

Calidad microbiológica e identificación de *Salmonella spp.* y *Escherichia coli* O157:H7 en bases para ensaladas

Chávez Servín E. E¹, García Ávila G. K¹, López García J. M¹, Murillo Puebla S. Y¹, Pacheco Cholico R.C⁵, Villarruel López A.¹, Vázquez Paulino O.D.¹

¹ Departamento de Farmacología. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Blvd Marcelino García Barragán #1421 esq. Calz. Olímpica, C.P. 44430, Guadalajara, Jalisco, México.

Teléfono: +52 (33) 1378 5900. olga.vazquez@academicos.udg.mx

Palabras clave: Número más probable, alimento, vaciado en placa

Introducción

El consumo de hortalizas y frutas frescas es parte importante de una dieta saludable, las bases de ensaladas listas para su consumo por lo regular contienen una mezcla de distintos tipos de hojas de lechugas como iceberg, romana y de variedad como único ingrediente o mezcladas con algunas hierbas, acelgas, verduras, fruta, crotones, huevo, quesos, almendras, etc. [1,2]

Desde el punto de vista microbiológico; son alimentos comparativamente de menor riesgo que las carnes y los productos lácteos. Sin embargo, en caso de que exista contaminación durante alguna etapa desde su cultivo, cosecha, preparación, almacenamiento y expendio son potencialmente peligrosos al ser consumidos sin ningún tipo de cocción. [1].

La tecnología actual no elimina el riesgo en forma total en estos productos, por lo que pueden constituir una vía de transmisión de parásitos y bacterias patógenas para el hombre. [1].

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) han sido catalogadas por expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) como el problema de salud pública más diseminado en el mundo contemporáneo, causa importante del descenso de la productividad económica mundial. La OMS estimó que sólo en el año 2005 murieron aproximadamente 1.8 millones de personas debido a enfermedad diarreica, asociada a la ingesta de agua o alimentos contaminados. Las infecciones por microorganismos coliformes e incluso la salmonelosis son infecciones de alto impacto para la salud humana, con alta mortalidad en grupos vulnerables de la población [2].

En los últimos años se han detectado un mayor número de enfermedades transmitidas por hortalizas, la información disponible muestra que es un problema que crece en importancia. Los riesgos biológicos asociados a los productos hortícolas están relacionados con las malas prácticas de producción, como el empleo de agua de riego contaminada, el uso de desechos biológicos sólidos como fertilizantes sin tratamiento o con tratamiento inapropiado, la presencia de animales en las áreas de cultivo, la proximidad a zonas de acumulación de aguas albañales o sólidos orgánicos, una inadecuada higiene de las instalaciones, entre otros. [1].

Según una investigación realizada por expertos de la Universidad de Sevilla y de la Universidad de Chile, los brotes de enfermedades transmitidas por frutas y hortalizas frescas siguen siendo frecuentes en la Unión Europea (UE) y en Estados Unidos de América (EUA), como demuestran los datos durante el periodo 2004-2012, en donde la *Salmonella spp.* es el segundo patógeno responsable de los brotes con un 16% en EEUU y 20% en UE, mientras que *E. coli* es responsable del 12.2% en EEUU y del 3.8% en UE [3].

México es uno de los principales países productores de hortalizas en el mundo quedando en el noveno lugar alcanzando una producción de 14.1 millones de toneladas [4], las hortalizas mexicanas son de las pocas actividades que mantienen una balanza comercial positiva dentro del sector rural, ya que el volumen exportado fue 4.1 veces mayor que el importado [5], estas constituyen una fuente de alimento sin igual dado a que sus propiedades físicas permiten su ingesta en fresco.

Existen estudios que corroboran que la contaminación de los productos frescos con patógenos como *Salmonella spp.* es significativa y puede contribuir a la carga de infecciones a través de los alimentos [6].

La determinación de *Escherichia coli* O157:H7 y otros microorganismos indicadores en lechugas empaquetadas adquiere relevancia a partir de la identificación de problemas frecuentes en diversos lugares que involucran esta relación, la problemática inició cuando se comenzaron a presentar casos de personas infectadas por la cepa de *Escherichia coli* O157:H7 productora de la toxina Shiga en 16 estados de EUA [7]. Así como la presencia de bacterias coliformes totales, coliformes fecales, *Escherichia coli*, patotipos diarreogénicos de *Salmonella spp.* las cuales se determinaron en ensaladas de vegetales que se promocionan como “listos para comer (RECS)” en restaurantes de la ciudad de Pachuca, México [8].

El objeto de esta investigación fue determinar la calidad microbiológica y la presencia de *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella spp.* en diferentes marcas de bases de ensaladas listas para consumo.

Metodología

Se seleccionaron 9 marcas comerciales de bases de ensaladas listas para su consumo en comercios de cadenas de supermercados de la zona oriente de Guadalajara, Jalisco, y se seleccionó una muestra de ensalada de un puesto de mercado con venta a granel. Todas las muestras se trasladaron al laboratorio de análisis dentro de una hielera en su empaque original, el análisis se inició dentro de la primera hora después de su recolección.

Preparación de la muestra: se identificaron al azar las muestras con numeración progresiva del 1 al 10, cada muestra fue preparada pesando 10 g de la muestra en condiciones de esterilidad, y adicionando 90 mL de diluyente de peptona al 0.1%, a partir de ésta primera dilución (1:10) se realizaron diluciones seriadas (1:100, 1:1000), siguiendo lo establecido en la NOM-110-SSA1-1994 “Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.”

Grupos indicadores: a partir de las diluciones mencionadas se inocularon por duplicado con 1 mL de cada dilución para el recuento de los grupos indicadores por la técnica de vaciado en placa, bacterias mesófilas aerobias [Agar cuenta estándar (ACE) 48 h a 35°C] NOM-092-SSA1-1994, “Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa”, mohos y levaduras [Agar dextrosa saboraud acidificado con ácido tartárico (ADS) 3, 4 y 5 días de incubación una serie a 35°C y otra a 28°C] NOM-111-SSA1-1994, “Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos” y coliformes totales [Agar bilis rojo violeta (ABRV) 24 h a 35°C] NOM-113-SSA1-1994 “Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa”.

Coliformes totales y fecales número más probable: de la dilución 1:10, se tomaron los mL necesarios para inocular los tubos con caldo lauril triptosa y campana de Dürham con una serie 3x3 para el recuento de coliformes por la técnica del número más probable, de acuerdo a la NOM-112-SSA1-1994 “Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable”. Se inocularon 10 ml para los primeros tres tubos a doble concentración, 1 mL para la siguiente serie a concentración sencilla y tres tubos más con 0.1 mL de muestra para la prueba presuntiva, se incubaron a 35°C/24 h, los tubos positivos (formación de gas) a partir de la prueba presuntiva, se inocularon con una asada a tubos con caldo bilis verde brillante con campana de Dürham y se incubaron a 35°C/24 h, se identificaron los tubos positivos, para la lectura y reporte de resultados de coliformes totales a partir de las tablas de NMP. De los tubos positivos, se tomó una asada para transferirla a tubos con caldo EC Mug con campana de Dürham, se incubaron a 45.5°C /24 h, los positivos se utilizaron para el reporte de coliformes fecales a partir de las tablas de NMP.

Identificación de *Salmonella spp.*: Se pesaron 25 g de la base de ensalada en condiciones asépticas, y se adicionaron a 225 mL de caldo lactosado, se llevaron al stomacher (marca Seward), por un minuto, se dejó reposar una hora a temperatura ambiente y se incubó por 24 h a 35°C, para el preenriquecimiento, se tomó un mL y se transfirió a tubos con 10 mL de medio Vassiliadis-Rappaport, se incubó 24h/35°C, posterior a la incubación se realizó el estriado para aislar en medio XLD se incubó 24 h a 35°C, se revisaron las placas en búsqueda de colonias típicas y posterior inoculación de pruebas bioquímicas para su identificación de acuerdo a la NOM-114-SSA1-1994, “Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos”, las cepas positivas se serotipificaron con antisueros polivalentes DIFCO®

Identificación de *E.coli* O157:H7: se realizó de acuerdo al apéndice H de la NOM-2010-SSA1-2014.” Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de

microorganismos patógenos”. A partir de los tubos de EC Mug positivos del recuento de coliformes fecales por NMP, se inocularon para aislar una caja de agar eosina azul de metileno (EMB) por tubo positivo, las colonias presuntivas se resembraron en agar nutritivo y se realizó tinción gram y pruebas bioquímicas presuntivas y confirmatorias para *E. coli*, a partir de las cepas confirmadas para *E. coli*, se inocularon en el agar cromogénico para *E.coli* O157H:7, y se confirmaron por serotipificación con antisueros polivalentes.

Resultados y discusión

Los coliformes totales sobrepasan el límite establecido en la NOM-093-SSA1-1994 (Cuenta total de mesofílicos aerobios 100 000 UFC/g, coliformes totales < 100 UFC/g.) en todas las muestras, destacando la número 9 que presenta una mayor presencia de bacterias coliformes totales.

El 90% de las marcas analizadas sobrepasan los límites establecidos por la NOM-093-SSA1-1994 la cual marca como límite 150,000 UFC/g de bacterias mesófilas aerobias.

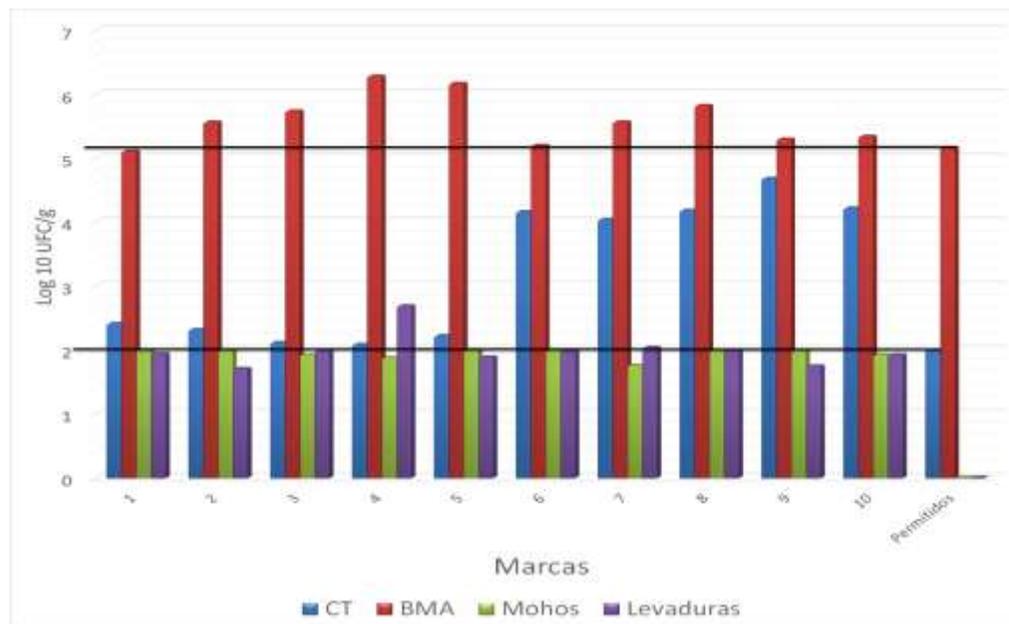
El 100% de las marcas analizadas presentó crecimiento de mohos y levaduras, sin embargo, se hace notorio que la marca número 4 es la que presenta un mayor crecimiento de levaduras.

Al realizar el análisis de ANOVA con un 95% de confianza, de un solo factor, demostró que se tienen 2 grupos homogéneos para coliformes totales, en donde las marcas 1, 2, 3, 4, 5 y 7 no muestran diferencia significativa entre ellas, por lo cual existe una calidad similar, siendo esta mayor a las marcas 6, 8, 9 y 10.

Para levaduras, las marcas 2 y 9 muestran diferencia significativa, por lo cual presentan mejor calidad respecto a la 1, 3, 5, 6, 7, 8 y 10, siendo la marca 4 la más contaminada.

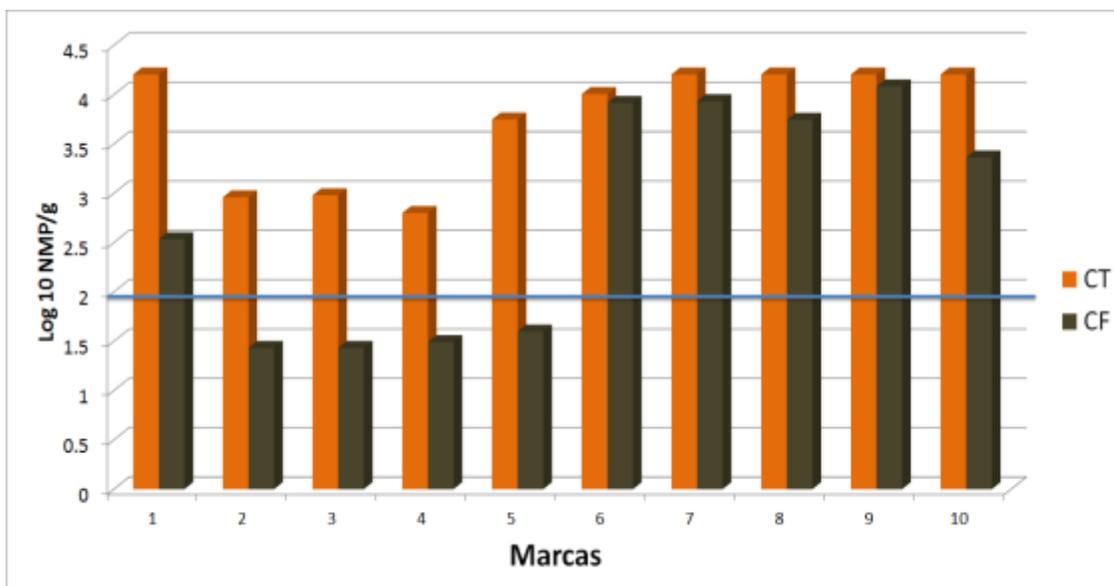
En los mohos, la marca 7 presenta diferencia significativa siendo esta la de mejor “calidad” respecto a la 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 y 10; las marcas 3, 4 y 10 no muestran diferencia entre ellas, resultando ser las marcas 1, 2, 5, 6, 8 y 9 las más contaminadas.

Se determinó que la marca 4 fue la más contaminada respecto a los BMA, mientras que la 1, 2, 6, 7, 9 y 10 se consideran de mejor calidad y muestran diferencia significativa en comparación con la 3, 8, 5 y 4.



Gráfica 1. Grupos indicadores entre marca

Se reporta que 100% de las marcas analizadas sobrepasa los límites permisibles para coliformes totales mientras que para los coliformes fecales solo el 60% de ellas lo excede.



Gráfica 2. Promedio de NMP/g Coliformes fecales y NMP/g de Coliformes totales

Observación: CT:coliformes totales, CF: coliformes fecales.

El análisis para microorganismos patógenos, reportó ausencia de *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* spp. sin embargo de las marcas analizadas se encontró que la muestra 8 y 10 dieron resultados para *Escherichia coli*.

Tabla 3. Prueba IMViC para resultados de *Escherichia coli*.

Marca	Indol	RM	VP	Citrato
8	+	+	-	-
8	+	+	-	-
8	+	+	-	-
8	+	+	-	-
10	+	+	-	-
10	+	+	-	-
10	+	+	-	-

10	+	+	-	-
----	---	---	---	---

La presencia de coliformes totales en las bases de ensalada "listas para el consumo" está asociado a un uso de aguas contaminadas para su lavado y malas prácticas de higiene en la producción.

La presencia de mesófilos aerobios implica condiciones inadecuadas de tiempo y temperatura durante su almacenamiento.

Los mohos y levaduras se pueden extender a través del polvo o aerosoles como consecuencia se debe tener en cuenta en las superficies del entorno de producción para un mejor control de higiene.

La presencia de *Escherichia coli* está asociada a un tratamiento inadecuado y/o contaminación posterior al tratamiento debido a equipos sucios o falta de higiene y a la multiplicación microbiana que pudiera haber permitido el crecimiento de toda la serie de microorganismos patógenos.

Conclusiones

Las bases de ensaladas analizadas no cumplen con la calidad microbiológica establecida.

El 100% de las muestras analizadas resultaron negativas a la presencia de patógenos como *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella spp.* por lo cual todas las muestras cumplen con las características de inocuidad.

A pesar de que las bases de ensaladas se venden bajo el eslogan de "listas para su consumo" se recomienda llevar a cabo un proceso de desinfección para así tener la certeza de que se está consumiendo un producto de buena calidad e inocuidad.

Referencias

1-Yamila Puig Peña, Virginia Leyva Castillo, Armando Rodríguez Suárez, José Carrera Vara, Pedro L. Molejón, Yoldrey Pérez Muñoz, Odeite Dueñas Moreira. Calidad microbiológica de las hortalizas y factores asociados a la contaminación en áreas de cultivo en La Habana. Rev haban cienc méd vol.13 no.1 Ciudad de La Habana ene.-feb. 2014. Consultado el 17 febrero, 2019. Obtenido de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2014000100013#:~:text=El%20consumo%20de%20frutas%20y,carnes%20y%20los%20productos%20%C3%A1cteos.

2-Barrantes, Kenia; Achí, Rosario. Calidad microbiológica y análisis de patógenos (Shigella y Salmonella) en lechuga. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, vol. 31, núm. 1, enero-junio, 2011, pp. 31-36 Sociedad Venezolana de Microbiología Caracas, Venezuela, Consultado el 21 febrero, 2019.

3-Universidades Sevilla y Santiago de Chile (2017). Infecciones alimentarias por consumo de frutas y hortalizas frescas. Consultado el 17 febrero, 2019. Obtenido de <https://seguridadalimentaria.elika.eus/infecciones-alimentarias-por-consumo-de-frutas-y-hortalizas-frescas/>

4-Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2016).Somos el noveno productor de hortalizas a nivel mundial. Consultado el 19 febrero, 2019 de <https://www.gob.mx/siap/articulos/somos-noveno-productor-de-hortalizas-a-nivel-mundial>

5-Ayala, G. A. V., Schwentesius, R. R. y Carrera, C. B. (2012). Hortalizas en México: competitividad frente a EE.UU. y oportunidades de desarrollo. Estados Unidos de América. Globalización, Competitividad y Gobernabilidad, 6(3), 70-88. Consultado el 18 de Febrero, 2019. Obtenido de: <http://www.anterior.banxico.org.mx/SieInternet/consultarDirectorioInternetAction.do?accion=consultarCuadro&idCuadro=CF373§or=6&locale=es>

6-Chavarriás Martha (2017). Infecciones alimentarias por el consumo de frutas y verduras. Consultado el 20 Febrero, 2019. Obtenido de <https://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/infecciones-alimentarias-por-el-consumo-de-frutas-y-verduras.html>

7-Centro para el control y prevención de enfermedades (CDC) , 2019, Brote de infecciones por E. coli vinculado a la lechuga romana (romaine) , Consultado en: <https://www.cdc.gov/ecoli/2018/o157h7-11-18/index-esp.htm>

8--Boletín UNAM-DGCS-486, Ciudad Universitaria (2011). En México, la bacteria Escherichia coli se vincula con diarrea aguda y persistente. consultado en 17 febrero, 2019 de http://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2011_486.html