con la probabilidad de transmitirse a un nuevo huésped (Bhunia, 2008).

Los patógenos se pueden clasificar como zoonóticos (transmisión de animales a humanos), geonóticos (adquiridos del suelo, agua o material vegetal en descomposición) o de origen humano (transmitidos persona-persona), en base a sus patrones de transmisión y movimiento entre diferentes hospederos y vectores. Entre los patógenos bacterianos zoonóticos podemos mencionar a *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium, *S. Enteritidis*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* y *Mycobacterium tuberculosis*; un patógeno geonótico es *Listeria monocytogenes* y algunos patógenos de origen humano son *S. Typhi*, *Vibrio cholerae* y *Shigella* spp. (Bhunia, 2008).

La mayor parte de las frutas y hortalizas frescas llegan a contaminarse con microorganismos patógenos por contacto con heces de humanos y animales. *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7 (y otras *E. coli* patógenas) tienden a ser transmitidos predominantemente por desechos fecales animales, ya sea directa o indirectamente a través de agua o suelo contaminados con materia fecal (León *et al.*, 2009).

En los alimentos vegetales se pueden encontrar bacterias como coliformes fecales, estreptococos fecales, *Pseudomonas* spp., *Erwinia* spp., *Clostridium perfringens*, *C.*

botulinum, serovariedades de *Salmonella*, *S. aureus* y bacterias ácido lácticas (Bhunja, 2008). Otras bacterias asociadas a frutas y hortalizas son: *Shigella*, especies de *Campylobacter*, *Y. enterocolitica*, *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus* y especies del género *Vibrio* (JIFSAN, 2002).

5.3.1 *E. coli* O157:H7

La cepa patogénica *E. coli* O157:H7 ha emergido como un patógeno de importancia en la transmisión de ETAs. Los síntomas clásicos de infección por este microorganismo son gastroenteritis y colitis hemorrágica, con complicaciones que incluyen púrpura trombocitopénica y HUS (Francis *et al.*, 1999). Esta bacteria tiene características de crecimiento y supervivencia similares a otros organismos entéricos, sobrevive a -20°C y puede crecer a temperatura mínima de 6.5°C, no posee resistencia inusual al calor y puede crecer en concentraciones salinas de 8%. El reservorio principal de *E. coli* O157:H7 es el ganado bovino (García and Heredia, 2009).

En 1982, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention, CDC por sus siglas en inglés) investigó dos brotes de diarrea hemorrágica grave asociados al consumo de hamburguesas en la misma cadena de restaurantes de comida rápida, permitiendo la identificación de una cepa de *E. coli* que expresaba los antígenos O157 y H7 y que no había sido reconocida como un patógeno (Riley *et al.*, 1983; Wells *et al.*, 1983; Tauxe, 1997).

Esta cepa mostró pertenecer a una categoría de *E. coli* que produce toxinas muy similares a las toxinas Shiga producidas por *Shigella dysenteriae* y distintas a las toxinas termoestables y termolábiles de *E. coli* previamente descritas (Armstrong *et al.*, 1996). Investigaciones posteriores indicaron que *E. coli* O157:H7 es responsable del 85 a 95% de los casos de síndrome urémico hemolítico (HUS) en Norteamérica (Griffin, 1995) y recientemente cada año se presentan aproximadamente 73,500 casos de infección por este microorganismo, solamente en Estados Unidos (Kaspar *et al.*, 2009).

Las cepas de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), incluido el serotipo O157:H7, producen dos tipos de toxinas: toxina Shiga 1 (Stx1) y toxina Shiga 2 (Stx2) y se hace referencia a estas cepas como *E. coli* STEC (productoras de toxina Shiga) o también como *E. coli* VTEC (productoras de verocitotoxina). *E. coli* O157:H7 es el serotipo STEC dominante en humanos en muchas partes del mundo (EFSA, 2011). Sin embargo, múltiples reportes han mostrado que otras STEC frecuentemente son causa de casos esporádicos en humanos y han estado implicados en numerosos brotes; algunos serogrupos implicados son O26, O111, O103 y O118 (Kaspar *et al.*, 2009; EFSA, 2011).

Los síntomas comunes de una infección con *E. coli* O157:H7 son gastroenteritis y colitis hemorrágica; las complicaciones incluyen púrpura trombocitopénica y síndrome urémico hemolítico (Martin *et al.*, 1986; Tauxe, 1997), ésta última evoluciona en falla renal y finalmente se produce la muerte en 3-5 % de los casos en jóvenes (Karmali *et al.*, 1983; Griffin and Tauxe, 1991; Tauxe, 1997).

El reservorio principal de *E. coli* O157:H7 es el ganado bovino (Wells *et al.*, 1991; Doyle *et al.*, 1997; Tauxe, 1997). La gran mayoría (32%) de los brotes de enfermedades causadas por este microorganismo en Estados Unidos (entre 1982 y 1994) ha estado asociada al consumo de carne molida de res y productos lácteos (Beuchat, 1995; Doyle *et al.*, 1997). Sin embargo, recientemente también se ha asociado a *E. coli* O157:H7 con frutas y vegetales frescos (Baert *et al.*, 2009).

Tan sólo entre 1982 y 1994, aproximadamente el 6% de los brotes causados por este organismo estuvo asociado con el consumo de vegetales o ensaladas (Doyle *et al.*, 1997). En años recientes se ha aislado a este microorganismo de brotes de soya, melones, manzanas, hojas de lechuga y germinados de alfalfa (CDC, 1997; Solomon *et al.*, 2002). El origen de la contaminación en tales casos fue probablemente el resultado de utilizar agua contaminada para riego o el uso de abono en los cultivos, además de procedimientos inadecuados de lavado.

Solomon *et al.* (2002) demostraron que la transmisión de *E. coli* O157:H7 puede ocurrir por suelo contaminado con estiércol (fertilizante) y agua de irrigación a las plantas de lechuga. Para llegar a esta conclusión, ellos utilizaron microscopía confocal de barrido por láser, microscopía de epifluorescencia y recuperación de células viables de tejidos internos de las plantas de lechuga. La bacteria migró al interior de los tejidos de la planta y así se protegió de la acción de agentes desinfectantes. Los experimentos demostraron que *E. coli* O157:H7 puede entrar a la planta de lechuga a través del sistema radicular y migrar a través de la porción comestible de la planta.

Por último, una comparación de los genomas de *E. coli* O157:H7 reveló el enorme impacto de la transferencia horizontal en la evolución de la virulencia de este patógeno. Además, comparaciones de microarreglos han mostrado divergencia en el contenido génico entre cepas O157 relacionadas (EFSA, 2011).

5.3.2 *Salmonella* spp.

La salmonelosis es una de las principales causas de enfermedades transmitidas por alimentos en el mundo (García and Heredia, 2009). El género *Salmonella* comprende más de 2,700 serotipos (Beuchat, 1995) y se divide en dos especies, *S. enterica* y *S. bongori* (D'Aoust, 2001; García and Heredia, 2009). Los principales reservorios de este microorganismo son animales y aves (Beuchat, 1995).

Salmonella es un bacilo Gram-negativo, aerobio, móvil (excepto *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*) y no esporulado, perteneciente al grupo de *Enterobacteriaceae* (NOM-114-SSA1-1994; FDA, 2009). Se encuentra ampliamente distribuido en animales, principalmente aves de corral y cerdos. Las fuentes ambientales de este organismo incluyen agua, suelo, insectos, superficies de fábricas, superficies de cocina, heces animales, carne cruda, aves de corral crudas y pescados y mariscos crudos, por mencionar algunas (FDA, 2009).

Salmonella es una bacteria mesofílica con crecimiento rápido entre 25 y 43°C y es capaz de crecer a temperaturas de refrigeración (4 a 10 °C), aunque es sensible a temperaturas superiores a 55 °C (D'Aoust, 2001). Respecto al pH, *Salmonella* crece activamente en el rango de pH de 3.6 a 9.5 y su pH óptimo son los valores cercanos a la neutralidad (D'Aoust, 2001).

Existen reportes que indican que esta bacteria puede sobrevivir y crecer en alimentos de baja acidez como el jugo de manzana y tejido de corazón del tomate (Shachar and Yaron, 2006).

Las serovariedades de *S. enterica* difieren en la especificidad del huésped, así como en características clínicas y epidemiológicas. La serovariedad Typhi sólo infecta a humanos, mientras que las serovariedades Typhimurium y Enteritidis infectan a una amplia variedad de huéspedes, incluyendo humanos, roedores y aves de corral. También, las distintas serovariedades difieren en sus rutas de transmisión. Typhimurium y Enteritidis infectan aves de corral; sin embargo, Typhimurium es más probable que se transmita a humanos a través de carne de ave; Enteritidis es más probable que lo haga a través de los huevos de ave. Además, se observa variación geográfica en las principales serovariedades; *S. Typhimurium* es la variedad más comúnmente asociada a salmonelosis en humanos en los países europeos y en Estados Unidos (Clavijo et al., 2006; García and Heredia, 2009).

Respecto a las enfermedades transmitidas por *Salmonella*, *S. enterica* está implicada en dos importantes síndromes clínicos en humanos: enterocolitis y fiebre entérica (García and Heredia, 2009).

La enfermedad más común y característica causada por *S. enterica* en humanos es la enterocolitis. Esta es una enfermedad autolimitada caracterizada por dolor abdominal severo, diarrea, vómito y fiebre; aparece 8 a 72 horas posteriores a la exposición a *Salmonella* no-tifoidea, con periodo de remisión entre 4 y 5 días a partir del inicio de los síntomas. La fiebre entérica es una enfermedad gastrointestinal aguda ocasionada por la

invasión de *S. Typhi* o *S. Paratyphi* en tejidos de un huésped humano. Los síntomas de esta enfermedad incluyen diarrea acuosa, fiebre prolongada y de aumento rápido, náusea y dolor abdominal, que aparecen entre 7 y 28 días después de la exposición al agente infeccioso (García and Heredia, 2009).

Los individuos muy jóvenes, ancianos e inmunocomprometidos son particularmente susceptibles a infecciones por *Salmonella*, que pueden evolucionar a infecciones sistémicas graves. En estos pacientes, la tasa de mortalidad puede incrementarse a más del 40% (D'Aoust, 2001).

5.4 INOCUIDAD ALIMENTARIA EN FRUTAS Y HORTALIZAS FRESCAS

La inocuidad alimentaria se define como la implementación de medidas que reducen los riesgos de contaminación, tanto biológicos como químicos y físicos, en los alimentos, para proteger a los consumidores de peligros involuntarios (Avendaño *et al.*, 2002).

El área de Microbiología de Alimentos se enfoca en los riesgos biológicos, que son los microorganismos transmitidos por alimentos, incluyendo bacterias, virus, parásitos y algunos hongos capaces de producir toxinas (JIFSAN, 2002). La seguridad microbiológica de los alimentos mínimamente procesados, como las frutas y hortalizas frescas, debe asegurarse a fin de mantener una calidad organoléptica y microbiológica aceptable (Rodríguez *et al.*, 2006).

Los riesgos biológicos de contaminación incluyen a los microorganismos de deterioro y a los microorganismos patógenos. Muchos microorganismos patógenos se propagan en la naturaleza y generalmente se encuentran en suelo, agua, animales y plantas (Bhunja, 2008).

Actualmente, existe gran preocupación respecto a la seguridad alimentaria de los productos del campo, dicha preocupación se debe a que estos productos se han

encontrado involucrados en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. Por ello, se ha enfocado a investigar el papel que juegan las prácticas agrícolas en la incidencia de bacterias patógenas en frutas y hortalizas (Materon *et al.*, 2007).

Los microorganismos patógenos se introducen en una planta procesadora de alimentos a través de las materias primas, el personal y el equipo. La recontaminación de los alimentos procesados también ocurre con frecuencia y contribuye a la aparición de brotes y enfermedades (Bhunias, 2008).

Los microorganismos patógenos pueden sobrevivir por periodos prolongados en superficies inertes que sirven como una fuente de contaminación; por ejemplo se ha reportado que *E. coli* puede sobrevivir de 1.5 h a 16 meses, *S. Typhi* de 6 h a 4 semanas, especies de *Shigella* de 2 días a 5 meses (Bhunias, 2008).

En cuanto a los factores de contaminación, hay muchos que pueden contribuir a la contaminación de frutas y hortalizas frescas a través de las operaciones de producción y empaquetado, entre ellos se encuentran: uso de agua de proceso o de irrigación contaminada, heces de animales (cuando se aplican como fertilizante) domésticos o silvestres, estiércol sin tratamiento previo, semillas contaminadas, insectos vectores, higiene pobre de manipuladores de alimentos, sanitización inadecuada de maquinaria y equipo, entornos de procesamiento e instrumentos de corte (Bhunias, 2008; Johnston *et al.*, 2005).

En 1983, el Comité de Expertos sobre Seguridad Alimentaria convocado conjuntamente por la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization of the United Nations, WHO por sus siglas en inglés) y la Organización de Alimentos y Agricultura (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO por sus siglas en inglés) concluyeron que las enfermedades causadas por alimentos contaminados constituyen “el problema de salud más extendido en el mundo contemporáneo” (JIFSAN, 2002).

En 1998, las agencias federales estadounidenses responsables de la seguridad alimentaria, Agencia de Drogas y Alimentos (Food and Drug Administration, FDA por sus siglas en inglés) y el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (United States Department of Agriculture, USDA por sus siglas en inglés), publicaron un documento titulado “Guidance for Industry. Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards for Fresh Fruits and Vegetables”, conocido como “la Guía”, que tenía como principal propósito proporcionar un marco de referencia para la identificación e implementación de prácticas que permitan reducir el riesgo de contaminación por microorganismos patógenos en los productos vegetales (Johnston *et al.*, 2005, 2006). La guía se basaba en las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA o GPA, por sus siglas en inglés) y las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF o GMP, por sus siglas en inglés) comunes en el crecimiento, cosecha, limpieza y/o lavado, clasificación, embalaje y transporte de la mayoría de las frutas y hortalizas vendidas a los consumidores sin procesar o mínimamente procesadas. Éstas eran prácticas voluntarias, con base científica, establecidas para ser utilizadas por los productores de frutas y hortalizas frescas nacionales y extranjeros con la finalidad de contribuir a garantizar la seguridad de sus productos (JIFSAN, 2002).

También en 1998, la FAO junto con el Instituto de Ciencias de los Alimentos e Ingeniería (Institute of Food Science and Engineering, University of Arkansas, IFSE/UA) iniciaron planes para desarrollar un curso de formación regional para México y Centroamérica sobre la garantía de la calidad y la seguridad de los productos agrícolas frescos (JIFSAN, 2002).

Actualmente se dispone de comités y organizaciones a nivel internacional que establecen guías y planes que permiten alcanzar una adecuada calidad microbiológica de los alimentos, incluidas las frutas y hortalizas frescas. También hay un creciente interés por monitorear los niveles de microorganismos patógenos en estos productos que han estado constantemente involucrados en brotes de ETAs en todo el mundo y con los datos que se obtengan se podrá conocer la eficacia de las medidas de prevención y corrección

efectuadas, así como el establecimiento de medidas más específicas según el tipo de contaminación y sus fuentes potenciales.

5.5 BROTES DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS ASOCIADOS AL CONSUMO DE FRUTAS Y HORTALIZAS

Se estima que la incidencia de enfermedades transmitidas por alimentos en Estados Unidos alcanza 48 millones de casos al año, 128,000 hospitalizaciones y 3,000 muertes (CDC, 2011).

Durante las pasadas décadas, el consumo de frutas y hortalizas frescas en Estados Unidos se ha incrementado. Concomitantemente, se ha asociado el consumo de estos productos con un número creciente de brotes causados por patógenos transmitidos por alimentos que ha sido reportado al CDC (Sivapalasingam *et al.*, 2004).

Asimismo, los brotes asociados a frutas y hortalizas en Estados Unidos van de 1% (708 de 68,712) de casos en 1970s a más de 12% (8,808 of 74,592) de casos en 1990s (Johnston *et al.*, 2005; Bassett and McClure, 2008).

Entre 1973 y 1997, se reportaron 25 brotes de enfermedades asociados a lechuga, causando 2,078 enfermedades reportadas, 181 hospitalizaciones y 6 muertes. Diecisiete brotes fueron asociados con un patógeno, incluyendo *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *Shigella*, *Cyclospora*, norovirus, virus de la hepatitis A y *Giardia* (Sivapalasingam *et al.*, 2004).

De 1981 a 1998, los virus tipo Norwalk (actualmente norovirus) fueron la causa más común de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, contando con 41% de todos los brotes reportados en Minnesota (Hedberg, 2006).

Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos asociados con melón han sido causados por muchas serovariedades de *S. enterica*, durante la década pasada. En el

2002, la U. S. Food and Drug Administration (FDA) emitió una alerta importante sobre melones de México después de que ocurrieron 3 brotes multiestatales consecutivos de *S. enterica* serotipo Poona cada primavera de 2000 a 2002 (Stine *et al.*, 2005).

En años recientes se han reportado brotes de enfermedades por bacterias, predominantemente *Salmonella*, por medio del consumo de muchas variedades de productos frescos, incluyendo tomate, lechuga, manzana y melón. Además, se ha mostrado que *Salmonella* es capaz de sobrevivir y persistir sobre y dentro de tomates durante su crecimiento en el campo (Endley *et al.*, 2003; Bohaychuk *et al.*, 2009).

Así mismo, al menos 12 brotes de infección por *Salmonella* se han asociado con el consumo de tomates frescos. Estos brotes han causado aproximadamente 1,990 enfermedades confirmadas por cultivo y aproximadamente otras 75,000 enfermedades no confirmadas. Estos datos indican que las infecciones por *Salmonella* spp. son un problema significativo (Voetsch *et al.*, 2004; CDC, 2007; Kirkland *et al.*, 2009).

Según datos de FoodNet, en el año 2005, el 23 % de los 473 casos confirmados de infección con *E. coli* O157:H7 estuvo asociado con brotes (CDC, 2008; Kaspar *et al.*, 2009).

En octubre de 2006, en Estados Unidos, el CDC dio a conocer un brote por infección con una cepa de *E. coli* O157:H7, en el que 199 personas de 26 estados resultaron afectadas. Entre los enfermos, 102 personas (51%) fueron hospitalizadas, 31 (16%) desarrollaron síndrome urémico hemolítico y se confirmaron 3 muertes; 22 de los pacientes (11%) eran niños menores de 5 años. El alimento asociado a este brote fueron espinacas crudas. *E. coli* O157 fue aislada de 13 paquetes de espinacas, 11 de ellos producidos por una misma compañía en un mismo día (CDC, 2006).

En noviembre del 2006 se presentó un brote de infección por una única cepa de *S. Typhimurium* asociado al consumo de tomate en restaurantes. Se registraron 183 casos

en 21 estados de Estados Unidos y 2 casos en Canadá de personas que habían viajado a E.U.A. (CDC, 2006).

En julio de 2007, se presentó en Estados Unidos un brote por *S. Wandsworth* asociado al consumo de un producto gourmet con vegetales que se vende empacado (arroz inflado y maíz con cubierta de vegetales). Se reportaron 65 casos en 20 estados de ese país, incluyendo California, Georgia, New York, Texas y Washington. Las personas infectadas fueron en su mayoría niños (91 % de los casos) de edades de 10 meses a 3 años que presentaron diarrea, 76 % de los casos presentaron heces con sangre y 6 pacientes fueron hospitalizados. *S. Wandsworth* es una rara cepa de *Salmonella* (CDC, 2007).

En abril de 2008, se investigó un brote de infecciones por *S. Litchfield* relacionado con el consumo de melón proveniente de Honduras. Se identificaron 51 personas infectadas en 16 estados de Estados Unidos, incluyendo Arizona, California, Georgia, Illinois, New Mexico, New York, Ohio, Washington, entre otros. Los pacientes tenían entre 0 y 93 años de edad y al menos 16 fueron hospitalizados. Además, se reportaron 9 casos en Canadá. Los investigadores de la FDA concluyeron que el alimento responsable fue el melón de una compañía hondureña (CDC, 2008).

A partir de abril del 2008 y hasta agosto de ese año, se infectaron 1,442 personas con una cepa de *S. Saintpaul* cuya huella genética fue identificada en 43 estados, el Distrito de Columbia y Canadá. Los estados con mayor número de casos fueron Texas (559), Illinois (120), New Mexico (115) y Arizona (59); en el Distrito de Columbia se reportó un caso y en Canadá 5 casos, de los cuales 4 parecen haberse originado en Estados Unidos. Al menos 286 personas fueron hospitalizadas y al parecer la infección ocasionó 2 muertes. Los pacientes tenían entre 0 y 99 años de edad, encontrándose la mayor incidencia en el rango de 20 a 29 años de edad (CDC, 2008a, b).

La investigación mostró que los chiles jalapeños fueron la principal fuente de contaminación. Además, se señaló al tomate como posible fuente, particularmente al

inicio del brote; las investigaciones posteriores los descartaron. Se llevó a cabo la trazabilidad de los chiles jalapeños con los distribuidores en Estados Unidos que recibieron vegetales cosechados y empacados en México. La cepa responsable del brote fue aislada de muestras de chile jalapeño recolectadas en un almacén de E.U.A. y en la casa de un paciente, también se aisló de muestras de chile serrano y de agua recolectadas en una huerta de México (CDC, 2008 a, b).

Durante la investigación de este brote, la FDA emitió una alerta a los consumidores en junio de 2008 para que evitaran el consumo de tomate rojo (bola, roma y ciruela), chile jalapeño y chile serrano cultivados, cosechados o empacados en México; la alerta para el tomate fue retirada en julio de 2008 y para los chiles en agosto de 2008 (CDC, 2008).

Entre febrero y abril del 2009, se presentó en Estados Unidos un brote de infecciones por *S. Saintpaul* relacionado con el consumo de germinados crudos de alfalfa. Resultaron infectadas 235 personas de 14 estados, cuyas edades comprendieron entre 0 y 85 años de edad; el 3% de los casos requirieron hospitalización. Los germinados de alfalfa contaminados provenían de una misma huerta en Omaha, Nebraska (CDC, 2009).

Entre marzo y junio de 2010, los germinados de alfalfa vuelven a ser protagonistas de un brote de infecciones ocasionadas por *S. Newport* en Estados Unidos. En esta ocasión resultaron afectados 44 individuos de 11 estados, edades entre 0 y 85 años; 7 hospitalizados (CDC, 2010).

En junio del 2011, un total de 20 personas, de 10 estados de E.U.A., resultaron enfermas por infección con *S. Panama*. Los pacientes tenían entre 1 y 68 años de edad y 3 de ellos fueron hospitalizados. Las investigaciones concluyeron que el brote estuvo asociado al consumo de melón proveniente de una huerta de Guatemala (CDC, 2011).

Entre enero y agosto del 2011, se presentó en Estados Unidos un brote multiestatal por *S. Agona* asociado al consumo de papaya. En total, resultaron infectados 106

individuos de 25 estados de ese país. Las personas infectadas tenían entre 0 y 91 años de edad, el 39 % de ellas eran menores de 5 años; 11 personas reportaron haber viajado a México la semana previa a su enfermedad y 10 pacientes fueron hospitalizados. Las investigaciones epidemiológicas, de trazabilidad y de laboratorio relacionaron este brote con el consumo de papaya fresca importada de México (CDC, 2011).

En noviembre del 2011, el CDC dio a conocer un brote de infecciones por *E. coli* O157:H7 asociadas al consumo de lechuga romana. Al 4 de diciembre de ese mismo año, 60 personas de 10 estados fueron infectadas con una cepa de *E. coli* serotipo O157:H7. Las personas enfermas tenían entre 1 y 94 años de edad, 30 (67 %) fueron hospitalizadas y 2 pacientes desarrollaron HUS. Las investigaciones indicaron que la lechuga romana fue la fuente de contaminación asociada a este brote, los individuos se infectaron al consumir este vegetal en barras de ensalada y en campus de algunas universidades (CDC, 2011).

5.6 FUENTES DE CONTAMINACIÓN DE FRUTAS Y HORTALIZAS

Las frutas y hortalizas frescas pueden contaminarse en cualquier punto de la cadena “de la granja a la mesa”. Si no hay medidas de control, el patógeno puede persistir e incluso multiplicarse en el alimento y, dependiendo de diversos factores que incluyen susceptibilidad del huésped, virulencia y dosis del patógeno, ocasionar una enfermedad y, dependiendo de otros factores, la muerte del individuo. A continuación se divide a las fuentes de contaminación en tres etapas: precosecha, cosecha y poscosecha.

5.6.1 Precosecha

La etapa de precosecha se considera la fase más temprana de la cadena granja-mesa e incluye siembra, cultivo, irrigación y otras actividades y tratamientos asociados con la producción de la planta madura. La importancia de la contaminación del producto durante el cultivo y la cosecha no está bien documentada debido a que una vez que

ocurre un brote, generalmente es difícil determinar la fuente específica de contaminación en la precosecha (León *et al.*, 2009).

La contaminación ocurre en la superficie del vegetal en la mayoría de los productos, sin embargo, existe evidencia de que los patógenos pueden ingresar por acción capilar en los espacios o hendiduras y/o en tejidos vegetales dañados durante la producción (Pettersen *et al.*, 2001).

En la guía de la FDA y la USDA (USFDA-CFSAN, 1998) se identifican numerosos factores de riesgo y áreas de control de contaminación microbiológica que deben implementarse en frutas y hortalizas frescas en etapa de precosecha. En el documento se incluyen puntos tales como la calidad microbiológica del agua, uso de estiércol y abono, manejo de animales y plagas, trazabilidad, limpieza y Sanitización y salud e higiene del trabajador (León *et al.*, 2009).

La contaminación de frutas y hortalizas en la etapa de precosecha ocurre frecuentemente como consecuencia de la exposición a suelo o agua contaminados. La fuente de agua de irrigación, la forma de distribución y el tipo de irrigación utilizado son factores de importancia que determinan el potencial de contaminación del producto (USFDA-CFSAN, 1998).

En general, el agua subterránea es menos probable de ser contaminada que las aguas superficiales, pues la calidad del agua superficial se afecta por los patrones de uso de la tierra en la cuenca. Estos patrones se pueden afectar por la presencia de heces de humanos y animales en el agua, tal como en el punto de origen (aguas residuales) y fuera del punto de origen, así como por la topografía y las fluctuaciones en las precipitaciones (León *et al.*, 2009).

El tipo de irrigación utilizada también puede influir en la contaminación de frutas y hortalizas. Las prácticas de irrigación que maximizan la exposición de la porción comestible del producto pueden incrementar la probabilidad de contaminación de frutas

y hortalizas. Las técnicas de goteo o subirrigación pueden minimizar la humectación de la porción comestible y, por lo tanto, disminuir la probabilidad de contaminación del producto. Desafortunadamente, se hace amplio uso de aguas residuales no tratadas para irrigación, especialmente en países en desarrollo, y el uso de estas aguas también puede incrementar el riesgo de contaminación de frutas y hortalizas (León *et al.*, 2009).

Steele and Odumeru (2004), Beuchat (2006) y Delaquis *et al.* (2007) han encontrado algunas fuentes de contaminación de productos vegetales en etapa de precosecha y su importancia, que incluyen: abono contaminado, sedimento de aguas residuales, agua de irrigación, escurrimiento de agua de las operaciones ganaderas y animales silvestres y domésticos. Además, las fuentes de contaminación indirecta podrían incluir las interacciones tróficas entre plantas y recolectores de plantas, como aves, mamíferos e insectos (Doyle and Erickson, 2007).

La proximidad de vida silvestre (aves, mamíferos, reptiles) ha adquirido interés como una fuente potencial de contaminación de frutas y hortalizas. Clayton (2006) observó en su trabajo muchas granjas que no tienen barreras que eviten la entrada de animales domésticos o silvestres a los cultivos y la mayoría de estas reportaron animales cerca de sus fuentes de agua.

Los animales son un vehículo de contaminación y pueden acelerar la degradación de los productos agrícolas, reduciendo en gran medida la calidad y la vida útil de los vegetales frescos (Bihn *et al.*, s.f.).

Las heces de animales domésticos, animales silvestres e insectos son una fuente potencial de contaminación animal. Beuchat and Ryu (1997) mencionan que algunas especies de pájaros pueden diseminar ciertos patógenos: *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *V. cholerae*, *Listeria* y *E. coli* O157:H7.

La tierra es un importante reservorio de microorganismos, entre ellos se pueden encontrar patógenos. En el suelo se encuentran comúnmente esporas de especies de

Clostridium, como *C. botulinum* y *C. perfringens*, al igual que esporas de *B. cereus* enterotoxigénica. Cabe mencionar que las esporas de *C. perfringens* son consideradas un indicador de contaminación fecal en alimentos (Beuchat and Ryu, 1997; Hirotsu *et al.*, 2001).

La contaminación de vegetales con microorganismos presentes en el suelo se puede llevar a cabo cuando se presenta lluvia intensa o a través del agua de riego, al salpicar el agua y llegar así al producto, ya que se sabe que muchos vegetales crecen en el suelo o muy cerca del mismo (Heaton and Jones, 2008).

Los contaminantes también pueden introducirse en el suelo si la tierra se utilizó previamente para producción animal o vertederos industriales, o si se aplicaron biosólidos, lodos, estiércol o residuos de animales como fertilizante o para disposición de residuos. El estiércol es particularmente riesgoso, debido a que las heces de animales pueden contener patógenos que llegan a los vegetales cultivados en el campo. La cercanía del fertilizante al vegetal, contención inadecuada del abono y una composta incorrecta pueden incrementar el riesgo de contaminación del producto y además eliminar los beneficios del abono en términos de potenciación del crecimiento (Bihn and Gravani, 2005).

Es imposible remover completamente bacterias, parásitos y virus del estiércol, debido a esto, los productores se enfocan en estrategias que minimicen los niveles de contaminantes microbianos. Los tratamientos pueden ser activos (composta correcta, pasteurización, entre otros) o pasivos (paso del tiempo) (Bihn and Gravani, 2005).

Ensayos experimentales del campo han demostrado que *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* persisten en el suelo por largos periodos de tiempo si se introducen con la composta o el agua de irrigación. En base a estos estudios, múltiples factores afectan la detección del patógeno en el producto cosechado (Doyle and Erickson, 2007):

- a) Proximidad de la porción comestible de la planta al suelo. Los cultivos de raíces (zanahorias, cebollas, etc.) o cultivos en estrecha proximidad al suelo (lechuga,

perejil, etc.) es más probable que se contaminen que los vegetales que crecen más alejados del suelo, como el tomate.

- b) Concentración del patógeno en suelo contaminado en el que se cultiva el vegetal. Mayores poblaciones del suelo aumentan la probabilidad de que el vegetal estará contaminado en la cosecha. Del mismo modo, concentraciones elevadas en las fuentes de agua de riego contaminada se traduciría en mayores cargas de suelo y a su vez en una mayor incidencia de contaminación de la planta. Por ejemplo, *E. coli* se ha detectado en plantas de lechuga tratadas con aguas residuales domésticas diluidas en niveles >2400 UFC/100 ml, pero en plantas irrigadas con agua de río se han encontrado cuentas de 431 UFC/ml (Økland *et al.* 2007).

La supervivencia de los patógenos en el suelo depende del tiempo y como tal, entre más tiempo transcurra entre la aplicación del vehículo contaminado y la cosecha, menor será la probabilidad de que el producto se encuentre contaminado (Doyle and Erickson, 2007).

Islam *et al.* (2004) reportaron que *E. coli* O157:H7 puede persistir por más de 5 meses en el suelo, después de la aplicación de fertilizantes orgánicos y agua de irrigación contaminada.

Por otra parte, Sivapalasingam *et al.* (2004) reporta que *E. coli* O157:H7 es capaz de sobrevivir en heces bovinas y en el suelo por más de 70 días, además tiene la capacidad de adherirse a las superficies y contaminar el producto al entrar en contacto con él, por ejemplo, al cortarlo. Aunado a lo anterior, se ha reportado que este microorganismo tiene la capacidad de internalizarse a los tejidos de las raíces de las plantas y pasar al sistema vascular y llegar a las estructuras aéreas (hojas y fruto). Esto podría limitar la eficacia de los lavados que se les da a los productos en la etapa de poscosecha (Hadjok *et al.*, 2005).

Estudios han intentado desarrollar intervalos recomendados entre fertilización y cosecha pero varían significativamente en su diseño y período de tiempo seguro (Doyle and Erickson, 2007).

Ingham *et al.* (2005) considera el intervalo mínimo recomendado de fertilización-cosecha del Programa Orgánico Nacional como satisfactorio, siendo este de 120 días. Por otra parte, utilizando una evaluación con enfoque de riesgo cuantitativo, se obtuvo como resultado un intervalo fertilización-cosecha de 12 meses necesario para eliminar los riesgos de siete diferentes patógenos (*Salmonella*, *L. monocytogenes*, *Campylobacter*, *E. coli* O157:H7, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia* y enterovirus).

Las siguientes variables contribuyen a las diferencias en la reducción de patógenos en suelo:

- a) Tipo de residuos aplicados. Por ejemplo, *E. coli* O157:H7 sobrevivió durante un tiempo ligeramente mayor en suelo tratado con estiércol de pollo que en estiércol tratado con estiércol de vaca (Islam *et al.* 2004) y *E. coli* se redujo significativamente más rápido en estiércol de cerdo que en el de oveja o cabra (Avery *et al.*, 2004).
- b) Tipo de cultivo. Gagliardi y Karns (2002) reportaron que *E. coli* O157:H7 persistió por 25-41 días en suelos arados, por 47-96 días en suelos abonados con centeno y por 92 días en suelos abonados con alfalfa.

Un problema importante que podría afectar la persistencia de los patógenos en las plantas es el lugar espacial (superficie o internalizado) de contaminación con el patógeno (Islam *et al.* 2004). Hay estudios que señalan que ocurre la internalización de patógenos por las plantas a través de las raíces, estos estudios han utilizado modelos de sistemas hidropónicos o en suelo (cámaras de cultivo) y usando principalmente semillas o plántulas como objeto experimental (Doyle and Erickson, 2007).

Miles *et al.* (2009) realizaron un estudio para determinar la capacidad de *S. Montevideo* para internalizarse en el fruto de tomate y el tejido vegetal a partir de agua

de irrigación y un stock de semillas contaminadas. No se recuperó la bacteria en tallo, hojas o fruto de plantas de tomate; las raíces no se evaluaron. Concluyeron que *S. Montevideo* no tiene la capacidad de contaminar el fruto del tomate vía agua de irrigación y stock de semillas contaminados e hicieron énfasis en la importancia del uso de agua de calidad en agricultura.

Kutter *et al.* (2006) demostraron la penetración de las paredes celulares de la epidermis de raíces de cebada por *S. enterica*. Franz *et al.* (2007) encontraron poblaciones significativas de *S. Typhimurium* (2.37 a 2.57 UFC/g) y *E. coli* O157:H7 (3.95 UFC/g) en muestras de hojas de plantas cultivadas en suelo contaminado.

El sitio de entrada más común se presume que es la penetración en las fisuras en la cubierta de las semillas (Wachtel *et al.* 2002) o la invasión en las uniones laterales de las raíces de las plántulas (Cooley *et al.* 2003; Dong *et al.* 2003b; Warriner *et al.* 2003). Se cree que la exudación de nutrientes en estos sitios de entrada actúa como desencadenante de la movilización de patógenos hacia esos lugares de la planta (Cooley *et al.* 2003; Dong *et al.* 2003b; Jablason *et al.* 2005), además, las características de adhesión y la capacidad de colonización del patógeno también representan un factor de importancia en su proliferación hacia dichos sitios (Wachtel *et al.* 2002, Dong *et al.* 2003a).

Otra condición que afecta la internalización de patógenos en sistemas modelo ha sido la presencia o ausencia de suelo y el acompañamiento de flora microbiana endógena que podría actuar como competidora de los patógenos alimentarios (Doyle and Erickson, 2007).

Por último, la supervivencia del patógeno y la movilización de éste hacia las porciones comestibles de la planta determinan el destino e impacto de los patógenos internalizados. Algunos estudios reportan el movimiento sistémico de patógenos a través del sistema vascular de la planta (Guo *et al.* 2002; Solomon *et al.* 2002; Solomon and Matthews 2005; Bernstein *et al.* 2007a, b). Alternativamente, Cooley *et al.* (2003) no

observó movimiento sistémico en berro, pero atribuyó la contaminación de la porciones comestibles al movimiento de patógeno en la superficie de la planta.

El potencial del patógeno a internalizarse requiere ser examinado a fondo simulando condiciones típicamente encontradas durante la temporada de cultivo.

5.6.2 Cosecha

En la etapa de cosecha se colectan las frutas y hortalizas por métodos manuales o mecánicos. En esta fase, las fuentes de contaminación difieren un tanto de aquellas que afectan durante la precosecha. Además, los contaminantes que actúan durante y después de la cosecha, dependen de que los vegetales sean empacados en campo (para distribución inmediata) o si se someten a lavado y subsecuente embalaje en una planta procesadora (empacadora) (Greig *et al.*, 2007).

La contaminación microbiológica de frutas y hortalizas puede ocurrir a través del contacto directo con equipo contaminado. Desafortunadamente, es difícil cerciorarse el grado al cual las superficies del equipo actúan como fuente de contaminación del producto o viceversa. Las superficies de la maquinaria y/o instrumentos que tienen contacto con los vegetales siempre deben lavarse y sanearse (USDA, 2001).

La contaminación también puede ocurrir durante la manipulación de los vegetales por parte de los trabajadores durante la cosecha. (Hernández *et al.*, 1997).

Los trabajadores de la industria alimentaria han sido responsables de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en muchos lugares durante décadas, y no hay indicio de que esta situación esté disminuyendo. La Comisión de Control de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos de la Asociación Internacional de Protección a los Alimentos (International Association for Food Protection, IAFP, por sus siglas en inglés) fue la encargada de recopilar y evaluar datos sobre los brotes asociados a los trabajadores (Greig *et al.*, 2007).

Se compilaron un total de 816 reportes con 80,682 casos de eventos que ocurrieron entre 1927 y el primer cuarto del 2006. La mayor parte de los brotes revisados eran de Estados Unidos, Canadá, Europa y Australia. Estos brotes, fueron ocasionados por 14 agentes infecciosos: norovirus (274 brotes y 27,081 casos) o probables norovirus (64 brotes y 2,085 casos), *S. enterica* (151 brotes y 9,893 casos), virus de hepatitis A (84 casos y 5,046 casos), *S. aureus* (53 brotes y 6,423 casos), *Shigella* spp. (33 brotes y 15,276 casos), *Streptococcus* de los grupos A y G de Lancefield (17 brotes y 3,670 casos) y los parásitos *Cyclospora*, *Giardia* y *Cryptosporidium* (23 brotes y 3,393 casos). Las frutas y hortalizas fueron el vehículo de transmisión en 7 brotes (1,263 casos) ocasionados por *Salmonella* spp., 3 brotes (122 casos) causados por *S. aureus* y 7 brotes (2,715 casos) por *Shigella* spp (Greig *et al.*, 2007).

Un estudio acerca de las prácticas agrícolas y de embalaje en varios estados de E.U.A., sugirió que el 94 % de todos los acres de frutas y 87 % de todos los acres de hortalizas analizados se cosecharon de forma manual (USDA, 2001). Por ello, las prácticas realizadas por los manipuladores de alimentos al cosechar y empacar productos vegetales puede tener una influencia significativa en el tipo y magnitud de los peligros a los que se exponen los alimentos durante su procesamiento, distribución y consumo.

Algunos problemas importantes de higiene en los trabajadores pueden incluir: manos contaminadas, falta de higiene, ropa y/o cabello sucio, heridas abiertas y/o infecciones en las manos, enfermedad gastrointestinal (como gastroenteritis o hepatitis) o ser acarreador asintomático de patógenos entéricos, acceso limitado o nulo a letrinas y defecación en cultivos (Greig *et al.*, 2007).

Bryan (1978) indicó que en 18 % de los 766 brotes que ocurrieron entre 1961 y 1972 en Estados Unidos, estuvo implicado un trabajador colonizado que tocó el alimento involucrado en el brote. Más recientemente, la CDC estimó que el 20% de las enfermedades transmitidas por alimentos causadas por agentes bacterianos fue resultado del contacto con un trabajador infectado (USFDA, 2000).

Clayton (2006) encontró elevados niveles de coliformes fecales y *E. coli* en las manos de trabajadores, lo que indica la presencia de contaminación fecal y el potencial de transmisión de patógenos entéricos.

Orozco *et al.* (2008b) realizaron un estudio en huertas mexicanas de tomate hidropónico con el objetivo de determinar el perfil microbiológico del tomate cultivado en esas huertas. Se investigaron 13 invernaderos y un vivero, los cuales poseen un elevado nivel tecnológico y llevan a la práctica su trabajo en condiciones sanitarias adecuadas (BPAs) a lo largo de todo el proceso de producción.

Se analizaron el tomate y otros materiales asociados con la huerta y se obtuvieron los siguientes resultados: los tomates mostraron niveles medios de *Enterobacteriaceae* de 0.8 log UFC/tomate, < 0.5 log UFC/tomate de coliformes y 0.5 NMP/tomate de *E. coli*. Además se encontró que 2.8 % de las muestras de tomate estaban contaminadas con *Salmonella* spp. y 0.7 % con *E. coli*. Otras muestras que resultaron positivas a la presencia de *Salmonella* fueron: charcos, suelo, paños de limpieza y esponjas. Algunas muestras tomadas del vivero y de los invernaderos fueron positivas para *E. coli*, mientras que *Salmonella* sólo se encontró en los invernaderos. Estos resultados muestran que a pesar de que en los invernaderos hidropónicos existen barreras físicas y prácticas adecuadas de trabajo, puede ocurrir contaminación fecal.

Orozco *et al.* (2008a) realizaron otro estudio con el objetivo de identificar las fuentes de contaminación de tomate por *Salmonella*. Se investigó la presencia de *Salmonella* en 906 muestras de tomate y 714 muestras ambientales de 14 invernaderos y una empacadora de tecnología avanzada. Se encontró *Salmonella*, y también *E. coli*, en muestras de tomate, charcos de agua, suelo, zapatos y heces de animales domésticos y silvestres. La presencia y persistencia de *Salmonella* en los charcos y el suelo indica que esta materia podría ser reservorio para el patógeno, favoreciendo su supervivencia e incluso su multiplicación. Además, es posible que los aerosoles de los charcos y el suelo alcancen los frutos de las plantas. Ellos mencionan que los zapatos contaminados de los

trabajadores pueden ser vehículos de contaminación de patógenos entéricos, lo cual debe considerarse como un importante punto de control durante los procesos que se realizan en los invernaderos.

Las prácticas de la huerta, respecto a la higiene del trabajador, también pueden influir en la contaminación del producto. Estas prácticas incluyen los programas de capacitación de los trabajadores, que abarcan aspectos de higiene personal, como lavado correcto de manos antes de entrar en contacto con los cultivos, uso de guantes y/o cofia, uso de letrinas, etc. Estas prácticas forman parte del control de calidad de la huerta y se mencionan en la guía de la FDA e incluyen las BPA, las BPM y el análisis de riesgos de puntos críticos de control (HACCP, por sus siglas en inglés) (Greig *et al.*, 2007).

Actualmente, continúan presentándose los brotes de ETAs en los que se ven involucrados trabajadores, debido a ello, existe la necesidad de una evaluación más exhaustiva del rol que tienen ellos en la transmisión de la enfermedad (Greig *et al.*, 2007).

5.6.3 Poscosecha

La poscosecha involucra lo que le sucede al alimento, en este caso frutas y hortalizas frescas, después de su cosecha, a través de su transportación, distribución y/o en establecimientos de venta. El término “procesamiento” se utiliza en esta etapa para referirse a los casos en los cuales el material crudo es convertido a un producto de valor agregado, tal como sería el caso de los tomates que se convierten en puré de tomate o que se empacan en cajas listos para su consumo. Las frutas y hortalizas crudas reciben un tratamiento más económico; algunas son empacadas y distribuidas inmediatamente después de cosecharse sin ningún tratamiento posterior, mientras que otras se lavan y/o desinfectan y empacan antes de su distribución (León *et al.*, 2009).

Las fuentes de contaminación en esta etapa incluyen heces de animales, insectos, otros vegetales, vehículos o contenedores donde se coloca el producto para su traslado

entre las diferentes operaciones del procesamiento y distribución, agua de lavado, equipo o utensilios de corte, embalaje y clasificación, bandas transportadoras y otras superficies de contacto y las manos de los manipuladores del producto (Izumi *et al.*, 2008).

Estudios previos demostraron que las cuentas de bacterias mesófilas aerobias y de mohos en la superficie de los vegetales se incrementó de 2.5×10^2 UFC/g a 3.2×10^3 UFC/g para mesófilos aerobios y de 1×10^3 UFC/g a 8.0×10^3 UFC/g para mohos durante la manipulación poscosecha (Izumi *et al.*, 2008).

Algunos factores de importancia que contribuyen a la contaminación poscosecha de frutas y hortalizas incluyen la contaminación cruzada y el lavado del producto. Existen numerosos riesgos de contaminación cruzada durante la producción de frutas y hortalizas, ya que cualquier materia que entre en contacto con el producto se puede convertir en una fuente potencial de contaminación microbiana (Gómez, 2009). El lavado es un importante proceso comúnmente empleado en la industria alimentaria para remover residuos de tierra y desechos, reduciendo de esta manera las poblaciones microbianas (Wang *et al.*, 2007).

El tratamiento de lavado que se realiza en la etapa de poscosecha en ocasiones incluye la desinfección utilizando hipoclorito de sodio (100-200 ppm), sin embargo está demostrado que este procedimiento sólo logra la reducción de menos de 2 log de bacterias (Warriner *et al.*, 2003).

Muchos productos vegetales pasan a través de instalaciones especializadas llamadas empacadoras. El trabajo de una empacadora es preparar los vegetales que vienen directamente del campo para subsecuente distribución. También se pueden reempacar los cultivos de otros países para cumplir con las especificaciones locales o nacionales. Los cultivos pueden pasar por etapas de lavado, donde son sumergidos en tanques de agua de lavado, rociados o enjuagados, después pasan a bandas transportadoras y/o son manipulados manualmente antes de colocarlos en el contenedor final de distribución (caja) (León *et al.*, 2009).

Investigadores coinciden en que ciertos cultivos, como melón, cilantro y perejil, presentan cargas microbianas mucho más altas cuando salen de la empacadora que cuando entran a esta directamente del campo (Castillo *et al.*, 2004; Johnston *et al.*, 2005, 2006). Esto indica que ciertos procesos que ocurren en las empacadoras pueden favorecer la contaminación cruzada y/o la proliferación microbiana.

Johnston *et al.* (2006) realizaron un estudio (Noviembre 2002 a Diciembre 2003) en el que compararon la calidad microbiológica de frutas y hortalizas frescas procedentes de México y Estados Unidos a través del proceso de empacado, examinaron los cambios en la calidad microbiológica de estos productos en cada etapa de producción y procesamiento y evaluaron la prevalencia de algunos patógenos en estos vegetales. Encontraron los siguientes niveles de microorganismos indicadores: 4.0 a 7.9 log₁₀ UFC/g de mesófilos aerobios, menos de 1.0 a 4.5 log₁₀ UFC/g de coliformes, menos de 1.0 a 4.0 log₁₀ UFC/g de *E. coli* y menos de 1.0 a 5.4 log₁₀ UFC/g de *Enterococcus*. No detectaron presencia de *Salmonella* spp., *Shigella* spp. ni *E. coli* O157:H7 en ninguna de las 466 muestras analizadas.

Castillo *et al.* (2004) investigaron seis huertas de melón y plantas empacadoras en el sur de Texas (950 muestras de melón, 140 de agua y 45 muestras ambientales) incluyendo el área del Valle de Río Grande y tres huertas en Colima, México (300 muestras de melón, 45 de agua y 15 muestras ambientales) para evaluar la contaminación del melón con *Salmonella* spp. y *E. coli* durante su producción y procesamiento. Las muestras del vegetal se tomaron sólo de su superficie. Del total de muestras (1,735), sólo 31 (1.8%) fueron positivas para *Salmonella* spp.

Johnston *et al.* (2005) realizaron un estudio para caracterizar las rutas de contaminación microbiana en frutas y hortalizas e identificar áreas de contaminación potencial durante la manipulación en etapa de poscosecha (producción y empaque). Se analizaron en total 398 muestras de vegetales (de hoja verde, hierbas y melón). Para los vegetales de hoja verde y las hierbas, las cuentas de indicadores presentaron niveles de

media geométrica de 4.5 a 6.2 log UFC/g (cuenta aerobia en placa), < 1 a 4.3 log UFC/g (coliformes y *Enterococcus*) y < 1 a 1.5 log UFC/g (*E. coli*). Para el melón, los niveles de microorganismos se incrementaron significativamente durante el empaque, con rangos de 6.4 a 7 log UFC/g (cuenta aerobia en placa), 2.1 a 4.3 log UFC/g (coliformes), 3.5 a 5.2 log UFC/g (*Enterococcus*) y < 1 a 2.5 log UFC/g (*E. coli*). La prevalencia de patógenos para todas las muestras fue de 0 y 0.7 % (3 de 398 muestras) para *E. coli* O157:H7 y *Salmonella*, respectivamente. Este estudio demuestra que cada paso de la producción, hasta llegar al consumidor, puede afectar la carga microbiana de los vegetales.

La carga microbiana en las bandas transportadoras está correlacionada con los niveles de microorganismos en los vegetales. Se han observado casos donde los trabajadores de las empacadoras presentan niveles elevados de coliformes fecales y *E. coli* en sus manos, lo que indica que los manipuladores de alimentos pueden ser una fuente de contaminación de productos vegetales (León *et al.*, 2009).

Thapa *et al.* (2011) colectaron 223 muestras de vegetal y de torundas ambientales en varias empacadoras. En las muestras de vegetal se encontraron cuentas de: cuenta aerobia en placa (ACP) (4.6 a 6.6 log UFC/g), coliformes totales (1 a 3 log UFC/g), *E. coli* (< 1 a 2 log UFC/g; *E. coli* patógena no se detectó), *Salmonella* spp. (no se detectó), *L. monocytogenes* (no se detectó).

Ailes *et al.* (2008) encontraron que los vegetales colectados en ciertos lugares en la etapa terminal de la empacadora se encontraban en mayor riesgo de contaminación por *E. coli* en comparación con productos idénticos recogidos en etapas iniciales, lo que indica que las superficies de contacto contaminadas pueden contaminar el producto.

Blanding (2006) encontró que ciertas prácticas de empaque, como limpieza, presencia de roedores u otras plagas y ausencia de un plan de capacitación para los trabajadores, pueden contribuir a la contaminación de los vegetales (León *et al.*, 2009).

Hall (2005) observó que existe una pequeña relación entre los niveles de microorganismos indicadores del agua utilizada para empaquetado y la calidad microbiológica de los productos vegetales. El agua monitoreada estaba generalmente limpia (ausencia o bajos niveles de microorganismos indicadores), probablemente debido a que venía de una fuente municipal de agua clorada (León *et al.*, 2009).

En Estados Unidos, entre el 50 y 60 % de las instalaciones de empaque utilizan agua de lavado desinfectada (USDA, 2001). Este podría no ser el caso de las instalaciones existentes en otros países.

El estricto mantenimiento de la sanidad del equipo, la atención a la salud e higiene del trabajador y la calidad del agua utilizada en el procesamiento de productos vegetales es crítico (León *et al.*, 2009). Esto debido a que sólo en los pasos de lavado pueden ser removidos los microorganismos patógenos que pudieran estar presentes, además que en la industria de vegetales frescos es común reciclar el agua por recirculación (Bhagwat, 2005).

La contaminación también puede ocurrir durante la transportación, conforme los productos se trasladan de la granja a la empacadora o de la empacadora al almacén para su posterior distribución. Esta contaminación se puede minimizar asegurando condiciones higiénicas y rangos de temperatura seguros durante el transporte de los vegetales (León *et al.*, 2009).

5.6.4 Punto de venta y manipulación del consumidor

Es generalmente reconocido que el lavado de los vegetales con agua en el punto de venta o en el hogar no puede eliminar completamente los microorganismos patógenos presentes, pero sí es capaz de reducir el número de ellos. Los manipuladores de alimentos por sí mismos contaminan el producto al no atender las prácticas de higiene recomendadas, tales como el lavado de manos antes de tocar cualquier alimento o superficie que pueda entrar en contacto con este (León *et al.*, 2009).

Investigaciones epidemiológicas y ambientales de brotes asociados a consumo de tomate han indicado que la contaminación del producto probablemente ocurre en etapas tempranas de la cadena granja-consumidor, como en la granja o durante su procesado. Sin embargo, en la mayoría de estos brotes, el consumo de tomate ocurrió en los restaurantes y se cree que las prácticas de manipulación del tomate en los restaurantes pueden contribuir a la proliferación de patógenos y a la contaminación cruzada (Kirkland *et al.*, 2009).

Las investigaciones de Kirkland *et al.* (2009) sugieren que las prácticas de manipulación del tomate en los restaurantes pueden contribuir a la aparición de brotes. Sin embargo, existen pocos datos empíricos acerca de cómo los trabajadores de los restaurantes manipulan el tomate. En su investigación observaron que no se utilizaron tablas de corte exclusivas para vegetales en el 49 % de los casos, no se utilizaron guantes en el 36 % de las observaciones y los tomates se lavaron con agua de grifo en el 82 % de los casos.

En la primavera del año 2006, en Lansing, Michigan, E.U.A., se presentaron tres brotes importantes en los que estuvieron involucrados restaurantes donde los trabajadores fueron responsables de haber causado aproximadamente 800 casos de infección por norovirus (Greig *et al.*, 2007).

Bohaychuk *et al.* (2009) analizaron niveles de indicadores y la presencia de algunos patógenos en frutas y hortalizas frescas de mercados en Alberta, Canadá entre Junio y Octubre de 2007; no encontraron presencia de *E. coli*, *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 ni *Campylobacter* spp. en ninguna de las 120 muestras de tomate analizadas.

Quiroz *et al.* (2009) realizaron un estudio para proporcionar un panorama general acerca del papel de los vegetales como vehículo de transmisión de *Salmonella* en México. Se tomaron 100 muestras de diferentes vegetales, entre ellos tomate, de la Central de Abastos en la Ciudad de México. De un total de 1,700 muestras analizadas,

98 fueron positivas para *S. Typhimurium*. Se encontró *Salmonella* en el 12 % de las muestras de perejil, 11 % de las muestras de cilantro, 9 % de las muestras de brócoli, el mismo porcentaje de las muestras de coliflor, “papaloquelite” (*Porophyllum ruderale*) y verdolaga (*Portulaca oleracea*), 7 % de las muestras de lechuga, espinaca y berro, 6 % de las muestras de perejil chino, 4 % de las muestras de remolacha, 3 % de las muestras de apio y lechuga romana y 1 % de las muestras de repollo y de papa.

Sus resultados indicaron que los vegetales crudos o mínimamente procesados pueden contaminarse con *Salmonella*, permitiendo la infección directa de los consumidores o la contaminación cruzada con otros alimentos. Estos vegetales contaminados pueden representar un alto riesgo a la salud del consumidor mexicano.

En nuestro país existen pocos datos por lo que es muy importante analizar el punto en donde ocurre contaminación durante la producción de esta hortaliza, para poder implementar medidas adecuadas de prevención y control, de ahí el presente estudio.

MATERIAL Y MÉTODO

PARTE 1: MICROORGANISMOS INDICADORES Y PATÓGENOS EN TOMATE DE PUNTO DE VENTA DEL ÁREA METROPOLITANA DE MONTERREY, NUEVO LEÓN

6.1 ZONA GEOGRÁFICA DE MUESTREO

El estado de Nuevo León está ubicado en el noreste de la República Mexicana. Tiene una superficie de 64,220 km², el 3.3% de la superficie total del país. Está limitado al norte y al este por Tamaulipas; al sur y al oeste por San Luis Potosí y Zacatecas; y al norte por Coahuila, Tamaulipas y el estado norteamericano de Texas. Las coordenadas geográficas de sus extremos son: al norte 27° 49' y al sur 23° 11' de latitud norte. Al este 98° 26' y al oeste 101° 14' de longitud oeste.

Alrededor de 6 % del terreno del estado se usa en la agricultura. Los principales cultivos son maíz forrajero, mandarina, manzana, naranja, nuez, papa, pastos, sorgo forrajero, sorgo grano, toronja y trigo grano.

Nuevo León comprende 51 municipios. Monterrey es la capital del estado; se encuentra a 73 km de Saltillo, 900 km de la Ciudad de México, 223 km de Nuevo Laredo y 300 km del puerto de Matamoros. Por esta posición es uno de los principales cruces comerciales de México. El área metropolitana está conformada los siguientes municipios: Monterrey, Guadalupe, San Nicolás de los Garza, San Pedro Garza García, Apodaca, General Escobedo, Santa Catarina, García y Juárez (Fig. 7, Gobierno de Nuevo León (2010)).

Para realizar este estudio se eligieron cinco municipios: Monterrey, Guadalupe, San Nicolás de los Garza, Escobedo y San Pedro Garza García.



Figura 7. Mapa de Nuevo León y su área metropolitana. Se resaltan en color amarillo los municipios del área metropolitana (Gobierno de Nuevo León, 2010).

6.2 MUESTREO

Para el análisis epidemiológico en punto de venta, se seleccionaron dos variedades de tomate: tomate bola y huaje. Se analizaron un total de 80 muestras, siendo 40 de cada variedad. De cada uno de los 5 municipios se tomaron 16 muestras, 8 de tomate bola y 8 de tomate huaje.

De las 80 muestras, 42 se compraron en supermercados y 38 se compraron en mercados populares, tiendas y fruterías. En cada establecimiento se compraron de 500 g a 1 Kg de tomate bola y la misma cantidad de tomate huaje. Las muestras se tomaron de diferentes puntos del área de exhibición del producto, utilizando una bolsa plástica comercial como guante y recolectando el tomate en otra bolsa plástica. El tomate que se seleccionó se cuidó que no tuviera daño visible ni contaminación. Cada bolsa fue identificada con la clave correspondiente con un marcador indeleble de tinta negra o azul.

La clave de identificación fue la siguiente: “B” para tomate bola y “H” para tomate huaje seguido del número consecutivo. Las muestras se transportaron en refrigeración a 4 °C al laboratorio y se analizaron dentro de las primeras 24 h después de su adquisición.

6.3 CEPAS BACTERIANAS

Como controles positivos se utilizaron las siguientes cepas bacterianas: *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* O157:H7 ATCC 43894, *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *Proteus mirabilis* ATCC 7002 donadas por la compañía Beckton and Dickinson de México.

Estas cepas se activaron a partir de cultivos de reserva almacenados en ultracongelación (-80 °C), para lo cual se tomó una asada del cultivo y se sembraron por estría en placas con agar infusión cerebro corazón (ICC, BIOXON) incubándose durante 24 ± 2 h a 35 °C. Posteriormente, una colonia aislada se inoculó en tubos con caldo ICC y se incubaron durante 24 ± 2 h a 35 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, se tomó una asada de las cepas y se sembraron por estría en tubos con agar ICC en pico de flauta, se incubaron 24 ± 2 h a 35 °C. Pasada la incubación estos tubos fueron mantenidos a 4°C y se usaron como cultivos de trabajo y como controles positivos en los ensayos correspondientes. Para la activación de las cepas se tomó una asada del cultivo y se sembró en caldo ICC incubándose éste por 24 ± 2 h a 35 °C.

6.4 DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS INDICADORES

Las muestras de tomate se analizaron para cuantificar los siguientes microorganismos indicadores: mesófilos aerobios, coliformes totales y coliformes fecales. Para la determinación de mesófilos aerobios se siguió la metodología descrita en la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994 “Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa”; en tanto que para la determinación de coliformes totales y coliformes fecales se utilizó la metodología descrita en el Manual de Análisis Bacteriológico (FDA-BAM) [Food and Drug Administration – Bacteriological Analytical Manual].

6.4.1 Preparación de la muestra

Se pesó asépticamente 10 g de la muestra en una bolsa estéril y se homogenizó con 90 ml agua peptonada 0.1% estéril en un homogeneizador peristáltico (Stomacher® Labeasy) durante 1 min (dilución de 10^{-1}).

A partir de la dilución primaria se prepararon diluciones decimales seriadas, transfiriendo 200 μ l de la dilución primaria a tubos de ensayo de 13 x 100 mm conteniendo 1.8 ml de solución salina fisiológica estéril (0.85%) y agitando en vórtex (Maxi Mix Plus Mod. M63215, Barnstead, Thermolyne Corp., IA, USA).

6.4.2 Mesófilos aerobios

Una vez preparadas las diluciones de la muestras, para la determinación de mesófilos aerobios según la NOM-092-SSA1-1994, se empleó la técnica de vertido en placa. Para ello se tomó una alícuota de 100 μ l de cada dilución y se colocó en el centro de una placa Petri estéril, posteriormente se agregaron 12 a 15 ml de Agar Cuenta en Placa (ACP) [Difco™, Becton Dickinson and Co., MD, USA] fundido y mantenido a 48 °C, se mezcló mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio y se dejó solidificar. Se incubaron las cajas en posición invertida a 35 ± 2 °C durante 48 ± 2 h. Transcurrido el tiempo de incubación se cuantificaron todas las colonias principalmente las placas con 25-250 colonias. Cada muestra se plaqueó por duplicado; además se incluyó una caja sin inóculo como control negativo.

6.4.3 Coliformes totales

Para la determinación de coliformes totales, una vez realizadas las diluciones, se emplearon las técnicas de siembra por vertido en placa y la de doble capa de agar. Se transfirieron alícuotas de las diluciones de la muestra a placas de Petri estériles y

posteriormente se agregaron 12 a 15 ml de Agar Bilis Rojo Violeta (RVBA, Difco™, Becton Dickinson and Co., MD, USA) fundido y mantenido a 48°C, se mezcló mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio y se dejó solidificar.

Posteriormente se añadieron 5 ml de RVBA suplementado con 4-metilumbeliferil- -D-glucurónido (MUG, Difco™, Becton Dickinson and Co., MD, USA) fundido y mantenido a 48°C (para detectar la presencia de *E. coli*) y se dejó solidificar. Se incubaron las cajas en posición invertida a 35 ± 2 °C durante 18-24 h.

Transcurrido el tiempo de incubación se observaron las placas con crecimiento microbiano bajo luz ultravioleta a una longitud de onda de 366 nm mediante la cual se manifiesta la fluorescencia azul característica de *E. coli*. Los coliformes se cuantificaron como colonias rojas a púrpura de al menos 0.5 mm de diámetro y con halo de precipitación debido a los ácidos biliares. Cada muestra se plaqueó por duplicado, además se incluyó una caja sin inóculo como control negativo y una caja inoculada con *E. coli* ATCC 25922 como control positivo.

6.4.4 Coliformes fecales

A partir de las placas de coliformes totales, se tomaron 10 colonias representativas de las mismas por picadura en el agar y se transfirió cada una a un tubo con 5 ml de medio EC y con campana de fermentación. Los tubos se incubaron en baño de agua (Precision Microprocessor Controlled 280 Series Water Bath, Thermo Electron Corp., VA, USA) a 45 ± 0.5 °C durante 48 h. Se observó la presencia de gas y crecimiento (turbidez) a las 24 y a las 48 h. Aquellos tubos que presentaron gas y turbidez se consideraron como positivos a coliformes fecales y se realizaron los cálculos correspondientes.

6.5 MICROORGANISMOS PATÓGENOS

Las muestras se analizaron para determinar la presencia o ausencia de los siguientes microorganismos patógenos: *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7. Para la determinación de *Salmonella* spp. se utilizó la metodología de la Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994 “Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos” y para la determinación de *E. coli* O157:H7 se empleó la metodología descrita en el FDA-BAM capítulo 4.

6.5.1 Determinación de *Salmonella* spp.

Se pesó asépticamente 25 g de la muestra por analizar en una bolsa estéril y se adicionaron 225 ml de caldo lactosado como preenriquecimiento (Difco™, Becton Dickinson and Co., MD, USA) estéril. Se dejó reposar durante 1 h. Se tomó una alícuota, se midió el pH de la muestra con el potenciómetro (Microprocessor pH Meter, Mod. pH 211, Hanna instruments, RI, USA) y se ajustó a 6.8 ± 0.2 con hidróxido de sodio 1 N o ácido clorhídrico 1 N estériles, según fuera necesario. Posteriormente se incubó 24 ± 2 h a 35 °C.

Transcurrido el tiempo de incubación, se agitó suavemente la bolsa y se transfirió 1 ml a un tubo con 10 ml de caldo Vassiliadis-Rappaport (Difco™, Becton Dickinson and Co., MD, USA) y 1 ml a otro tubo con 10 ml de caldo selenito cistina usados como enriquecimiento selectivo (Difco™, Becton Dickinson and Co., MD, USA). Los tubos se incubaron de 18 a 24 h a 35°C. Para el aislamiento, después de la incubación, se mezclaron por agitación en vórtex los tubos con caldos y se estriaron en agar xilosa lisina desoxicolato (XLD), agar verde brillante (VB) y agar *Salmonella-Shigella* (SS) [Difco™, Becton Dickinson and Co., MD, USA] cuyas placas se incubaron por 24 ± 2 h a 35°C. Al término de éste, se observaron las placas para investigar la presencia de colonias típicas de *Salmonella*, de acuerdo con las siguientes características: en el agar XLD las colonias típicas son rosas o rojas que pueden ser transparentes con o sin centro negro o completamente negras; en el agar VB las colonias son rojas o rosas que pueden

ser transparentes rodeadas por medio enrojecido; las bacterias fermentadoras de la lactosa dan colonias amarillas. Para el caso del agar SS las colonias son translúcidas, ocasionalmente opacas, algunas colonias dan centro negro y las fermentadoras de la lactosa son rojas. A partir de las placas con colonias presuntivas de *Salmonella*, se realizaron las pruebas bioquímicas.

6.5.1.1 Identificación bioquímica.

Se seleccionaron al menos dos colonias típicas presuntivas de *Salmonella* de cada medio selectivo. Se inocularon dos tubos, uno con agar triple azúcar hierro (TSI) [Difco™, Becton Dickinson and Co., MD, USA] y otro con agar hierro lisina (LIA) [Difco™, Becton Dickinson and Co., MD, USA], por estría en la superficie inclinada y por punción en el fondo tocando levemente el centro de cada colonia. Los tubos se incubaron por 24 ± 2 h a 35°C . Se observó el crecimiento en los tubos y se consideraron presuntivamente positivas para *Salmonella* las colonias que dieron las siguientes reacciones:

Agar TSI: en el fondo del tubo se observó vire del indicador debido a la fermentación de la glucosa; en la superficie del medio se observó un color rojo más intenso que el medio original debido a la no fermentación de la lactosa ni de la sacarosa. En la mayoría de los casos se observó coloración negra a lo largo de la punción debido a la producción de ácido sulfhídrico.

Agar LIA: se observó intensificación del color púrpura en todo el tubo por la descarboxilación de la lisina. Se consideraron negativos aquellos cultivos que produjeron claramente color amarillo en el fondo del agar. La mayoría de las cepas de *Salmonella* produjeron ácido sulfhídrico en este medio con ennegrecimiento a lo largo de la punción.

Se continuó el análisis con los tubos que presentaron reacciones típicas de *Salmonella* en TSI y/o LIA.

A partir de los tubos de TSI que fueron positivos se llevó a cabo la prueba de la ureasa. Se tomó crecimiento del cultivo presumiblemente positivo de cada tubo de medio TSI y se inocularon tubos de caldo urea. Se utilizaron los siguientes controles: un control positivo que se inoculó con *Proteus mirabilis* ATCC 7002 y un control negativo para comparar el vire púrpura de las reacciones positivas con el color del medio original. Los tubos se incubaron por 24 ± 2 h a 35°C . Se descartaron todos los cultivos que dieron ureasa positiva y se retuvieron los cultivos que dieron la prueba negativa (sin cambio de color del medio).

Todas las muestras presuntivas de *Salmonella* spp. se analizaron por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para su confirmación.

6.5.2 Determinación de *E. coli* O157:H7

Para la determinación de la presencia o ausencia de *E. coli* O157:H7 se estriaron los tubos de caldo EC que fueron positivos para coliformes fecales en agar MacConkey con sorbitol (Difco™, Becton Dickinson and Co., MD, USA) suplementado con telurito de potasio (T) 2.5 mg/l y cefixima (C) 0.05 mg/l [Sigma-Aldrich, Co. LLC., MO, USA] (SMAC-CT) y se incubaron las placas 24 ± 2 h a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se examinaron las placas para investigar la presencia de colonias típicas de *E. coli* O157:H7, siendo éstas incoloras o color crema translúcido y centro marrón de 1 a 2 mm de diámetro.

Todas las muestras presuntivas para *E. coli* O157:H7 se analizaron por la técnica de PCR para su confirmación.

6.5.3 Confirmación de *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7 por la técnica de PCR

Para la confirmación de las cepas aisladas presuntivas de *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7 se utilizó la técnica de PCR siguiendo el protocolo descrito por Wang *et al.* (1997), el cual se describe a continuación.

6.5.3.1 Extracción de DNA.

Las cepas bacterianas, tanto los aislados presuntivos como las cepas control, se activaron en caldo ICC, incubándolas 24 ± 2 h a 35°C . Transcurrido el periodo de incubación, se tomaron 0.5 ml del cultivo y se homogenizaron con 1 ml de amortiguador salino de fosfatos (PBS; 0.05 M; pH 7.4) estéril. Se centrifugó a $9000 \times g$ por 3 min. Se realizaron 3 lavados con PBS y uno con agua miliQ; el precipitado fue resuspendido en 50 μl de agua miliQ. Las muestras se diluyeron 1:10 con Tritón X-100 al 1%, se incubaron en un baño de agua hirviendo durante 5 min e inmediatamente después se enfriaron en un baño de agua con hielo. De allí, se tomaron 2 μl de muestra que sirvieron como templado para la amplificación de DNA.

6.5.3.2 Amplificación.

De cada muestra se tomó una cantidad de 2 μl de DNA extraído y se añadieron a 23 μl de la mezcla de reacción, la cual contenía: 2.5 μl de buffer de reacción 1x (Tris-HCl 50 mmol/l, pH 8.5; KCl 20 mmol/l), 1.5 μl de MgCl_2 3 mmol/l, 0.0625 μl de dNTPs 0.25 mmol/l cada uno (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0.045 μl de Taq polimerasa 0.9 U, los iniciadores en concentración 0.25 $\mu\text{mol/l}$ (Tabla 2) y agua miliQ hasta completar 23 μl . El volumen total de la mezcla de reacción con la muestra fue de 25 μl .

La amplificación de la reacción se llevó a cabo en un termociclador (PCR Express Termo Hybaid, MA, USA) usando el protocolo reportado por Wang *et al.* (1997) que indica las siguientes condiciones de reacción: un ciclo de 94°C por 15 s, seguido de 35 ciclos de 94°C por 3 s, 50°C por 10 s y 74°C por 35 s y finalmente, un ciclo de 74°C por 2 min y 45°C por 2 s.

6.5.3.3 Visualización.

Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2% con una corriente de 120 V. La tinción se llevó a cabo con bromuro de etidio (50 $\mu\text{g/ml}$) para ser visualizados bajo luz ultravioleta.

Tabla 2. Iniciadores utilizados en PCR.

Especie	Gen blanco	Iniciadores Secuencia (5'-3')	Producto (pb)
<i>Salmonella</i> spp.	invA	Sal-3 TATCGCCACGTTTCGGGCAA Sal-4 TCGCACCGTCAAAGGAACC	275
<i>E. coli</i> O157:H7	hlyA	O157-3 GTAGGGAAGCGAACAGAG O157-4 AAGCTCCGTGTGCCTGAA	361

PARTE 2: MICROORGANISMOS INDICADORES Y PATÓGENOS EN LA CADENA DE PRODUCCIÓN EN CAMPO DE TOMATE DE LA REGIÓN DE CADEREYTA JIMÉNEZ, NUEVO LEÓN, MÉXICO

6.6 ZONA GEOGRÁFICA DE MUESTREO

El municipio de Cadereyta Jiménez se encuentra ubicado en la parte central del estado de Nuevo León, en las coordenadas 25° 36' de latitud norte y 100° 00' de longitud oeste a una altura de 360 metros sobre el nivel del mar. Sus límites son: al norte con los municipios de Juárez y de Pesquería, al sur con Allende, Montemorelos y General Terán, al este con General Terán y los Ramones y al oeste con Juárez e Hidalgo.

Tiene una extensión territorial de 1,004.4 km². En cuanto al uso potencial del suelo, están dedicadas a la agricultura 59,773 hectáreas. Se cultiva maíz, frijol, trigo, cebada, espiga para escoba, sorgo forrajero, mijo, naranja, mandarina, toronja y hortalizas. Cadereyta ocupa uno de los primeros lugares del estado en producción de cítricos.

Información geográfica: Gobierno de Nuevo León (2005).



Figura 8. Vista aérea de algunos cultivos en los que se obtuvieron muestras de una de las huertas de estudio, Cadereyta, N. L.

6.7 MUESTREO

Se tomaron muestras de 2 huertas productoras de tomate del municipio de Cadereyta, Nuevo León, México (Fig. 8). Durante la primera visita a cada una de las huertas se observó la cantidad de cuadros de cultivo, las variedades y las posibles fuentes de contaminación del tomate que siembran y cosechan. Además, se realizó una entrevista con el dueño y/o con el encargado de las huertas para conocer las temporadas de siembra y cosecha, tipo de irrigación, forma de cosecha, maquinaria y equipo, características del personal y de los manipuladores, capacitación, instalaciones para empaclado (en caso de haberlas), exportación del producto, etc.

Durante la temporada de cosecha se hicieron visitas a las huertas para coleccionar muestras de tomate, suelo, agua y manos de los manipuladores. Se tomaron muestras antes y después de tocar el producto, denominadas *precosecha* y *cosecha*,

respectivamente. También se tomaron muestras en puntos de *distribución* y de *empaque* (en caso de haberlo).

Se formaron series de muestras, a cada serie o conjunto se le denominó *cadena*, la cual constó de 8 a 10 muestras: una muestra de suelo (pre cosecha), tres o cuatro muestras de lavado de tomate (pre cosecha, cosecha, distribución y/o empaque), dos muestras de agua de irrigación (en campo y de la fuente) y dos o tres muestras de enjuague de manos de los manipuladores (cosecha, distribución y/o empaque). En la Figura 9 se esquematiza la composición de una cadena. En total se colectaron 16 cadenas de tomate. Una vez colectadas se transportaron en hieleras con geles fríos al laboratorio donde se mantuvieron a 4 ± 2 °C y se procesaron dentro de las 24 h posteriores al muestreo.

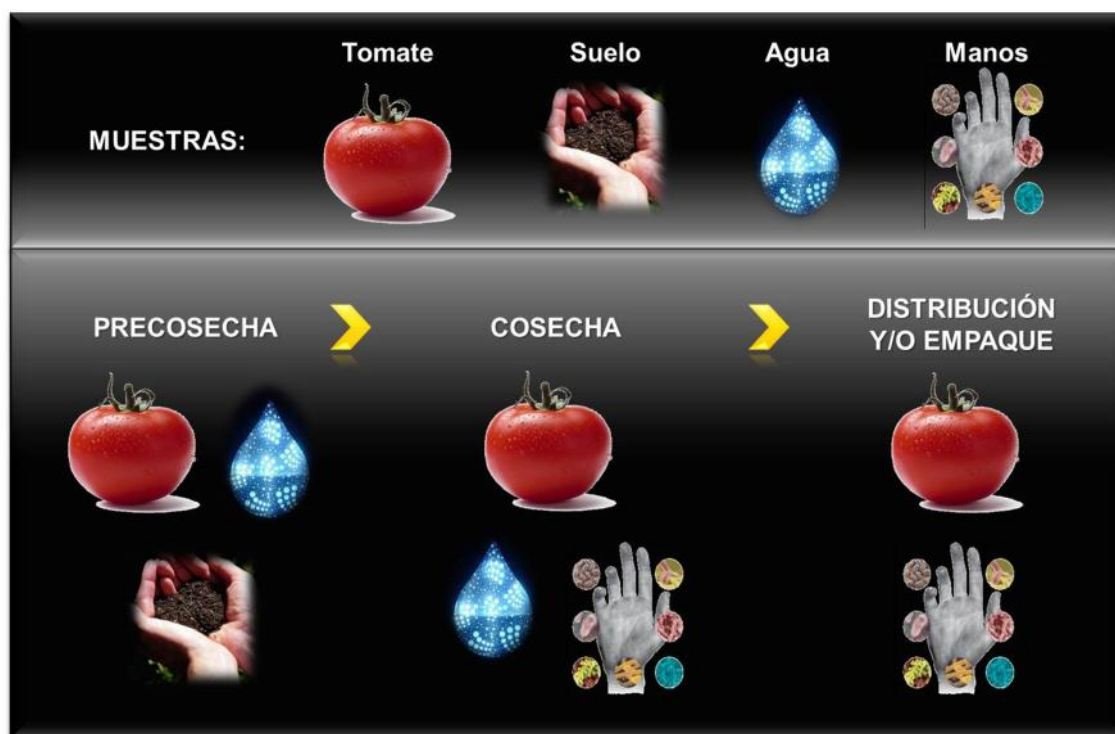


Figura 9. Esquema de una cadena.

6.7.1 Determinación de puntos de muestreo

Se eligió, al azar un número de una tabla de números aleatorios (Apéndice) que fue la cantidad de pasos a caminar a lo largo del cultivo tomando como punto de inicio una de las esquinas del cuadro de cultivo. Cuando el número elegido al azar fue mayor a la longitud total del cultivo, no se tomaba la muestra, sino que se elegía otro número hasta conseguir uno menor a dicha longitud. Se realizó lo mismo para internalizarse en el cultivo, repitiéndose el proceso en dos ocasiones mas obteniendo tres puntos aleatorios de muestreo en cada cultivo.

6.7.2 Tipos de muestra

6.7.2.1 Tomate.

Consistió en el agua de lavado de 18 tomates enteros, realizando dos lavados de 9 tomates cada uno.

Para el caso de la precosecha, se tomaron con guantes estériles los tomates directamente de la planta y se lavaron con 500 ml de agua peptonada 0.1% estéril en una bolsa Nasco Whirl-Pak® (92 oz.). La bolsa con el producto se agitó vigorosamente por 30 s, se masajéó durante 60 s y de nuevo agitación por 30 s más.

En el caso de la cosecha, distribución y empaque se solicitó a un manipulador de cada área (campo, arpillera o caja y banda transportadora respectivamente) nos proporcionara los tomates y los depositara en la bolsa; se realizó el mismo procedimiento que el párrafo anterior.

Todo el protocolo se repitió para los otros dos puntos aleatorios de muestreo. Las bolsas con muestra se colocaron en una hielera conteniendo geles fríos y se transportaron al laboratorio.

6.7.2.2 Suelo.

Una muestra de suelo consistió en aproximadamente 100 g de suelo, para lo cual se insertó una cuchara estéril en un ángulo de 45° con el suelo y a una profundidad aproximada de 5 cm, se transfirieron a una bolsa Nasco Whirl-Pak® (18 oz.) de 500 ml; se repitió el procedimiento siete veces con la misma cuchara y siguiendo un patrón circular dentro de 30 cm del tallo de las plantas a muestrear.

Todo el protocolo se repitió para los otros dos puntos aleatorios de muestreo. Las bolsas con muestra se colocaron en una hielera conteniendo geles fríos y se transportaron al laboratorio.

6.7.2.3 Agua de irrigación.

Una muestra de agua de irrigación consistió en 1.5 L de agua tomados de la cintilla de irrigación, manguera o tubería, para lo cual se sanitizó la superficie de ésta con una torunda impregnada de hipoclorito de sodio (NaClO) al 10%, se dejó fluir el agua 30 s y se colectó la muestra en una bolsa Nasco Whirl-Pak® (92 oz.) hasta completar 1.5 L. Se recolectó el agua en el punto más cercano al producto. Cuando la presión del flujo de agua no permitía esto (por ejemplo, en la irrigación por goteo) se desconectaba la cintilla de la manguera y, de esta última, se tomaba la muestra.

Todo el protocolo se repitió para los otros dos puntos aleatorios de muestreo. Las bolsas con muestra se colocaron en una hielera conteniendo geles fríos y se transportaron al laboratorio.

6.7.2.4 Agua de fuente.

Se sanitizó la superficie externa del grifo o manguera con una torunda impregnada con NaClO al 10%, se dejó fluir el agua por 30 s y se tomaron dos muestras de 2 L cada una en bolsas Nasco Whirl-Pak® (92 oz.). Las muestras se colocaron en una hielera conteniendo geles fríos y se transportaron al laboratorio.

6.7.2.5 Enjuague de manos.

Una muestra de enjuague de manos consistió en el agua de enjuague de ambas manos de un manipulador de producto, ya sea durante la cosecha, la distribución y/o el empaque. Para ello, en el caso de la cosecha se solicitó al empleado más cercano que estuviera cosechando en ese momento se lavara las manos durante 30 s, limpiándose también las uñas y masajeándose por 60 s mas, en 750 ml de agua peptonada 0.1% estéril contenida en una bolsa Nasco Whirl-Pak® (92 oz.). En el caso de las muestras de distribución y empaque, se obtuvieron de manipuladores de los sitios respectivos bajo las mismas condiciones mencionadas.

Todo el protocolo se repitió para los otros dos puntos aleatorios de muestreo. Las bolsas con muestra se colocaron en una hielera conteniendo geles fríos y se transportaron al laboratorio.

6.8 MUESTRAS COMPUESTAS

Previo al procesamiento de cada muestra se realizó la preparación de la *muestra compuesta*, la cual consistió en mezclar cada una de las tres muestras colectadas en los puntos aleatorios a una bolsa Nasco Whirl-Pak® (92 oz.), cerrarla y homogenizar el contenido para formar una muestra compuesta homogénea.

En el caso del suelo, la muestra compuesta se formó pesando en condiciones de esterilidad 100 g de cada una de las tres muestras colectadas en los sitios aleatorios para obtener una muestra compuesta de 300 g.

Una vez que se preparó la muestra compuesta, se realizó el análisis microbiológico dentro de las 24 h posteriores a la colecta.

6.9 CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS INDICADORES

Las muestras se analizaron para identificar y cuantificar los siguientes microorganismos indicadores: *E. coli*, coliformes (totales y fecales) y *Enterococcus* spp.

Primeramente, para todas las muestras exceptuando las de agua de irrigación, se realizaron diluciones tomando como base la Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994 “Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico”, como a continuación se describe.

Una vez homogenizada la muestra compuesta, a partir de una muestra de enjuague (tomate y manos) se tomó una alícuota de 0.5 ml y se diluyó con 4.5 ml de solución salina (NaCl 0.85%) fisiológica estéril (dilución 10^{-1}). Se realizaron de aquí dos diluciones decimales seriadas más usando alícuotas de 0.5 ml en 4.5 ml de solución salina fisiológica estéril (10^{-2} y 10^{-3}).

En el caso de la muestra de suelo, se pesó 25 g de la muestra compuesta y se homogenizó con 75 ml de agua peptonada 0.1% estéril (dilución 1:4) masajeándola hasta obtener una suspensión completa y homogénea. Se permitió que las partículas grandes sedimentaran durante 15 min y se procedió a transferir 0.5 ml de las capas superiores de la suspensión para preparar dos diluciones adicionales en 4.5 ml solución salina fisiológica estéril (1:40 y 1:400).

Las diluciones preparadas se emplearon para la cuantificación de *E. coli* y coliformes (suelo) y para la cuantificación de enterococos totales (tomate, manos y suelo).

En la cuantificación de *E. coli* y coliformes de muestras de enjuague (tomate y manos) y de agua de irrigación y también para cuantificar enterococos en muestras de agua de irrigación, se utilizó la técnica de filtración por membrana descrita en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (Greenberg, 1992).

Utilizando pinzas estériles (Pall, Corp., NY, USA), se colocó un filtro de membrana estéril (cara cuadrículada hacia arriba) de 0.45 μm (Millipore S-Pak™, Millipore Corp., MA, USA) sobre la placa porosa del soporte. Cuidadosamente se colocó el embudo correspondiente sobre el soporte para cerrarlo. Se procedió a filtrar volúmenes de las muestras bajo vacío parcial (Bomba de vacío Mod. DOA-P712-AA, Pall, Corp., NY, USA). El sistema completo de filtración por membrana se muestra en la Figura 10.

6.9.1 *E. coli* y coliformes

6.9.1.1 Tomate y enjuague de manos.

Para la determinación de *E. coli* y coliformes en estas muestras se utilizó la técnica de filtración por membrana descrita anteriormente. Se procedió a filtrar volúmenes de 1 ml, 2 ml y 50 ml de muestra por separado bajo vacío parcial.



Figura 10. Sistema de filtración por membrana para cuantificación de microorganismos indicadores y detección de patógenos.

Se filtraron 3 a 4 muestras de tomate (pre cosecha, cosecha, distribución y/o empaque) y 2 a 3 muestras de enjuague de manos (cosecha, distribución y/o empaque) por cadena. Con la membrana aún en su lugar, se lavó el embudo por filtración de tres porciones de 20-30 ml de agua de dilución estéril. Al término del lavado final se retiró el embudo e inmediatamente se removió el filtro de membrana con pinzas estériles y se colocó en el agar cromogénico RAPID'*E.coli* 2 (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) el cual contiene sustratos cromogénicos que permiten detectar simultáneamente la actividad de dos enzimas, β -D-glucuronidasa (GLUC) y β -D-galactosidasa (GAL) (Lauer *et al.*, 2006). Las placas se incubaron a 35 y/o a 45 °C durante 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se contaron las colonias. Para este medio, los microorganismos coliformes, excepto *E. coli*, son GAL-positivos y GLUC-negativos (GAL+/GLUC-) y forman colonias azules o verdes, mientras que *E. coli* presenta ambas enzimas (GAL+/GLUC+) y forma colonias púrpura. Se descartaron colonias de cualquier otra coloración (Figura 11). La cuenta de coliformes totales y/o fecales se obtuvo por adición del número de colonias verdes o azules al número de colonias púrpuras.

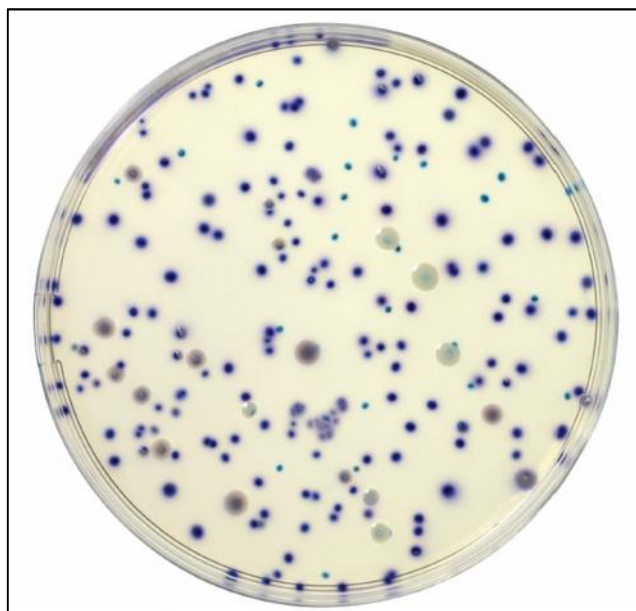


Figura 11. Placa de agar RAPID'*E.coli* 2. Las bacterias coliformes presentan colonias azul-verde y *E. coli* presenta colonias púrpura. Fuente: Bio-Rad Laboratories, 2006.

6.9.1.2 Agua de irrigación.

En este caso se utilizó la técnica de filtración por membrana mencionada en el apartado anterior, a diferencia que los volúmenes filtrados fueron: 50 ml, 100 ml y 250 ml. Se filtraron 2 muestras de agua de irrigación por cadena, una de agua de campo y otra de agua de fuente. Al terminar la filtración, la membrana se colocó cuidadosamente con la parte cuadrículada hacia arriba en una placa de agar cromogénico RAPID'*E.coli* 2 y se incubó a 35 y/o a 45 °C durante 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se contaron las colonias

6.9.1.3 Suelo.

De las diluciones de suelo previamente realizadas se tomó una alícuota de 100 µl de cada una de las diluciones y se sembraron por extensión sobre una placa de agar cromogénico RAPID'*E.coli* 2. Las placas se incubaron a 35 y/o a 45 °C durante 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se contaron las colonias características de ambos microorganismos como previamente se mencionó.

6.9.2 Enterococos totales

6.9.2.1 Tomate y enjuague de manos.

De las diluciones decimales seriadas realizadas previamente de las muestras compuestas, se tomó una alícuota de 100 µl de cada dilución (1:10, 1:100 y 1:1000) y se sembró por extensión en una placa de agar KF Streptococcus (Difco™, Becton Dickinson and Co., MD, USA) suplementado con cloruro de 2, 3, 5-trifenil-tetrazolio (TTC) 1% (Sigma-Aldrich, Co. LLC., MO, USA), después se incubó a 35 °C durante 48 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se contaron las colonias características de *Enterococcus* spp. en este medio, cuya presencia se detecta con púrpura de bromocresol que cambia de color púrpura a amarillo, por la capacidad de los enterococos de metabolizar maltosa y lactosa con producción de ácido, además que estos microorganismos reducen el TTC a formazán dando una coloración roja a las colonias (Figura 12).



Figura 12. Placa de agar KF Streptococcus. Las bacterias de enterococos forman colonias rojas. Fuente: Merck, 2002.

6.9.2.2 Suelo.

De las diluciones de suelo previamente realizadas se tomó una alícuota de 100 μ l de cada una de las diluciones (1:4, 1:40 y 1:400) y se sembró por extensión sobre una placa de agar KF Streptococcus. Las placas se incubaron a 35 °C durante 48 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se contaron las colonias características de dicho microorganismo como previamente se mencionó.

6.9.2.3 Agua de irrigación.

En este caso se utilizó la técnica de filtración por membrana mencionada en el apartado anterior, a diferencia que los volúmenes filtrados fueron: 50 ml, 100 ml y 250 ml. Al terminar la filtración, la membrana se colocó cuidadosamente con la parte cuadriculada hacia arriba en la placa de agar KF Streptococcus y se incubó a 35 °C durante 48 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se contaron las colonias características.

Para el caso de todos los ensayos se realizó el plaqueo por duplicado.

6.10 MICROORGANISMOS PATÓGENOS

Las muestras se analizaron para detectar la presencia de los siguientes microorganismos patógenos: *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7.

6.10.1 Tomate y enjuague de manos

Estas muestras se sometieron primeramente a una prefiltración seguida de una filtración por membrana del prefiltrado obtenido, debido a su turbidez. Para la prefiltración, mediante pinzas estériles, se colocó un papel filtro estéril en un embudo Büchner conectado a un matraz Kitazato y se procedió a filtrar 300 ml de muestra utilizando una bomba de vacío (TODAY'S Chemker 400, Rocker Scientific Co., Ltd. Taipei, Taiwan). Se tomó el papel filtro con pinzas estériles y se introdujo en una bolsa Nasco Whirl-Pak® (18 oz.) conteniendo 225 ml de Caldo de Preenriquecimiento Universal (Difco™, Becton Dickinson and Co., MD, USA).

Posteriormente, con el prefiltrado restante se realizó la técnica de filtración por membrana, en la que esta última se introdujo a la misma bolsa del caldo de preenriquecimiento universal anterior. Las muestras se incubaron a 35 °C durante 18 a 24 h.

Transcurrido el tiempo de incubación, se agitó vigorosamente cada bolsa con muestra, se tomó una asada y se estrió por duplicado en placas de agar xilosa lisina desoxicolato (XLD) y agar sulfito bismuto (SB) [Difco™, Becton Dickinson and Co., MD, USA] para *Salmonella* spp. y en placas de agar *E. coli* O157:H7 (DIBICO®, Becton Dickinson and Co., MD, USA) para dicha bacteria. Las placas se incubaron a 35 °C durante 24 h y se examinaron para investigar la presencia de microorganismos patógenos.

6.10.2 Agua de irrigación

Para este tipo de muestra se utilizó la técnica de filtración por membrana descrita previamente en el que volumen de muestra filtrado fue de 750 ml. Al terminar la filtración, la membrana se introdujo en una bolsa Nasco Whirl-Pak® (18 oz.) conteniendo 225 ml de Caldo de Preenriquecimiento Universal. Las muestras se incubaron a 35 °C durante 18 a 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se agitó vigorosamente cada bolsa con muestra, se tomó una asada y se estrió por duplicado en placas de agar XLD y agar SB para *Salmonella* spp. y en placas de agar *E. coli* O157:H7 para dicha bacteria. Las placas se incubaron a 35 °C durante 24 h y se observaron para determinar la presencia o ausencia de microorganismos patógenos.

6.10.3 Suelo

Para este caso, se pesaron asépticamente 25 g de muestra y se transfirieron a una bolsa Nasco Whirl-Pak® (18 oz.) conteniendo 225 ml de Caldo de Preenriquecimiento Universal, se homogeneizó por agitación y masaje durante 60 s y se incubó a 35 °C durante 18 a 24 h. Se homogeneizó la muestra, se tomó una asada y se estrió por duplicado en placas de agar XLD y agar SB para *Salmonella* spp. y en placas de agar *E. coli* O157:H7 para esta bacteria. Las placas se incubaron a 35 °C durante 24 h y se observaron para determinar si hay microorganismos patógenos presentes.

La observación de las colonias características se realizó como previamente se había mencionado. Todas las muestras presuntivas de *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7 se analizaron por la técnica de PCR para su confirmación.

6.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la primera parte, que comprendía el análisis epidemiológico en punto de venta, en la comparación de mesófilos aerobios, coliformes totales y coliformes fecales, se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar la normalidad de estas

variables: a las variables normales se les realizó un análisis de varianza (ANOVA) de uno o dos factores (según fuera el caso); para las variables no normales se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. Para las variables de presencia o ausencia de *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7 se aplicó la prueba no paramétrica de Cochran. Se utilizaron los paquetes estadísticos SPSS Statistics v17.0 y STATISTICA v7.0. Antes de realizar el análisis estadístico de los datos se asignó un valor numérico a las variables independientes y a algunas de las variables dependientes, como se indica en la Tabla 3.

Tabla 3. Variables dependientes e independientes.

TIPO DE VARIABLE	VARIABLE	NOMBRE	VALOR
Independiente	Municipio	Guadalupe	1
		San Nicolás	2
		Monterrey	3
		Escobedo	4
		San Pedro	5
	Lugar de compra	Supermercado	1
		Mercado	2
	Producto	Tomate bola	1
		Tomate huaje	2
Dependiente	Mesófilos aerobios	MA	Cuenta
	Coliformes totales	CT	Cuenta
	Coliformes fecales	CF	Cuenta
	<i>Salmonella</i> spp.	S	Presencia = 1 Ausencia = 0
	<i>E. coli</i> O157:H7	EC	Presencia = 1 Ausencia = 0

Las variables MA, CT y CF (mesófilos aerobios, coliformes totales y coliformes fecales respectivamente) se transformaron a \log_{10} para probar su normalidad, las variables transformadas se denominaron: logMA, logCT y logCF, respectivamente.

Las variables transformadas se sometieron a la prueba de Kolmogorov-Smirnov para probar su normalidad, encontrándose que las variables logMA y logCT presentaron una distribución normal ($P > 0.05$) y la variable logCF presentó una distribución no-normal ($P < 0.05$).

Para la segunda parte se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de uno o dos factores (según fuera el caso). Para las variables de presencia o ausencia de *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7 se aplicó la prueba no paramétrica de Cochran. Se utilizó el software estadístico SPSS Statistics v17.0.

RESULTADOS

PARTE 1: MICROORGANISMOS INDICADORES Y PATÓGENOS EN TOMATE DE PUNTO DE VENTA DEL ÁREA METROPOLITANA DE MONTERREY, NUEVO LEÓN

En total se analizaron 80 muestras de tomate durante el período de Octubre de 2010 a Enero de 2011, de las cuales 40 fueron de tomate bola y 40 de tomate huaje.

7.1 MICROORGANISMOS INDICADORES

7.1.1 Mesófilos aerobios (MA)

Para el análisis de las variables normales (cuentas de mesófilos y de coliformes totales) se realizó un análisis de varianza (ANOVA), encontrándose diferencia significativa ($P < 0.01$) en las cuentas de mesófilos aerobios (MA) en los diferentes municipios de estudio. Se observaron cuentas de estos microorganismos que van desde $2.71 \log_{10}$ hasta $4.13 \log_{10}$ UFC/g. Estas cuentas fueron mayores en los municipios de Guadalupe ($4.13 \log_{10}$ UFC/g) y Escobedo ($4.01 \log_{10}$ UFC/g) y las menores se detectaron en San Nicolás ($2.71 \log_{10}$ UFC/g). Las diferencias en las cuentas de mesófilos aerobios entre los diferentes municipios se muestran en la gráfica de la Figura 13.

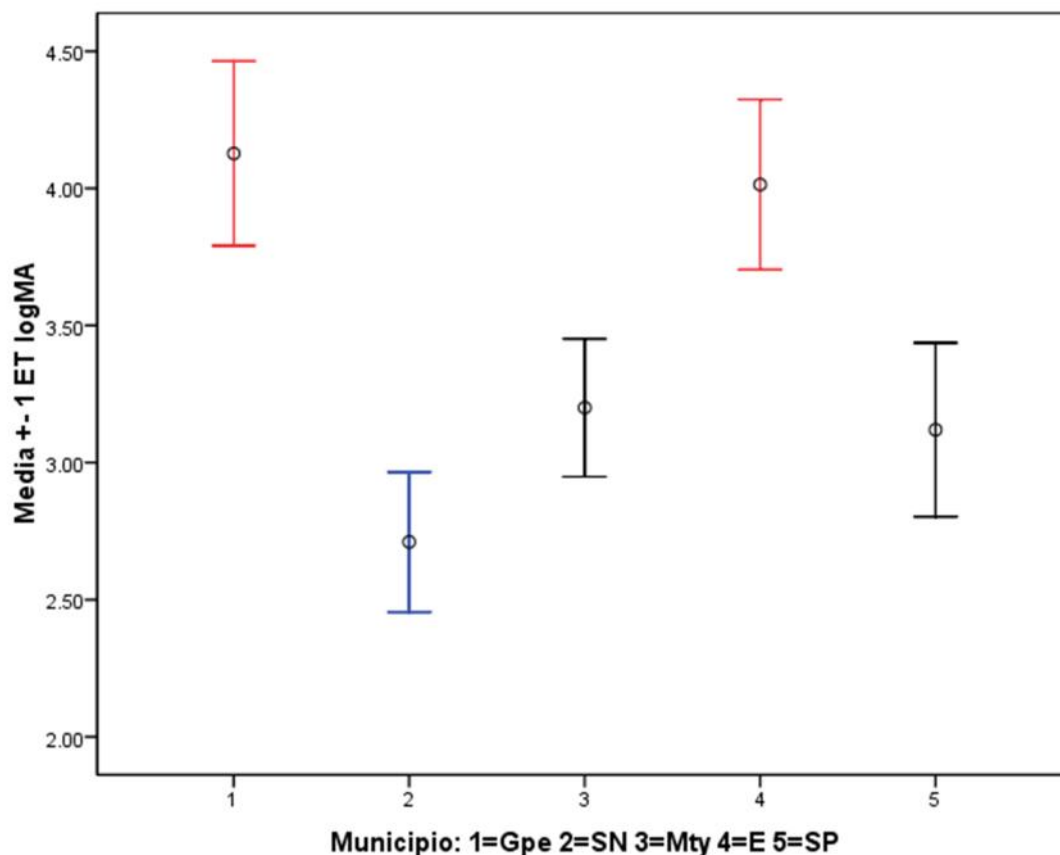


Figura 13. Cuentas de mesófilos aerobios (MA) (\log_{10} UFC/g) en muestras de tomate bola y huaje en punto de venta expendidos en supermercados y mercados en el área metropolitana de Monterrey, N. L. ($P < 0.01$). Municipios: 1 = Gpe (Guadalupe), 2 = SN (San Nicolás de los Garza), 3 = Mty (Monterrey), 4 = E (Escobedo), 5 = SP (San Pedro Garza García). ET = Error Estándar.

También se compararon las cuentas de indicadores entre las dos variedades de tomate examinadas y se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$) en las cuentas de mesófilos aerobios entre las dos variedades de la hortaliza, siendo mayores las cuentas de este indicador en el tomate huaje ($3.69 \log_{10}$ UFC/g) que en el tomate bola ($3.17 \log_{10}$ UFC/g). Estos resultados se muestran en la Figura 14.

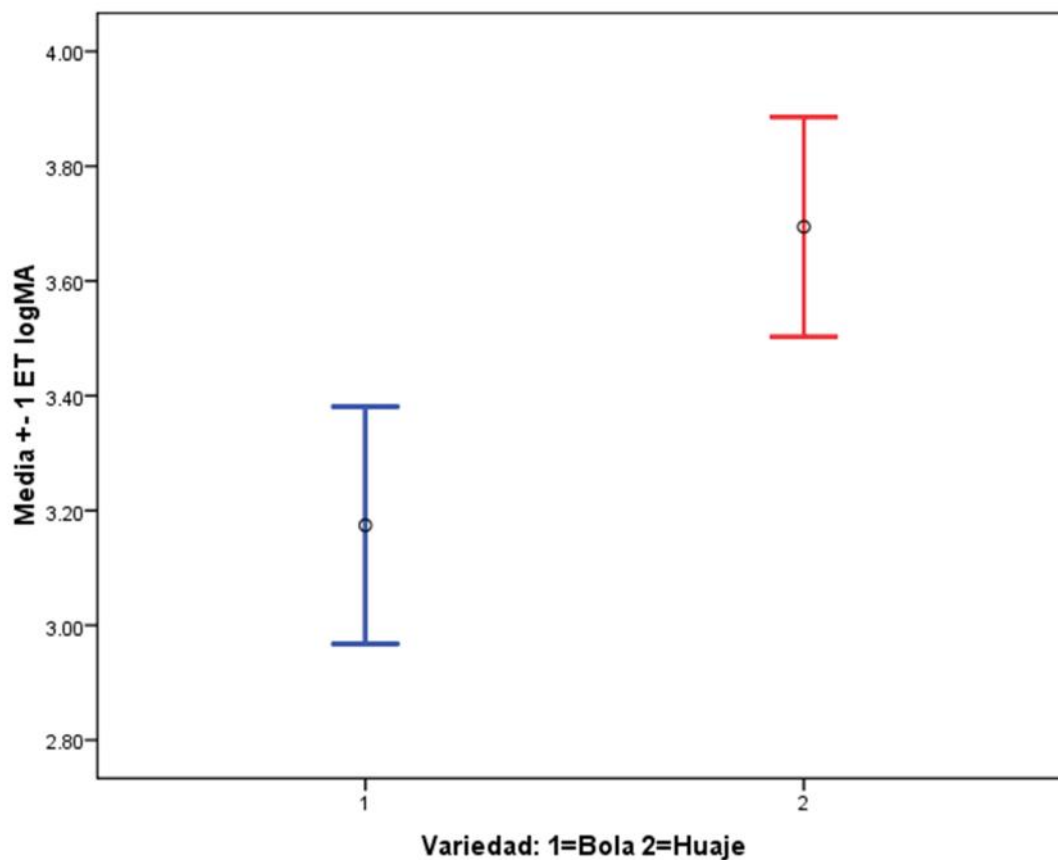


Figura 14. Cuentas de mesófilos aerobios (MA) (\log_{10} UFC/g) en dos variedades de tomate: bola (1) y huaje (2) obtenidos de supermercados y mercados del área metropolitana de Monterrey, N. L. ($P < 0.05$). ET = Error Estándar.

7.1.2 Coliformes totales (CT)

En el análisis de las cuentas de coliformes totales se realizó un análisis de varianza (ANOVA). No se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los municipios, ni entre las dos variedades de tomate, ni entre supermercados y mercados.

Las cuentas de coliformes totales fueron mayores en el municipio de Escobedo (3.05 \log_{10} UFC/g) y los demás presentan las siguientes cuentas (en orden decreciente): Guadalupe, 2.38; San Pedro, 2.31; Monterrey, 2.22 y San Nicolás, 2.19 \log_{10} UFC/g (Figura 15).

El tomate huaje presentó ligeramente mayor cuenta de coliformes totales que el tomate bola (2.49 y 2.36 \log_{10} UFC/g, respectivamente) (Figura 16).

En cuanto a las muestras provenientes de mercados se obtuvieron cuentas más elevadas de coliformes totales (2.58 \log_{10} UFC/g) que en las provenientes de supermercados (2.29 \log_{10} UFC/g) (Figura 17).

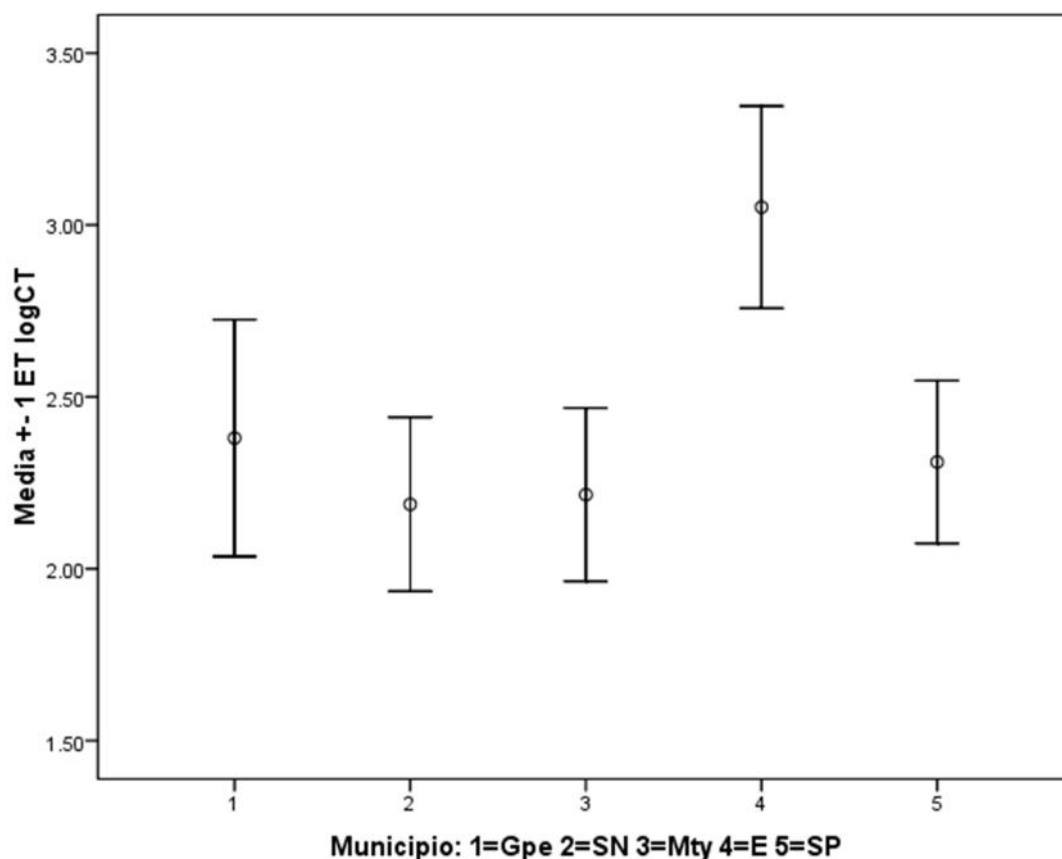


Figura 15. Cuentas de coliformes totales (CT) (\log_{10} UFC/g) de muestras de tomate que se expenden en los diferentes municipios de Monterrey N. L. y su área metropolitana. ($P > 0.05$). Municipios: 1 = Gpe (Guadalupe), 2 = SN (San Nicolás de los Garza), 3 = Mty (Monterrey), 4 = E (Escobedo), 5 = SP (San Pedro Garza García). ET = Error Estándar.

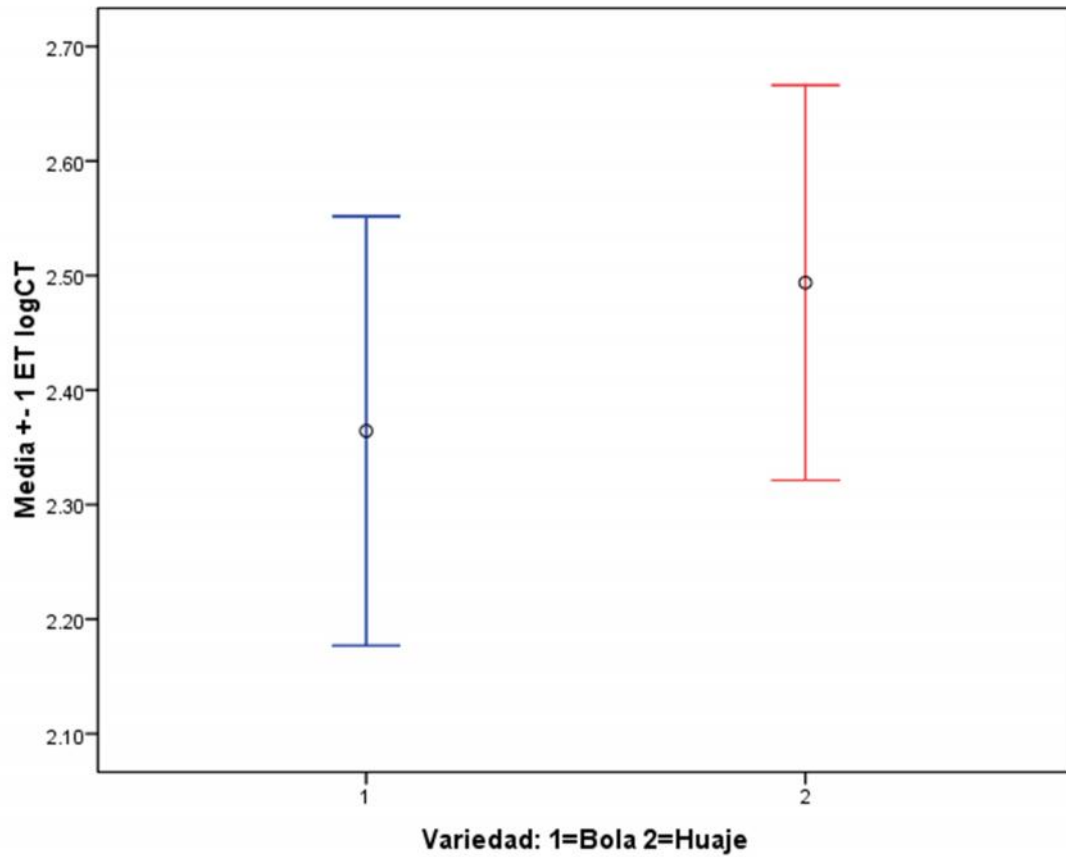


Figura 16. Cuentas de coliformes totales (CT) (\log_{10} UFC/g) en dos variedades de tomate: bola (1) y huaje (2) ($P > 0.05$). ET = Error Estándar. Muestras obtenidas de supermercados y mercados del área metropolitana de Monterrey, N. L.

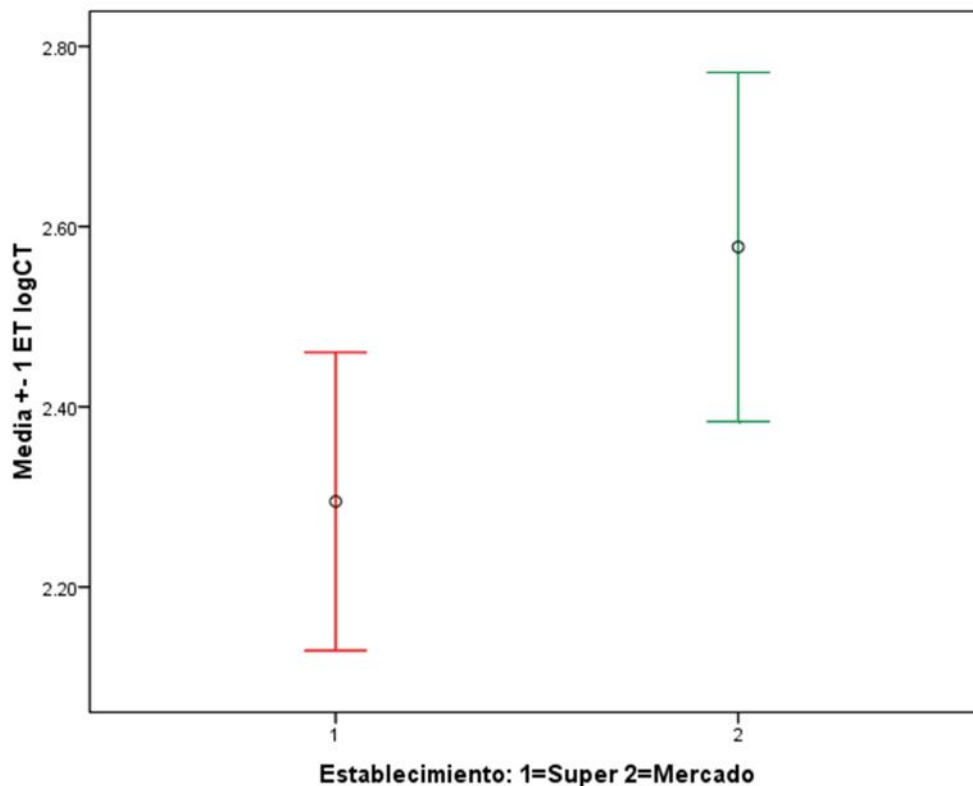


Figura 17. Cuentas de coliformes totales (CT) (\log_{10} UFC/g) en muestras de tomate según los tipos de establecimiento: supermercados (1) y mercados (2) de Monterrey y su área metropolitana. ($P > 0.05$). ET = Error Estándar.

7.1.3 Coliformes fecales (CF)

Dado que los datos de coliformes fecales presentan una distribución no-normal se construyeron tablas de contingencia y se encontró que existe una diferencia significativa ($P < 0.05$) en las cuentas de estos organismos con respecto al tipo de tomate y sitio de muestreo, siendo la diferencia principal en el tomate bola y en las muestras obtenidas de supermercados (Figuras 18 y 20).

En el análisis con las tablas de contingencia se encontró que en las cuentas de coliformes fecales de los supermercados existe una dependencia significativa ($P < 0.05$) entre los municipios (Figura 18).

El 78.6% (33) de las muestras de los supermercados tuvieron una cuenta de 5 UFC/g, este porcentaje está distribuido como sigue: 23.8% (10) de San Pedro, 19% (8) de Monterrey, 16.7% (7) de Guadalupe y el 9.5% (4) de San Nicolás y Escobedo.

El 14.3% (6) de las muestras de los supermercados tuvieron una cuenta de 50 UFC/g, de las cuales 4 muestras (9.5%) fueron de Escobedo y 2 (4.8%) de San Nicolás. Sólo una muestra (2.4 %) presentó cuenta de 8 UFC/g y una muestra (2.4%) de 11 UFC/g, ambas de San Nicolás. También, una muestra (2.4%) de Guadalupe presentó 500 UFC/g, que fue la mayor cuenta de coliformes fecales.

Se encontró una dependencia significativa de las cuentas de coliformes fecales entre los municipios ($P < 0.05$) para el tomate variedad bola; estos resultados se muestran en la gráfica de la Figura 20. El 75% de las muestras (30 muestras) de tomate bola presentaron cuenta de 5 UFC/g, porcentaje distribuido como sigue: Monterrey (8 muestras) y San Pedro (8 muestras) el 20% de las muestras cada municipio, San Nicolás (4) y Escobedo (4) el 10% de las muestras cada municipio y Guadalupe (6) el 15% de las muestras de tomate bola.

El 12.5% de las muestras de esta variedad, que corresponde a 5 muestras (4 de Escobedo y 1 de San Nicolás), presentaron 50 UFC/g. Además, 5% de las muestras de tomate bola (2) tomadas en Guadalupe presentaron cuenta de 500 UFC/g. Una muestra (2.5%) tuvo una cuenta de 8 UFC/g, una muestra (2.5%) presentó 11 UFC/g y otra (2.5%) mostró 15 UFC/g, las tres muestras se tomaron en San Nicolás.

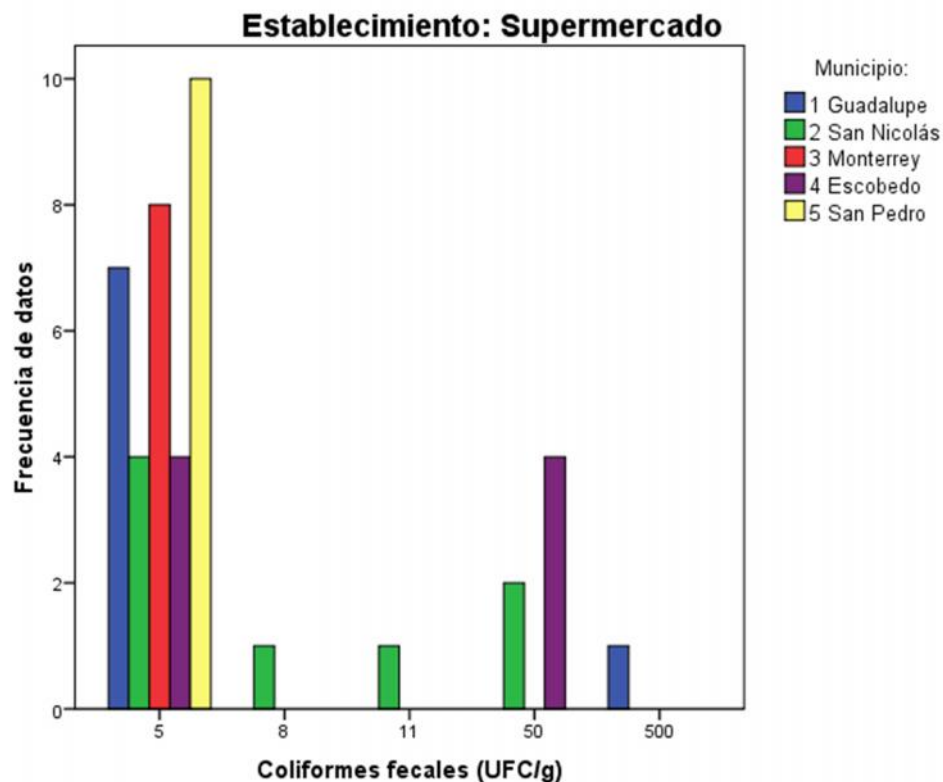


Figura 18. Cuenta de coliformes fecales (UFC/g) en muestras de tomate expendidos en supermercados del área metropolitana de Monterrey, N. L. ($P < 0.05$)

En los mercados (Figura 19) y para el tomate huaje (Figura 21), se encontró que no existe diferencia significativa entre los municipios y las cuentas de coliformes fecales, ni en ambas variedades de tomate contra los establecimientos y las cuentas de coliformes fecales ($P > 0.05$).

En las muestras obtenidas a partir de mercados, no se observó diferencia significativa ($P > 0.05$) de las cuentas de coliformes fecales entre los diferentes municipios. El 71.1% (27) de las muestras contenían 5 UFC/g, de las cuales 8 (21.1%) muestras, 7 (18.4%), 4 (10.5%) correspondieron a Monterrey, San Nicolás, Guadalupe, Escobedo y San Pedro respectivamente.

El 21.1% (8) de las muestras tuvieron una cuenta de 50 UFC/g de las cuales era 3 (7.9%) muestras de los municipios de Guadalupe y Escobedo y 2 (5.3%) de San Pedro.

Del municipio de Guadalupe 1 (2.6%) muestra y una de Escobedo (2.6%) presentaron 500 UFC/g. 2.6%). Del municipio de San Nicolás sólo se obtuvo una muestra (2.6%) con coliformes fecales en 15 UFC/g (Figura 19).

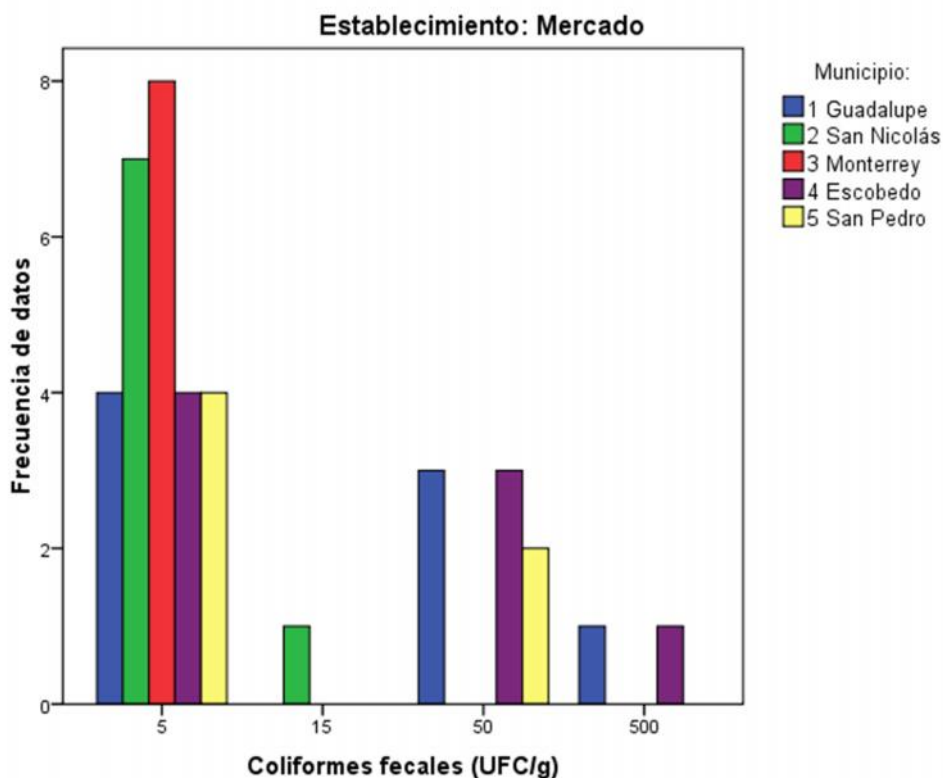


Figura 19. Cuenta de coliformes fecales (UFC/g) en muestras de tomate expendidos en mercados del área metropolitana de Monterrey, N. L. ($P > 0.05$)

En la variedad huaje del tomate, se encontró que no existe diferencia significativa entre los municipios en las cuentas de coliformes fecales ($P > 0.05$). El 75% (30) de las muestras presentó una cuenta de 5 UFC/g del cual 20% (8), 17.5% (7), 15% (6), 12.5% (5), 10% (4) corresponden a los municipios de Monterrey, San Nicolás, San Pedro, Guadalupe y Escobedo, respectivamente. Cuentas de 50 UFC/g se presentaron en el 22.5% de las muestras (9), porcentaje dividido entre Guadalupe y Escobedo (7.5% cada uno, 3 muestras de cada municipio), San Pedro (5%, 2 muestras) y una muestra (2.5%) de San Nicolás. Sólo en una muestra de Escobedo (2.5%) se obtuvo una cuenta de 500 UFC/g (Figura 21).

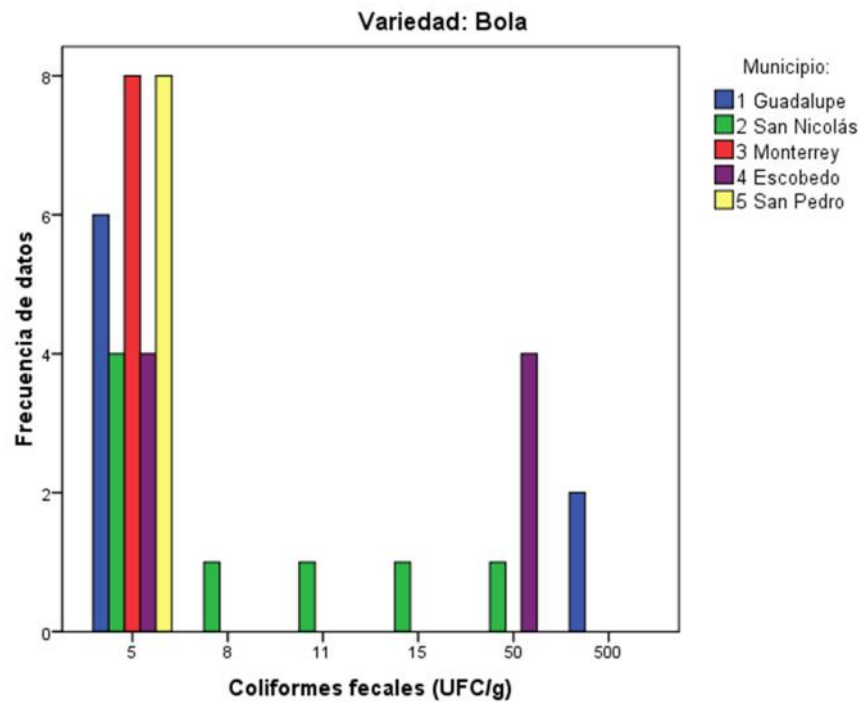


Figura 20. Cuenta de coliformes fecales (UFC/g) en muestras de tomate bola expendidos en el área metropolitana de Monterrey, N. L. ($P < 0.05$).

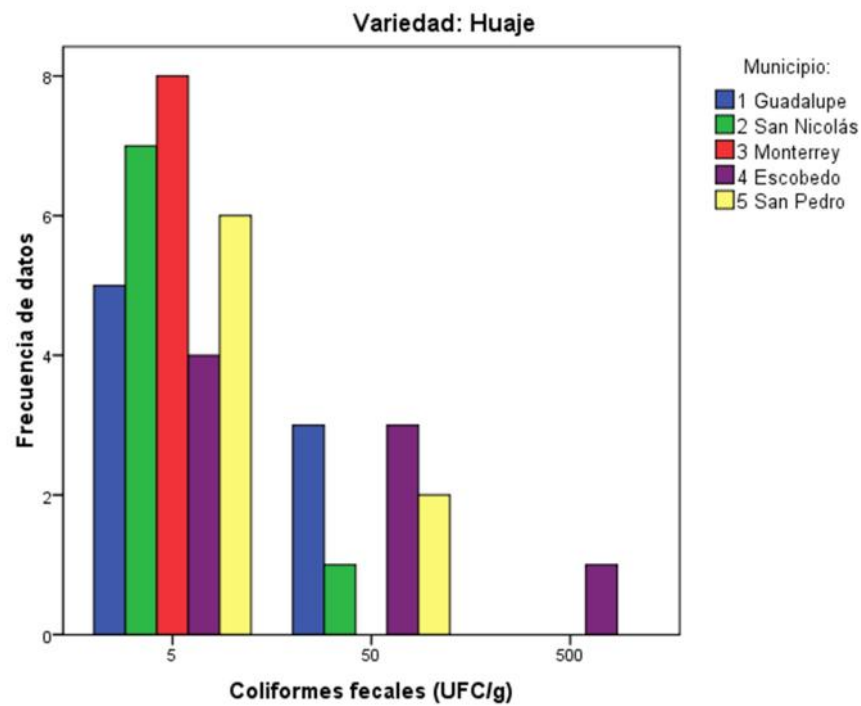


Figura 21. Cuenta de coliformes fecales (UFC/g) en muestras de tomate huaje expendidos en el área metropolitana de Monterrey, N. L. ($P < 0.05$).

7.2 MICROORGANISMOS PATÓGENOS

En el análisis de microorganismos patógenos, se aplicó la prueba no paramétrica de Cochran, siendo las variables: presencia o ausencia de *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7. Se encontró que sí hay diferencia significativa ($P < 0.05$) entre la presencia y ausencia de estos microorganismos patógenos de estudio. De las 80 muestras de tomate analizadas, sólo en una muestra de tomate bola se encontró presencia de *Salmonella* spp. (1.25%) la cual fue confirmada por la técnica de PCR mencionada previamente, esta muestra se obtuvo en un supermercado del municipio de Guadalupe. Ninguna de las muestras fue positiva para *E. coli* O157:H7.

PARTE 2: MICROORGANISMOS INDICADORES Y PATÓGENOS EN LA CADENA DE PRODUCCIÓN EN CAMPO DE TOMATE DE LA REGIÓN DE CADEREYTA JIMÉNEZ, NUEVO LEÓN, MÉXICO

En total se recolectaron y analizaron 136 muestras, distribuidas en 16 cadenas, durante el periodo de mayo a julio de 2011. De estas muestras, 16 fueron de suelo, 28 de agua, 54 de tomate rojo y 38 de manos de manipuladores de las huertas de estudio.

7.3 MICROORGANISMOS INDICADORES

7.3.1 *E. coli*

En el análisis de resultados de *E. coli* se realizó un ANOVA para comparar los diferentes tipos de muestra. Se analizaron 136 muestras y se encontró que existe alta diferencia significativa ($P < 0.01$) entre los tipos de muestra analizados.

Las cuentas de *E. coli* obtenidas son las siguientes: 40 UFC/g (suelo), 4.53 UFC/ml (producto de precosecha), 7.87 UFC/ml (manos durante la cosecha), 5.37 UFC/ml (producto de cosecha), 2.88 UFC/ml (producto de distribución), 2.83 UFC/ml (manos

durante distribución), 0.1047 UFC/ml (agua de fuente), 0.1354 UFC/ml (agua de sitio), 4.78 UFC/ml (producto de empaque) y 4.04 UFC/ml (manos durante el empaque) (Figura 22).

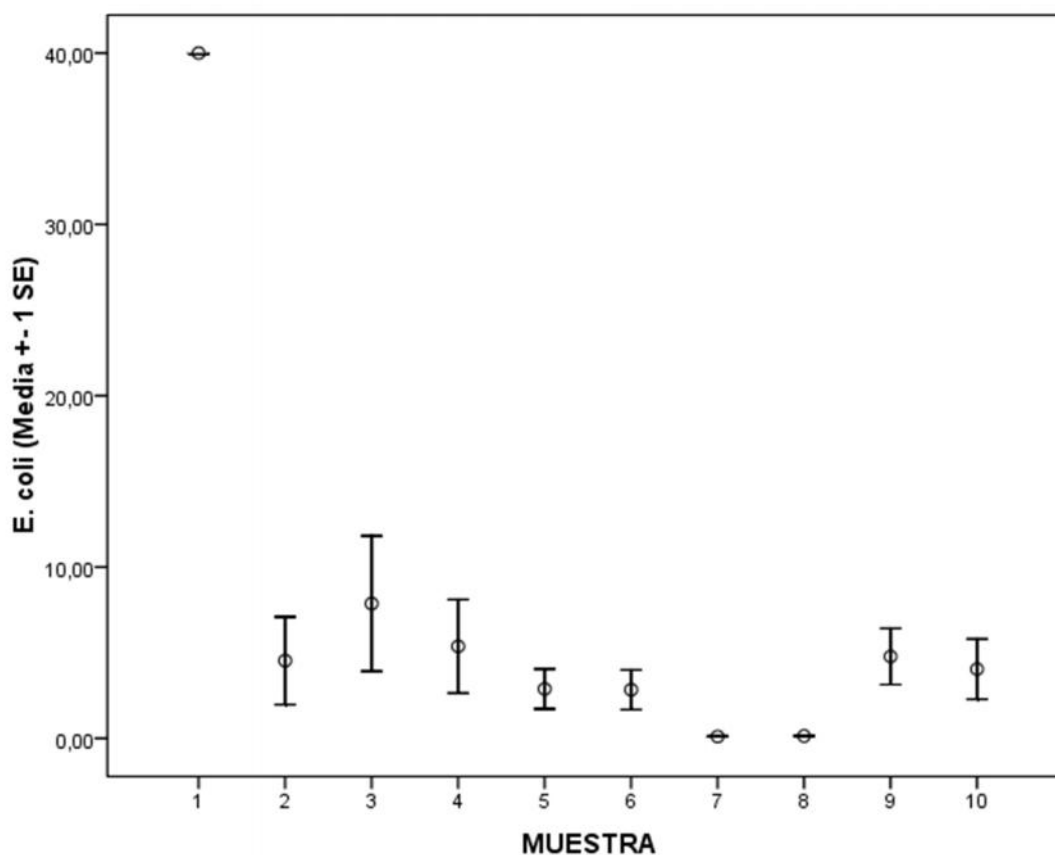


Figura 22. Cuentas de *E. coli* (UFC/ml para muestras líquidas, UFC/g para muestras de suelo) en huertas de Nuevo León ($P < 0.01$). Muestra: 1: suelo, 2: producto de precosecha, 3: manos durante la cosecha, 4: producto de cosecha, 5: producto de distribución, 6: manos durante distribución, 7: agua de fuente, 8: agua de sitio, 9: producto de empaque, 10: manos durante el empaque. SE: Error Estándar.

7.3.2 Coliformes totales

Las cuentas de coliformes totales se compararon entre los diferentes tipos de muestra mediante un ANOVA. Se analizaron 41 muestras y se compararon las medias de coliformes totales, encontrándose alta diferencia significativa ($P < 0.01$) entre ellas.

Las medias de las cuentas fueron las siguientes: 32008 UFC/g (suelo), 60 UFC/ml (producto de precosecha, manos durante la cosecha, producto de cosecha, producto de distribución y manos durante distribución), 11.34 UFC/ml (agua de fuente), 16.75 UFC/ml (agua de sitio), 2 UFC/ml (producto de empaque) y 30.05 UFC/ml (manos durante el empaque) (Figura 23).

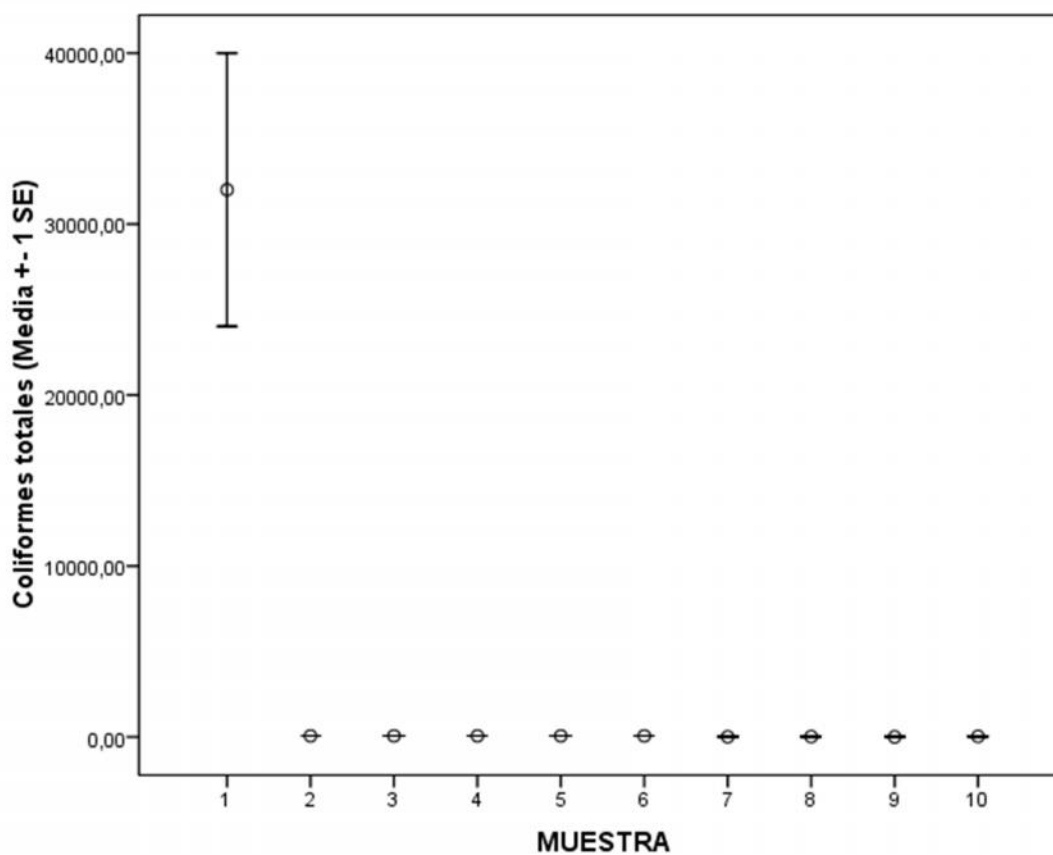


Figura 23. Cuentas de coliformes totales (UFC/ml para muestras líquidas, UFC/g para muestras de suelo) en huertas de Nuevo León ($P < 0.01$). Muestras: 1: suelo, 2: producto de precosecha, 3: manos durante la cosecha, 4: producto de cosecha, 5: producto de distribución, 6: manos durante distribución, 7: agua de fuente, 8: agua de sitio, 9: producto de empaque, 10: manos durante el empaque. SE: Error Estándar.

7.3.3 Coliformes fecales

En el ANOVA se compararon los resultados de coliformes fecales entre los tipos de muestra. Se examinaron 113 muestras y no se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$).

Los resultados de las cuentas de coliformes fecales son los siguientes: 1727.33 UFC/g (suelo), 2677.13 UFC/ml (producto de precosecha), 10160.27 UFC/ml (manos durante la cosecha), 2771.13 UFC/ml (producto durante la cosecha), 10692.60 UFC/ml (producto de distribución), 17871.60 UFC/ml (manos durante distribución), 38.40 UFC/ml (agua de fuente), 2.4 UFC/ml (agua de sitio), 73627.60 UFC/ml (producto en empaque), 332 UFC/ml (manos durante el empaque) (Figura 24).

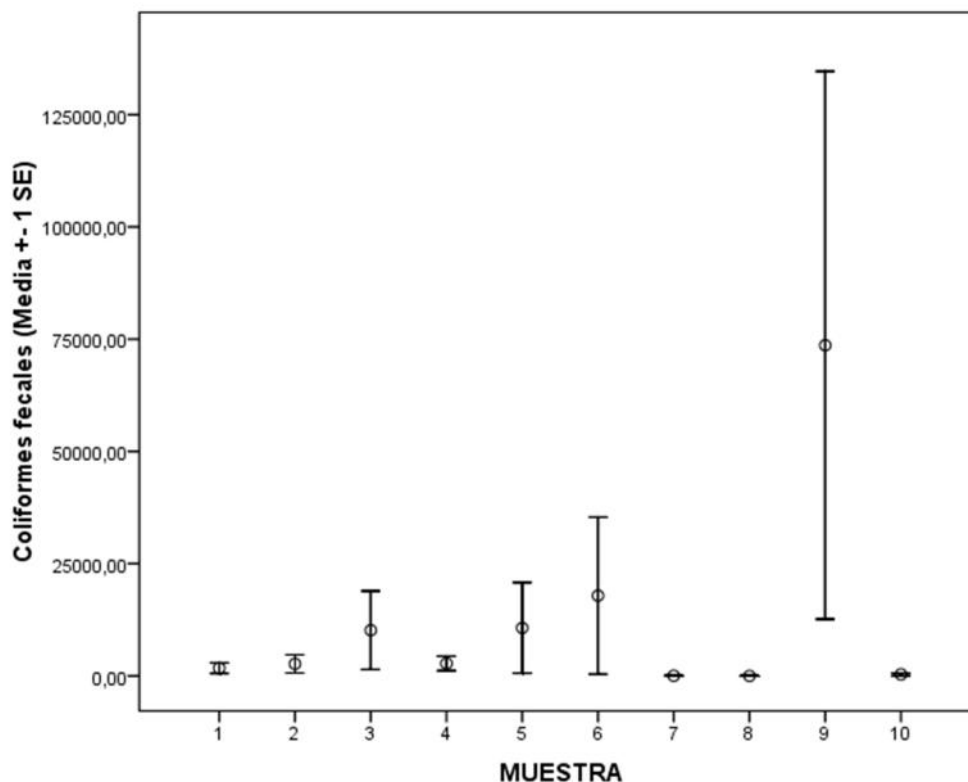


Figura 24. Cuentas de coliformes fecales (UFC/ml para muestras líquidas, UFC/g para muestras de suelo) en huertas de Nuevo León ($P > 0.05$). Muestras: 1: suelo, 2: producto de precosecha, 3: manos durante la cosecha, 4: producto de cosecha, 5: producto de distribución, 6: manos durante distribución, 7: agua de fuente, 8: agua de sitio, 9: producto de empaque, 10: manos durante el empaque. SE: Error Estándar.

7.3.4 Enterococos totales

En el análisis de resultados, también se realizó un ANOVA para comparar las cuentas de enterococos entre los tipos de muestra de estudio. Se examinaron 134 muestras y se encontró que existe alta diferencia significativa ($P < 0.01$) entre los diferentes tipos de muestra. Las cuentas de enterococos totales obtenidas son las siguientes: 73.75 UFC/g (suelo), 251.25 UFC/ml (producto de precosecha), 68139.67 UFC/ml (manos durante la cosecha), 10193.67 UFC/ml (producto de cosecha), 5157.53 UFC/ml (producto de distribución), 78949.80 UFC/ml (manos durante distribución), 403.68 UFC/ml (agua de fuente), 0.1908 UFC/ml (agua de sitio), 52.50 UFC/ml (producto de empaque) y 57293.75 UFC/ml (manos durante el empaque). Los resultados se muestran en la gráfica de la Figura 25.

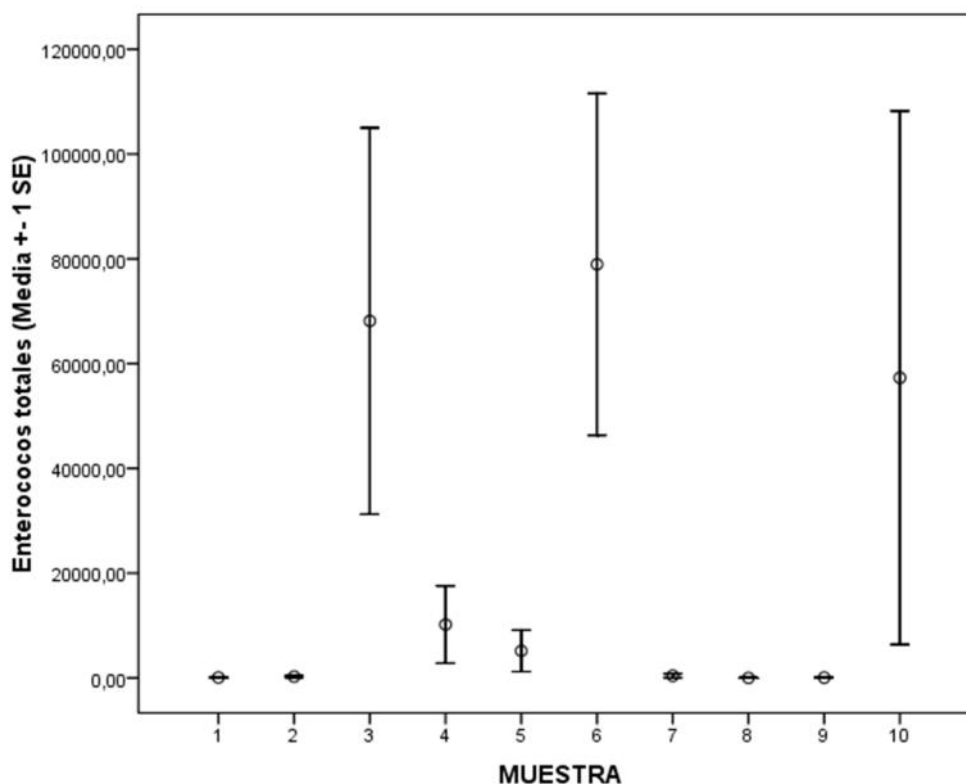


Figura 25. Cuentas de enterococos totales (UFC/ml para muestras líquidas, UFC/g para muestras de suelo) en huertas de Nuevo León ($P < 0.01$). Muestras: 1: suelo, 2: producto de precosecha, 3: manos durante la cosecha, 4: producto de cosecha, 5: producto de distribución, 6: manos durante distribución, 7: agua de fuente, 8: agua de sitio, 9: producto de empaque, 10: manos durante el empaque. SE: Error Estándar.

7.4 MICROORGANISMOS PATÓGENOS

Se examinaron 136 muestras y ninguna de ellas fue positiva para la presencia de *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7.

DISCUSIÓN

PARTE 1: MICROORGANISMOS INDICADORES Y PATÓGENOS EN TOMATE DE PUNTO DE VENTA DEL ÁREA METROPOLITANA DE MONTERREY, NUEVO LEÓN

8.1 MICROORGANISMOS INDICADORES

En los análisis realizados en las muestras de tomate, las cuentas de mesófilos aerobios fueron de 2.71 log UFC/g a 4.13 log UFC/g. También se compararon las cuentas de este indicador entre las dos variedades de tomate (bola y huaje) y se encontraron cuentas de 3.69 log UFC/g en el tomate huaje y 3.17 log UFC/g en el tomate bola.

Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Gómez (2009), quien reportó cuentas menores de 10^4 UFC/g de microorganismos indicadores (mesófilos aerobios y coliformes totales) en tomate.

Las cuentas de coliformes totales estuvieron en el rango de 2.19 \log_{10} UFC/g a 3.05 \log_{10} UFC/g. El tomate huaje presentó cuentas mayores (2.49 \log_{10} UFC/g) que el tomate bola (2.36 \log_{10} UFC/g), sin embargo no hubo diferencia significativa entre los resultados. Estos hallazgos también concuerdan con el estudio realizado por Gómez (2009), quien reportó cuentas menores de 10^4 UFC/g para coliformes totales en muestras de tomate.

En las cuentas de coliformes fecales se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los municipios de estudio para muestras provenientes de supermercados y muestras de tomate bola. El 78.6 % de las muestras de supermercados y el 71.1 % de las provenientes de mercados presentaron cuentas de 5 UFC/g, existiendo dependencia significativa entre los diferentes municipios sólo para las muestras de supermercado. El

75 % de las muestras de tomate bola y el mismo porcentaje de tomate huaje presentaron cuentas de 5 UFC/g, existiendo diferencia significativa entre los diferentes municipios sólo para la variedad bola. No hay estudios previos que comparen tipo de establecimiento y variedad de vegetal en el área metropolitana de Monterrey que permitan establecer un punto de referencia.

Los resultados obtenidos de mesófilos aerobios y coliformes fecales quedaron dentro de los límites que señala la NOM-093-SSA1-1994, que aunque ya no está en vigor, sirve para dar un parámetro numérico a la carga microbiana esperada en diferentes alimentos, y que establece el límite máximo permisible para ensaladas de vegetales crudos o de frutas en 150,000 UFC/g de mesófilos aerobios y 100 UFC/g o ml de coliformes fecales. Las Normas Oficiales Mexicanas no establecen parámetros de límites microbiológicos permisibles para frutas y hortalizas, sin embargo, la especificación sanitaria en la norma antes mencionada puede tomarse como referencia para comparar los resultados obtenidos en la presente investigación.

Las cuentas de microorganismos indicadores del tomate generalmente son más bajas que las encontradas en otros vegetales, como zanahoria, lechuga, perejil, cebolla cambray, melón, brócoli, entre otros. Incluso, en la presente investigación se encontraron diferencias significativas en las cuentas de mesófilos aerobios entre las dos variedades de tomate analizadas. Se cree que esto podría deberse a que la cantidad de microorganismos indicadores presentes depende, en parte, de las características físicas del vegetal, además de las condiciones de cultivo, la manipulación poscosecha y las condiciones de almacenamiento del producto (Beuchat and Ryu, 1997; Gómez, 2009). Así, la carga microbiana en un vegetal se correlaciona con la probabilidad de que los vegetales estén en contacto con la fuente de contaminación durante el cultivo: suelo, fertilizantes orgánicos y agua de irrigación (Brandl, 2006; Hamilton *et al.*, 2006; Heaton and Jones, 2008; Tyler and Triplett, 2008).

El tomate es una hortaliza con superficie lisa, esta característica morfológica puede ser un factor de importancia que influye en la menor carga de microorganismos

presentes en el producto. Padaga *et al.* (2000) demostraron que la estructura física del brócoli, al ser heterogénea, presenta variación en la cantidad de microorganismos presentes, siendo mayor la carga microbiana en las cabezas florales superficiales. Esto indica que la concentración de microorganismos en los vegetales puede depender de sus características físicas, entre otros factores.

Doyle and Erickson (2007) demostraron que la proximidad del fruto en la planta al suelo es un factor de contaminación del producto; los cultivos que se desarrollan en el suelo o muy cerca de este, son más propensos a contaminación que los que se desarrollan más alejados del suelo, como el tomate. Esto podría ser otra razón por la cual las cuentas de microorganismos indicadores en esta hortaliza son generalmente menores que los recuentos de otros vegetales.

Respecto a las diferencias encontradas entre las variedades del producto, el tomate bola y el tomate huaje son manipulados en condiciones de cultivo y comerciales similares (Sargent *et al.*, 2005), por lo que habría de hacerse una investigación más exhaustiva con mayor número de muestras y durante un periodo más largo para conocer los factores que influyen en la manifestación de estas diferencias, los cuales pueden ser muy variados, desde diferencias morfológicas y fisiológicas del fruto, los tiempos de maduración de cada variedad, la vida de anaquel, hasta diferencias geográficas del lugar de origen del producto.

En la presente investigación, se esperaba encontrar diferencia significativa en las cuentas de indicadores entre los tipos de establecimiento de estudio, con cuentas mayores de indicadores microbianos para las muestras de los mercados. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran lo contrario. Esto coincide con Gómez (2009) y contrasta con los hallazgos encontrados por Miranda *et al.* (2008) y por Falomir *et al.* (2010).

Miranda *et al.* (2008) observaron que la contaminación microbiana en los vegetales es mayor para las muestras de mercados que para las de supermercados.

Falomir *et al.* (2010) encontraron que los vegetales (incluyendo tomate bola y huaje) provenientes de supermercados estaban menos contaminados con bacterias coliformes (11 muestras de 30) en comparación con los vegetales de mercados (19 muestras de 30).

Dado que las cuentas de mesófilos y coliformes totales en ambos tipos de establecimiento no muestran diferencia significativa, la carga microbiana del producto pudiera indicar que se trata de contaminación adquirida en uno o más puntos de la cadena de producción, en el campo durante el cultivo y la cosecha, en la empacadora o el almacén (Beuchat and Ryu, 1997; USFDA-CFSAN, 1998; Johnston *et al.*, 2006; Ailes *et al.*, 2008; León *et al.*, 2009), y no tanto que la manipulación es inadecuada en uno u otro establecimiento; puesto que cada etapa de la cadena granja-mesa puede afectar la carga microbiana de los vegetales (Johnston *et al.*, 2005). Esto con base también en las observaciones realizadas durante el estudio en campo, donde la manipulación del producto es la misma independientemente del destino del vegetal (supermercado, mercados populares o exportación).

Los microorganismos indicadores pueden contaminar cultivos en el campo o en cualquier punto de la cadena granja-mesa. Sin tener en cuenta la fuente, la presencia de organismos indicadores en la superficie de frutas y hortalizas plantea la posibilidad de transmisión de patógenos por vegetales frescos. Aún si los vegetales no se consumen crudos, puede ocurrir contaminación cruzada al tener contacto con los productos contaminados y/o utensilios (Hirotsu, 2001).

8.2 MICROORGANISMOS PATÓGENOS

En la presente investigación se evaluó también la presencia de microorganismos patógenos. Se encontró presencia de *Salmonella* spp. en una muestra de Guadalupe, N. L. siendo la incidencia de este microorganismo del 1.25 %. No se detectó *E. coli* O157:H7 en ninguna de las muestras analizadas.

Estos hallazgos concuerdan, en parte, con los estudios de Gómez (2009), quien reporta presencia de *Salmonella* spp. en una muestra de perejil del municipio de Monterrey (incidencia de 0.3 %); en su investigación, no encontró a este patógeno en tomate y también reporta la ausencia de *E. coli* O157:H7 en frutas y hortalizas de estudio.

La ausencia de patógenos en el presente trabajo concuerda también con otras investigaciones, que se mencionan a continuación. Bohaychuk *et al.* (2009) no encontraron presencia de *Salmonella* spp. ni de *E. coli* O157:H7 en ninguna de las 120 muestras de tomate provenientes de mercados en Alberta, Canadá en el periodo de junio a octubre de 2007. También en Canadá, en Ontario, Arthur *et al.* (2007) analizaron muestras de vegetales frescos (tomate, lechuga, melón, cebollín, cebolla cambray, perejil y cilantro) de mercados y centros de distribución en el verano de 2004, encontrando que el 0.17 % de las muestras fueron positivas a la presencia de *Salmonella* spp.

Quiroz *et al.* (2009) no detectaron presencia de *Salmonella* spp. en ninguna de las 100 muestras de tomate de la Central de Abastos en la Ciudad de México.

Doyle and Erickson (2007) encontraron en su investigación que la incidencia de *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* en frutas y hortalizas frescos es variable, tanto en campo como en punto de venta. Establecen que, con excepción de tres estudios (Samadpour *et al.*, 2006; CDC, 2006; CDC, 2011), *E. coli* O157:H7 no se encontró en ninguna de las muestras. Por otra parte, la incidencia de *Salmonella* spp. va de 0 % a 35.7 % y esto probablemente refleja diferencias en la implementación de prácticas agrícolas e higiénicas en los lugares en los que se presentaron tales incidencias.

En Reino Unido, Sago *et al.* (2003) analizaron muestras de ensaladas listas para consumo que contenían tomate, lechuga, pepino, zanahoria, pimiento, berro, col, germinados y otros vegetales; no detectaron presencia de *Salmonella* spp. ni de *E. coli* O157:H7 en ninguna muestra.

Una investigación reciente en México que no coincide con los resultados del presente trabajo es la realizada por Miranda *et al.* (2009) quienes llevaron a cabo un estudio en el cual evaluaron 78 muestras de vegetales: tomate, chile, lechuga, espinaca, zanahoria y cebolla, colectados de supermercados y mercados populares en el estado de Hidalgo, México. Lograron aislar *Salmonella* spp. de 4 muestras adquiridas en supermercados y de 13 muestras de mercados populares, siendo la incidencia del patógeno de 21.8 %. Su estudio reveló que la prevalencia de *Salmonella* fue significativamente mayor en vegetales de mercados populares que en los de supermercados. Contrario al presente trabajo, donde no hubo diferencia significativa entre los dos tipos de establecimiento.

Las frutas y hortalizas frescas han estado implicadas en la transmisión de *E. coli* O157:H7 (Beuchat, 1996; CDC, 1997; Doyle *et al.*, 1997; Solomon *et al.*, 2002; Sivapalasingam *et al.*, 2004; CDC, 2006; Baert *et al.*, 2009; CDC, 2011). Sin embargo, también existen reportes de investigaciones realizadas en Estados Unidos y Europa en los que no se detectó presencia de *E. coli* O157:H7 en muestras de productos vegetales (Riordan *et al.*, 2001; McMahon and Wilson, 2001; Sagoo *et al.*, 2001; Johnston *et al.*, 2005; Mukherjee *et al.*, 2004, 2006) y que concuerdan con los resultados encontrados en la presente investigación.

Se ha señalado que la fecha de muestreo es un factor de importancia en la determinación de la cantidad y presencia de microorganismos patógenos. En invierno es menos probable que se detecten patógenos en comparación con primavera y/o verano, esta pudiera ser una razón de la baja incidencia de microorganismos patógenos de este trabajo, pues el muestreo y análisis se realizaron entre octubre de 2010 y enero de 2011; aunque en algunas de las referencias citadas se encontró incidencia baja de patógenos durante el verano (Arthur *et al.*, 2007; Bohaychuk *et al.*, 2009). También se deben considerar las diferencias climáticas geográficas de los lugares de muestreo, pues existen cambios de temperatura, presión, humedad, viento, etc. entre diferentes zonas geográficas que pudieran impactar en la presencia o ausencia de microorganismos indicadores y/o patógenos.

Dado que las cuentas de microorganismos indicadores están en el rango de lo permitido por la normativa correspondiente y la incidencia de microorganismos patógenos es baja en el tomate analizado, según los hallazgos del presente trabajo, se pudiera considerar que el procesamiento, manipulación y almacenaje del tomate en la cadena granja-mesa es adecuado. En punto de venta, el almacenamiento y la manipulación del producto son puntos clave para el aseguramiento de la calidad microbiológica del producto. Se ha reportado que existe un alto riesgo de contaminación de los productos vegetales durante su manejo y acopio (Ailes *et al.*, 2008). Incluso, el almacenamiento prolongado de frutas y hortalizas puede contribuir a un incremento de la carga microbiana presente (Odumeru *et al.*, 1997).

PARTE 2: MICROORGANISMOS INDICADORES Y PATÓGENOS EN LA CADENA DE PRODUCCIÓN EN CAMPO DE TOMATE DE LA REGIÓN DE CADEREYTA JIMÉNEZ, NUEVO LEÓN, MÉXICO

8.3 MICROORGANISMOS INDICADORES

En el análisis microbiológico se determinó la presencia de *E. coli* en suelo (40 UFC/g), principalmente. También se encontró este indicador en tomate (pre cosecha, cosecha, distribución y empaque), en manos (cosecha, distribución y empaque) y agua de irrigación, en rangos de 0.1047 UFC/ml a 7.87 UFC/ml; siendo las cuentas menores para el agua de irrigación y las mayores para las manos de los trabajadores de las huertas durante las labores de cosecha. Es importante mencionar que el producto en la planta (pre cosecha) y en el empaque presentaron cuentas muy similares (4.53 UFC/ml y 4.78 UFC/ml).

Los niveles de *E. coli* para tomate fueron de 4.53 UFC/ml (pre cosecha), 5.37 UFC/ml (cosecha), 2.88 UFC/ml (distribución) y 4.78 UFC/ml (empaque); esto equivale a 0.0839 UFC/tomate (pre cosecha), 0.0994 UFC/tomate (cosecha), 0.0533 UFC/tomate (distribución) y 0.0885 UFC/tomate (empaque). Las cuentas de *E. coli* en manos de

manipuladores fueron de 7.87 UFC/ml (cosecha), 2.83 UFC/ml (distribución) y 4.04 UFC/ml (empaque); equivalente a 1.31 UFC/mano (cosecha), 0.472 UFC/mano (distribución) y 0.673 UFC/mano (empaque).

Estos resultados obtenidos son similares a los detallados por Orozco *et al.* (2008), quien encontró cuentas de *E. coli* de < 2.8 NMP/g de suelo, < 0.5 NMP/tomate y < 28 NMP/mano (después de lavado) en un estudio que realizaron en huertas de tomate hidropónico.

Las cuentas de coliformes totales estuvieron en el rango de 2 UFC/ml (producto en empaque) a 32×10^3 UFC/g (suelo). El suelo presentó el mayor recuento de coliformes totales respecto a los demás tipos de muestra (diferencia altamente significativa, $P < 0.01$), cuyas cuentas no presentaron diferencia significativa entre sí. Cabe mencionar que el tomate en la planta (precosecha) y después de ser manipulado (cosecha y distribución) presentó cuentas de 60 UFC/ml; las manos de los trabajadores en etapas de cosecha y distribución presentaron el mismo recuento de coliformes totales.

Las cuentas de coliformes totales de suelo equivalen a 4.51 log UFC/g de suelo y las de tomate equivalen a 1.78 log UFC/ml, estas últimas corresponden por unidad a 0.0458 log UFC/tomate y son similares a lo reportado por Orozco *et al.* (2008) quienes determinaron cuentas de coliformes de < 0.5-3.9 log UFC/tomate y < 0.7-4.7 log UFC/g de suelo en un estudio realizado en huertas de tomate hidropónico.

En el análisis de coliformes fecales no se encontró diferencia significativa entre las 113 muestras analizadas. Los resultados de este indicador fueron menores en agua de sitio (2.4 UFC/ml) y mayores en las demás muestras con rango de 17×10^2 UFC/ml (suelo) a 74×10^3 UFC/ml (tomate en empaque).

En el análisis microbiológico de enterococos totales se encontró alta diferencia significativa entre las cuentas de los diferentes tipos de muestra de estudio. Las cuentas fueron de 0.1908 UFC/ml (agua de sitio) a 79×10^3 UFC/ml (manos durante operaciones

de distribución). Las manos de los trabajadores de las huertas presentaron cuentas elevadas (57×10^3 UFC/ml a 79×10^3 UFC/ml). En tanto que el tomate en etapa de precosecha y al final de su procesamiento, en el empaque, presentó cuentas de 251.25 UFC/ml y 52.50 UFC/ml, respectivamente; sin embargo, en la cosecha y distribución los niveles de enterococos en el producto fueron elevados (10×10^3 UFC/ml y 5×10^3 UFC/ml, respectivamente).

Los recuentos de enterococos en tomate equivalieron a 0.668 log UFC/tomate (precosecha), 2.27 log UFC/tomate (cosecha), 1.97 log UFC/tomate (distribución) y 0.972 UFC/tomate (empaque). Los niveles de enterococos en manos equivalen a 4.06 log UFC/mano (cosecha), 4.12 log UFC/mano (distribución) y 3.98 log UFC/mano (empaque). Estos resultados son similares a los de Orozco *et al.* (2008), quienes reportan niveles de *Enterobacteriaceae* de < 0.5 – 5.3 log UFC/tomate, < 0.7 – 6.9 log UFC/g de suelo y < 0.6 – 4.1 log UFC/mano (después de lavado).

Hallazgos similares reportaron Johnston *et al.* (2006) que en su investigación con productos vegetales en cultivos y empacadoras encontraron < 1 a 4.5 log UFC/g de coliformes, < 1 a 4.0 log UFC/g de *E. coli* y < 1 a 5.4 log UFC/g de *Enterococcus*. Además, Johnston *et al.* (2005) realizaron un estudio para caracterizar las rutas de contaminación microbiana en frutas y hortalizas e identificar áreas de contaminación potencial durante la manipulación en etapa de poscosecha (producción y empaque) y encontraron niveles de < 1 a 4.3 log UFC/g (coliformes y *Enterococcus*) y < 1 a 1.5 log UFC/g (*E. coli*).

Thapa *et al.* (2011) encontraron cuentas de 1 a 3 log UFC/g de coliformes totales y < 1 a 2 log UFC/g de *E. coli* en muestras vegetales y ambientales en empacadoras.

Las investigaciones citadas refieren a hallazgos similares a los del presente estudio. Es importante señalar que las cuentas de indicadores permanecen relativamente constantes durante todo el proceso de producción, desde su cultivo hasta el empaque. Asimismo todas las cuentas presentan niveles bajos. Las fuentes importantes de

contaminación son el suelo (*E. coli* y coliformes totales) y las manos de los manipuladores del producto (enterococos), lo que elevó los niveles de indicadores (*E. coli* y enterococos) en el producto durante la cosecha y distribución.

El suelo se ha reconocido como fuente de contaminación de frutas y hortalizas en etapa de precosecha al ser un importante reservorio de microorganismos, entre ellos algunos patógenos (Beuchat and Ryu, 1997; USFDA-CFSAN, 1998; Hirovani *et al.*, 2001; Steele and Odumeru, 2004; Beuchat, 2006; Delaquis *et al.*, 2007; Bhunia, 2008; Falomir *et al.*, 2010). Los patógenos bacterianos como *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7 (y otras *E. coli* patógenas) tienden a ser transmitidos predominantemente por desechos fecales animales, ya sea directa o indirectamente a través de agua o suelo contaminados con materia fecal (FDA, 2009; León *et al.*, 2009).

En el presente trabajo, el suelo fue una fuente de contaminación de tomate con *E. coli* y coliformes totales, indicadores de contaminación fecal y de condiciones sanitarias pobres y, por consiguiente, patogenicidad potencial (Hirovani *et al.*, 2001). Esto pudiera deberse a la proximidad de vida silvestre (aves, mamíferos, reptiles) y acceso de animales domésticos (perros, gatos, caballos, etc.) a los cultivos, lo cual se observó durante los muestreos. Se ha establecido que los animales son un vehículo de contaminación de frutas y hortalizas, reduciendo en gran medida la calidad y vida útil de los vegetales frescos (Bihn *et al.*, s.f.; Clayton, 2006), esto por los microorganismos patógenos de sus heces o de su piel, pelo o escamas (Beuchat and Ryu, 1997).

La contaminación de vegetales con microorganismos presentes en el suelo puede ocurrir cuando se presenta lluvia intensa o mediante el agua de riego, al salpicar agua y de esta manera llegar al producto (Heaton and Jones, 2008). Además, los contaminantes también pueden introducirse en el suelo si este se utilizó previamente para producción animal o si se aplicaron biosólidos, estiércol o residuos de animales como fertilizante. Una vez introducidos, es imposible remover completamente bacterias, parásitos y virus del estiércol. La solución consiste en la aplicación de tratamientos que pueden ser

activos (pasteurización, entre otros) o pasivos (paso del tiempo) (Bihn and Gravani, 2005).

Otra fuente de contaminación del tomate fueron las manos de los manipuladores, donde se detectaron *E. coli*, coliformes totales y fecales y enterococos, principalmente. Las manos han sido reconocidas como una fuente de contaminación en los alimentos y se ha mostrado que el lavado de manos es un método preventivo efectivo (Orozco *et al.*, 2008). La mayoría de los trabajadores de las huertas de estudio vivían en áreas rurales y tenían contacto cercano con animales domésticos.

Los trabajadores pueden presentar algunos problemas importantes de higiene que pueden incluir: manos contaminadas, ropa y/o cabello sucio, heridas abiertas y/o infecciones en las manos, enfermedad gastrointestinal o ser acarreador asintomático de patógenos entéricos, acceso limitado o nulo a letrinas y defecación en cultivos (Johnston *et al.*, 2005; Greig *et al.*, 2007; Bhunia, 2008). Asimismo, se han reportado brotes en donde estuvieron implicados trabajadores en contacto con alimentos (Bryan, 1978; USFDA, 2000) y se han encontrado niveles elevados de indicadores en las manos de los trabajadores (Clayton, 2006).

Actualmente, existe gran preocupación respecto a la seguridad alimentaria de los productos del campo, debido a que se han visto involucrados en brotes de ETAs. Por ello, es importante cumplir adecuadamente con las BPA y las BPF, según lo marca la guía “Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards for Fresh Fruits and Vegetables” (JIFSAN, 2002; Johnston *et al.*, 2005, 2006; Materon *et al.*, 2007) para los productores de frutas y hortalizas frescas nacionales y extranjeros con la finalidad de contribuir a garantizar la seguridad e inocuidad de sus productos.

Las prácticas de la huerta, en lo referente a la higiene del trabajador, son importantes para prevenir la contaminación del producto. Estas prácticas incluyen los programas de capacitación de los trabajadores en aspectos de higiene personal como lavado correcto de manos antes de entrar en contacto con los cultivos, uso de guantes y/o cofia, uso de

letrinas, etc. Estas prácticas forman parte del control de calidad de la huerta y se mencionan en la guía de la FDA (Greig *et al.*, 2007).

8.4 MICROORGANISMOS PATÓGENOS

Se analizaron 136 muestras y en ninguna se detectó la presencia de *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7. Estos hallazgos concuerdan con los reportados por Johnston *et al.* (2006), quienes no detectaron presencia de *Salmonella* spp., *Shigella* spp. ni *E. coli* O157:H7 en ninguna de las 466 muestras analizadas y con los reportados por Thapa *et al.* (2011) que colectaron muestras de vegetales y no detectaron *E. coli* patógena ni *Salmonella* spp. Mukherjee *et al.* (2004) no detectaron presencia de *E. coli* O157:H7 en ninguna de las 476 muestras analizadas de diferentes cultivos orgánicos y convencionales de tomate, lechuga, pimiento verdem repollo, pepino, fresa y manzana, entre otros. Asimismo, los resultados muestran similitud con los de Johnston *et al.* (2005), ellos determinaron la prevalencia de patógenos en etapa de poscosecha durante el procesamiento de frutas y hortalizas frescas, que fue de 0 % y 0.7 % para *E. coli* O157:H7 y *Salmonella*, respectivamente.

Por el contrario, algunos autores han reportado presencia de microorganismos patógenos en muestras de frutas y hortalizas frescas. Orozco *et al.* (2008a) realizaron un estudio con el objetivo de identificar las fuentes de contaminación de tomate por *Salmonella*. Se detectó la presencia de *Salmonella* y *E. coli* en muestras de tomate, charcos de agua, suelo, zapatos y heces de animales domésticos y silvestres. En otro trabajo, Orozco *et al.* (2008b) encontraron que 2.8 % de las muestras de tomate estaban contaminadas con *Salmonella* spp. y 0.7 % con *E. coli*. Otras muestras que resultaron positivas a la presencia de *Salmonella* fueron: charcos, suelo, paños de limpieza y esponjas. Castillo *et al.* (2004) investigaron huertas de melón y plantas empacadoras encontrando que el 1.8% de las muestras fueron positivas para *Salmonella* spp.

La ausencia de *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7 en este estudio indica que el suelo, las manos de los trabajadores en campo y en las empacadoras y el agua de irrigación no

contribuyen como fuentes de contaminación del tomate producido en las huertas de Nuevo León analizadas. Es importante recalcar que estas huertas distribuyen el producto localmente y también lo exportan a otros países por lo que cumplen con las BPA y BPF, incluyendo el lavado de manos e instalaciones sanitarias para los trabajadores, los resultados son muestra de ello.

Otra causa de la ausencia de patógenos en este trabajo sería que el muestreo se realizó en un periodo corto de tiempo (meses), a diferencia de otros autores (Johnston *et al.*, 2005, 2006; Orozco *et al.*, 2008) que utilizaron una metodología similar en un periodo mayor de tiempo y detectaron presencia de patógenos. Es necesario realizar un estudio por un tiempo mayor en diferentes estaciones del año para tener una mayor certeza de la incidencia de *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7 en las huertas de Nuevo León.

CONCLUSIONES

Los microorganismos indicadores presentes en tomate bola y tomate huaje en punto de venta del área metropolitana de Monterrey, N. L. estaban en números dentro de los límites establecidos por las Normas Oficiales Mexicanas.

Se encontró presencia de *Salmonella* spp. en una muestra (1.25 %) de tomate bola proveniente de un supermercado del municipio de Guadalupe, N. L.

Se encontró ausencia de *E. coli* y de *E. coli* O157:H7 en tomate bola y tomate huaje.

Las cuentas de *E. coli* fueron de 2.88 a 5.37 UFC/ml (tomate), 40 UFC/g (suelo), 0.1047 a 0.1354 UFC/ml (agua de irrigación) y 2.83 a 7.87 UFC/ml (manos). El suelo es la principal fuente de contaminación de este microorganismo.

Las cuentas de coliformes totales fueron de 2 a 60 UFC/ml (tomate), 32×10^3 UFC/g (suelo), 11.34 a 16.75 UFC/ml (agua de irrigación) y 30 a 60 UFC/ml (manos). El suelo es la fuente principal de contaminación con coliformes totales.

Las cuentas de coliformes fecales fueron de 3×10^3 a 74×10^3 UFC/ml (tomate), 17×10^2 UFC/g (suelo), 2.4 a 38.40 UFC/ml (agua de irrigación) y 332 a 18×10^3 UFC/ml (manos). No hay diferencia significativa entre las muestras.

Las cuentas de enterococos totales fueron de 52.5 a 10×10^3 UFC/ml (tomate), 73.75 UFC/g (suelo), 0.1908 a 403.68 UFC/ml (agua de irrigación) y 57×10^3 a 79×10^3 UFC/ml (manos). Las manos de los manipuladores son la fuente principal de contaminación con *Enterococcus* spp.

Se determinó ausencia de *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7 en tomate, suelo, agua de irrigación y manos de los manipuladores del producto.

Las fuentes de contaminación de tomate son: el suelo durante la precosecha, como fuente de *E. coli* y coliformes totales; las manos de los trabajadores como fuente de *Enterococcus* spp. durante las etapas de cosecha y poscosecha (distribución y empaque) de la producción del tomate en huertas de Nuevo León, México.

Se acepta la hipótesis nula planteada, el tomate que se produce en el estado de Nuevo León está contaminado con microorganismos indicadores fecales, aunque en niveles bajos, y está ausente de los patógenos *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7. Los microorganismos indicadores presentes en el tomate, específicamente *E. coli* y *Enterococcus* spp., están asociados con los encontrados en suelo y en manos de manipuladores.

LITERATURA CITADA

Adams MR, Moss MO. 1995. Food Microbiology. Cambridge: United Kingdom, pp. 216-223.

Agros, 2011. *Importancia del tomate* [internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.agros.com.mx/consumers.aspx?language=es-MX> [Revisado el 20 de septiembre de 2011].

Ailes EC, León JS, Jaykus L, Johnston LM, Clayton HA, Blanding S, Kleinbaum DG, Backer LC, Moe CL. 2008. Microbial concentrations on fresh produce are affected by post-harvest processing, importation, and season. *Journal of Food Protection* 71:2389-2397.

Armstrong GL, Hollingsworth J, Morris JG. 1996. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. *Epidemiologic Reviews* 18:29-51.

Avendaño B, Schwentesius R, Lugo S. 2002. Inocuidad en hortalizas ¿Beneficio para el consumidor o nueva barrera al comercio? Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial (CIESTAAM). Universidad Autónoma de Chapingo, México, pp. 26.

Avery SM, Moore A, Hutchison ML. 2004. Fate of *Escherichia coli* originating from livestock faeces deposited directly onto pasture. *Letters in Applied Microbiology* 38:355-359.

Baert L, Vandekinderen I, Devlieghere F, Coillie EV, Debevere J, Uyttendaele M. 2009. Efficacy of sodium hypochlorite and peroxyacetic acid to reduce murine norovirus 1,

B40-8, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 on shredded iceberg lettuce and in residual wash water. *Journal of Food Protection* 72:1047-1054.

Bassett J, McClure P. 2008. A risk assessment approach for fresh fruits. *Journal of Applied Microbiology*. 104:925-943.

Bernstein N, Sela S, Neder-Lavon S. 2007a. Assessment of contamination potential of lettuce by *Salmonella enterica* serovar Newport added to the plant growing medium. *Journal of Food Protection* 70:1717-1722.

Bernstein N, Sela S, Pinto R, Ioffe M. 2007b. Evidence for internalization of *Escherichia coli* into the aerial parts of maize via the root system. *Journal of Food Protection* 70:471-475.

Betts GD. 2000. Controlling *E. coli* O157. *Nutrition and Food Science* 30:183-186.

Beuchat LR. 1995. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *Journal of Food Protection* 59:204-216.

Beuchat, LR. 1996. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *Journal of Food Protection* 59:204-216.

Beuchat LR. 2006. Vectors and conditions for preharvest contamination of fruits and vegetables with pathogens capable of causing enteric diseases. *British Food Journal* 108:38-53.

Beuchat LR, Ryu JH. 1997. Produce handling and processing. *Emerging Infectious Diseases* 3:459-465.

Bhagwat A. 2005. Microbiological safety of fresh cut produce: Where are we now? In: *Microbiology of Fresh Produce: Emerging Issues in Food Safety*, Matthews KR (ed). ASM Press: Washington, DC, pp. 121-165.

Bhunia AK. 2008. Introduction to Foodborne Pathogens. In: *Foodborne Microbial Pathogens*, Bhunia AK. Springer: New York, pp. 1-16.

Bihn EA, Gravani RB. 2005. Good agricultural practices in produce safety. In: *Microbiology of fresh produce: Emerging issues in food safety*, Matthews KR (ed). ASM Press: Washington, DC, pp. 21-53.

Bihn EA, Rangarajan A, Suslow TV, Gravani RB, Pritts MP, Worobo R. *Good Agricultural Practices an overview for growers and packers* [internet]. USA. Disponible en el sitio de red: http://www.gaps.cornell.edu/Educationalmaterials/GAPsCDPPTS/GAPs_An_overview_for_growers_and_packers.pdf [Revisado el 17 de mayo de 2012].

Bohaychuk VM, Bradbury RW, Dimock R, Fehr M, Gensler GE, King RK, Rieve R, Romero P. 2009. A microbiological survey of selected Alberta-grown fresh produce from farmers' markets in Alberta, Canada. *Journal of Food Protection* 72:415-420.

Brandl MT. 2006. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annual Review of Phytopathology* 44:367-392.

Bryan F. 1978. Factors that contribute to outbreaks of foodborne disease. *Journal of Food Protection* 10:816-827.

Castillo A, Mercado I, Lucia LM, Martínez-Ruiz Y, Ponce J, Murano EA, Acuff GR. 2004. *Salmonella* contamination during production of cantaloupe: a binational study. *Journal of Food Protection* 67:713-720.

Castro J, Rojas M, Noguera Y, Santos EM, Zúñiga A, Gómez CA. 2006. Calidad sanitaria de ensaladas de verduras crudas, listas para su consumo. *Industria Alimentaria* 9-21.

CDC. 1997. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating alfalfa sprouts—Michigan and Virginia, June-July 1997. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 46:741-744.

CDC. 2006. *Salmonellosis - Outbreak investigation, October 2006* [internet]. Disponible en el sitio de red: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonellosis_2006/110306_outbreak_notice.htm [Revisado el 27 de marzo de 2012].

CDC. 2006. *Update on multi-state outbreak of E. coli O157:H7 infections from fresh spinach, October 6, 2006* [internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.cdc.gov/foodborne/ecolispinach/100606.htm> [Revisado el 27 de marzo de 2012].

CDC. 2007. Multistate outbreaks of *Salmonella* infections associated with raw tomatoes eaten in restaurants—United States, 2005-2006. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 56:909-911.

CDC. 2007. *Salmonella Wandsworth outbreak investigation, June - July 2007* [internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.cdc.gov/salmonella/wandsworth.htm> [Revisado el 27 de marzo de 2012].

CDC. 2008. *FoodNet surveillance report for 2005* [internet]. Disponible en el sitio de red: http://www.cdc.gov/foodnet/annual/2005/2005_AR_Report.pdf [Revisado el 27 de marzo de 2012].

CDC. 2008. *Investigation of outbreak of infections caused by Salmonella Litchfield* [internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.cdc.gov/salmonella/litchfield/> [Revisado el 27 de marzo de 2012].

CDC. 2008. *Investigation of outbreak of infections caused by Salmonella Saintpaul* [internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.cdc.gov/salmonella/saintpaul/jalapeno/index.html> [Revisado el 27 de marzo de 2012].

CDC. 2008. Outbreak of *Salmonella* serotype Saintpaul infections associated with multiple raw produce items — United States, 2008. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 57(34):929-934.

CDC. 2009. *Investigation of an outbreak of Salmonella Saintpaul infections linked to raw alfalfa sprouts* [internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.cdc.gov/salmonella/saintpaul/alfalfa/> [Revisado el 27 de marzo de 2012].

CDC. 2010. *Investigation update: Multistate outbreak of human Salmonella Newport infections linked to raw alfalfa sprouts* [internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.cdc.gov/salmonella/newport/index.html> [Revisado el 27 de marzo de 2012].

CDC. 2011. *CDC Estimates of foodborne illness in the United States. CDC 2011 Estimates: Findings* [internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html> [Revisado el 13 de junio de 2012].

CDC. 2011. *Investigation announcement: Multistate outbreak of E. coli O157:H7 infections linked to romaine lettuce* [internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.cdc.gov/ecoli/2011/ecoliO157/romainelettuce/120711/index.html> [Revisado el 27 de marzo de 2012].

CDC. 2011. *Investigation update: Multistate outbreak of human Salmonella Agona infections linked to whole, fresh imported papayas* [internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.cdc.gov/salmonella/agona-papayas/082911/index.html> [Revisado el 27 de marzo de 2012].

CDC. 2011. *Investigation update: Multistate outbreak of Salmonella Panama infections linked to cantaloupe* [internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.cdc.gov/salmonella/panama0311/062311/index.html> [Revisado el 27 de marzo de 2012].

Clavijo RI, Loui C, Andersen GL, Riley LW, Lu S. 2006. Identification of genes associated with survival of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in chicken egg albumen. *Applied and Environmental Microbiology* 72:1055–1064.

Clayton, H, 2006. *An epidemiologic study to describe the relationship between farming practices and microbial indicator concentrations on produce from farms in the southern United States*. Thesis (M.P.H.). Emory University.

Cooley MB, Miller WG, Mandrell RE. 2003. Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and competition by *Enterobacter asburiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 69:4915-4926.

Corpeño B. 2004. Manual del cultivo de tomate. Centro de Inversión, Desarrollo y Exportación de Agronegocios (IDEA): San Salvador, El Salvador, pp. 1-6.

D'Aoust JY. 2001. *Salmonella*. In: Guide to Foodborne Pathogens, Labbé RG and García S (eds.). Wiley: New York, pp. 163–192.

Deisingh AK, Thompson M. 2004. Strategies for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. *Journal of Applied Microbiology* 96:419-429.

Delaquis P, Bach S and Dinu LD. 2007. Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 in leafy vegetables. *Journal of Food Protection* 70:1966-1974.

De León VM. 2007. Boletín de la OEIDRUS (Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable). Avances estadísticos del sector rural de Tamaulipas. Gobierno de Tamaulipas. SAGARPA 1:1-14.

Dong Y, Iniguez AL, Ahmer BMM, Triplett EW. 2003a. Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago truncatula*. *Applied and Environmental Microbiology* 69:1783-1790.

Dong Y, Iniguez AL, Triplett EW. 2003b. Quantitative assessments of the host range and strain specificity of endophytic colonization by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Plant and Soil* 257:49-59.

Doyle MP, Erickson MC. 2007. Summer meeting 2007 – the problems with fresh produce: an overview. *Journal of Applied Microbiology* 105:317-330.

Doyle MP, Zhao T, Meng J, Zhao S. 1997. *E. coli* O157:H7. In: *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*, Doyle MP, Beuchat LR and Montville TJ (eds). American Society of Microbiology Press: Washington DC, pp. 171-191.

EFSA (European Food Safety Authority). 2011. Urgent advice on the public health risk of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* in fresh vegetables. *EFSA Journal* 2011 9:1-50.

Falomir MP, Gozalbo D, Rico H. 2010. Coliform bacteria in fresh vegetables: from cultivated lands to consumers. In: *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, Méndez A (ed). Formatex: Spain, pp. 1175-1181.

FDA (Food and Drug Administration). 1992. Bacteriological Analytical Manual (BAM). FDA: USA.

FDA. 1998. *Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A* [internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm> [Revisado el 15 de marzo de 2012].

FDA, 2009. *Bad Bug Book: Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook* Salmonella spp. [internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm069966.htm> [Revisado el 15 de marzo de 2012].

Feng P, Weagant S. 2002. Diarrheagenic *Escherichia coli*. In: *Bacteriological Analytical Manual* [internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.cfsan.fda.gov/ebam/bam-toc.html> [Revisado el 12 de marzo de 2012].

Fluckey WM, Loneragan GH, Warner RD, Echeverry A, Brashears MM. 2009. Diversity and susceptibility of *Enterococcus* isolated from cattle before and after harvest. *Journal of food Protection* 72:766-774

Francis GA, Thomas C, O'Beirne D. 1999. The microbiological safety of minimally processed vegetables. *International Journal of Food Science and Technology* 34:1-22.

Franz E, Visser AA, Van Diepeningen AD, Klerks MM, Termorshuizen AJ, van Bruggen AHC. 2007. Quantification of contamination of lettuce by GFP-expressing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Food Microbiology* 24:106-112.

Gagliardi JV, Karns JS. 2002. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on plant roots. *Environmental Microbiology* 4:89-96.

García S, Heredia N. 2009. Foodborne pathogens and toxins: an overview. In: *Microbiologically safe foods*, Heredia N, Wesley I, García S. John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey, USA, pp. 15-52.

Gobierno de Nuevo León, 2005. *Enciclopedia de los municipios de México Estado de Nuevo León Cadereyta Jiménez* [internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.e-local.gob.mx/work/templates/enciclo/nuevoleon/municipios/19009a.htm> [Revisado el 22 de mayo de 2012].

Gobierno de Nuevo León. 2010. *Portal del Gobierno del Estado de Nuevo León, México* [internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.nl.gob.mx/> [Revisado el 31 de enero de 2010].

Gómez, MA, 2009. *Evaluación microbiológica de frutas y hortalizas expendidos en la zona metropolitana de Monterrey, N. L., mediante tecnologías rápidas*. Tesis (M.C.). Universidad Autónoma de Nuevo León.

Greenberg AE. 1992. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. USA, pp. 9-1-9-147.

Greig JD, Todd ECD, Bartleson CA, Michaels BS. 2007. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 1. Description of the problem, methods, and agents involved. *Journal of Food Protection* 70:1752-1761.

Griffin PM. 1995. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: *Infections of the gastrointestinal tract*, Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, et al. (eds.) Raven Press: New York, NY, pp. 739-761.

Griffin PM, Tauxe RV. 1991. The epidemiology of infections caused by *E. coli* O157:H7, other enterohaemorrhagic *E. coli*, and the associated haemolytic syndrome. *Epidemiological Reviews* 13:60-98.

Guo X, van Iersel MW, Chen J, Brackett RE, Beuchat LR. 2002. Evidence of association of salmonellae with tomato plants grown hydroponically in inoculated nutrient solution. *Applied and Environmental Microbiology* 68:3639-3643.

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. *Applied and Environmental Microbiology* 72:3284-3290.

Heaton JC, Jones K. 2008. Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *Journal of Applied Microbiology* 104:613-626.

Hedberg CW. 2006. Epidemiology of Viral Food-borne Outbreaks. In: *Viruses in Foods*, Goyal SM. Springer: US, pp. 239-255.

Hernández F, Monge R, Jiménez C, Taylor L. 1997. Rotavirus and hepatitis A virus in market lettuce (*Latuca sativa*) in Costa Rica. *International Journal of Food Microbiology* 37:221-223.

Hirovani H, Naranjo J, Moroyoqui PG, Gerba CP. 2001. Demonstration of indicator microorganisms on surface of vegetables on the market in the United States and Mexico. *Journal of Food Science* 67:1847-1850.

Hadjok C, Mittal GS, Warriner K. 2008. Inactivation of human pathogens and spoilage bacteria on the surface and internalized within fresh produce by using a combination of ultraviolet light and hydrogen peroxide. *Journal of Applied Microbiology* 104:1014-1024.

Infoagro Systems, S. L., 2003. *El cultivo del tomate* [internet]. InfoAgro.com. Disponible en el sitio de red: <http://infoagro.com/hortalizas/tomate.htm> [Revisado el 1 de agosto de 2011].

Ingham SC, Fanslau MA, Engel RA, Breuer JR, Breuer JE, Wright TH, Reith-Rozelle JK, Zhu J. 2005. Evaluation of fertilization-to-planting and fertilization-to-harvest intervals for safe use of noncomposted bovine manure in Wisconsin vegetable production. *Journal of Food Protection* 68:1134-1142.

Islam M, Doyle MP, Phatak SC, Millner P, Jiang X. 2004. Persistence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on leaf lettuce and parsley grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Journal of Food Protection* 67:1365-1370.

Izumi H, Poubol J, Hisa K, Sera K. 2008. Potential sources of microbial contamination of satsuma mandarin fruit in Japan, from production through packing shed. *Journal of Food Protection* 71:530-538.

Jablasone J, Warriner K, Griffiths M. 2005. Interactions of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* plants cultivated in a gnotobiotic system. *International Journal of Food Microbiology* 99:7-18.

Jaramillo J, Rodríguez VP, Guzmán M, Zapata M, Rengifo T. 2007. Manual técnico: Buenas Prácticas Agrícolas en la producción de tomate bajo condiciones protegidas. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO: Colombia, pp. 13-281.

JIFSAN (Joint Institute for Food Safety and Applied Nutrition). 2002. Mejorando la seguridad y calidad de frutas y hortalizas frescas: Manual de formación para instructores. University of Maryland: Maryland, USA, pp. 1-350.

Johnston LM, Jaykus LA, Moll D, Anciso J, Mora B, Moe CL. 2006. A field study of the microbiological quality of fresh produce of domestic and Mexican origin. *International Journal of Food Microbiology* 112:83-95.

Johnston LM, Jaykus LA, Moll D, Martínez MC, Anciso J, Mora B, Moe CL. 2005. A field study of the microbiological quality of fresh produce. *Journal of Food Protection* 68:1840-1847.

Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim C. 1983. Sporadic cases of haemolytic uremic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *E. coli*. *Lancet* 1:619-620.

Kaspar C, Doyle ME and Archer J. 2009. FRI Food Safety Review: non-O157:H7 Shiga toxin-producing *E. coli* from meat and non-meat sources. Food Research Institute, University of Wisconsin-Madison Dec. 2009/April 2010:1-26.

Kirkland E, Green LR, Stone C, Reimann D, Nicholas D, Mason R, Frick R, Coleman S, Bushnell L, Blade H, Radke V, Selman C, The EHS-NET Working Group. 2009. Tomato handling practices in restaurants. *Journal of food Protection* 72:1692-1698.

Kutter S, Hartmann A, Schmid M. 2006. Colonization of barley (*Hordeum vulgare*) with *Salmonella enterica* and *Listeria* spp. *FEMS Microbiology Ecology* 56:262-271.

León JS, Jaykus LA, Moe CL. 2009. Food safety issues and the microbiology of fruits and vegetables. In: *Microbiologically safe foods*, Heredia N, Wesley I, García S. John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey, USA, pp. 255-290.

Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2004. *Brock Biología de los microorganismos*. Pearson-Prentice Hall. USA, pp. 951.

Martin ML, Shipman LD, Wells JG, Potter ME, Hedberg K, Wachsmuth IK, Tauxe RV, Davis JP, Arnoldi J, Tilleli J. 1986. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy cattle associated with two cases of hemolytic uremic syndrome. *Lancet* 2:1043.

Materon LA, Martinez M, McDonald V. 2007. Identification of sources of microbial pathogens on cantaloupe rinds from pre-harvest to post-harvest operations. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23:1281–1287.

McMahon MAS, Wilson IG. 2001. The occurrence of enteric pathogens and *Aeromonas* species in organic vegetables. *International Journal of Food Microbiology* 70:155-162.

Méndez RA. 2004. Desarrollo y validación de una prueba de fácil aplicación para determinación de Enterococos en agua de consumo humano. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala: Guatemala, pp. 71.

Miles JM, Sumner SS, Boyer RR, Williams RC, Latimer JG, McKinney JM. 2009. Internalization of *Salmonella enterica* serovar Montevideo into greenhouse tomato plants through contaminated irrigation water or seed stock. *Journal of Food Protection* 72:849-852.

Miranda JM, Mondragón AC, Martínez B, Guarddon M, Rodríguez JA. 2009. Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* from different raw foods in Mexico. *Journal of Food Protection* 72:966-971.

Mukherjee A, Speh D, Dyck E, Diez F. 2004. Preharvest evaluation of coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157:H7 in organic and conventional produce grown by Minnesota Farmers. *Journal of Food Protection* 67:894-900.

Mukherjee A, Speh D, Jones AT, Buesing KM, Diez F. 2006. Longitudinal microbiological survey of fresh produce grown by farmers in the upper Midwest. *Journal of Food Protection* 69:1928-1936.

Muniesa M, Jofre J, García-Aljaro C, Blanch AR. 2006. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the environment. *Environmental Science and Technology* 40: 7141-7149.

Nataro JP, Kaper JB. 1998. Diarrhoeagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 11:142-201.

Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994, Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos.

Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.

Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos.

Odumeru JA, Mitchell SJ, Alves DM, Lynch JA, Yee AJ, Wang SL, Styliadis S, Farber JM. 1997. Assessment of the microbiological quality of ready-to-use vegetables for health-care food services. *Journal of Food Protection* 60:954-960.

Økland M, Reitehaug E, Secic I, Johannessen GS, Østensvik Ø, Bomo A-M, Vogelsang C. 2007. Recovery of *E. coli* from lettuce one week after irrigation with different types of water. In: International Association for Food Protection Poster Presentation P1-39, Orlando, FL, July 8–11.

Orozco L, Iturriaga MH, Tamplin ML, Fratamico PM, Call JE, Luchansky JB, Escartín EF. 2008a. Animal and environmental impact on the presence and distribution of *Salmonella* and *Escherichia coli* in hydroponic tomato greenhouses. *Journal of Food Protection* 71:676-683.

Orozco L, Rico-Romero L, Escartín EF. 2008b. Microbiological profile of greenhouses in a farm producing hydroponic tomatoes. *Journal of Food Protection* 71:60-65.

Padaga M, Heard GM, Paton JE, Fleet GH. 2000. Microbial species associated with different sections of broccoli harvested from three regions in Australia. *International Journal of Food Microbiology* 60:15-24.

Paton JC, Paton A. 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical Microbiology Reviews* 11:450-479.

Petterson SR, Teunis PF, Ashbolt NJ. 2001. Modeling virus inactivation on salad crops using microbial count data. *Risk Analysis* 21:1097-1108.

Quiroz-Santiago C, Rodas-Suárez O, Vázquez CR, Fernández FJ, Quiñones-Ramírez EI, Vázquez-Salinas C. 2009. Prevalence of *Salmonella* in vegetables from Mexico. *Journal of Food Protection* 72:1279-1282.

Ramos Ortega A, Carballo Carballo A, Hernández Livera A, Corona Torres T, Sandoval Villa M. 2006. Caracterización de líneas de jitomate en hidroponía. *Agricultura Técnica en México* 32:213-223.

Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. The New England Journal of Medicine 308:681-685.

Riordan DC, Sapers GM, Hankinson TR, Magee M, Mattrazzo AM, Annous BA. 2001. A study U. S. orchards to identify potential source of *Escherichia coli* O157:H7. Journal of Food Protection 64:1320-1327.

Rodríguez S, Questa AG, Guzmán CG, Casóliba RM, Coronel MB. 2006. Calidad microbiológica de vegetales mínimamente procesados. Experiencias en el noroeste argentino. In: I Simpósio Ibero-Americano de Vegetais Frescos Cortados, San Pedro, Brazil, Abril 2006.

SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2008. Exportaciones de productos agroindustriales por 17 MMDD en 2008: SAGARPA. Boletín número 181/08. SAGARPA: México, pp. 2.

SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2011. *Tomate* [Internet]. SAGARPA. Disponible en el sitio de red: <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/infografias/Paginas/Tomate.aspx> [Revisado el 1 de agosto de 2011].

Sagoo SK, Little CL, Mitchell RT. 2001. The microbiological examination of ready-to-eat organic vegetables from retail establishments in the United Kingdom. Letters in Applied Microbiology 33:434-439.

Sagoo SK, Little CL, Mitchell RT. 2003. Microbiological quality of open ready-to-eat salad vegetables: effectiveness of food hygiene training of management. Journal of Food Protection 66:1581-1586.

Samadpour M, Barbour MW, Nguyen T, Cao TM, Buck F, Depavia GA, Mazengia E, Yang P, Alfi D, Lopes M, Stopforth JD. 2006. Incidence of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in retail fresh ground beef, sprouts, and mushrooms. *Journal of Food Protection* 69:441-443.

Sargent SA, Brecht JK, Olczyk T. 2005. Handling Florida vegetables series – Round and roma tomato types. University of Florida IFAS Extension SS-VEC-928:1-9.

Shachar D, Yaron S. 2006. Heat tolerance of *Salmonella enterica* serovars Agona, Enteritidis, and Typhimurium in peanut butter. *Journal of Food Protection* 69:2687–2691.

SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera), 2010. *Tomate rojo (jitomate)* [internet]. SAGARPA. Disponible en el sitio de red: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=264&Itemid=427 [Revisado el 5 de agosto de 2011].

Sivapalasingam S, Friedman, CR, Cohen L, Tauxe RV. 2004. Fresh produce: A growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *Journal of Food Protection* 67: 2342-2353.

Smoot ML, Pierson MD. 1997. Microorganismos indicadores y criterios microbiológicos. En: *Microbiología de los alimentos fundamentos y fronteras*, Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ (eds). Acribia. España, pp. 69-82.

Solomon EB, Matthews KR. 2005. Use of fluorescent microspheres as a tool to investigate bacterial interactions with growing plants. *Journal of Food Protection* 68:870-873.

Solomon EB, Yaron S, Matthews KR. 2002. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Applied and Environmental Microbiology* 68:397-400.

Steele M, Odumeru J. 2004. Irrigation water as a source of foodborne pathogens on fruit and vegetables. *Journal of Food Protection* 67:2839–2849.

Stine SW, Song I, Choi CY, Gerba CP. 2005. Effect of relative humidity on preharvest survival of bacterial and viral pathogens on the surface of cantaloupe, lettuce, and bell peppers. *Journal of Food Protection* 68:1352-1358.

Tauxe RV. 1997. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. *Emerging Infectious Diseases* 3:425-434.

Thapa SP, Kim SS, Park HR, Park DS, Lim CK, Hur JH. 2011. Study on microbiological condition of fresh produce at different stages of packaging sheds. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 54:243-253.

Tyler HL, Triplett EW. 2008. Plants as a habitat for beneficial and/or human pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 46:53-63.

USDA, 1975. *USDA color chart* [internet]. Fotógrafo Adel Kader. Postharvest Technology Center, University of California. Disponible en el sitio de red: <http://ucanr.org/sites/postharvest/pfvegetable/TomatoPhotos/?repository=30014&a=83755> [Revisado el 7 de agosto de 2011].

USDA, 2001. *Agricultural chemical usage: fruit and vegetable agricultural practices* [internet]. Disponible en el sitio de red: <http://usda.mannlib.cornell.edu/MannUsda/viewDocumentInfo.do?documentID=1568> [Revisado el 9 de mayo de 2012].

USFDA (U.S. Food and Drug Administration), 2000. *Report of the FDA retail food program database of foodborne illness risk factors* [internet]. Disponible en el sitio de red:

<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/RetailFoodProtection/FoodborneIllnessandRiskFactorReduction/> [Revisado el 9 de mayo de 2012].

USFDA-CFSAN (U.S. Food and Drug Administration–Center for Food Safety and Applied Nutrition), 1998. *Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards for Fresh Fruits and Vegetables* [internet]. Disponible en el sitio de red:

<http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/ProduceandPlanProducts/> [Revisado el 7 de mayo de 2012].

Valdés de León, LC, 2011. El cultivo de tomate va decreciendo en México. *Milenio online* [internet], 1 de agosto. Disponible en el sitio de red: <http://impreso.milenio.com/node/9001559> [Revisado el 1 de agosto de 2011].

Voetsch A, Van Gilder T, Angulo F, Farley M, Shallow S, Marcus R, Cieslak P, Deneen V, Tauxe R. 2004. FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. *Clinical Infectious Diseases* 38:S127-S134.

Wachtel MR, Whitehand LC, Mandrell RE. 2002. Association of *Escherichia coli* O157:H7 with preharvest leaf lettuce upon exposure to contaminated irrigation water. *Journal of Food Protection* 65:18-25.

Wang RF, Cao WW, Cerniglia CE. 1997. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *Journal of Applied Microbiology* 83:727-736.

Warriner K, Spaniolas S, Dickinson M, Wright C, Waites WM. 2003. Internalization of bioluminescent *Escherichia coli* and *Salmonella* Montevideo in growing bean sprouts. *Journal of Applied Microbiology* 95:719-727.

Wells JG, Davis BR, Wachsmuth IK, Riley LW, Remis RS, Sokolow R, Morris GK. 1983. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *Journal of Clinical Microbiology* 18:512-520.

Wells JG, Shipman LD, Greene KD, Sowers EG, Green JH, Cameron DN, Downes FP, Martin ML, Griffin PM and Ostroff SM. 1991. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. *Journal of Clinical Microbiology* 29:985-989.

Zucca I, Bougeois CM, Mescle JF. 1998. *Microbiología alimentaria Volumen 1*. Acribia: España, pp 487-677.

APÉNDICE

Clean Greens III

Protocolo de muestreo

04.campo

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

RESUMEN CURRICULAR

Ma. del Carmen Cárdenas Cárdenas

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Acentuación en Microbiología

Tesis: IDENTIFICACIÓN DE FUENTES DE CONTAMINACIÓN DURANTE LA PRODUCCIÓN DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill.) EN EL ESTADO DE NUEVO LEÓN, MÉXICO

Campo de Estudio: Inocuidad Alimentaria.

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 17 de abril de 1985, hija de Felipe de Jesús Cárdenas Guzmán y María del Carmen Cárdenas Herrera.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo en 2009.

Experiencia Profesional: Docente de Asignatura en Escuela Preparatoria No. 8 de la UANL desde 2011; Analista en el Departamento de Microbiología de Alimentos del Laboratorio Central Regional de Monterrey en Comité para el Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Nuevo León, A. C. (2008-2009).