

ESTADO DE INOCUIDAD DEL SISTEMA PRODUCTIVO DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill) EN RELACIÓN A LA PRESENCIA DE *Escherichia coli* O157:H7

Piedra Vargas JJ, Gallegos Robles MA, Salazar Sosa E, Vázquez Vázquez C, García Hernández JL, Trejo Escareño HI, Orona Castillo I.

Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Agricultura y Zootecnia. Km 35 Carretera Gómez Palacio-Tlahualilo. Domicilio Conocido, Venecia, Durango, México
Código Postal 35170. Teléfonos 01(871)711-8876, 711-8875.

*e-mail: jesúspiedravargas@hotmail.com

RESUMEN

Con el objetivo de conocer el estado de inocuidad así como identificar puntos críticos de contaminación, en el proceso de producción y empaque de tomate en el rancho el secreto S.P.R. DE R.L., se analizaron 76 muestras correspondientes a tres muestreos en el periodo Otoño-Invierno 2013, para determinar la presencia de microorganismos patógenos, en base al manual de análisis Microbiológico USDA-FSIS (2002), y mediante PCR determinar la presencia de *E. coli* O157:H7. En el primer muestreo, en los análisis microbiológicos se presentó un 91.3 % positivas a crecimiento microbiano, en el segundo un 72.73% y en el tercer muestreo un 42.11%. Las bacterias presentes fueron *E. coli*, *Klebsiella* spp, *Proteus* spp, *Citrobacter* spp, *Pseudomonas* spp y *Salmonella* spp. En las pruebas moleculares de un total de 35 muestras correspondientes al primer muestreo, el 11.4 % fueron portadoras del antígeno somático O157 y el otro 11.4 % al flagelar H7. Las principales fuentes de contaminación en este estudio fueron: trabajadores, suelo y plaga de sapos, además otras zonas del área de empaque como: rodillos, fruto y tolva.

Palabras clave: Inocuidad, tomate, *E. coli* O157:H7.

ABSTRACT

With the objective of to meet the safety status so as to identify critical points of contamination in the production process and packing tomatoes at the Rancho El Secreto S.P.R. de R.L., were analyzed 76 samples corresponding to three sampling in the period autumn to winter 2013, to determine the presence of pathogenic microorganisms, based on USDA-FSIS Microbiological analysis manual (2002), and by PCR to determine the presence of *E. coli* O157: H7. In the first sampling for microbiological analysis showed a 91.3% positive for microbial growth. the second a 72.73 % and 42.11 % one third sampling. The bacteria found were *E. coli*, *Klebsiella* spp, *Proteus* spp, *Citrobacter* spp, *Pseudomonas* spp y *Salmonella* spp. In molecular testing of a total of 35 samples in the first sample, 11.4% were carrying the somatic antigen O157y the other 11.4% to flagellar H7. The main sources of pollution in this study were: workers, soil and plague of frogs, plus other areas of the packing area as rolls, fruit and hopper.

Key words: safety, tomatoes, *E. coli* O157:H7.

Área: Microbiología y Biotecnología.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) se producen por la ingesta de alimentos contaminados con microorganismos patógenos (González y Rojas., 2005). Es por eso que la inocuidad ha pasado a ser una cuestión de alta prioridad

para muchos gobiernos (Loaharanu-Paisan, 2001). Según Fuentes *et al.*, (2010), debido a la fuerte relación que existe entre la inocuidad y la salud del consumidor, el obtenerla adquiere importancia fundamental. Castillo *et al.*, (2003), mencionan que las fuentes de contaminación por patógenos son diversas, entre ellas se encuentran las manos de los trabajadores y el agua de uso agrícola. Las bacterias más comunes asociadas a las ETA, están representados principalmente por bacterias como *E. coli* y *Salmonella* spp, (Fuentes *et al.*, 2010). Las cepas de *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC), pertenecen a la categoría de enterotoxigénica (EHEC). Dentro del grupo STEC, *E. coli* O157:H7 es el serotipo aislado más frecuentemente y al que se le atribuye la ocurrencia de la mayoría de los grandes brotes (Rivas *et al.*, 2008). Gallegos *et al.*, (2010) señala que la detección rápida de patógenos mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), en los alimentos es un aspecto crítico, principalmente en aquellos que entran en maduración muy pronto, como los productos hortofrutícolas. Según Bayona (2009), en años recientes la industria alimentaria ha reenfocado su atención sobre *E. coli* O157:H7 como un indicador del estado higiénico de los alimentos. Por tal motivo este estudio lleva como principal objetivo, determinar la presencia de microorganismos patógenos, pero en especial dirigido a la búsqueda de *E. coli* O157:H7, así como identificar puntos críticos de contaminación en producción y empaque de tomate.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Rancho el secreto S.P.R. DE R.L., (empresa en proceso de certificación) localizado en el poblado Juan E. García, Municipio de Lerdo, Durango, México, en la producción de tomate. Se realizaron tres muestreos en el periodo agosto-octubre del 2013, con fin de identificar puntos críticos de contaminación y hacer las correcciones correspondientes, en el área de producción y/o empaque donde se identificaran problemas de contaminación. El método de muestreo se realizó mediante el empleo de esponjas, hisopo, así como toma directa y por medio de enjuague para fruto en campo y empaque (NOM-109-SSA1-1994). Cada una de las muestras se colocaron en solución salina (Cloruro de sodio ACS-Fermont 0.8%), posteriormente se procedió a hacer la siembra de cada una de las muestras en base al manual de análisis Microbiológico USDA-FSIS, (2002) (metodología para aislar *E. coli*). Primeramente se hizo el preenriquecimiento en medio EC (Difco™), transfiriendo 1 ml de la muestra a un tubo de ensaye con 10 ml del caldo nutritivo y se incubó por 24 h a 37°C, posteriormente se pasaron a 10 ml de agar Sorbitol MacConkey(MCD LAB), se pusieron a incubar a 37°C por 24 h, después de identificar colonias sospechosas a *E. coli*, se pasaron a las pruebas bioquímicas en Citrato de Simmons (MCD LAB) y Triple Sugar Iron Agar (TSI) (BD BIOXON), se incubaron por 24 h a 35°C para identificar qué microorganismo patógeno estaba presente.

Extracción del ADN. Se obtuvieron a partir del medio EC (Difco™), se tomó tres veces 1 ml y se centrifugó a 3000 rpm durante 1 min (Centrifuga Thermo Electro corp. Micro CL 17) para formar una pastilla en tubos Eppendorf de 1,5 ml y hacer la extracción en base al método CTAB.

Reacciones de PCR. Las reacciones de PCR se realizaron utilizando los oligonucleótidos mencionados en la Tabla I. Se realizó un PCR multiplex para amplificar dos fragmentos correspondientes a los genes, *rfbE* y *fliC*. El volumen utilizado para la reacción fue de 25 µl (Tabla II).

Tabla I. Iniciadores usados en las reacciones de PCR para la identificación y caracterización molecular de *E. coli* O157:H7.

Gen	Secuencia 5' → 3'	Tamaño (pb)
<i>rfbE</i>	(F) AAGATTGCGCTGAAGCCTTTG	497
	(R) CATTGGCATCGTGTGGACAG	
<i>fliC</i>	(F)	625
	GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC	
	(R) CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC	

Tabla II. Mix para PCR. *E. coli* O157:H7.

Ingredientes mix PCR	1Rx	Condiciones del termociclador
Agua miliQ	14.22 µl	Etapa 1, paso 1 = 95°C, 1 min
Buffer	2.5 µl	
MgCl ₂	0.875 µl	Etapa 2, paso 1 = 95°C, 30 seg paso 2 = 66°C, 30 seg paso 3 = 72°C, 30 seg
Primer 1 (F)	1 µl	
Primer 1 (R)	1 µl	
Primer 2 (F)	1 µl	programar etapa 2, 35 veces
Primer 2 (R)	1 µl	
dNTP's (Bioline)	2 µl	Etapa 3, paso 1 = 72°C, 10 min
Taq (Bioline)	0.4 µl	
ADN	1 µl	
Total	25 µl	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados microbiológicos del primer muestreo realizado en campo y empaque arrojan que aún no han adoptado bien los Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento (POES), pues en las muestras que se analizaron en el área de empaque solo 3 resultaron negativas. En las muestras analizadas del área de producción en campo (invernadero), todas tienen contaminación (Tabla III).

Tabla III. Datos correspondientes al primer muestreo realizado el 12 de agosto del 2013.

Bacteria	N° muestras positivas a cada patógeno	Porcentaje (%)
<i>E.coli</i>	20	57.14
<i>Proteus</i> spp	3	8.57
<i>Klebsiella</i> spp	5	14.28

<i>Salmonella</i> spp	4	11.42
Negativas	3	8.57
Total	35	100

Debido a la fuerte contaminación se hicieron las siguientes correcciones en los POES para posteriormente realizar el segundo muestreo (Tabla IV):

Tabla IV. POES aplicados para la realización del segundo muestreo.

Área a desinfectar	Frecuencia sugerida	Producto químico empleado
Manos de trabajadores	Periódicamente durante el día	Jabón líquido y desinfectante
Maquinaria de empaque	Dos veces por semana	Cloro 100 ppm
Reja de transporte	Dos veces por semana	Cloro 100 ppm
Agua de riego y empaque	Ajustar cloración	Cloro 100 ppm

Los resultados del segundo muestreo reflejan que el trabajo de limpieza del equipo del área de empaque no ha resultado eficaz ya que solo 6 muestras son negativas y las otras 16 resultaron ser positivas (Tabla V).

Tabla V. Datos correspondientes al segundo muestreo. 2 de septiembre del 2013.

Bacteria	N° de muestras positivas a cada patógeno	Porcentaje (%)
<i>Klebsiella</i> spp	13	59.09
<i>Pseudomonas</i> spp	2	9.09
<i>Citrobacter</i> spp	1	4.54
Negativas	6	27.27
Total	22	100

La corrección para el tercer muestreo fueron las mismas, añadiendo la limpieza de todo el equipo de empaque un desarmado total de las piezas y se limpiaron con cloro en una concentración de 250 ppm.

En el tercer muestreo se encontró una considerable disminución de muestras positivas con un total de 8 positivas de un total de 19 muestras, también se llegó a detectar los puntos críticos de contaminación los cuales están en los trabajadores, agua de riego y empaque, suelo, y rodillo de selección, concluyendo, por tanto que el fruto presenta contaminación originada en campo (Tabla VI).

Tabla VI. Datos correspondientes al tercer muestreo. 21 de octubre del 2013.

Bacteria	N° de muestras positivas a cada patógeno	Porcentaje (%)
<i>Klebsiella</i> spp	6	31.50
<i>E. coli</i>	1	5.26
<i>Proteus</i> spp	1	5.26
Negativas	11	57.89
Total	19	100

n cuanto a los resultados de la prueba de PCR, del primer muestreo, de un total de 35 muestras un 11.4 % fueron positivas al gen *fliC*, y otro 11.4 % al gen *rfbE*. (Figura 1), y el 77.2 % fueron negativas.

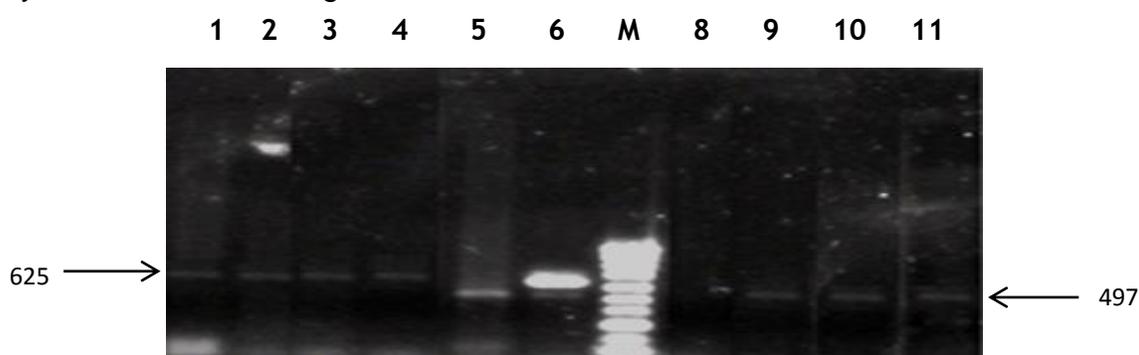


Figura 1. Productos de PCR a partir de los genes *flic* (625 pb) y *rfbE* (497 pb). Carriles 1-4= muestras positivas al gen *fliC*. Carril 6= *E. coli* O157:H7. Carril M = marcador de peso molecular hyperladder 100 pb (bioline). Carril 8= control negativo. Carril 5,9-11, muestras positivas al gen *rfbE*.

Por lo tanto de las 20 muestras (57.14 %), que manifestaron características típicas de *E. coli*, en agar TSI y Citrato de Simmons, solo 4 (11.4 %) fueron positivas al antígeno O157 y 4 (11.4 %) al antígeno H7. Cabe resaltar que es muy probable que se hubiera podido encontrar el serotipo O157:H7, ya que estos genes se encuentran localizados en plásmidos, y por medio de la transferencia horizontal, se puedan intercambiar ambos genes y así formar el serotipo *E. coli* O157:H7.

De acuerdo a la Agencia para la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) de 1996 al 2008 se presentaron 82 brotes de enfermedades asociadas con el consumo de frutas y hortalizas frescas. Todos los brotes fueron asociados a *E. coli* y *Salmonella* spp (Anónimo, 2009). En el estudio realizado por Barrantes y Achi., (2011), en la mayoría de las muestras (65%) se encontró contaminación por *E. coli*, en lechuga debido a factores como: agua de mala calidad, abonos orgánicos sin previo tratamiento, la mala manipulación y el almacenamiento inadecuado del fruto. Los resultados del presente artículo coinciden con el trabajo de Barrantes y Achi, (2009), en que el agua de uso agrícola de mala calidad es un factor de contaminación por *E. coli*. Raggio y Moro (2008), mencionan que el riesgo de brotes de enfermedades se puede minimizar utilizando agua de riego de calidad.

Rivera *et al.*, (2009), demostraron que en hortalizas hay un alto índice de contaminación fecal (*E. coli*), a consecuencia de riego con agua contaminada con materia fecal, omisión o desconocimiento de las condiciones sanitarias básicas de manipulación. Tales resultados concuerdan con la presente investigación, ya que uno de los puntos de contaminación está en la manipulación del traslado de campo a empaque, reja de transporte, añadiendo rodillos de empaque, agua, suelo y plaga de sapos. Los datos obtenidos por Luna *et al.*, (2012), indican que las especies de enterobacterias en fruto y suelo, identificadas con mayor frecuencia, tanto en tomate y suelo, son *E. coli* y *Citrobacter freundii*.

BIBLIOGRAFÍA

- Anónimo. 2009. Guidance for Industry: Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards of Tomatoes. Center for Food Safety and Applied Nutrition. FDA- U.S. Dept. Health and Human Services. Estados Unidos.
- Barrantes K., Achi R. 2011. Calidad microbiológica y análisis de patógenos (*Shigella* y *Salmonella*) en lechuga. Revista de la sociedad venezolana de Microbiología. Vol. 31, num. 1. pp. 31-36.
- Bayona RMA. 2009. Evaluación microbiológica de alimentos adquiridos en la vía pública en un sector del norte de Bogotá. Rev. U.D.C.A Act. y División. Científica. 12 (2): pp. 9-17.
- Castillo A., Mercado I., Martínez R., Ponce de León J., Murano EA., Acuff GR., 2003. *Salmonella* Contamination during Production of Cantaloupe: A Binational study. Journal food protection 67: 713-720.
- Fuentes S., Barboza CM., Eleazar J. 2010. Inocuidad y bioconservación de alimentos. Redalyc, Acta Universitaria. Vol. 20, No. 1. pp. 43-52.
- Gallegos RMA., Morales LA., Álvarez G., Vázquez VC. 2010. Caracterización Molecular de Serotipos de salmonella asociados a sistemas productivos de melón y chile Bell. Publicado en Agricultura Orgánica Tercera parte.
- González-Flores T., Rojas-Herrera. 2005. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR; Prevención y diagnóstico. Salud Pública de México, vol.47, num.5. pp. 388-390.
- Loaharanu-Paisa. 2001. Creciente demanda de alimentos inocuos. Boletín OIEA.
- López-Cuevas O., Leon-Felix J., Jimenez-Edeza M., Chaidez-Quiroz C. 2009. Detección y resistencia a antibióticos de *E. coli* y *Salmonella* en agua y suelo agrícola. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 32 (2).
- Luna-Guevara ML., Delgado-Alvarado AB., Herrera-Cabrera E., Torres A., Avelino-Flores F., Navarro-Ocaña F., Parada-Guerra F. 2012. Diversidad de enterobacterias asociadas a frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y suelos de invernadero. Scientia Agropecuaria 2.161 - 169.
- Ortega-González M., Rodríguez-Martínez C., Zhurbenco R. 2010. Validación de métodos alternativos para el análisis microbiológico de alimentos y aguas. Métodos cualitativos. Revista cubana de Higiene y Epidemiología, vol. 48. núm. 2. pp. 162-176.

- Raggio M., Moro de Raggio N. 2008. Diagnóstico de la calidad microbiológica de frutas y hortalizas en Chihuahua, México. *Revista Internacional de Botánico Experimental*.77: 129-136.
- Rivas M., Leotta G., Chinen I. 2008. Manual de procedimientos, Diagnostico y caracterización de *Escherichia coli* 0157, productor de la toxina Shiga a partir de alimentos. Centro regional de referencia de WHO global salmsury para América del sur.
- Rivera-Jacinto M., Rodríguez-Ulloa C., López-Orbegoso J. 2009. Contaminación fecal de hortalizas que se expenden en el mercado de la ciudad de Cajamarca, Perú. *Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública*; 26(1): 45-48.