

Décimo

10

**Congreso
Internacional
Inocuidad de Alimentos**

**XXV Reunión Nacional de Microbiología,
Higiene y Toxicología de los Alimentos**

Reunión de la Asociación Mexicana de Protección a los Alimentos

6, 7 y 8 de noviembre de 2008, 9:00 a 15:00 horas

Puerto Vallarta, Jalisco, México

Memorias



FRECUENCIA DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES, *E. coli* GENÉRICA Y GRUPOS PATÓGENOS DE *E. coli* EN JUGO FRESCO DE ZANAHORIA

Castro-Rosas J.¹, Sánchez, M. I.¹, Santos, L.E.M, Zúñiga, E.A. Gómez, A.C.A.¹ y Rangel, V. E.²

¹Centro de Investigaciones Químicas, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Centro Universitario, Carretera Pachuca-Tulancingo Km 4.5, Pachuca, Hidalgo, C.P. 42076, ²Ingeniería Agroindustrial, Universidad Politécnica de Francisco I. Madero. Tepatepec, Hidalgo. CP. 42660. Correo: jcastro@uaeh.edu.mx

Palabras clave: *Escherichia coli* patógena, jugo, zanahoria

Introducción. Recientemente, la demanda de verduras crudas se ha incrementado entre los consumidores debido a que se les percibe como saludables. No obstante, correlativamente se ha detectado también un incremento en el número de casos de enfermedad asociados al consumo de verduras (7). Por lo general, las verduras crudas se encuentran expuestas a múltiples fuentes de contaminación durante su producción, cosecha, transporte y comercialización lo que incrementa la probabilidad de la presencia de peligros biológico en las verduras (4). En México se consumen una diversidad de jugos frescos no pasteurizados de verduras, dentro de los que se incluye el de zanahoria. Por lo general, estos jugos son consumidos crudos. Aunque no existen artículos científicos con datos sobre la inocuidad de los jugos crudos de zanahoria que se comercializa en nuestro país, existe la posibilidad de que los jugos puedan contener microorganismos patógenos que desencadenen un padecimiento en el consumidor. Un grupo de microorganismos potencialmente presente en los jugos de zanahoria es el de los patotipos o grupos patógenos de *Escherichia coli*. En nuestro país, cuatro son los grupos de *E. coli* que con mayor frecuencia se aíslan de pacientes con gastroenteritis: enteropatógena (ECEP), enteroinvasiva (ECEI) y enterotoxigénica (ECET) y *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC, por sus siglas en inglés) (3). Debido a la naturaleza de desarrollo de la zanahoria, inherentemente podría existir peligro de patógenos microbianos. Además, en atención a las malas prácticas de higiene que con frecuencia se aplican en la preparación de los jugos tanto en los que se comercializan en la vía pública como en los de mercados o en algunos restaurantes, es posible la presencia de grupos patógenos de *E. coli* en los jugos de zanahoria. Por tal motivo, en este trabajo se investigó la frecuencia de coliformes termotolerantes, *E. coli* genérica y grupos patógenos de *E. coli* en jugo crudo de zanahoria.

Metodología. Los jugos frescos de zanahoria fueron comprados en una fonda y en 7 establecimientos de la central de abastos en la ciudad de Pachuca, Hidalgo. Se analizaron en total 71 muestras de jugo (25 de la fonda y 46 de los comercios de la central de abastos). Los jugos fueron preparados por los vendedores al momento de la compra. Las muestras fueron compradas y transportadas en su empaque de venta (vaso de plástico cerrador con tapa de plástico) a temperatura de $8 \pm 2^\circ\text{C}$ y bajo condiciones higiénicas tal como lo establece la legislación sanitaria de México (NOM-109-SSA1-1994). Las muestras se analizaron dentro de las dos primeras horas después de su compra. Se tomaron 50 mL a partir del volumen inicial del jugo (aprox. 250mL) y se depositaron en una bolsa estéril de polietileno; posteriormente, se le adicionó 450 mL de caldo lactosado y se homogenizó en un *Stomacher* a 260 rpm/1 minuto. A partir de la muestra homogenizada se cuantificó coliformes termotolerantes (*Ct*) [cabe señalar que los *Ct* son lo mismo que los coliformes fecales (CF); actualmente el nombre correcto para referirse a los CF es el de coliformes termotolerantes (1) por lo que a lo largo del texto usaremos esta última nomenclatura] y *Escherichia coli* genérica mediante la técnica del Número Más Probable (NMP) basándose en el manual de la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos de Norte América (1). Se cuantificaron y aislaron las cepas

típicas y atípicas de *E. coli* (lactosa negativa) tal como se establece en los protocolos respectivos (1). La identificación de los grupos patógenos se realizó a partir de las cepas típicas y atípicas de *E. coli* aisladas, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Se analizó un total de 250 cepas de *E. coli*. Se buscaron 6 grupos patógenos o patotipos de *E. coli*: ECET, ECEP, ECEI, STEC, ECEG (enteroagregativas) y ECED (enterodifusas) ECED. Para identificar a las cepas diarreogénicas (EPEC, EIEC, ETEC, EAEC y STEC) se realizó un PCR múltiple para cada cepa de *E. coli* típica o atípica aislada (6). Para las agregativas se empleó un PCR convencional o simple al que fueron sometidas nuevamente todas las cepas (2). Como control, paralelamente se realizó el PCR de cada una de las cepas patógenas y además en la electroforesis en gel se incluyeron marcadores de peso molecular (2, 6). Debido a que las cepas de *E. coli* analizadas para determinar su potencial patógeno fueron aisladas a partir de los tubos empleados para la cuantificación de *E. coli* genérica mediante la técnica del NMP, fue posible cuantificar también la concentración de los grupos patógenos de *E. coli* identificados.

Resultados y discusión. En las muestras obtenidas en la fonda, el 40 y 28% de las muestras resultaron positivas para *Ct* y *E. coli* genérica, respectivamente, y 1 muestra (4 %) resultó positiva para *E. coli* patógena. Los valores mínimos, mediana y media de cada microorganismo o grupo microbiano en los jugos en general fueron bajos (Tabla 1).

Tabla 1. Valores mínimos, medianas, medias y máximos de *Ct*, *E. coli* y *E. coli* patógena en jugo de la fonda

Microorganismo o grupo	Mínimo	Mediana	Media	Máximo
<i>Ct</i>	<3.0 *	<3.0	114	>1100
<i>E. coli</i>	<3.0	<3.0	69	1100
Patotipos de <i>E. coli</i>	<3.0	<3.0	0.36	9.2

* (NMP/mL)

Es interesante notar la gran diferencia que existe entre la información proporcionada por los valores de la media y la mediana de la Tabla 1. La media nos proporciona información limitada, solo expresa el promedio de los valores; además esta en función de los valores individuales de cada muestra, por lo que no permite deducir si al menos el 50 % de las muestras presentaron un contenido microbiano por debajo del promedio. Por el contrario, la mediana expresa el valor al cual el 50 % de las muestras contienen una concentración por abajo o por arriba de ella. Con base en esto, por ejemplo en la Tabla 1 se expresa que el contenido de *Ct* en el 50 % de las muestras tuvo por debajo de 3.0 NMP /mL.

Para el caso de los jugos obtenidos en la central de abastos la frecuencia de *Ct* y *E. coli* fue de 98 y 78 %, respectivamente; y *E. coli* patógena se identificó en el 13 % de las muestras de jugo. En estos jugos la mediana de *Ct* y *E. coli* genérica fue mayor que la encontrada en los jugos de la fonda (Tabla 2). En lo que respecta al tipo de grupo patógeno encontrado, solo una muestra de los jugos de la fonda resultó contaminada, no obstante, en esta muestra se encontraron simultáneamente 2 patotipos: ECET y STEC en una concentración de 9.2 NMP/mL de ambos patotipos (Tabla 3). Es destacable la presencia del grupo STEC en los jugos ya que en éste grupo está incluida la *E. coli* enterohemorrágica (ECEH). Cuando la STEC es del tipo O157 comúnmente se emplea el nombre ECEH para designarla; cuando no son del tipo O157 únicamente se refiere a estas cepas como STEC ó también como STEC no O157 (5).

Tabla 2. Valores mínimos, medianas, medias y máximos de *Ct*, *E. coli* y *E. coli* patógena en jugo de la central de abastos

Microorganismo o grupo	Mínimo	Mediana	Media	Máximo
<i>Ct</i>	<3.0 *	210	422	>1100
<i>E. coli</i>	<3.0	20	84	1100
Patotipos de <i>E. coli</i>	<3.0	<3.0	1	23

* (NMP/mL)

Para el caso de los jugos de la central de abastos, en 6 de ellos se identificaron patotipos de *E. coli* (Tabla 3). Los patotipos identificados fueron STEC, ECET y ECEP. En este tipo de jugos en una de las muestras se identificó de manera simultánea dos grupos patógenos: STEC y ECET, y en otra se encontraron tres grupos: STEC, ECET y ECEP (Tabla 3). La ECEP solamente se aisló en una de las muestras del jugo JCA en una concentración de 23 NMP/mL (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración y patotipo de *E. coli* identificado según tipo de jugo

Tipo de jugo - clave de muestra	ECET	STEC	ECEP
Fo ¹ -16	9.2 *	9.2	< 3
CA ² - 5	9.2	9.2	< 3
CA - 12	< 3	3.6	< 3
CA - 14	< 3	3.6	< 3
CA - 16	< 3	3.6	< 3
CA - 27	3.6	< 3	< 3
CA - 41	23	23	23

¹jugos de fonda; ²jugos de la central de abastos; *(NMP/mL)

En general los resultados encontrados evidencian un riesgo potencial en los jugos. La presencia de STEC en los jugos sugiere contaminación de origen de la zanahoria, así como una inadecuada desinfección. Es sabido que los principales reservorios de STEC son los rumiantes (5), por lo que es muy probable que la contaminación haya ocurrido en el campo. A diferencia, ECET y ECEP tienen como principal reservorio al humano; en consecuencia, su presencia en los jugos sugiere contaminación por los manipuladores de la zanahoria o bien contaminación humana durante la obtención del jugo y/o nula desinfección de la zanahoria. No obstante, la presencia simultánea de 2 (STEC y ECEP) ó 3 patotipos (STEC, ECEP y ECET) en los jugos obtenidos de la fonda o en los de la central de abastos, sugiere la ocurrencia de ambos tipos de contaminación (de origen y humana) y nula o deficiente desinfección de la zanahoria. Finalmente, a la concentración en la que se encontró a los tres patotipos en los jugos, éstos deben considerarse como un peligro para el consumidor.

En nuestro país, por lo general los jugos de zanahoria son mantenidos a temperatura ambiente en ocasiones hasta 6 horas y posteriormente los jugos que no son vendidos son almacenados

en refrigeración. En un estudio previo observamos que los patotipos STEC, ECEP y ECET tienen potencial para multiplicarse en jugo de zanahoria tanto en refrigeración como a temperatura ambiente. En consecuencia, es posible que bajo las condiciones comunes de manejo o venta de los jugos de zanahoria los patotipos de *E. coli* se desarrollen en el jugo incrementando su concentración hasta llegar o rebasar la dosis mínima infectante incrementando con ello el riesgo para el consumidor.

Desafortunadamente en nuestro país no existe una norma específica que regule la venta de jugos crudos. A diferencia varios países han implementado nuevas normativas y sistemas con la finalidad de disminuir los riesgos a la salud asociados al consumo de jugos no pasteurizados, esto debido al alto número de brotes que se han presentado por su consumo, y sobre todo a la severidad de las infecciones causadas por los patógenos involucrados en tales brotes (2).

Conclusiones. Aunque el estudio abarcó pocos establecimientos y de una sola ciudad, los resultados dan una idea del nivel de higiene de los jugos preparados en este tipo de sitios, y además sugieren la posibilidad de que el nivel de higiene que se encontró en los jugos, se mantenga en otros establecimientos, no sólo de la ciudad donde se desarrolló el estudio, sino también en restaurantes o establecimientos de otras ciudades o estados de México. En tal caso es necesario realizar mayores estudios para confirmar esta hipótesis. Por otro lado, sería adecuado realizar mayores estudios en los establecimientos donde se obtuvieron los jugos con la finalidad de determinar el origen de los problemas. La información derivada de estos estudios permitirá atender con eficiencia los problemas higiénicos en estos establecimientos y, en lo sucesivo, prevenirlos; disminuyendo con ello los posibles brotes de enfermedad asociados al consumo de jugo crudo de zanahoria.

Bibliografía

1. BAM (Bacteriological Analytical Manual *Online*). 2001. Disponible en la página: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>, fecha de acceso: Septiembre, 2008.
2. Cerna, J.F., J.P. Nataro and T. Estrada-García. 2003. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* 41:2138–2140.
3. Eslava C., J.M. Villaseca and A. Cravioto. 1993. Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea. *En: Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales.* Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, México, D.F. 251-265.
4. Fernández, E. E. 2001. Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro.
5. Hussein, H. S., S. L. Lake and T. P. Ringkob. 2001. Review: Cattle as a reservoir of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* including O157:H7 - pre- and post-harvest control measures to assure beef safety. *Prof. Anim. Sci.* 17:1-16.
6. López-Saucedo C., J.F. Cerna, N. Villegas-Sepúlveda, R. Thompson, F.R. Velázquez, J.Torres, P.I. Tarr and T. Estrada-García. 2003. Single Multiplex Polymerase Chain Reaction to detect diverse loci, associated with diarrheagenic *E. coli*, *Emerg. Infect. Diseases.* 9:127-131.
7. Lynch M., J. Painter, R. Woodruff and C. Braden. 2006. Surveillance for *Foodborne-Disease Outbreaks: United States, 1998-2002.* *Morb. Mortal. Week. Rep.* Vol. 55, No. SS-10.
8. Norma Oficial Mexicana, NOM-093-SSA-1994, Bienes y Servicios. Práctica de Higiene y Sanidad en la Preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos.