

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO
DE LA REPÚBLICA (PROPAC)
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

***Enterobacteriaceae, Escherichia coli Y Salmonella spp* COMO PARÁMETROS EN LA
VERIFICACIÓN DE LAS PRÁCTICAS SANITARIAS AGRÍCOLAS DURANTE EL MANEJO
POSCOSECHA DE HORTALIZAS EN EMPRESAS EXPORTADORAS**

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

PRESENTA

IBQ. ELBA VERÓNICA ARIAS RIOS

DIRIGIDO POR

DR. EDUARDO FERNÁNDEZ ESCARTÍN

C.U. SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO., NOVIEMBRE 2011



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA
REPÚBLICA (PROPAC)
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

***Enterobacteriaceae, Escherichia coli Y Salmonella spp* COMO PARÁMETROS EN LA
VERIFICACIÓN DE LAS PRÁCTICAS SANITARIAS AGRÍCOLAS DURANTE EL MANEJO
POSCOSECHA DE HORTALIZAS EN EMPRESAS EXPORTADORAS**

TESIS
QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

PRESENTA
IBQ. ELBA VERONICA ARIAS RIOS
DIRIGIDO POR
DR. EDUARDO FERNÁNDEZ ESCARTÍN

SINODALES

Dr. Eduardo Fernández Escartín

Presidente

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

Secretaria

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

Vocal

Dr. Ramón Alvar Martínez Peniche

Suplente

Dr. Fausto Tejeda Trujillo

Suplente

Q.B. Magali E. Aguilar Ortiz
Director de la Facultad

Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre 2011
México

RESUMEN

México es un exportador prominente de frutas y hortalizas a Estados Unidos. Sólo entre 2008 y 2010, una media de 24% de los productos hortícolas importados por aquel país provinieron de México con un valor de 8 500 millones de dólares. Desafortunadamente, en diversas ocasiones estos productos han estado involucrados en brotes de enfermedad. La FDA sigue con frecuencia la norma de analizar productos en la frontera para determinar la presencia de *Salmonella* como criterio de aceptación. Debido a la probabilidad de falsos negativos, esa institución se apoya adicionalmente en el cumplimiento de las prácticas sanitarias agrícolas. Por su parte las empresas deben verificar mediante pruebas de laboratorio que ese apego ciertamente se traduce en una reducción de riesgo de contaminación con patógenos en el producto. Dentro de este esquema, es necesario primero seleccionar los microorganismos indicadores que mejor respondan al propósito de verificación de las prácticas sanitarias agrícolas. El objetivo de este estudio consistió en determinar la incidencia de *Salmonella* spp y de microorganismos indicadores en seis diferentes hortalizas como recurso para verificar las prácticas sanitarias agrícolas durante su cosecha y empaque en diez empresas exportadoras. Durante 9 meses se colectaron muestras de hortalizas, ambiente y superficies de trabajo. En todas las muestras se determinaron las poblaciones de *Enterobacteriaceae*, coliformes fecales y *E. coli* y la presencia (en su caso, la cuantificación) de *Salmonella* spp en hortalizas, tierra, composta, herramientas de corte y mesas. En cada visita se registró la frecuencia de violaciones relacionadas con una eventual contaminación fecal. Globalmente, la calidad microbiológica de las hortalizas resultó aceptable: la mediana de *E. coli* fue menor al límite de detección (0.82 NMP/unidad) e índices de *E. coli* de 4.2% y 0% de *Salmonella*, en superficies de 6.8% de *E. coli* y 0% de *Salmonella*. Entre el total de muestras de superficie, el productor de brócoli mostró la mayor frecuencia de violaciones e índices de contaminación por *E. coli*. La composta utilizada para la producción de pepino europeo mostró niveles mayores a 24 NMP *Salmonella*/g. En general, los resultados mostraron una relación significativa entre la baja incidencia de *E. coli* tanto en superficie (6.8%) como en las hortalizas (4.2%) y la frecuencia de las violaciones a las prácticas sanitarias agrícolas referidas (10%). No se observó relación entre la incidencia de *E. coli* y el grado de suciedad aparente de las superficies.

(Palabras clave: exportación, hortalizas, prácticas sanitarias agrícolas, verificación, *Salmonella*)

SUMMARY

Mexico is a prominent exporter of fruits and vegetables to the United States. Only between 2008 and 2010, an average of 24% of the horticultural products imported by that country came from Mexico with a value of \$8 500 million dollars. Unfortunately, in several occasions these vegetables have been involved in food-borne disease outbreaks. The FDA often follows the analysis of the produce in order to determine the presence of *Salmonella* as a criterion for acceptance. Due to the probability of false negatives, FDA also depends on the performance of Good Agricultural Practices. On the other hand, farms must be verified with laboratory testing to substantiate those practices certainly minimize the risk of pathogenic contamination in their products. Within this scheme, it is necessary to select the indicator microorganisms that best meet the purpose of verification of the Good Agricultural Practices. The objective of this study was to determine the incidence of *Salmonella* spp and indicator microorganisms in six kinds of vegetables as a resource for the Good Agricultural Practices' verification during harvesting and packing in ten exporter farms. During a period of 9 months, samples of vegetable, environment, and work surfaces were collected. Densities of *Enterobacteriaceae*, fecal coliforms, and *E. coli* were determined in all samples. Presence of *Salmonella* spp was determined (and where appropriate, was quantified) in produce, soil, manure, cutting tools, and tables. The infringement frequency of safety standards related to fecal contamination was recorded in each farm visit. In general, the microbiological quality of the vegetables was acceptable: the *E. coli* median was lower than the detection limit (0.82 MPN /unit) and 4.2% of *E. coli* and 0% of *Salmonella* rates, in the work surfaces of 6.8% of *E. coli* and 0% of *Salmonella*. Among the total of surfaces samples, the broccoli producer showed the highest frequency of the Good Agricultural Practices' violations and *E. coli* contamination rates. Compost used for production of European cucumber showed levels greater than 24 MPN *Salmonella*/g. In general, the results showed a significant relationship between the low incidence of the indicator microorganisms of both work surfaces (6.8%) and the vegetables (4.2%) and the frequency of the Good Agricultural Practices' violations indicated (10%). There was not evidence of a relationship between the *E. coli* incidence and the degree of dirtiness in the work surfaces.

(Key words: exportation, fruits and vegetables, Good Agricultural Practices, verification, *Salmonella*)

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por el apoyo económico para la realización de este proyecto y a todos aquellos que participaron de alguna manera en esta investigación.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	ii
SUMMARY	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 ANTECEDENTES.....	3
2.1 Riesgos asociados al consumo de alimentos.....	3
2.1.1 Enfermedades microbianas asociadas al consumo de alimentos ..	4
2.2 Expresión del riesgo.....	6
2.3 Frutas y hortalizas	7
2.3.1 Hortalizas involucradas en brotes de ETAs.....	8
2.4 F&H de exportación.....	10
2.5 Fuentes y mecanismos de contaminación de patógenos a las F&H ..	14
2.5.1 Agua de uso agrícola.....	16
2.5.2 Fauna	17
2.5.3 Humanos.....	18
2.5.4 Tierra.....	18
2.6 Inocuidad alimentaria. Organismos de regulación.....	19
2.6.1 Estados Unidos: FDA	19
2.6.2 México: SAGARPA.....	26
2.6.3 Microorganismos indicadores.....	27
2.6.4 Microorganismos patógenos	30
2.7 Acciones de prevención y control de los peligros microbianos.....	32
2.7.1 Análisis de peligros y puntos críticos de control	33

2.7.2	Verificación de procesos de lavado y desinfección de superficies y hortalizas	33
3	OBJETIVOS.....	37
3.1	Objetivo general	37
3.2	Objetivos particulares	37
4	MATERIALES Y METODOS.....	38
4.1	Materiales.....	38
4.1.1	Medios de cultivo.....	38
4.1.2	Soluciones.....	39
4.1.3	Reactivos y colorantes	39
4.2	Métodos.....	40
4.2.1	Estudio observacional de las condiciones sanitarias de operación en las empresas exportadoras de hortalizas.	40
4.2.2	<i>Enterobacteriaceae</i> , coliformes fecales, <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> spp y <i>L. monocytogenes</i> en las hortalizas y materiales asociados durante la cosecha y empaçado.....	41
5	RESULTADOS Y DISCUSION	50
5.1	Estudio observacional	50
5.2	Incidencia de microorganismos indicadores, <i>Salmonella</i> spp y <i>L. monocytogenes</i> en hortalizas y superficies asociados a su cosecha y empaçado	63
5.2.1	Incidencia global.....	63
5.2.2	Incidencia de patógenos en los seis tipos de hortalizas	75
5.2.3	Incidencia de indicadores en superficies con contacto directo con las hortalizas en las diez empresas	78

5.3	Asociación entre las prácticas sanitarias de operación y los niveles de microorganismos indicadores y patógenos en las hortalizas y en materiales asociados a su cultivo y empaque.	86
5.3.1	Limpieza de pepino europeo y jitomate con jerga antes de su empacado	88
5.3.2	Lavado y desinfección del espárrago	89
5.3.3	Lavado y desinfección de contenedores, manos, guantes, herramientas de corte y mesas.....	93
6	CONCLUSIONES	104
7	BIBLIOGRAFÍA.....	106

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Grupos de alimentos mayormente implicados como causa de brotes y casos de enfermedad. EE.UU.. 1998-2007.	4
2. Número de brotes asociados a alimentos por agente etiológico en el periodo de 1998-2002.	5
3. Costo (millones anuales) de ETAs causadas por ciertos patógenos en EE.UU en 1993.	6
4. Principales productos hortofrutícolas involucrados como vehículos de transmisión de microorganismos patógenos. Periodo 1998- 2007. EE.UU.	10
5. Crecimiento del volumen de importación de productos hortofrutícolas en EEUU. y el país de origen. Periodo 2000 – 2006.	12
6. Rechazos por la FDA de los principales países exportadores a EE.UU. Entre 2007-2009.	20
7. Número y razón de rechazos de alimentos por la FDA según la región o país en 2007.	21
8. Primeros países con mayor número de rechazos por EE.UU. asociados con agentes microbianos en 2007.	22
9. Primeros cinco grupos de alimentos por orden de la cantidad de rechazos en EE.UU. asociados con microorganismos en 2007.	22
10. Hortalizas y métodos de cultivo de cada empresa.	41
11. Puntos de muestreo de las hortalizas, agua y superficies.	42
12. Conformación de las unidades experimentales de las hortalizas y superficies de trabajo estudiadas.	42
13. Especificación de los microorganismos analizados en hortalizas, superficies de trabajo, piso y agua.	45
14. Serie de volúmenes de muestra inoculados para el pre-enriquecimiento con caldo lactosado (CL).	46
15. Infraestructura sanitaria de las diez empresas.	51
16. Frecuencia de las violaciones a las condiciones que pueden afectar significativamente la inocuidad de las hortalizas.	58

17. Violaciones a las PSAs. Porcentajes de violación a las PSAs en las 10 empresas según el tipo de cultivo.	61
18. Distribución de los microorganismos indicadores en 371 hortalizas de las 10 empresas.	64
19. Criterios microbiológicos del Laboratorio de Servicio de Salud Pública para el aseguramiento de la calidad microbiológica de algunas muestras de alimentos listos para su consumo en el punto de venta.	66
20. Incidencia de <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> en hortalizas según el lugar de producción.	67
21. Resumen del contenido de <i>Enterobacteriaceae</i> (ENT), coliformes fecales (CF) y <i>E. coli</i> (EC) en hortalizas de 10 empresas según el tipo de cultivo.	70
22. Incidencia de <i>E. coli</i> en hortalizas.	71
23. Resumen de <i>Enterobacteriaceae</i> (ENT), coliformes fecales (CF) y <i>E. coli</i> en hortalizas de diez empresas.	73
24. Incidencia de <i>Salmonella</i> spp en hortalizas colectadas en las diez empresas.	76
25. Incidencia de <i>L. monocytogenes</i> hortalizas colectadas en las diez empresas.	76
26. Tipos de superficies analizadas en cada una de las diez empresas.	78
27. Mediana de ENT, CF y <i>E. coli</i> en herramienta de corte de 8 empresas.	81
28. Resumen de ENT, CF y <i>E. coli</i> en superficies según el tipo de cultivo.	85
29. <i>Enterobacteriaceae</i> en superficies antes y después del proceso de lavado y desinfección de superficies.	93
30. Porcentaje de <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> en las hortalizas y violaciones a las prácticas sanitarias agrícolas y de operación de las diez empresas según el tipo de cultivo	96

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Conformación de la exportación agroalimentaria de México en 2010 (SFA-DGAFR, 2011).	13
2. (Fuente: USDA, 2011). Valor de la cosecha por exportación a EE.UU. de algunas hortalizas mexicanas. Periodo 2006 - 2010	14
3. Mecanismos por los cuales las hortalizas frescas pueden llegar a contaminarse con microorganismos patógenos y servir como vehículos de enfermedades humanas (Beuchat, 1996).	15
4. Valor de las importaciones de melón Cantaloupe en EE.UU. Periodo 1990-2010 (USDA, 2011).	25
5. Origen de hortalizas implicadas en brotes de ETAs. Periodo 1998- 2002	26
6. Esquema general para la determinación y recuento de <i>Salmonella</i> .	47
7. Tipos de protección al cultivo entre las 10 empresas.	52
8. Tipo de cultivo y de riego en las empresas.	53
9. Nivel de protección del pozo profundo en las empresas A, C, E, F, G y K.	54
10. Reservorios de agua en empresas productoras de hortalizas.	56
11. Principales violaciones a las PSAs detectadas en las empresas productoras de hortalizas.	59
12. Principales violaciones a las PSAs detectadas en las empresas productoras de hortalizas.	60
13. Coliformes fecales (CF), <i>E. coli</i> (EC) y <i>Enterobacteriaceae</i> (ENT) en 371 muestras de hortalizas de 10 empresas exportadoras.	64
14. Resumen de carga de 1) <i>Enterobacteriaceae</i> ; 2) coliformes fecales; 3) <i>E. coli</i> en hortalizas según el tipo de cultivo.	69
15. Contenido de microorganismos indicadores según el tipo de hortaliza.	72
16. <i>Enterobacteriaceae</i> (ENT), coliformes fecales (CF) y <i>E. coli</i> (EC) en superficies con contacto directo en la producción de hortalizas de las diez empresas exportadoras.	79
17. Resumen de los grupos indicadores en cinco tipos de superficies de la empresa F. 1) <i>Enterobacteriaceae</i> ; 2) coliformes fecales; 3) <i>E. coli</i> .	82

18. Resumen de contenido de <i>E. coli</i> en tres superficies de las empresas..	83
19. Frecuencia de <i>E. coli</i> en contenedores, herramienta de corte, manos, guantes y mesas según el tipo de cultivo: invernadero o cultivo abierto. Rangos expresados en Log NMP/unidad.	85
20. Contenido de microorganismos indicadores en jergas utilizadas para remover el polvo del jitomate y del pepino europeo (empresa H y J) justo antes de su empaclado.	88
21 Proceso de cosecha-empaque del espárrago.	89
22. Reducción de las poblaciones de <i>Enterobacteriaceae</i> durante el proceso de cosecha-empacado del espárrago en la empresa A.	90
23. <i>Enterobacteriaceae</i> en pepino gourmet antes y durante la remodelación del área de empaclado.	92
24. Resumen de la carga de microorganismos indicadores en la herramienta de corte de siete empresas.	95
25. Distribución de <i>E. coli</i> en manos según el grado de suciedad.	99
26. Distribución de <i>E. coli</i> en guantes según el grado de suciedad.	100
27. Distribución de <i>E. coli</i> en mesas según el grado de suciedad.	101
28. Distribución de <i>E. coli</i> en contenedores según el grado de suciedad.	102
29. Distribución de <i>E. coli</i> en herramientas de corte según el grado de suciedad.	103

1 INTRODUCCIÓN

Tanto el incremento en el consumo de frutas y hortalizas (F&H) frescas, como el riesgo de enfermar por infecciones microbianas tras su consumo, son temas de interés ampliamente reconocidos en la actualidad. Sin embargo, no es de extrañar que aún así se sigan presentando brotes de enfermedades transmitidas por este tipo de alimentos (ETAs). Destacan como agentes etiológicos de estos brotes *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Cryptosporidium* spp, *Cyclospora* spp., *Clostridium botulinum*, virus de hepatitis A y Norovirus.

La alta incidencia y elevado costo económico de las enfermedades transmisibles por cualquier tipo de alimento han generado preocupación en muchos países, que se expresa en el establecimiento de normas microbianas como recurso para proteger la salud de la población y favorecer el comercio nacional e internacional de alimentos. Para alcanzar este objetivo, se ha implementado lo que se conoce como prácticas sanitarias de operación, que tienen un efecto significativo en la prevención de la contaminación por patógenos de los productos en el proceso continuo del campo a la mesa. De manera concurrente se aplican sistemas preventivos para el aseguramiento de la inocuidad, como el Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (S-APPCC). Países importadores de productos hortofrutícolas exigen a sus proveedores el apego a estas recomendaciones. Consecuentemente, los especialistas en inocuidad de los alimentos subrayan la importancia de identificar y evaluar los determinantes de la contaminación durante la producción y manejo de los alimentos.

Desafortunadamente México cuenta con insuficiente información sobre la frecuencia con la que los microorganismos patógenos se encuentran en las F&H, y con muy poca o nula información sobre la magnitud de su participación como vehículos microbianos de patógenos en la presentación de brotes de ETAs. Debe tenerse presente que estos alimentos contienen nutrientes que pueden favorecer la sobrevivencia o sustentar el desarrollo de tales microorganismos. Resulta por

tanto fundamental ampliar la información disponible acerca de la microbiología de las F&H (y factores que la determinan) en cada una de las etapas de su producción.

El presente trabajo tiene como objetivos: A) detectar y valorar la incidencia de *Salmonella* spp y algunos microorganismos indicadores como recurso para la verificación de las prácticas sanitarias agrícolas (PSAs) que se siguen durante la cosecha y empaclado en seis tipos de hortalizas. B) identificar fuentes relevantes de contaminación de *Salmonella* durante la pre y poscosecha; y C) determinar el grado de asociación entre las condiciones sanitarias de manejo de las hortalizas y los contenidos de microorganismos de interés sanitario en diversos materiales involucrados en el proceso productivo, incluidas las propias hortalizas.

Las hortalizas se han visto implicadas en brotes de ETA. Países importadores de hortalizas, tales como EE.UU., han establecido normas microbianas como recurso para proteger la salud de su población. El gobierno de México, a través del SENASICA modificó algunos de los requisitos para la obtención del certificado como empresas exportadoras. Estas modificaciones insisten en que las empresas deben demostrar con estudios de laboratorio la efectividad de las prácticas sanitarias que se pongan en operación. Los Comités Estatales de Sanidad Vegetal de los Estados de Guanajuato (CESAVEG) y Querétaro (CESAVEQ) se han acercado al Laboratorio de Inocuidad Microbiana de los Alimentos de nuestra Universidad para llevar a cabo un estudio en diez empresas exportadoras de hortalizas enfocado a la observación de las prácticas sanitarias agrícolas para la detección de violaciones que pongan en riesgo la inocuidad del producto y la correspondiente verificación del saneamiento de los materiales que tienen contacto directo con las hortalizas.

2 ANTECEDENTES

2.1 Riesgos asociados al consumo de alimentos

La microbiología de agua y alimentos ha identificado tres componentes en la configuración del riesgo de enfermar asociado a su consumo: el alimento, el agente patógeno y el individuo. El peligro microbiano se puede expresar con diferentes niveles de riesgo y se encuentra determinado por la contaminación, sobrevivencia y desarrollo del microorganismo patógeno en el alimento (Fernández- Escartín, 2008). La gestación del riesgo inicia con la contaminación, y el desencadenamiento del daño está determinado por diversos factores inherentes a cada componente de la tríada referida (e.g. virulencia y cantidad del microorganismo, cantidad de alimento consumido, inmunocompetencia del individuo) (Fernández- Escartín, 2008). Microorganismos que muestran dosis infectante baja (10 quistes de *Giardia lamblia*, por ejemplo) por sí misma puede ocasionar enfermedad cuando el alimento contaminado es consumido. Otros patógenos requieren multiplicarse en el alimento para alcanzar niveles elevados de dosis infectante o para sintetizar toxinas hasta una concentración que tenga expresión clínica en el consumidor; por ejemplo *Staphylococcus aureus* (Mossel *et al.*, 1990; Rendtorf, 1954). Una situación particularmente desfavorable ocurre ante personas inmunocomprometidas (*i.e.* recién nacidos, personas mayores de 60 años y mujeres embarazadas) que tienen mayor riesgo de enfermar (CSPI, 2009).

Una dieta sana se basa en el consumo balanceado de los diferentes grupos de alimentos libres de agentes patógenos (Burnett *et al.*, 2004; Tauxe *et al.*, 1997). Por tal razón, en las últimas décadas se ha incrementado el consumo de F&H crudas como resultado de una mayor promoción realizada por expertos en nutrición (Erickson *et al.*, 2010).

Los cambios en la producción industrial, los patrones de consumo de alimentos y el aumento en el consumo de F&H crudas (como vehículos potenciales de agentes infecciosos) pueden contribuir al incremento en la frecuencia de brotes asociados al consumo de alimentos (Beuchat y Ryu, 1997).

2.1.1 Enfermedades microbianas asociadas al consumo de alimentos

Cifras obtenidas del CDC, y del Centro de Interés Público para la Ciencia (CSPI) identificaron 2,688 brotes por enfermedades microbianas transmitidas por alimentos en EE.UU. durante 1998-2007. Agrupados por tipo de alimentos el número de brotes y casos arrojan las cifras que aparecen en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Grupos de alimentos mayormente implicados como causa de brotes y casos de enfermedad. EE.UU.. 1998-2007.

Tipo de alimento	Número de brotes	Número de casos
Mariscos	838	7,298
Frutas y Verduras	684	26,735
Aves	538	13,498
Carne de res	428	9,824
Carne de cerdo	200	4,934

(Fuente: CSPI, 2009)

Si bien las F&H no fueron la primer causa de brotes, si lo son con el número de casos (43%), lo que evidencia brotes con afectación de números elevados de víctimas.

El conocimiento de los agentes microbianos involucrados en los brotes de ETAs es esencial para diseñar medidas de prevención. Lynch (2006) muestran cifras al respecto para EE.UU. (Cuadro 2).

Cuadro 2. Número de brotes asociados a alimentos por agente etiológico en el periodo de 1998-2002.

Bacteria	Número de brotes
<i>Salmonella</i>	585
<i>E. coli</i>	140
<i>Clostridium perfringens</i>	130
<i>S. aureus</i>	101
<i>Shigella</i>	67
<i>Campylobacter</i>	61
<i>Bacillus cereus</i>	37
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	25
<i>Clostridium botulinum</i>	12
<i>L. monocytogenes</i>	11
<i>Yersinia enterocolitica</i>	8
<i>Vibrio cholerae</i>	3
<i>Brucella</i>	1
<i>Streptococcus</i>	1
<i>Vibrio</i> , otros	1
Otras bacterias	1

(Fuente: Lynch *et al.*, 2006)

Beatty *et al.* (2006) investigaron uno de los mayores brotes de ETAs en EE.UU. que tuvo lugar entre el 2 y 10 de junio de 2006. El agente etiológico fue *E. coli* enterotoxigénica. Un platillo delicatessen fue el vehículo de propagación del patógeno. El brote tuvo lugar en Illinois y se calcula que 3,300 personas fueron afectadas.

2.2 Expresión del riesgo

Costo económico y magnitud

En años recientes ha emergido un gran número de patógenos transmisibles por los alimentos que se ven implicados en brotes de ETAs con notable impacto en términos de casos y costos económicos (Smith, 1995). Los daños resultantes de la deficiente calidad sanitaria de los alimentos consisten en la presentación de enfermedades, gastos de atención médica, menoscabo de la calidad de vida, pérdidas económicas por deterioro de los alimentos, daño al turismo y causa de muerte (Fernández- Escartín, 2008). En general, el aumento en la incidencia de las ETAs se asocia con cambios en las prácticas agrícolas y su procesamiento, un incremento en el comercio de alimentos a escala internacional y por cambios en los hábitos de alimentación e incremento de la movilidad de la población. Se estima que cada año ocurren unos 76 millones de ETAs en EE.UU. (26,000 casos por 100,000 habitantes), 2 millones en el Reino Unido (3,400 casos por 100,000 habitantes) y 750,000 en Francia (1,220 casos por 100,000 habitantes) (Mead *et al.*, 1999). En España, entre 1990 y 2003 se reportaron 1,652 brotes; en 871 brotes (80.8%) se identificó como agente etiológico a *Salmonella* con 14 695 casos, 1 534 hospitalizaciones y 4 muertes (Domínguez *et al.*, 2006). Buzby *et al.* (1996) resumen los costos por ETAs en EE.UU. según el patógeno causante. *Salmonella* fue una de las causas con mayor número de casos con mayores costos sociales y económicos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Costo (millones anuales) de ETAs causadas por ciertos patógenos en EE.UU en 1993.

Patógeno	Casos por consumo de alimentos	Costo total (millones de dólares)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,513,000	1,200
<i>Campylobacter</i>	1,375,000 – 1,750,000	600 -1,000
<i>Salmonella</i>	696,000 – 3,840,000	600 -3,500
<i>Clostridium perfringens</i>	10,000	100
<i>E. coli</i> O157:H7	8,000 – 16,000	200 -600
<i>L. monocytogenes</i>	1,526 – 1,767	200 -300
Total	3,603,526 – 7,130,767	2,900 -6,700

(Fuente: Buzby *et al.*, 1996)

El costo de las ETAs en EE.UU. se estima en 152 mil millones de dólares por año, cifra que se resuelve en un costo promedio de 1,850 dólares cada vez que alguien enferma por consumo de alimentos (Weise, 2010).

Un problema fundamental es que los consumidores usualmente no pueden conocer si un alimento es seguro sino hasta después de consumirlo (generalmente los patógenos no deterioran los alimentos). Las enfermedades transmitidas por alimentos generan gastos en los consumidores, tales como medicamentos, inasistencia al trabajo, secuelas e inclusive la muerte. El análisis en el impacto económico de un brote por *Staphylococcus aureus* en la India mostró que cerca del 40% del costo total del brote fue solventado por las personas afectadas (OMS, 2005).

2.3 Frutas y hortalizas

Las F&H crudas se han convertido en uno de los alimentos más deseables porque con frecuencia el consumidor de hoy los percibe saludables, sabrosos y frescos. En México, su producción en 2008 fue de 291'647,654 toneladas (SIAP, 2010). Con el crecimiento en el mercado la industria está frente a nuevos retos que requieren atención especialmente en la protección de los consumidores contra los peligros microbianos (FDA, 2001).

Una encuesta reciente realizada por el Servicio de Investigación Económica de la USDA mostró que el consumo de F&H frescas o mínimamente procesadas ha incrementado más de 12% en la última década y el consumo *per capita*, desde 284 libras en 1987 a 318 libras en 1997 (Ching, 1993; Kaufman *et al.*, 2000).

Los nutrientes propios de las F&H pueden ser aprovechados por los microorganismos, situación que se ve favorecida por otros factores ecológicos. En la medida en que prevalece esta condición se incrementa la probabilidad de desencadenar alguna enfermedad infecciosa, intoxicación o toxiinfecciosa.

La frecuencia de brotes de enfermedad transmitidos por las F&H reportados por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de los EE.UU. se ha incrementado en los últimos años (Bean *et al.*, 1997; Sapers *et al.*, 2006). El alza se atribuye primariamente a la implantación de una mejor y mayor vigilancia

epidemiológica, pero existen evidencias de la participación de otros factores como la activa promoción que reciben tales productos frescos, parte importante de una dieta saludable (Bean y Griffin, 1990) y el empleo de técnicas de detección de patógenos más sensibles y específicas.

Recientes brotes en todo el mundo se han ligado epidemiológicamente al consumo de frutas frescas, hortalizas y jugos no pasteurizados (CDC, 1975; Besser, 1993; Miller, 1994; Leyer, 1995; Uljas *et al.*, 1999). En todos los casos se han identificado factores relacionados con violaciones en el manejo higiénico durante la producción, transporte y distribución. Los funcionarios de gobierno de salud pública requieren nuevos enfoques y una reevaluación de esas prácticas operativas (Sapers *et al.*, 2009). Un factor de riesgo adicional resulta del hecho de que generalmente se consumen crudas.

A raíz del plan de una iniciativa para garantizar la inocuidad de frutas y hortalizas nacionales e importadas emitido por el presidente de EE.UU. en 1997, países exportadores como México adoptaron lineamientos integrales de sistemas de prevención con el fin de atender las exigencias internacionales y obtener productos que cumplan con las normas más altas de calidad e inocuidad.

La prevención de la contaminación por patógenos en las F&H es prioritaria como medida efectiva de control por parte de los agricultores y empacadores, lo que exige la aplicación y definición de prácticas sanitarias agrícolas. El principio de estas prácticas consiste en el reconocimiento de que todo material que se pone en contacto con estos alimentos, puede dar lugar a una contaminación inadmisibles. La mayoría de los microorganismos patógenos provienen del hombre y animales.

2.3.1 Hortalizas involucradas en brotes de ETAs

Teóricamente cualquier fruta u hortaliza puede ser vehículo de bacterias, virus o parásitos patógenos al hombre. En casi todos los países su participación en los brotes de ETAs continúa siendo un problema significativo de salud pública (Fernández- Escartín, 2008). Entre 1982 y 1997 se observó una mayor tendencia a consumir alimentos fuera del hogar, incluidas las barras de ensaladas en los restaurantes. Grandes cantidades de F&H listas para el consumo se exponen al

consumidor en centros comerciales, lo que diversifica la variedad de patógenos involucrados en los brotes de ETAs (Silvapalasingam *et al.*, 2004).

En EE.UU. la proporción de brotes relacionados con las F&H frescas aumentó de menos de 1% entre todos los brotes con vehículo conocido en la década de 1970, al 6% en la década de 1990 (Silvapalasingam *et al.*, 2004). El promedio de brotes también se duplicó, y la proporción de casos asociados pasó de menos del 1 al 12% en ese período. En Australia, representaron 4% de todos los brotes de origen alimentario en el periodo 2001 - 2005 (Kirk *et al.*, 2008).

Existen más de 200 enfermedades transmisibles por alimentos (OMS, 2005) cuya causa incluye virus, bacterias, parásitos, toxinas, pesticidas, químicos industriales, metales y más recientemente, priones (OMS, 2005). Muchas han sido causados por norovirus, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella* y *E. coli*. La diarrea es el síndrome más común de estos problemas alrededor del mundo.

En una recopilación del CDC hecha por Bean (1997) para el periodo 1988-1992, se encontró que 79% de los brotes fue debido a bacterias, donde *Salmonella* Enteritidis causó el mayor número de brotes, casos y muertes.

Salmonella ha sido aislada de varios tipos de F&H frescas, algunas de las cuales se han asociado con salmonelosis humana. Este patógeno ha sido identificado como causa de incidentes aislados e incluso de brotes multiestatales en diferentes países (Jaquette *et al.*, 1996).

El Cuadro 4 muestra la frecuencia de brotes, casos asociados, agente etiológico y tipo de fruto u hortaliza que se han registrado en EE.UU. en el periodo 1998 – 2007. Destaca la alta morbilidad, sobre todo por consumo de ensaladas de hojas verdes.

Cuadro 4. Principales productos hortofrutícolas involucrados como vehículos de transmisión de microorganismos patógenos. Periodo 1998- 2007. EE.UU.

Alimento	Patógeno	Brotos	Casos
Ensalada de hojas verdes	Norovirus	196	6 722
Frutas y ensaladas de frutas	Norovirus	38	1 810
Lechuga	Norovirus	32	1 106
Hortalizas y ensalada de hortalizas	Norovirus	27	895
Germinados	<i>Salmonella</i>	19	724
Tomate	<i>Salmonella</i>	17	1 694
Melón	<i>Salmonella</i>	15	474
Ensalada de hojas verdes	<i>E. coli</i>	13	291
Ensalada de hojas verdes	<i>Salmonella</i>	12	521
Lechuga	<i>E. coli</i>	12	361

(Fuente: Doyle *et al.*, 2008)

2.4 F&H de exportación

La producción mundial y comercio internacional de F&H frescas se ha incrementado rápidamente durante las últimas dos décadas. La producción en países desarrollados no siempre cubre la demanda. Algunas sólo se producen por temporadas, por lo que se recurre a la importación. Países como Alemania, Bélgica, Francia, Inglaterra, Canadá y EE.UU. son los principales países importadores (FDA, 2008). Muchos de los exportadores cuentan con pobres sistemas de control de la inocuidad, bajos estándares de seguridad alimentaria y deficientes prácticas sanitarias (Doyle y Erickson, 2008).

Los países en desarrollo suelen competir bien en los mercados mundiales de productos agrícolas porque los que se exportan pueden ser producidos a más bajo costo o cosechados en diferentes épocas (Doyle y Erickson, 2008).

EE.UU. es el principal país importador de hortalizas. En 1992 consumió 13.4% de las hortalizas exportadas a nivel mundial (FDA, 2008), lo que representa un mercado potencial para México.

En 2001, 11% del suministro total por peso de alimentos en EE.UU. fue importado, incluyendo 12% de carne vacuna, 17% de hortalizas frescas y congeladas, 23% de fruta fresca y congelada y 83% de pescados y mariscos frescos y congelados (Jerardo, 2003). México aportó 27% de frutas, y otros países de Latinoamérica, 40% (Doyle y Erickson, 2008).

En 2006, EE.UU. importó más de 64 mil millones de dólares en alimentos. Bebidas, productos tropicales, frutas y hortalizas fueron los principales alimentos del valor de importación (Dohlman y Gehlhar, 2007). Casi 100% de las hortalizas que exporta nuestro país tienen como destino final EE.UU. (INEGI, 2010).

Diversidad de países comercializan gran variedad de productos agrícolas con EE.UU. Alrededor de 36% del valor de estos alimentos proviene principalmente de Canadá (22%) y México (14%) (USDA, 2011).

El volumen de importación de hortalizas frescas en EE.UU. fue del 13.8% en el 2000 y tuvo un incremento casi de 17% en 2004. El crecimiento del volumen importado varió según el tipo de hortaliza, pero no implicó necesariamente una mayor cuota del consumo doméstico total. Un crecimiento alto en el volumen importado desde 2000 ocurrió con las hortalizas de hoja verde (Cuadro 5) (Doyle y Erickson, 2008).

Cuadro 5. Crecimiento del volumen de importación de productos hortofrutícolas en EEUU. y el país de origen. Periodo 2000 – 2006.

Hortalizas	Cambios en el volumen importado 2000-2005 (%)	Principal país exportador	Consumo per cápita de hortalizas en EE.UU
Espinacas	314	México	2.3
Lechuga	303	México	20.3
Champiñones	62	Canadá	2.6
Cebolla	51	México/ Peru	21.2
Espárrago	48	Peru	1.2
Pimiento morrón	60	México	6.6
Jitomate	36	México	20.6
Brócoli	28	México	5.6
Pepino	28	México	6.5

Cálculos basados en la información disponible en <http://www.fas.usda.gov/ustrade>

Exportación de hortalizas mexicanas

Debido a la proximidad geográfica con EE.UU., el contar con un clima propicio, diferentes temporadas de producción y capital humano barato, México es el principal exportador de frutas y verduras a EE.UU. Este país adquirió 98% de las exportaciones mexicanas entre 1999 y 2001 con un valor de 696 millones de dólares (Huang, 2004). México cuenta con 23 millones de hectáreas para el cultivo, lo que representa 11.7% de la superficie total del país y un 4% de esa superficie se utiliza para el cultivo de F&H (Huang, 2004; USFDA/CFSAN, 2001).

El principal destino de las exportaciones agroalimentarias es la región del Tratado del Libre Comercio de América del Norte (EE.UU. y Canadá); más de 75% de las ventas totales del sector se destinan a esos países. Los pertenecientes a la Unión Europea, son el segundo destino; participan con aproximadamente 5% del total (SFA-DGAFR, 2011).

Información del Banco de México indica que las exportaciones agropecuarias se ubicaron en 7.7 mil millones de dólares en 2009, cifra

ligeramente inferior a la observada el año previo. En 2010 las hortalizas fueron el principal producto de exportación a EE.UU. (Figura 1) (SAGARPA, 2010).

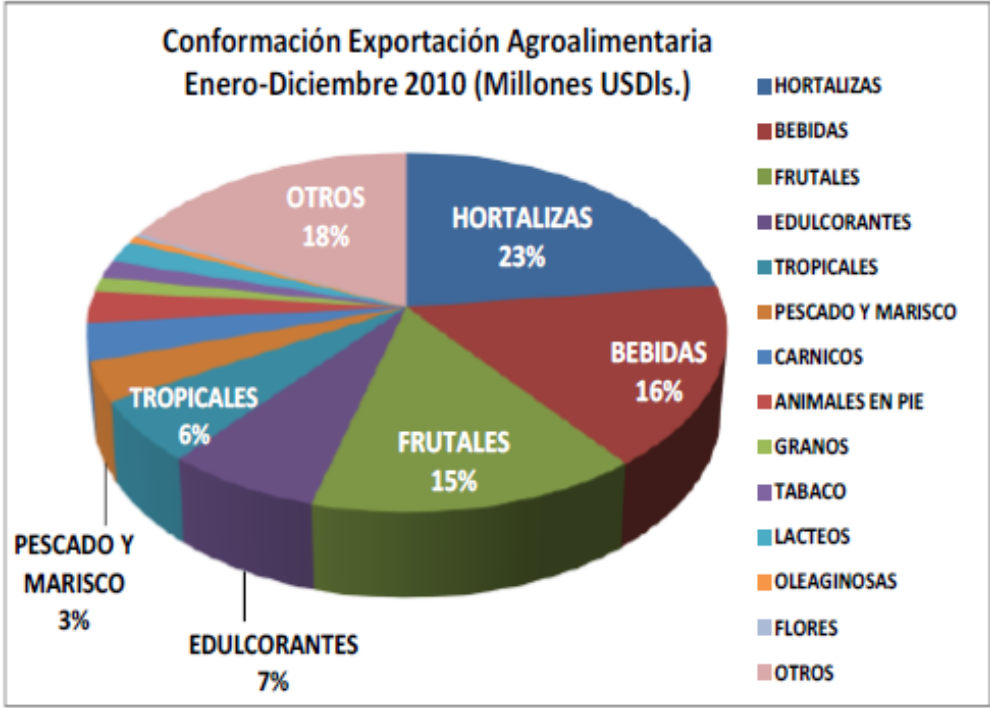


Figura 1. Conformación de la exportación agroalimentaria de México en 2010 (SFA-DGAFR, 2011).

El jitomate, legumbres varias, aguacate, pimiento, pepino, brócoli son algunos de los principales productos con mayor valor en exportación principalmente a la región TLCAN. El principal producto en términos de valor es el jitomate (Figura 2) del cual en el periodo de 2008 al 2009 se han exportado más de 1,200 millones de dólares (SAGARPA, 2010).

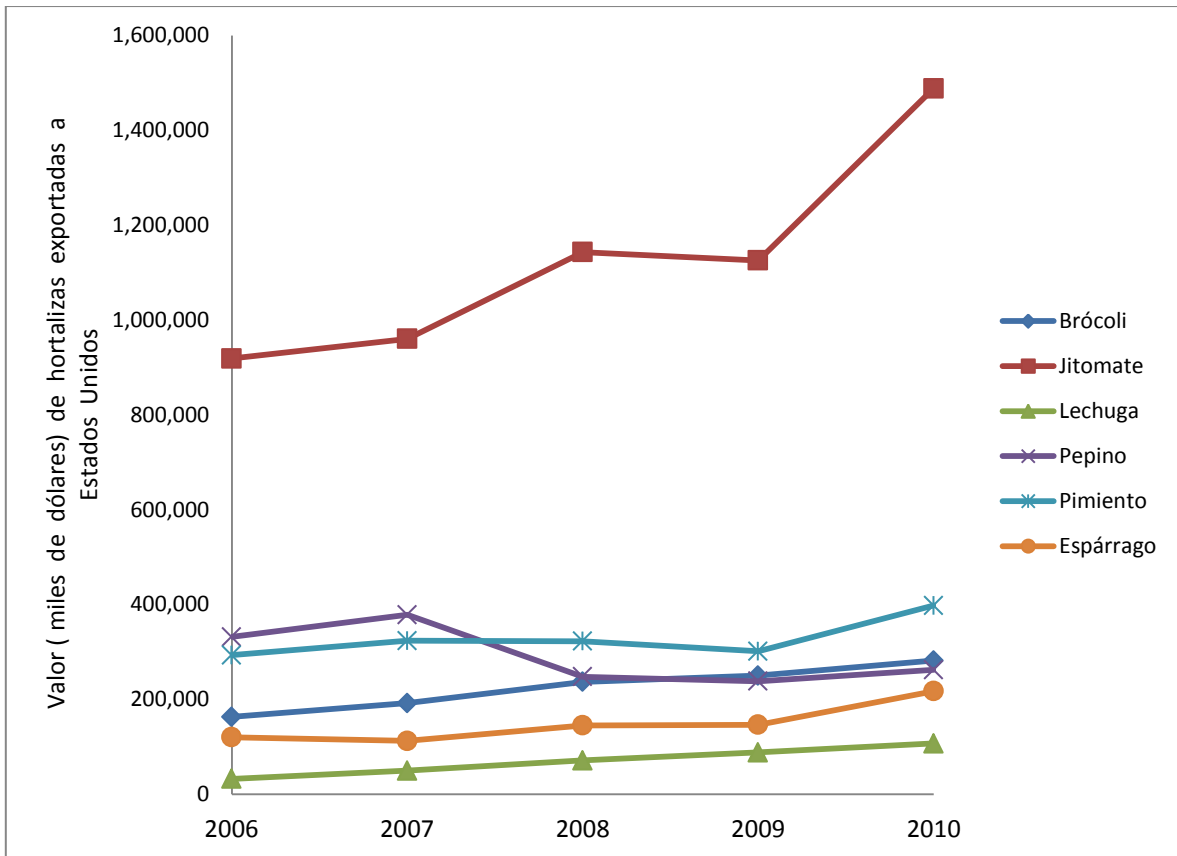


Figura 2. (Fuente: USDA, 2011). Valor de la cosecha por exportación a EE.UU. de algunas hortalizas mexicanas. Periodo 2006 - 2010

2.5 Fuentes y mecanismos de contaminación de patógenos a las F&H

La calidad de las F&H puede valorarse en cierta medida a partir de su apariencia, color, turgencia y aroma, cualidades que no son aplicables en el caso de la inocuidad. La inspección visual no permite decidir si éstas son seguras para su consumo. Su superficie muestra en general una microbiota natural inofensiva, o por lo menos intrascendente; sin embargo, esporádicamente pueden ocurrir niveles bajos de contaminación por microorganismos patógenos. Estos eventos no son descartables durante las operaciones de producción, cosecha, lavado, cortado, empackado, transporte y preparación (Caldwell *et al.*, 2003). En general se reconoce que la contaminación más significativa suele suceder en la precosecha (Sapers *et al.*, 2006). En esta etapa deben considerarse la tierra, el agua de riego, la presencia de materia fecal humana o animal, el tipo de fertilizante utilizado, el aire y las personas que atienden las tierras de cultivo.

En la poscosecha destaca la maquinaria y el equipo, los recipientes, animales domésticos y silvestres, los trabajadores, el polvo de la atmósfera y los vehículos (Fernández- Escartín, 2008; Michaels *et al.*, 2004). De manera destacada, los métodos de desinfección que se utilizan en el empacado de las frutas y hortalizas tienen un impacto importante en la carga microbiana final. En el mejor de los casos la carga se ve disminuida, pero frecuentemente este tipo de productos muestra niveles importantes de suciedad o materia orgánica. Así, cuando se pretende desinfectar con agentes químicos como el hipoclorito de sodio, éste se inactiva progresivamente, de manera que los patógenos contaminantes difícilmente se eliminan del todo en el alimento (Sapers *et al.*, 2006).

El problema del peligro microbiano, no obstante, puede no estar limitado a la contaminación. Una diversidad de factores (Figura 3) influye tanto en la composición de la flora microbiana nativa como en la sobrevivencia y desarrollo de microorganismos patógenos.

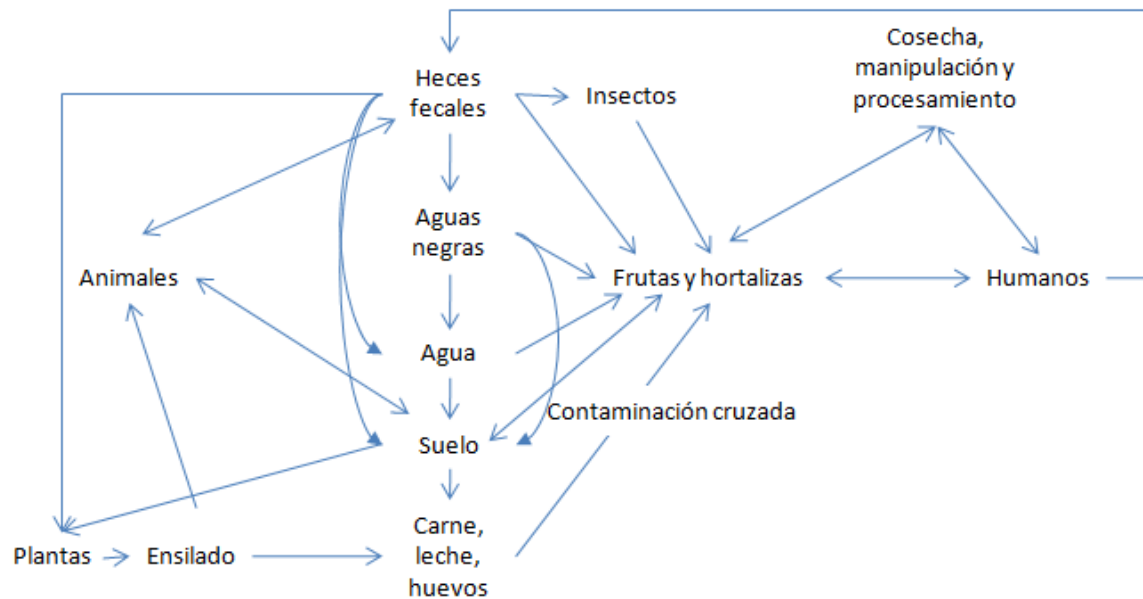


Figura 3. Mecanismos por los cuales las hortalizas frescas pueden llegar a contaminarse con microorganismos patógenos y servir como vehículos de enfermedades humanas (Beuchat, 1996).

2.5.1 Agua de uso agrícola

El agua de uso agrícola es aquella que se utiliza para cualquier actividad agronómica. Incluye el riego, lavado, enfriado, y elaboración de mezclas de fertilizantes o pesticidas (Sapers *et al.*, 2006). Agua de origen profundo la encontramos en los mantos acuíferos. Ésta se extrae a través de bombeo (Steele y Odumeru, 2005).

La calidad microbiológica del agua depende de su origen y protección ulterior (FDA, 2001). La de origen profundo generalmente es de buena calidad como resultado del proceso de depuración a la que es sometida por la naturaleza, a menos que se contamine con escurrimientos superficiales; tal es el caso de los pozos viejos que presentan grietas en su revestimiento.

El agua de irrigación contribuye directamente en la calidad microbiológica de las hortalizas. El riesgo de enfermar por la ingesta de patógenos en el agua está influenciado por el nivel de contaminación, tipo de patógenos y su persistencia en el agua, tierra y alimento (FDA, 2001). Es inexcusable asegurar que el agua se encuentre libre de patógenos cuando va a tener contacto directo con las porciones comestibles de la planta (Sapers *et al.*, 2006).

Se han aislado *E. coli*, especies de *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Shigella* spp., así como *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, *Cyrclospora cayetanensis*, *Toxoplasma gondii*, norovirus y virus de la hepatitis A (Gast y Holt, 2000) a partir los diferentes tipos de agua.

El enjuague de F&H después de la cosecha remueve gran parte de la tierra y suciedad adherida a la superficie y con ello, una importante población de microorganismos. Sin embargo, también se reconoce que el agua empleada durante el enjuague puede ser una fuente de diseminación de la contaminación hacia otros productos. Ejemplos claros de esta situación se observaron en los brotes de salmonelosis registrados en 1990 y 1993 asociados al consumo de jitomate crudo, y que dieron lugar a por lo menos 300 casos de enfermedad en cuatro entidades de EE.UU. (Wood *et al.*, 1991). Se descubrió que los jitomates en cuestión procedían de la misma empacadora en donde, al parecer, la fuente de contaminación había sido el agua empleada en su enjuague.

2.5.2 Fauna

Cualquier animal que no es utilizado como alimento para el hombre, o que simplemente se encuentra en los sitios donde estos se preparan, constituye la llamada fauna nociva. Su importancia sanitaria radica en el potencial que tienen como vehículos activos o pasivos de microorganismos patógenos, o materia extraña. La presencia de fauna nociva es incompatible con la producción o almacenamiento de alimentos de buena calidad sanitaria (Fernández-Escartín, 2008). Animales silvestres y domésticos como pájaros, venados, perros, roedores, anfibios, insectos y reptiles son reservorios potenciales de microorganismos patógenos; sus heces pueden facilitar la expansión de los patógenos en el campo, empacadoras, empresas procesadoras y distribuidoras (Sapers *et al.*, 2006; Clark, 2009).

Las aves son importantes vectores de una amplia y rápida diseminación de *Salmonella* en el ambiente (Davies y Wray, 1996). Por ejemplo, las gaviotas que se alimentan en los desagües constituyen un importante vector de *L. monocytogenes* y bacterias entéricas en la agricultura (Fenlon, 1985).

El acceso de estos animales a los invernaderos puede ser controlado; no obstante, la producción agrícola en el campo abierto es un desafío donde se facilita la invasión o simple presencia esporádica de animales silvestres. En los invernaderos se dispone de alternativas viables de prevención y control de estos animales. La solución se sustenta en una tolerancia cero a la presencia de animales silvestres. En la práctica, sin embargo, no es posible su implementación absolutamente segura.

2.5.3 Humanos

Una de las fuentes de contaminación microbiana más preocupantes hacia los alimentos es el ser humano. El hombre puede ser portador de cualquier patógeno transmisible por los alimentos, asintomático o no, manejador o consumidor, y aportar microorganismos a través de las uñas, manos, mucosa nasal y faringe, descargas broncopulmonares, contenido intestinal y orina (Green, 2005; Fernández- Escartín, 2008). Durante el cultivo de hortalizas puede contaminar directamente la tierra de cultivo cuando deposita heces fecales o directamente al manipular los productos con sus manos.

Específicamente, las manos son un importante vehículo de contaminación con microorganismos patógenos durante la obtención y manipulación de alimentos. Pueden haber sido contaminadas con microorganismos provenientes del tracto gastrointestinal, objetos o alimentos contaminados (Paulson, 2000). Una revisión de 81 brotes de ETAs atribuidos a contaminación por el personal, mostró que 89% participaba como transmisor de patógenos a través de las manos (Guzewich, 1999).

2.5.4 Tierra

La tierra es un reservorio importante de microorganismos. Es común encontrar esporas de bacterias y hongos (Fernández- Escartín, 1981). En la tierra no expuesta a contaminación fecal predominan bacterias gram positivas como corinebacterias, bacilos y micrococos que constituyen cerca de 70% de las 10^{6-9} bacterias que suelen existir por gramo de tierra (Fernández- Escartín, 1981). La presencia de bacterias patógenas en la tierra no suele ser frecuente, especialmente si se encuentra expuesta al sol.

2.6 Inocuidad alimentaria. Organismos de regulación

Como se anotó, las ETAs son un problema mundial de salud pública. La demanda por alimentos inocuos es directamente proporcional al incremento en su consumo, hecho del cual derivan dos condiciones que deben subrayarse. Por un lado, se acompaña de ingreso de divisas para los países que las exportan, o la pérdida del mismo ante el rechazo del producto por la presencia de microorganismos patógenos. Segundo, se fortalece el comercio internacional, que insiste en seguir las directrices del Codex Alimentarius en lo concerniente a la formulación y ajuste de políticas y programas de protección de la inocuidad de los alimentos dentro del marco de los sistemas nacionales de cada país. Esto propicia un manejo sanitario más comprometido ante los productos de exportación, que en teoría deberían de ofrecer la misma calidad a la de aquellos que fundamentalmente se destinan al consumo nacional. La realidad es que los países exportadores, generalmente denominados países en sub y/o en desarrollo, tienden a implementar lineamientos de prácticas sanitarias que responden a las exigencias del comprador. Esto se ha hecho evidente, por ejemplo, desde el decomiso hasta el cierre del mercado de productos provenientes de México hacia los EE.UU. (CDC, 2001).

2.6.1 Estados Unidos: FDA

EE.UU. requiere que todos los alimentos importados cumplan con los mismos estándares de seguridad alimentaria que se ejercen en la industria en ese país. Los alimentos importados deben de ser puros, saludables y elaborados bajo condiciones sanitarias.

Como es bien conocido, la FDA es el organismo estadounidense que regula la seguridad alimentaria referente a todos los productos alimenticios (exceptuando productos cárnicos y de aves y huevos) y medicamentos. A diferencia de la USDA, no requiere que los alimentos de importación sean producidos bajo los sistemas de seguridad alimentaria equivalentes a los aplicados en EE.UU.; en cambio, se basa en las pruebas intermitentes a los productos en la frontera para detectar

contaminación química y/o biológica que pudiera atentar contra la inocuidad del alimento. El volumen de alimentos de importación regulados por la FDA ha crecido rápidamente. En 2006 la FDA recibió cerca de 9 millones de embarques de productos importados, 10 veces más que la década pasada (Doyle *et al.*, 2006). Entre mayo de 2006 y abril de 2007, México fue el país con el mayor número de rechazos de alimentos de importación en EE.UU. (1,271), seguido por la India (1,109 rechazos) y China (720) (Becker, 2010). Para el periodo 2007-2009 estos números aumentaron aproximadamente 300% (México con 3,693; la India con 3,051 y China con 2,334 rechazos) (Becker, 2010) (Cuadro 6). Aunque la contaminación microbiológica no ocupa el primer lugar como tipo de rechazo, no significa que sea de menor importancia (Cuadro 7 y Cuadro 8), pues las consecuencias socioeconómicas tanto para países importadores como exportadores llegan a ser determinantes para que se siga efectuando el intercambio de alimentos. El ejemplo más conocido por su impacto socioeconómico es el del melón cantaloupe en el periodo de 2000 al 2003.

Cuadro 6. Rechazos por la FDA de los principales países exportadores a EE.UU. Entre 2007-2009.

País	Valor de importación a EE.UU*	% importación a EE.UU	Rechazos por la FDA (N° de líneas)	% de todos los rechazos por la FDA
Canadá	55.451	20.7	928	3.4
México	33.452	12.7	3.693	13.7
China	15.337	5.8	2.334	8.6
Tailandia	10.649	4.0	709	1.6
Indonesia	9.463	3.6	1.071	4.0
Italia	9.151	3.5	766	2.8
Chile	8.872	3.4	123	0.5
Brasil	7.693	2.9	262	1.0
Australia	7.681	2.9	69	0.3
Francia	6.377	2.4	422	1.6
Nueva Zelanda	5.542	2.1	22	0.1
Colombia	5.113	1.9	164	0.6
Malasia	4.760	1.8	172	0.6
India	4.690	1.8	3.051	11.3
Otros países	79.196	30.5	13.786	50.1
Total	263.427	100.0	27.011	100.0

*Valor de productos agrícolas y mariscos expresado en billones de dólares

Fuente: preparado por la base CRS en FAS BICO Import Commodity Aggregations (primeras tres columnas) y datos de OASIS (FDA) (últimas dos columnas).

Cuadro 7. Número y razón de rechazos de alimentos por la FDA según la región o país en 2007.

Razones de rechazo	Numero de rechazos por región o país								
	África	Latinoamérica y el Caribe	Canadá	México	Europa	Asia (sin incluir Japón)	Japón	Australia	Total
Aditivos alimentarios	25	108	84	259	237	812	22	14	1,561
Residuos de pesticida	2	895	100	306	85	437	5	4	1,834
Contaminación microbiológica	17	91	18	127	87	586	34	5	695
Suciedad	25	217	54	684	140	1,098	41	4	2,263
Baja acidez en enlatados	29	100	5	15	198	355	63	26	791
Etiquetado	92	525	194	304	649	1,064	52	46	2,926
Otras	186	480	419	244	1,768	2,708	152	63	6,020
Total	376	2,416	874	1,939	3,164	7,060	369	162	16,360

(Fuente: Doyle *et al.*, 2008)

Cuadro 8. Primeros países con mayor número de rechazos por EE.UU. asociados con agentes microbianos en 2007.

País	Total de rechazos (% de violaciones microbianas)	Suciedad (n° de rechazos)	<i>Salmonella</i> (n° de rechazos)
India	474 (17.4)	184	278
México	398 (14.6)	257	65
China	288 (10.5)	258	17
Vietnam	218 (8.0)	77	117
Indonesia	213 (7.8)	126	64

Un porcentaje importante de los productos rechazados se debe a la presencia de microorganismos patógenos, principalmente en pescados y mariscos. Las hortalizas son el 4° grupo de alimento con mayor rechazo, siendo México el país más destacado al respecto (Cuadro 9) (Doyle y Erickson, 2008).

Cuadro 9. Primeros cinco grupos de alimentos por orden de la cantidad de rechazos en EE.UU. asociados con microorganismos en 2007.

	Grupo de alimento	Número total de rechazos	País principal (No. de rechazos)	No. de países con rechazos
1	Pescados y mariscos	1,064	Indonesia (202)	51
2	Especies	403	India (235)	24
3	Frutas	301	China (61)	33
4	Hortalizas	266	México (136)	28
5	Queso	203	México (65)	17

Fuente: Recopilado del sitio web OASIS de la FDA. Enero a diciembre de 2007.

Participación de las hortalizas exportadas en brotes de ETAs

Aunque la contaminación microbiana en las F&H mexicanas no es la principal causa de rechazo de productos hortofrutícolas (14.6 % en 2007) por la FDA, no es de menor importancia que los otros rubros. Para decidir si un alimento se encuentra contaminado con patógenos es necesario realizar pruebas microbiológicas. Existe gran incertidumbre al determinar si el alimento es inocuo (ausencia de patógenos) porque las muestras analizadas ordinariamente no son representativas de los grandes lotes de importación. Si por azar se toman muestras de un lote contaminado, existe la posibilidad de haber retirado en el muestreo parte de la hortaliza que no estaba contaminada, ya que generalmente en estos productos la contaminación es escasa y heterogéneamente distribuida.

Consecuencias económico-sociales

La inocuidad de los alimentos es una cuestión fundamental de salud pública para cualquier país. Las enfermedades transmitidas por los alimentos como consecuencia de la presencia de patógenos microbianos, biotoxinas y contaminantes químicos representan graves amenazas para la salud de miles de millones de personas.

El acceso de los países a los mercados de exportación de los alimentos continuará dependiendo de su capacidad para cumplir los requisitos reglamentarios que imponen los países importadores. Como la producción agrícola es el punto central de las economías de la mayor parte de los países en desarrollo, estas medidas de protección de los alimentos revisten importancia fundamental. Grandes brotes asociados a *E. coli* y *Salmonella* han puesto de manifiesto la magnitud de los problemas de la inocuidad de los alimentos y acentuado en la opinión pública la convicción de que los modernos sistemas de explotación agrícola deben ser modificados.

Brotos de Salmonella por consumo de melón cantaloupe

Un ejemplo citado de manera recurrente, es el de los brotes por consumo de melones 'Cantaloupe' contaminados con *Salmonella entérica* Poona. Fueron tres brotes sucesivos multiestatales en EE.UU. que ocurrieron en el verano de 2000 (47 casos), 2001 (50 casos incluyendo dos muertes) y 2002 (58 casos) (CDC, 2002). En 2000 y 2001 la FDA evaluó los ranchos donde se produjeron los melones e identificó varias fuentes de contaminación posibles en el campo y durante el lavado y empaquetado del melón. Se encontró que las medidas de protección a la inocuidad del producto eran insuficientes, así que en 2001 los melones de este productor se mantuvieron en bodegas y efectivamente, se cerró frontera al productor. Sin embargo, después del brote del 2002, la FDA emitió una alerta a todos los productores de melón 'Cantaloupe' de México, prohibió las importaciones mientras el gobierno mexicano desarrolló un programa de certificación bajo la cual se permitiera reanudar el comercio. Fue detectado subsecuentemente que los melones que provocaron los brotes del 2002 fueron producidos en un solo rancho y que habían sido mal etiquetados para evadir que EE.UU. mantuviera en reserva de importar sus productos por lo establecido en 2001 para esa empresa. El productor se declaró culpable y se castigó con una multa de 5 millones de dólares. Los brotes recurrentes condujeron a mejoras en los niveles de producción y regulación mexicanos y los brotes por *Salmonella* Poona cesaron. Esto evidenció que los puntos de contaminación fueron controlados y las exportaciones de melón cantaloupe mexicanos continuaron. Sin embargo, el nivel de exportación de estos melones aún no se ha recuperado (USDA, 2011); prueba de ello es que en la actualidad el nivel es aproximadamente 16% del valor (miles de dólares) exportado en 1999 (Figura 4).

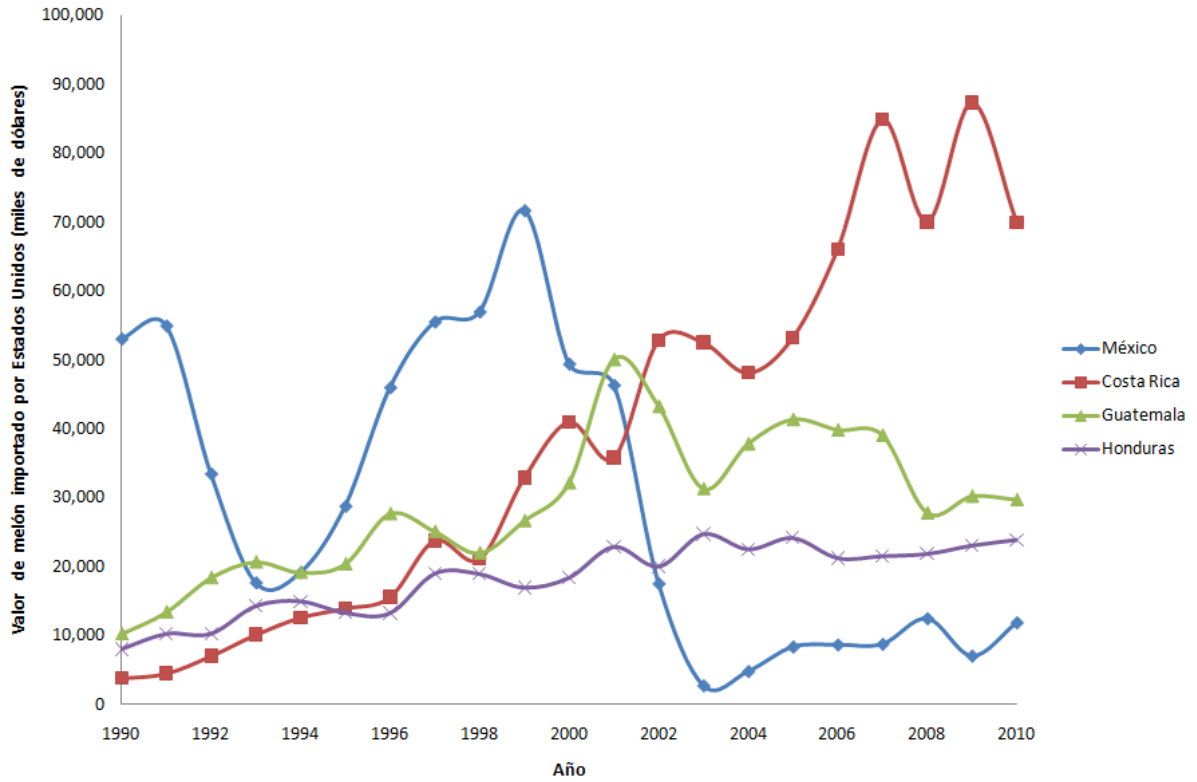


Figura 4. Valor de las importaciones de melón Cantaloupe en EE.UU. Periodo 1990- 2010 (USDA, 2011).

En un estudio realizado por la FDA, se recopiló información epidemiológica para conocer el origen de las hortalizas vehículo de transmisión de patógenos causantes de ETAs del periodo 1998-2002. En diez de 34 brotes, las hortalizas mexicanas fueron confirmadas como el vehículo de patógenos y en dos más como sospechosas (Figura 5) (Smith, 2011)

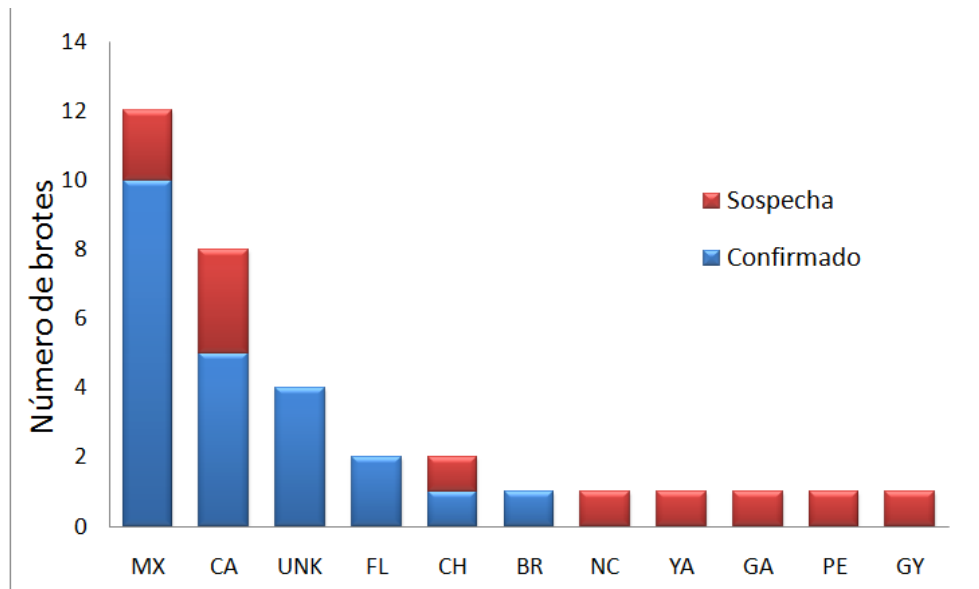


Figura 5. Origen de hortalizas implicadas en brotes de ETAs. Periodo 1998- 2002
Fuente: Smith, 2011.

2.6.2 México: SAGARPA

En 2010 la SAGARPA estableció nuevos requisitos para la certificación de las empresas para exportación de productos hortofrutícolas. El objetivo es la reducción de riesgos de contaminación en la producción primaria de alimentos de origen agrícola, y pretende demostrar la aplicación de prácticas sanitarias y la disponibilidad de una buena infraestructura sanitaria. Esta evaluación se efectúa en el campo, durante la cosecha y en el área de empaque y se apoya con pruebas de laboratorio. Los análisis reflejan la eficiencia de los procedimientos de higienización de superficies y de hortalizas cuando se utilizan microorganismos indicadores.

2.6.3 Microorganismos indicadores

El recurso más efectivo para verificar las prácticas sanitarias de operación, incluido el lavado y desinfección de F&H y de las superficies de trabajo, consiste en el uso de microorganismos indicadores. Constituyen un grupo especial dentro de la flora nativa de los alimentos y del ambiente cuya presencia y concentración guarda relación con la eficiencia de los procesos de verificación referidos. La determinación de su concentración en los materiales antes y después de exponerse a los tratamientos, proporciona una medida de fácil manejo y relativamente consistente de evaluación, cuando se controlan factores propios de cada tratamiento y de los materiales implicados. Han sido utilizados las bacterias mesófilas aerobias, las *Enterobacteriaceae*, los coliformes totales, coliformes fecales y *E. coli*.

2.6.3.1 Bacterias mesófilas aerobias (BMA)

Las bacterias mesófilas aerobias forman parte de un extenso grupo de microorganismos muy heterogéneos, que tienen en común la capacidad de desarrollar en las condiciones ecológicas que requiere la prueba: un medio de cultivo de composición definida, la condición de aerobiosis y la temperatura y tiempo de incubación. Entre los microorganismos que pueden desarrollar se encuentran algunos patógenos.

La importancia que el recuento de las BMA tiene en las F&H es conocer las condiciones sanitarias del equipo que tiene contacto directo con estos productos después de haber sido lavado y/o desinfectado, y una forma para valorar la eficiencia de los tratamientos aplicados.

2.6.3.2 Familia *Enterobacteriaceae*

Microorganismos indicadores de gran utilidad, porque aportan información acerca de las posibles condiciones en las cuales el alimento fue tratado. El uso del grupo *Enterobacteriaceae* como indicador de calidad sanitaria es mejor que los coliformes porque los primeros están taxonómicamente mejor definidos, son más

abundantes e incluyen especies fermentadoras de la glucosa y patógenas como *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*. En Europa, el grupo *Enterobacteriaceae* ha sido usado ampliamente como indicador de la calidad de los alimentos, en tanto que se recurre a los coliformes y coliformes fecales tradicionalmente en EE.UU. (Keith, 2001), esto es, sólo se incluyen las bacterias fermentadoras de la lactosa.

Mossel *et al.* (1990) recomiendan el examen *Enterobacteriaceae* de los alimentos en lugar de los coliformes en un intento por obtener una mejor estimación de los microorganismos glucosa positivos y lactosa negativos de la microflora de los alimentos.

2.6.3.3 Coliformes totales (CT) y fecales (CF)

El concepto de organismos coliformes, aplicado originalmente para referirse a todas aquellas bacterias semejantes a la *E. coli* en su hábitat, morfología y cultivo, ha llegado por el uso a conformar un grupo de microorganismos que comparten ciertas características cuyas relaciones taxonómicas entre sus miembros son más bien fortuitas (Fernández- Escartín, 2008). Esto ha sido la consecuencia del manejo especial que se hace de ellos como indicadores de la calidad sanitaria del agua y alimentos.

Los coliformes se definen como bacilos gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa con producción de gas dentro de 48 h de incubación a 35 °C. Este grupo pretende involucrar aquellos microorganismos propios del contenido intestinal, aunque existen algunos inconvenientes de la utilización de la prueba: bacterias (*e.g. Enterobacter aerogenes*) que no son exclusivos del contenido intestinal y fermentan la lactosa. De modo contrario, algunas cepas de *E. coli* son lentas fermentadoras de la lactosa (patógenas) y quedan fuera de la definición al no ser detectadas durante el ensayo (Fernández- Escartín, 2008).

Los coliformes se inactivan por tratamientos térmicos relativamente moderados (temperaturas de 70°C), la luz ultravioleta y una concentración de cloro residual de 0.1-0.3 mg/L en el agua potable (Fernández- Escartín, 2008).

El grupo de los coliformes fecales son aquellos coliformes que fermentan la lactosa con producción de gas a 44.5-45.5°C. Se pretende que este grupo de microorganismos sea un indicador directo más confiable de contaminación con materia fecal ya que la mayoría de los coliformes provenientes de esta fuente fecal fermentan la lactosa con producción de gas bajo estas temperaturas. Sin embargo, Geldreich (1970) encontró que de miles de cepas aisladas de heces fecales humanas y animales el porcentaje que no producía gas a 44.5°C osciló entre 0.4 y 7.1, el correspondiente a las cepas provenientes de verduras, insectos y tierra fue entre 14.5 a 22.9. Con la finalidad de poner de manifiesto alguna relación entre la positividad a la prueba de coliformes fecales y la presencia de *E. coli* y otros géneros. Ruiz (2007) aisló cepas de bacterias a partir de tubos positivos a la prueba de coliformes fecales y las identificó bioquímicamente. Encontró que sólo 44.6% contenía *E. coli*. En muestras de agua de pozo profundo, el total de las muestras aisladas de la prueba de coliformes fecales respondió al perfil microbiano de *Enterobacter*, es decir, gérmenes ambientales de procedencia no fecal. Sin embargo, en México, la SAGARPA sigue recurriendo a la cuantificación de coliformes fecales en hortalizas como indicadores de malas PSAs. De tal manera que los departamentos gubernamentales están obligados a emplear este grupo indicador (SAGARPA_(a), 2010).

2.6.3.4 *E. coli*

E. coli ha sido usado históricamente como indicador de contaminación fecal. A diferencia de los coliformes o coliformes fecales, tiene bases taxonómicas bien establecidas (Fernández-Escartín, 2000). Es el típico coliforme porque se trata de una bacteria cuyo hábitat natural es el intestino de los animales de sangre caliente. En la materia fecal sus niveles oscilan entre 10^6 y 10^9 UFC/g.

Un inconveniente del empleo de *E. coli* como indicador radica en que tiende a morir en ambientes secos, congelados o con pH bajo, lo que puede ocasionar que cierta población de *E. coli* sufra daño subletal. Ante esta situación el microorganismo puede no ser detectado con las técnicas ordinarias, a menos que se recurra a los medios recomendados para su resucitación (FDA/CFSAN, 2001).

En las hortalizas sin embargo, su presencia es sugestiva de contaminación fecal reciente considerando que en ausencia de materia fecal no suele existir en estos productos, y su tendencia es más bien a morir.

Una cualidad elemental pero sobresaliente en la diferenciación de las cepas patógenas intestinales de *E. coli* con respecto a las no patógenas, es la limitada capacidad de las primeras para fermentar la lactosa (Fernández- Escartín, 2008). *E. coli* posee las características del microorganismo indicador ideal: no es patógena, de fácil y rápida detección, comparte el hábitat de los patógenos entéricos y posee características de sobrevivencia similares (Scott *et al.*, 2002). Adicionalmente, por lo general se encuentra en concentraciones mucho más elevadas que los patógenos que pudiera predecir.

La detección de la especie *E. coli* se lleva a cabo por medio de una pruebas que genera tres posibles respuestas con el medio lauril sulfato más MUG cuando se incuba a $44.5^{\circ}\text{C} \pm 0.2$: (1) la reacción de MUG (fluorescencia a la luz UV por reacción de la glucoronidasa sobre el sustrato 4-metilumbeliferil- β -D-glucoronido), (2) fermentación de la lactosa y (3) producción de indol. La prueba se aplica sin tener que recurrir al empleo del cultivo puro de la bacteria.

2.6.4 Microorganismos patógenos

2.6.4.1 *Salmonella* spp

Dentro de los microorganismos de interés sanitario en las F&H, destaca *Salmonella*, bacilo móvil, Gramnegativo de la familia *Enterobacteriaceae*. Es de singular relevancia por su participación en brotes de enfermedad asociado a su consumo. Este patógeno muestra cierta capacidad para sobrevivir a factores ambientales, cualidad que favorece su aislamiento de diversos materiales. Su hábitat natural es el intestino del hombre y animales; por tanto, es expulsada a través de las heces fecales. Se le ha aislado del medio ambiente, hortalizas en cultivo, animales silvestres, domésticos, de explotación y nocivos, de humanos enfermos, asintomáticos o convalecientes, de utensilios y fomites (Fernández- Escartín, 2008).

La sobrevivencia de *Salmonella* fuera del cuerpo humano y de los animales está afectada por condiciones ambientales como la humedad, temperatura, exposición de agentes germicidas y la composición del material implicado (Lee, 1978).

De manera natural los vegetales se contaminan por *Salmonella* a través del contacto directo o indirecto con materia fecal humana o animal. Los agentes etiológicos asociados a brotes por F&H son vastos, con predominio de *Salmonella* spp y *Shigella* spp (Beuchat, 2002; Sewell y Farber, 2001; Sivapalasingam *et al.*, 2004).

Salmonella se ha asociado a brotes por consumo de jitomate, sandía, melón, naranja, cidra, germinados y otros (Matthews, 2006). Para su aislamiento hay que considerar las características propias del alimento, que permitan la remoción de la superficie del alimento (Ukuku y Fett, 2002).

2.6.4.2 *L. monocytogenes*

El género *Listeria* contiene seis especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. seeligeri* y *L. grayi*. Todas Gram positivas, bacilos no esporulados con diámetro 0.5 µm y largo de 0.5-2.0 µm. Es anaerobio facultativo, catalasa positivo, oxidasa negativo y presenta movilidad a 20 a 25°C (Seeliger y Jones, 1986).

Destaca entre los demás patógenos por algunas características singulares: amplia distribución en el medio ambiente, capacidad psicrótrófa extrema que le permite proliferar a temperaturas cercanas a 0°C, elevada letalidad en los casos de listeriosis y gran potencial para colonizar el equipo y nichos diversos dentro de las plantas procesadoras (Ludén, 2000; Ramaswamy, 2007). Se adhiere y forma biopelículas en diversas superficies, tales como acero inoxidable, hule, vidrio, plásticos, madera y otros (Blackman y Frank, 1996), que son comunes en los sitios donde se procesan alimentos. La adhesión puede ocurrir al cabo de pocos minutos a bajas o medianas temperaturas (Mafu *et al.*, 1990). Algunas cepas específicas se manifiestan dominantes y muy persistentes dentro de un sitio particular; su capacidad de adherencia es más acentuada (Lundén *et al.*, 2000).

La presencia de *L. monocytogenes* en cultivos es bien conocida (Weiss y Seeliger, 1975). Este microorganismo ha sido aislado de rábanos, pepinos, calabazas, coliflor, jitomates, lechuga, apio, cebollas, zanahorias y papas (Schlech *et al*, 1983; Ho *et al.*, 1986; Heisick *et al.*, 1989). En diversas ocasiones *L. monocytogenes* ha sido el agente etiológico de brotes de ETAs (Schlech *et al*, 1983; Ho *et al.*, 1986). Recientemente se presentaron cuatro brotes de listeriosis por consumo de melón ‘Cantaloupe’ en EE.UU. Los brotes iniciaron en julio de 2011. El número de personas infectadas ascendió a 116 y 23 muertes (CDC, 2011).

2.7 Acciones de prevención y control de los peligros microbianos

Un producto con aceptable nivel de inocuidad microbiana se consigue mediante: A) la ejecución de prácticas sanitarias a lo largo de la cadena agroalimentaria, desde la producción primaria en el campo, distribución y comercialización, hasta el consumo; B) la aplicación de S-APPCC. El problema es que a lo largo de la cadena pueden irse sumando acciones o situaciones que conduzcan finalmente a un producto de cuestionable inocuidad debido principalmente a la contaminación con patógenos. Es posible cancelar o mitigar este problema si se implementan acciones preventivas contra la contaminación, sobrevivencia y/o desarrollo de microorganismos patógenos.

La disminución de la contaminación puede lograrse a través de adecuadas maniobras durante el cultivo y cosecha. La validez de estas prácticas proviene del conocimiento del hábitat de los patógenos potencialmente presente en las F&H, su comportamiento en el alimento y la eficiencia de los tratamientos dirigidos a cancelar/ reducir su presencia o desarrollo. Son conocidas en conjunto como prácticas sanitarias agrícolas (PSAs).

Las PSAs y las prácticas sanitarias de operación (PSO) tienen como meta llevar a su mínima expresión el riesgo de contaminación de los alimentos en el continuo del campo a la mesa. Se refieren al conjunto de operaciones generales de producción de las F&H empleadas en el cultivo, la cosecha, la selección, el

empaques, el almacenaje y el transporte e higiene del trabajador, efectuadas en el campo (Bihn, 2006).

2.7.1 Análisis de peligros y puntos críticos de control

Este S-APPCC es un enfoque efectivo y racional para asegurar la inocuidad de los alimentos desde la cosecha hasta el consumo (FDA, 1998). Su objetivo es prevenir los peligros microbianos en los alimentos y acercarse cuanto sea posible al alimento inocuo. Los principios que le dan sustento están basados en el conocimiento científico (Fernández- Escartín, 2008). Funciona más eficazmente cuando se aplica de manera concurrente con los programas de aseguramiento de la calidad. Elementos implícitos fundamentales del sistema son las operaciones sanitarias de producción y distribución, la adecuada sanidad, y el diseño y mantenimiento del equipo. Requiere la satisfacción de ciertos prerrequisitos y acciones preliminares entre las que se incluyen la capacitación del personal y la disponibilidad de recursos elementales, como la dotación de agua potable, protección contra la fauna y la implementación de las PSAs y PSO (Abadias *et al.*, 2008).

Ejecutadas estas acciones es necesario identificar los peligros específicos para implementar medidas de control que se monitorean de manera continua o periódica. Finalmente, si las acciones en el proceso de elaboración del alimento no cancelan las oportunidades de contaminación, sobrevivencia y desarrollo de agentes patógenos, lo recomendable es modificar el proceso (Abadias *et al.*, 2008). Un plan APPCC es específico para cada producto y proceso.

2.7.2 Verificación de procesos de lavado y desinfección de superficies y hortalizas

La detección de patógenos humanos en las F&H crudas y la ocurrencia de brotes de ETAs asociados a alimentos contaminados, representan serios problemas de salud pública con alto costo económico. Consecuentemente, es de

interés para la industria alimentaria el desarrollo de acciones encaminadas a la reducción de la contaminación microbiana. Si esta se presenta durante el cultivo o la cosecha, la mejor opción se apoya en la implementación de prácticas sanitarias agrícolas (Sapers *et al.*, 2006). Como esta acción no permite una eliminación absolutamente segura, incluso ajustándose a prácticas sanitarias, el productor o procesador dependerá de acciones correctivas de lavado y desinfección como segunda barrera protectora.

Los procesos de lavado y desinfección tienen la función de remover la suciedad y disminuir la carga microbiana de los materiales. Se admite en general que la simple remoción de la suciedad con agua y detergente (lavado) puede remover hasta 1 log de carga microbiana. Una desinfección adicional removerá alrededor de 2 - 5 log de la carga dependiendo del agente germicida y condiciones de aplicación que se utilicen. Resulta evidente la necesidad de comprobar la eficiencia de estos tratamientos para asegurar la calidad microbiológica de los alimentos.

2.7.2.1 Germicidas aplicados a las frutas y hortalizas en la industria

En la industria se utilizan germicidas que reducen al menos 3 log la población de microorganismos. Los principales germicidas utilizados se pueden agrupar como (Sapers *et al.*, 2006):

- Mezclas de ácido peracético con agua oxigenada
- Derivados halogenados
- Agentes de oxidación
- Aldehídos
- Compuestos de amonio cuaternario
- Agua electrolizada

Dos de ellos son especialmente utilizados para tratar F&H y materiales asociados a las etapas de cosecha y empaclado: hipoclorito de sodio y sales cuaternarias de amonio (Beuchat *et al.*, 1998; Sidhu *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2011).

Hipoclorito de sodio (NaClO)

El cloro es el germicida más comúnmente utilizado en la industria para tratar alimentos crudos (Foley *et al.*, 2004). Su actividad antimicrobiana depende de la cantidad de cloro disponible como ácido hipocloroso no disociado (HClO) en el agua que se pone en contacto con los microorganismos (Pirovani *et al.*, 2006).

Para desinfectar las F&H de manera comercial, se utiliza comúnmente el cloro en concentraciones de 50 a 200 ppm con tiempo de contacto de 1 a 2 minutos (CFR, FDA, 2001); con una reducción de bacterias de no más de 3 log (Beuchat, 1998). Una ventaja del cloro es su amplio espectro antimicrobiano, fácil aplicación y bajo costo; en contraparte, es altamente corrosivo. Presenta un potencial mutagénico entre los productos secundarios de sus reacciones con los compuestos orgánicos de los alimentos (Beuchat, 1998). Asimismo, cuando una solución clorada se pone en contacto con la superficie del producto, el desinfectante reacciona con la materia orgánica (tejido celular, jugos celulares, partículas de suelo, microorganismos), mermando los efectos del germicida (Puig-Durán, 1999; Pirovani *et al.*, 2006).

El ion hipocloroso (OCl^-) y el oxígeno (O) generados con la mezcla del hipoclorito de sodio con el agua, no poseen efectos germicidas. La molécula sin ionizar del HClO, en cambio, puede penetrar la pared de la célula bacteriana e interferir con enzimas que contienen sulfhidrilo, los cuales intervienen en el metabolismo de la glucosa. La inhibición de sistemas enzimáticos esenciales acarrea la muerte de la célula (Vignoli, 2008).

Sales cuaternarias de amonio

Los compuestos de amonio cuaternario son una familia de compuestos antimicrobianos, considerados como agentes activos catiónicos potentes como germicidas (Puig-Durán, 1999). Son activos para eliminar bacterias Grampositivas y Gramnegativas, aunque afecta a éstas últimas en menor grado. Son bactericidas, fungicidas y viricidas. Su actividad la desarrollan más eficientemente en medio alcalino. Se enlazan positivamente a los sitios negativamente cargados de la pared bacteriana de la célula. Estos enlaces electrostáticos dan lugar a

tensiones en la pared de la célula. También interfieren con el flujo normal de compuestos críticos en la fisiología de la membrana de la célula (Puig-Durán, 1999).

Peróxido de hidrógeno

Son ejemplos de agentes oxidantes el ozono, el ácido peracético y el peróxido de hidrógeno, el cual se utiliza con mayor frecuencia. Concentraciones de 3-6% el peróxido de hidrógeno destruye de manera eficaz la mayor parte de las bacterias; en concentraciones más altas (10 a 25%) provoca la destrucción de todos los microorganismos, incluidas esporas. La forma oxidante activa no es el peróxido de hidrógeno, sino el radical hidroxilo libre formado tras su descomposición (Murray *et al.*, 2006). Es más inocuo que el cloro para el ser humano y para el medio ambiente.

Se suministra en forma de solución al 3% lista para usar, o como solución acuosa al 30% que debe ser diluida hasta 5 a 10 veces su volumen en agua. Sin embargo, estas soluciones al 3-6% por sí solas son relativamente lentas y limitadas como germicidas. Los productos disponibles hoy en día tienen otros ingredientes para estabilizar el contenido de peróxido de hidrógeno, acelerar su acción germicida y hacerlo menos corrosivo.

El peróxido de hidrógeno y el ácido peracético pueden ser corrosivos para metales como aluminio, cobre, latón y zinc. También pueden decolorar tejidos, cabellos, piel y mucosas. Se deben de almacenar lejos del calor y protegidos de la luz (OMS, 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Valorar la incidencia de *Salmonella* spp y de microorganismos indicadores en seis diferentes hortalizas como recurso para verificar las prácticas sanitarias agrícolas que se aplican durante su cosecha y empaque en diez empresas exportadoras.

3.2 Objetivos particulares

1. Efectuar estudios observacionales sobre la infraestructura y condiciones sanitarias de operación en diez empresas exportadoras de hortalizas.
2. Determinar la incidencia de *Enterobacteriaceae*, coliformes fecales, *E. coli*, *Salmonella* spp y *L. monocytogenes* en las hortalizas y materiales asociados durante la cosecha y el empackado.
3. Determinar el grado de asociación entre las prácticas de operación y los niveles de los microorganismos indicadores y patógenos en las hortalizas y materiales asociados y valorar su empleo como recurso de verificación de las prácticas agrícolas.

4 MATERIALES Y METODOS

4.1 Materiales

Autoclave eléctrica de mesa, 121 °C (Market-Forge, Sterilimatic)
Balanza analítica digital, 120g x 0.0001g (Sartorius)
Balanza granataria, sensibilidad 0.1 g, Modelo No. CT200-S (OHAUS)
Baño María de precisión de 44.5 ± 0.2 °C Modelo 251 (Precisión Scientific)
Bolsas de poli-papel en rollo sin marca comercial diferentes tamaños
Bolsas de polietileno capacidad 500 mL (Whirl - Pack)
Campana de flujo laminar (Alder y Veco)
Centrifuga de mesa (HermLe)
Cuenta colonias (Québec Reichert-Jung)
Homogenizador (Stomacher, Seward 400)
Horno para esterilización (Shel-lab)
Incubadora de 35° (Pecision Scientific, Seward 400)
Incubadora de 30° (Pecision Scientific, Seward 400)
Lámpara de luz U.V. Modelo 56 (Blas-Ray)
Microscopio luminoso (Leica)
Potenciómetro óptico (Jenway), modelo 3510
Vortex, modelo G650 Scientific Industries Inc (Daiger Vortex Genie 2)
Micropipetas 2-1000 µl (Labsystems)
Unidades de filtración (Millipore)

4.1.1 Medios de cultivo

Agar Base Sangre (ABS), (BD Bioxon)
Agar cuenta estándar (ACE), (BD Bioxon)
Agar rojo violeta bilis con 1% glucosa (ARVBG), (BD Bioxon)
Agar sulfito bismuto (ASB), (BD Bioxon)
Agar xilosa lisina desoxicolato de sodio (XLD), (BD Bioxon)
Agar soya tripticasa (AST), (BD Bioxon)

Agar eosina azul de metileno (EMB), (Becton Dickinson)

Agar hierro y triple azúcar (TSI), (BD Bioxon)

Agar hierro lisina (LIA), (BD Bioxon)

Caldo lactosado (CL), (BD Bioxon)

Caldo lauril sulfato mas MUG (CLF), (BD Bioxon)

Caldo tetrionato (CTT), (BD Bioxon)

Caldo Rappaport Vassiliadis (CRV), (BD Bioxon)

Caldo soya tripticasa (CST), (BD Bioxon)

Caldo urea, (BD Bioxon)

Caldo soya tripticasa con extracto de levadura al 0.6%

4.1.2 Soluciones

Diluyente de peptona 0.1% (DP) (Peptona de caseína, BD Bioxon)

Solución salina isotónica (SSI) 0.85% (cloruro de sodio, Productos Químicos Monterrey)

Alcohol al 70%

4.1.3 Reactivos y colorantes

Coloración de Gram (cristal violeta, safranina, lugol, alcohol etílico 95%), (Sigma Chemical Co.)

Rojo de metilo, (Sigma Chemical Co.)

Antisuero polivalente A-I y Vi para *Salmonella* (DIFCO)

4.2 Métodos

4.2.1 Estudio observacional de las condiciones sanitarias de operación en las empresas exportadoras de hortalizas.

Se realizaron de una a seis visitas a cada empresa productora de hortalizas localizadas en los estados de Querétaro y Guanajuato. El periodo de muestreo se extendió de junio de 2010 a marzo de 2011. En cada visita se observaron las condiciones sanitarias de infraestructura y de operación. De los lineamientos sanitarios establecidos por SENASICA (2010) para la certificación en sistemas de reducción de riesgos de contaminación en la producción primaria de alimentos de origen agrícola, se seleccionaron las violaciones más significativas por su impacto en la inocuidad de los productos agrícolas y su cumplimiento se registró en un formato (Anexo A).

4.2.2 *Enterobacteriaceae*, coliformes fecales, *E. coli*, *Salmonella* spp y *L. monocytogenes* en las hortalizas y materiales asociados durante la cosecha y empaçado

4.2.2.1 Muestras. Programa de muestreo

Se colectaron hortalizas y superficies de materiales asociados durante su cultivo y empaque. Las hortalizas estudiadas y los métodos de cultivo y lugar de empaque se muestran en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Hortalizas y métodos de cultivo de cada empresa.

EMPRESA	Hortaliza	Tipo de cultivo	Lugar de empaque
A	Espárrago	Tradicional	Empacadora
B	Pepino gourmet	Invernadero	Empacadora
C	Lechuga bola	Tradicional	Tabla de cultivo
D	Brócoli	Tradicional	Tabla de cultivo
E	Jitomate orgánico	Invernadero	Empacadora
F	Jitomate	Invernadero	Empacadora
G	Pimiento morrón	Invernadero	Empacadora
H	Pepino europeo orgánico	Invernadero	Empacadora
I	Lechuga bola	Tradicional	Tabla de cultivo
J	Jitomate	Invernadero	Empacadora

El programa de muestreo se describe en el Cuadro 11. Las muestras de las hortalizas y de las superficies estuvieron conformadas como se indica en el Cuadro 12. Se analizaron muestras compuestas de hortalizas, que consisten en un conjunto de unidades de cada hortaliza (Cuadro 12). De esta manera se amplía el área de cultivo muestreada y se obtiene una imagen más consistente y representativa de las poblaciones microbianas estudiadas.

Cuadro 11. Puntos de muestreo de las hortalizas, agua y superficies.

Muestra	Punto de muestreo
Hortaliza	Cultivo Empacadora
Agua	Pozo Reservorio Lavabo Para consumo humano
Piso o tierra	Invernadero Tabla de cultivo
Superficies	Manos y/o guantes Equipo y maquinaria de la empacadora Cajones de transporte de las hortalizas Herramienta de corte

Cuadro 12. Conformación de las unidades experimentales de las hortalizas y superficies de trabajo estudiadas.

Tipo de muestra	Unidad experimental
Brócoli*	10 g
Espárrago	6 piezas
Jitomate bola	6 piezas
Lechuga*	10 g
Pepino europeo	2 piezas
Pepino gourmet	5 piezas
Pimiento morrón	4 piezas
Manos y guantes	1 par
Tijeras, cuchillos	1 pieza
Contenedores y mesas de empaque	400 cm ²

* Para la determinación de los microorganismos indicadores se analizaron 10 gramos; y para la determinación de patógenos 25 gramos. Mientras que para las demás hortalizas (integras) se analizaron por unidades experimentales independientemente del tipo de microorganismo a analizar.

4.2.2.2 Preparación de las muestras

4.2.2.2.1 Hortalizas

A las muestras compuestas de espárrago, jitomate bola, pepino europeo, pepino gourmet y pimiento morrón se agregaron 100 mL de DP. Cada fruto se frotó durante un minuto con las manos desde el exterior de la bolsa para desprender los microorganismos de la superficie, cuidando no dañar la integridad física del alimento.

A las muestras de brócoli y lechuga se adicionaron 90 mL de DP y se homogenizaron a velocidad media en el estomaquer durante un minuto.

4.2.2.2.2 Agua

Pozo profundo, estanque y lavabos

Todas las muestras consistieron en volúmenes de 300 a 500 mL colectadas en bolsas Whirl pak®. La parte exterior de las bolsas fue asperjada con alcohol a 70% antes de su uso.

Las llaves donde se colectó agua de pozo profundo y de lavabo fueron previamente cepilladas con agua y jabón, y frotadas con alcohol a 70%. El agua se dejó correr durante 30 segundos antes de la toma.

A las muestras de agua clorada se les adicionó tiosulfato de sodio (Na_2SO_3) estéril para su inactivación.

4.2.2.2.3 Pasillos dentro del invernadero

Se muestrearon 50 m a lo largo del pasillo de acuerdo con Harris *et al.* (2007) arrastrando una torunda de Moore humedecida con leche descremada estéril. La torunda se colocó en una bolsa de plástico comercial y se homogenizó durante 1 minuto a velocidad media en estomaquer.

4.2.2.2.4 Tierra y composta

Se colectó tierra y/o composta de diferentes zonas de las tablas de cultivo (aproximadamente un kilogramo por muestra). Se colocaron 10 g en 90 mL de DP y se homogenizaron en el estomaquer durante un minuto a velocidad media.

4.2.2.2.5 Superficies

Se colectaron muestras antes y después del proceso de lavado/desinfección. Se utilizaron 100 mL de DP para las superficies antes del tratamiento, y 30 mL de caldo neutralizante (CN) para las tratadas. El CN contiene tween 80 y lecitina, agentes neutralizantes de antimicrobianos como cloro, yodo, sales cuaternarias de amonio. Su función es inhibir residuos de germicidas en las superficies muestreadas.

Manos y/o guantes

Entre trabajadores de la cuadrilla de cosecha y empaque seleccionados al azar se muestrearon ambas manos y/o guantes. Se sumergieron las manos (una por una) en la bolsa de plástico comercial con el DP o CN y se frotaron durante 1 minuto desde el exterior para desprender los microorganismos.

Contenedores para transporte de las hortalizas, mesas en empacadora y equipo de corte

Se utilizó gasa estéril (3x4 cm) humedecida con DP o CN para frotar 400 cm² de los contenedores y mesas, o para el cuchillo y tijeras. Se depositó cada gasa en bolsa de polipapel con los 100 mL de DP o en 30 mL de CN. El contenido se homogenizó por un minuto a velocidad media en estomaquer.

4.2.2.3 Análisis microbiológicos

Las muestras fueron analizadas dentro de las 24 horas posteriores a la colecta. En el Cuadro 13 se especifican los microorganismos indicadores y patógenos determinados para cada tipo de muestra.

Cuadro 13. Especificación de los microorganismos analizados en hortalizas, superficies de trabajo, piso y agua.

Hortalizas	Manos y guantes	Contenedores, mesas, equipo de corte	Tierra y pasillos	Agua
ENT ¹	ENT	ENT	CF	CT
CF	CF	CF	EC	CF
EC	EC	EC	SAL	EC
SAL		SAL		BMA
LM		LM		

¹ ENT, *Enterobacteriaceae*; CT, coliformes totales; CF, coliformes fecales; EC, *E. coli*; SAL, *Salmonella* spp; LM, *L. monocytogenes*; BMA, bacterias mesófilas aerobias.

4.2.2.3.1 Bacterias indicadoras

BMA (vaciado en placa)

Se utilizó agar cuenta estándar (ACE) y las placas se incubaron a 35°C/24h (Peeler y Maturin, 1992).

Enterobacteriaceae

Se utilizó la técnica de vaciado en placa con agar rojo bilis violeta más 1% de dextrosa (ARBV-G). Las placas fueron incubadas a 35°C durante 24 h según Kornacki y Johnson (2001).

Coliformes totales, coliformes fecales y *E. coli*

Se usó la técnica de NMP para coliformes totales, fecales y *E. coli*. El esquema de aislamiento se describe en el Anexo B (Swanson *et al.*, 2001). La serie de tubos para la técnica del NMP se anotan en el Cuadro 14.

Cuadro 14. Serie de volúmenes de muestra inoculados para el pre-enriquecimiento con caldo lactosado (CL).

Muestra	Serie de tubos (mL del homogenizado o muestra)			
Hortalizas ¹ , manos ² , guantes ² y superficies ³	1 (10)	1 (5)	1 (0.1)	1 (0.01)
Agua	5 (10)	2 (1)		
Tierra y composta	3 (0.1)	3 (0.01)	3 (0.001)	

¹ Unidad experimental (Cuadro 12)

² Dos manos o guantes

³ 400 cm²

El cálculo se realizó empleando la aproximación de Thomas (Swanson *et al.*, 2001).

$$\frac{NMP}{UE} = \frac{N}{\sqrt{P * T}}$$

Fórmula

UE = Unidad experimental (g, mL)

N = número de tubos positivos

P = volumen total de muestras en tubos negativos

T = volumen total de la muestra analizada

4.2.2.3.2 Bacterias patógenas

Salmonella spp

La detección de *Salmonella* se efectuó por la técnica de cultivo tradicional y por PCR (Anexo B). La mitad del homogenizado (DP) se mantuvo de 4 a 7 °C para la cuantificación de *Salmonella* en las muestras positivas (Figura 6).

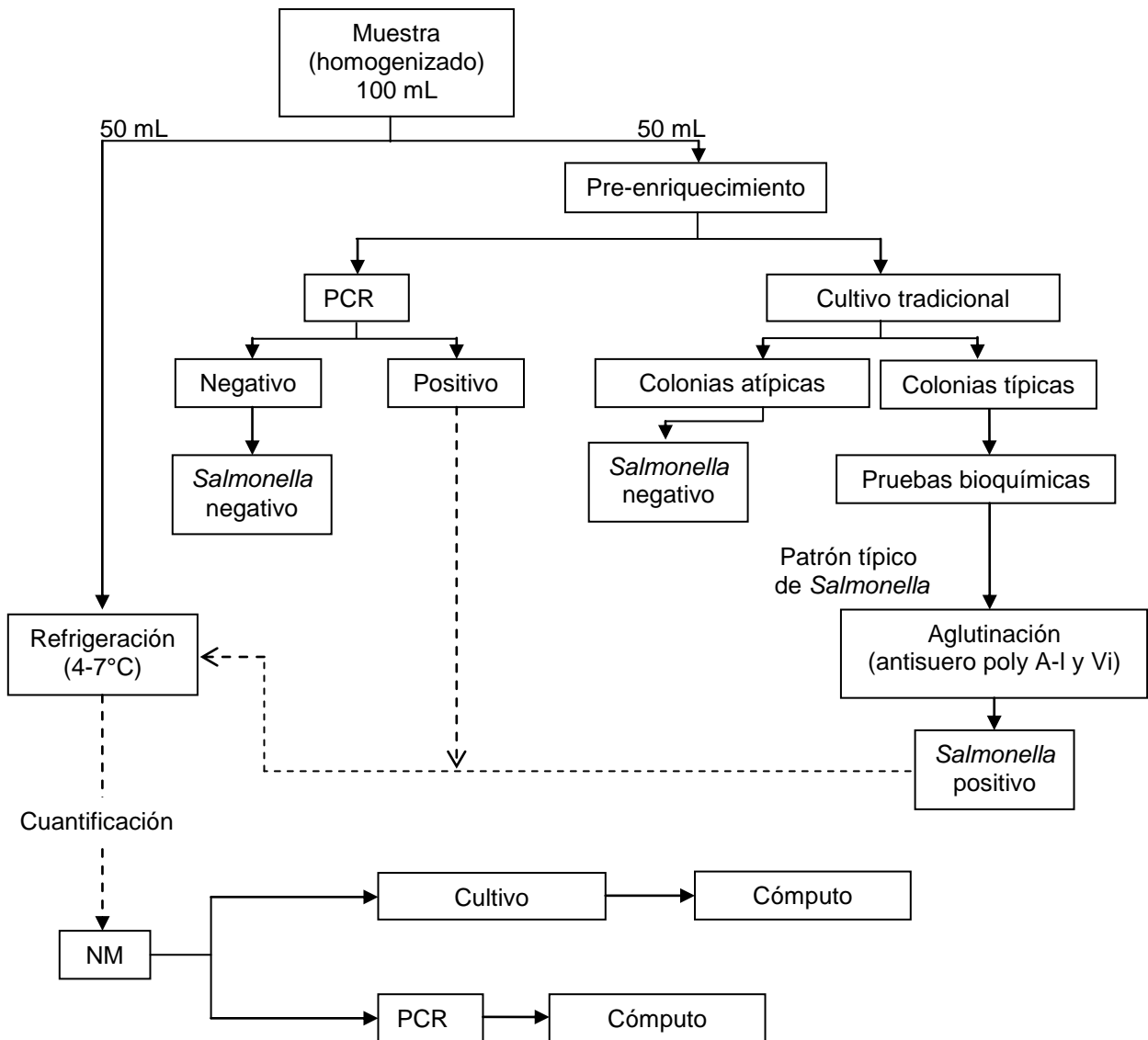


Figura 6. Esquema general para la determinación y recuento de *Salmonella*.

La identificación de *Salmonella* por la técnica de cultivo (Anexo B) se realizó según lo especificado en el CMMEF (Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods) (Andrews *et al.*, 2001). Se seleccionaron 5-7 colonias sospechosas y se confirmaron mediante pruebas bioquímicas (TSI, LIA y Urea) (Edwards *et al.*, 1972; Koneman *et al.*, 1983). Las cepas con el patrón típico de *Salmonella* se confirmaron mediante aglutinación con antisero poly A-I yVi (Difco™).

La detección de *Salmonella* spp mediante PCR se realizó a partir de 1 mL de la muestra preenriquecida en CST (Anexo B). Los iniciadores utilizados fueron *invA* diseñados por Liu *et al.* (2002). Los genes *invA* son de composición exclusiva y altamente conservada del género *Salmonella*.

En esta investigación no se evaluó la especificidad de los iniciadores aprovechando la experiencia de estudios anteriores en este laboratorio (Orozco, 2008).

En caso de positividad a *Salmonella* (cultivo tradicional o PCR), se cuantificó por la técnica del NMP con la porción del homogenizado de DP refrigerado (Figura 6) o de la muestra de tierra o composta.

L. monocytogenes

La detección de *L. monocytogenes* se realizó en superficies de trabajo (mesas y herramientas de corte), y en hortalizas. Se utilizaron la técnica de cultivo y la de PCR (Anexo B).

A partir del agar Mox se seleccionaron de 5 a 7 colonias sospechosas y se confirmaron con seis pruebas: gram, movilidad en SIM, fermentación de manitol, xilosa y ramnosa, y producción de β -hemólisis. Las cepas con el patrón típico fueron confirmadas finalmente por PCR como se indica en el Anexo B. Los iniciadores utilizados fueron *hly* diseñados por Aznar y Alarcon (2002).

4.2.2.4 Análisis estadísticos

Para evitar una sub representación de las cargas microbianas de las muestras a los resultados estuvieron por debajo del límite de detección de la técnica, se asignó un valor medio entre cero y el límite de detección de la técnica (Shumway *et al.*, 1989; Gagliardi *et al.*, 2003; Johnston *et al.*, 2005).

Los análisis estadísticos (cuantiles, medias geométricas, comparación de medias) se realizaron en el programa JMP 5.0.1. Para la comparación de medias se utilizaron las pruebas de Tukey o t-student con nivel de significancia de $P < 0.05$.

5 RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Estudio observacional

El aseguramiento de la inocuidad de los alimentos se reconoce como una causa mayor de preocupación por los gobiernos de los países, debido a las consecuencias sanitarias y socioeconómicas severas que origina. Por ejemplo, muy recientemente en 2011 en Alemania se desencadenó un mega brote causado por *E. coli* O104:H4 contenida en germinado de soya orgánica; este se extendió a otros países e incluso a otros continentes. El brote provocó 3,351 casos de diarrea, 38 muertes y 824 episodios de síndrome urémico hemolítico (Marler, 2011).

El consumo de F&H frescas ha sido creciente en las últimas décadas a nivel mundial (CDC, 1996; Díaz y Vernon, 1999). Es muy conocido que estos productos han estado involucrados como vehículos de tales brotes (WHO, 2010). Los estudios epidemiológicos permiten concluir que la mejor manera de producir F&H con el mínimo riesgo de contaminación es aplicando los nuevos enfoques sanitarios de producción (Díaz y Vernon, 1999). Estos enfoques se basan en la prevención de la contaminación con el patógeno en el alimento y en evitar su desarrollo y/o sobrevivencia (Fernández- Escartín, 2008).

En este estudio se trabajó con diez empresas mexicanas productoras y exportadoras de seis tipos de hortalizas: una de espárrago, dos de pepino, dos de lechuga, una de brócoli, tres de jitomate y una de pimiento morrón. Todas las empresas participan en el programa de Sanidad Vegetal de SAGARPA. Se realizaron de una a seis visitas por empresa durante nueve meses y en cada visita se registraron las violaciones a las PSAs. El encargado de inocuidad del proceso de cada empresa y/o personal de SENASICA estuvo presente durante los muestreos.

En general, los ranchos cuentan con buena infraestructura y tecnología en el área de cultivo y de empaque (Cuadro 15, Figura 7); fueron evidentes, sin embargo, violaciones a las PSAs. La extensión de los terrenos fue desde 1 a 150 ha. En todos los cultivos se utiliza el sistema de riego por goteo con agua extraída de pozos profundos (Figuras 8 y 9).

Cuadro 15. Infraestructura sanitaria de las diez empresas.

Empresa	EMPRESA Hortaliza	INFRAESTRUCTURA	
		cultivo	empacadora
A	espárrago	+ ¹	+
B	pepino gourmet	+	+
C	lechuga	+	+
D	brócoli	+	+
E	jitomate orgánico	+	E*
F	jitomate	+	+
G	pimiento	+	E
H	pepino europeo	+	+
I	lechuga	+	+
J	jitomate	+	+

¹ +, aceptable; ±, marginalmente aceptable; -, inaceptable

* E, La empresa no cuenta con el área de empaque

La condición de aceptabilidad o no aceptabilidad de operaciones, situaciones y una infraestructura sanitaria no resulta en ocasiones fácil de medir. Las violaciones pueden ocurrir de manera generalizada y frecuente o sólo esporádicamente. Algunas tienen mayor impacto sanitario que otras. Cuando el resultado de estas violaciones involucra una contaminación fecal, se trata de una violación crítica. Para contar con criterios mínimos de infraestructura, se consideraron:

- Predio colindante con crianza de animales con insuficiente protección
- Materia fecal animal o humana
- Presencia de animales
- Equipo sucio y estado de conservación
- Material sucio y estado de conservación
- Instalación de sanitarios en área separada del área de cultivo y empaque
- Una instalación sanitaria por cada 20 trabajadores

- Con equipamiento sin agua potable, jabón líquido, papel higiénico, toallas de papel, cesto de basura con bolsa plástica y gel antibacteriano
- Tapetes sanitarios sin germicida
- Materia orgánica en recovecos
- Trampas para fauna nociva en mal estado
- Calzado de calle dentro del invernadero o empacadora
- Uso de fertilizantes orgánicos inseguros
- Deficiente construcción del pozo profundo



Figura 7. Tipos de protección al cultivo entre las 10 empresas.
 Empresa A, malla inadecuada; C: malla ciclónica; D, lienzo de piedra con malla ciclónica.

Empresa A



Empresa C



Empresa D



Empresa E



Empresa F



Empresa G



Empresa I



Empresa J



Figura 8. Tipo de cultivo y de riego en las empresas.

Empresa A, cultivo de espárrago a cielo abierto; C, cultivo de lechuga a cielo abierto; D, cultivo de brócoli a cielo abierto; E, cultivo de jitomate orgánico en invernadero; F, cultivo de jitomate en invernadero; G, cultivo de pimienta morrón en invernadero; I, cultivo de lechuga a cielo abierto; J, cultivo de jitomate en invernadero.

Empresa A



Empresa C



Empresa E



Empresa F



Empresa G



Empresa K



Figura 9. Nivel de protección del pozo profundo en las empresas A, C, E, F, G y K.

Es necesario destacar que existe gran diferencia de las condiciones de trabajo entre las empresas que comercializan a nivel nacional respecto a las de exportación. La exigencia que ejerce el gobierno de México y los clientes a los productores es mayor cuando la comercialización se realiza en el extranjero. Como era de esperar, fue menor la frecuencia de violaciones en las empresas que hemos estudiado respecto a lo reportado en aquellas de producción nacional (Rangel, 2009).

Entre las diversas fuentes y mecanismos potenciales de contaminación a las hortalizas, destaca el agua de riego y los propios trabajadores (Marteau *et al.*, 1998; Greig *et al.*, 2007). La calidad microbiana del agua de irrigación depende mayormente de la fuente de extracción del agua. La más segura es la de pozo profundo. Puede, sin embargo, llegar a contaminarse por fuentes cercanas al pozo o por daños físicos en su construcción. Por ejemplo, en Argentina detectaron alta prevalencia de *E. coli* en el agua de pozo asociada a una baja profundidad y por su proximidad a colecciones de aguas negras (Marteau *et al.*, 1998).

En los ranchos productores de hortalizas objeto de estudio, se almacena el agua extraída de los pozos en estanques. La contaminación puede generarse ante un mantenimiento deficiente o si no se encuentra debidamente cercado o protegido contra el ingreso de animales, sean silvestres o domésticos. Rangel (2009) detectó fauna doméstica dentro del reservorio de agua en 50% de las visitas a una empresa productora de zanahoria. Los niveles de *E. coli* detectados fueron de 10.8 a >3,400 NMP/ 100 mL.

En general, en las 10 empresas los reservorios de agua se mantienen en condiciones aceptables de protección y mantenimiento (Figura 10). Sin embargo, específicamente en las empresas D y E el programa de mantenimiento es inadecuado. Ambos estanques requerían desazolve. Peor aún, dentro del reservorio de la empresa D se detectó un anfibio (Figura 11). Afortunadamente, ante estos hallazgos, las empresas tomaron acciones de correctivas de inmediato.

Empresa C



Empresa D



Empresa E



Empresa F



Empresa G



Empresa K



Figura 10. Reservorios de agua en empresas productoras de hortalizas.

Empresa C, reservorio con infraestructura y protección aceptable; D, reservorio de concreto con infraestructura y protección aceptable; E, reservorio de concreto con infraestructura aceptable; F, reservorio de metal con infraestructura aceptable; G, reservorio de metal con infraestructura aceptable; K, reservorio de piedra con infraestructura aceptable.

El Cuadro 16 muestra la frecuencia de violaciones a las PSAs de cada empresa. Lamentablemente, el número de visitas realizadas fue escaso, lo que resta consistencia a los resultados evaluatorios. Entre las maniobras y condiciones de trabajo con potencial peligro microbiano destaca de manera recurrente la falta de uso de zapatos de trabajo y tapetes sanitarios sin germicida en la empacadora, omisión de guantes, cofia y mandil. Durante las visitas a las empresas se

detectaron maniobras de los trabajadores que ponen en riesgo la inocuidad de la hortaliza y estas maniobras fueron agrupadas como conducta antihigiénica de trabajadores para incluirlas como violaciones a las PSA (Cuadro 16, Figuras 11 y 12). Generalmente la mayoría de los trabajadores proviene de pueblos cercanos a las empresas. No es raro que el trabajador durante su traslado a la empresa contamine sus zapatos con materia fecal. La falta de eficacia en su desinfección ya ha sido demostrada por Rico Romero (2003): pisar el tapete sanitario no redujo significativamente el contenido de *Enterobacteriaceae* ni la positividad de *E. coli*.

Los trabajadores que tienen contacto directo con los alimentos durante su producción han sido reconocidos frecuentemente como responsables de la diseminación de patógenos causantes de brotes de ETA (Guzewich, 1999). En EE.UU., el CDC (Centers for Disease Control) estimó que el 20% de los brotes causados por agentes bacterianos son provocados por transmisión del patógeno al alimento a partir de manejadores infectados (Bryan, 1978).

La identificación de cada evento de contaminación a través de inspección visual y muestreos para análisis microbiológicos es virtualmente imposible. El lavado correcto de las manos se ha reconocido como un método para la prevención de la contaminación microbiana a los alimentos (Green *et al.*, 2006).

El uso de guantes durante la cosecha y empacado de las hortalizas de manera general no fue la regla; se observó sólo en el 50% de las empresas. Sin embargo, su empleo para la protección de los alimentos no recibe reconocimiento universal (Todd *et al.*, 2010). Existen pros y contras para su uso: protegen al trabajador de alimentos de posibles heridas y recíprocamente, protegen al propio alimento de contaminación. Uno de los principales inconvenientes es la sensación de seguridad, que propicia deficiente higiene de las manos y de los guantes mismos (Todd *et al.*, 2010; Paulson, 1996).

Cuadro 16. Frecuencia de las violaciones a las condiciones que pueden afectar significativamente la inocuidad de las hortalizas.

Etapa/ procedimiento/ acción	Empresa										Total
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	
Predio colindante con crianza de animales sin protección o insuficiente	0/6 ¹	0/6	0/3	0/2	0/2	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/34
Uso de fertilizantes orgánicos	0/3	0/6	0/3	0/2	2/2	0/3	0/3	3/3	0/3	0/3	0/31
Restos de alimentos o sus empaques	2/6	2/6	0/3	0/2	0/2	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	4/34
Materia fecal animal o humana	0/6	0/6	0/3	0/2	0/2	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/34
Presencia de animales ²	0/6	1/6	0/3	0/2	0/2	0/3	0/3	0/3	3/3	1/3	5/34
Equipo sucio	1/6	0/6	-	0/2	2/2	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/31
Material sucio	1/6	14/35	0/18	0/24	0/12	0/18	0/18	0/18	0/18	0/18	15/185
Instalación sanitaria en área separada del área de cultivo y empaque ³	0/6	0/12	0/3	0/2	0/2	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/40
Menos de una instalación sanitaria por cada 20 trabajadores	0/6	0/12	0/3	0/2	0/2	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/40
Equipamiento sin agua potable, jabón líquido, papel higiénico, toallas de papel, cesto de basura con bolsa plástica y gel antibacteriano	6/9	0/12	0/3	0/2	0/2	0/6	0/3	0/3	0/3	0/3	6/46
Tapetes sanitarios sin germicida	0/6	15/21	-	-	4/4	0/6	0/6	0/9	-	0/3	19/55
Materia orgánica en recovecos	1/3	0/12	-	0/2	0/2	0/3	0/3	0/3	-	-	1/28
Trampas para fauna nociva en mal estado	0/3	0/12	-	-	0/2	0/3	0/3	0/3	-	-	0/26
Aseo del personal (aparente) deficiente	0/6	0/12	0/18	0/12	2/12	0/18	6/18	0/18	0/18	0/18	8/150
No se viste calzado exclusivo para trabajo dentro del rancho	18/18	36/36	18/18	12/12	12/12	18/18	18/18	18/18	18/18	18/18	186/186
No hay lavado de manos después de ir al baño o al reanudar actividades	0/6	0/12	0/18	0/12	0/12	0/18	0/18	0/18	0/18	0/18	0/150
No se usa guantes, cofia y/o mandil	6/18	12/36	18/18	0/12	0/12	3/18	3/18	18/18	18/18	0/18	78/186
Conducta antihigiénica de trabajadores	0/3	2/6	2/3	2/2	0/2	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	7/31
Total	35/123	83/254	38/365	14/94	12/98	21/135	28/132	39/135	39/120	22/123	

¹ Frecuencia/número de observaciones

² Dentro del rancho

³ Mayor a 400 metros del área de cosecha



Figura 11. Principales violaciones a las PSAs detectadas en las empresas productoras de hortalizas. Empresa A, carencia de solución clorada para el lavado de la hoz y cubeta en la cosecha de espárrago; D, personal de la cuadrilla de cosecha sentado en las mesas de empaque durante la cosecha de brócoli; D₁; cajas para empaque de brócoli en contacto con lodo; D₂, animal silvestre en reservorio de agua; E, pozo no protegido. Encharcamiento de agua permanente; E₁, reservorio de agua descuidado; E₂, tapetes sanitarios secos. Mal concepto de tapete sanitario; E₃, tapetes sanitarios secos; F, zona de composteo de estiércol justo afuera de la empresa (entrada principal).



Figura 12. Principales violaciones a las PSAs detectadas en las empresas productoras de hortalizas. Empresa F₁, disposición de agua deficiente; F₂, transito de animales domésticos y silvestres dentro de la empresa; F₃, tlacuaches dentro del invernadero; F₄, herramientas de trabajo y accesorios personales sobre el producto empacado; G, invernadero en funcionamiento con área expuesta al ambiente; I₁, paso común para la población a pocos metros de las tablas de cultivo; I₂, presencia de animales domésticos dentro del rancho; J₁, tapetes sanitarios con tierra; J₂, excretas de animales silvestres dentro del rancho.

Para conocer de manera diferencial cómo afectan a las hortalizas las violaciones a las PSAs según el tipo de cultivo, las diez empresas se clasificaron en dos grupos: en cultivo abierto y en invernadero. Se eligieron aquellas PSAs que están más relacionadas con contaminación fecal (Cuadro 17) a partir de la lista de verificación (Anexo A).

Cuadro 17. Violaciones a las PSAs. Porcentajes de violación a las PSAs en las 10 empresas según el tipo de cultivo.

Situación / procedimiento / acción	% violaciones	
	Cultivo abierto	Cultivo invernadero
Predio colindante con crianza de animales sin protección o insuficiente	0.0	0.0
Materia fecal animal o humana *	0.0	16.7
Fauna doméstica o silvestre *	25	12.5
Baños portátiles o fijos distantes**	0.0	0.0
Equipamiento sin agua potable, jabón líquido, papel higiénico, toallas de papel, cesto de basura con bolsa plástica y/o gel antibacteriano	0.0	0.0
Falta lavado de manos después de ir al baño o al reanudar actividades	6.3	0.0
Tapetes sanitarios sin germicida	0.0	33.3
No se viste calzado de trabajo	100	83.3
Comportamiento inadecuado	22.1	17.2
% global	20 ^a	18.3 ^a

^a Letras iguales, no existe diferencia significativa entre el porcentaje de violaciones a las PSAs entre tipos de cultivo ($P < 0.05$)

* dentro del rancho

** mayor a 400 m

Se analizaron y compararon los porcentajes de violaciones a estas PSAs entre los dos grupos de empresas (Cuadro 17). No existe diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los porcentajes globales a las violaciones a las PSAs entre las empresas según el tipo de cultivo. Sin embargo, es necesario insistir en que la trascendencia de las diferentes clases de violación no tiene la misma repercusión en cuanto al nivel de exposición de los materiales a la

materia fecal. Así, la presencia de heces dentro de una empresa tienen un impacto muy diferente que la carencia de toallas de papel en el baño. Por otra parte, debemos subrayar que el total de visitas y número de observaciones es reducido, sobre todo tomando en cuenta que el estadio incluyó 10 empresas.

5.2 Incidencia de microorganismos indicadores, *Salmonella* spp y *L. monocytogenes* en hortalizas y superficies asociados a su cosecha y empaqueo

El conocimiento de la abundancia y distribución de los microorganismos en las hortalizas y materiales es fundamental, como referencia, para valorar la relación entre esas poblaciones y la comisión de violaciones de las PSAs al tiempo del muestreo. Elementalmente, en la medida en que las poblaciones microbianas se presentan sin grandes variaciones en los diferentes muestreos de un mismo material, más significativa será el grado de asociación con respecto a una o más violaciones específicas. Adicionalmente, la asociación se hace más consistente conforme el número de unidades analizadas es más elevado. Como ya se indicó, algunas violaciones (manos sucias manejando directamente la hortaliza en la zona de empaque) tienen un efecto inmediato y directo en el nivel de las poblaciones microbianas detectadas. Tal tipo de violación no sólo es pasajera, sino que llega a resultar inconsistente, en términos de la oportunidad para ser detectada en contraste con lo que ocurre ante una violación que persiste de manera más o menos constante (agua de pozo inadecuadamente protegido, o inadecuada desinfección del agua).

5.2.1 Incidencia global

A lo largo del estudio se analizaron 371 muestras compuestas de los seis especies de hortalizas correspondientes a espárrago (26.7%), brócoli (3.2%), lechuga (22.4%), jitomate (25.6%), pepino (17.5%) y pimiento morrón (4.6%).

De manera global, los rangos de *Enterobacteriaceae* (ENT), coliformes fecales (CF) y *E. coli* (EC) fueron de 1.4 a 8.8 Log UFC ENT/unidad, 0.52 a 2.68 Log NMP CF/unidad y 0.52-2.68 Log NMP *E. coli*/unidad (Figura 13). La mediana de ENT en las hortalizas fue de 4.34 Log UFC/unidad, y las de CF y

E. coli estuvieron por debajo del límite de detección (<0.82 Log NMP/unidad) (Cuadro 18). La positividad (valores mayores al límite de detección) de CF y *E. coli* fue significativamente diferente ($P < 0.05$); con 10.3 y 4.3%, respectivamente.

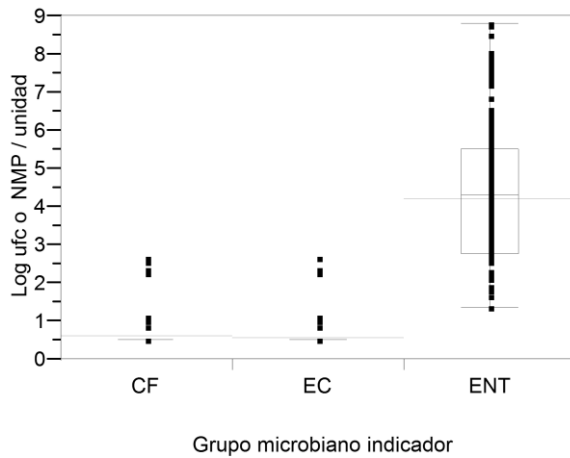


Figura 13. Coliformes fecales (CF), *E. coli* (EC) y *Enterobacteriaceae* (ENT) en 371 muestras de hortalizas de 10 empresas exportadoras.

Cuadro 18. Distribución de los microorganismos indicadores en 371 hortalizas de las 10 empresas.

Grupo indicador ^a	N	Media	Mínimo	25%	Mediana	75%	90%	Máximo
ENT	313	4.21 ± 1.89 ^b	1.40	2.77	4.34	5.52	6.36	8.83
CF	225	0.62 ± 0.38	0.52	0.52	0.52	0.52	0.67	2.68
EC	312	0.55 ± 0.20	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	2.68

^a Log UFC ENT/ unidad, Log NMP CF/ unidad, Log NMP *E. coli*/ unidad

^b Log UFC ± error estándar

Sagoo *et al.* (2003), al examinar 3,826 muestras de ensaladas de verduras crudas en Inglaterra, observaron que la mayoría de las muestras (99.3%) mostraban una calidad microbiológicamente satisfactoria o aceptable de acuerdo a las Directivas Microbiológicas del Laboratorio de Servicio de Salud Pública de aquel país (Cuadro 19). Por otra parte, la Comisión Internacional de Seguridad Microbiológica de los Alimentos (ICMSF) también sugiere límites microbiológicos para productos hortícolas (Anónimo, 1978): de 5 muestras de hortalizas frescas de un lote, 2 pueden tener valores mayores a 10 UFC *E. coli*/g, pero menores a 100 UFC *E. coli*/g. *Salmonella* debe de estar ausente en 25 g de 10 muestras de un lote.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la calidad microbiana (en función de la presencia de *E. coli*) de las hortalizas producidas en las empresas exportadoras estudiadas resultan aceptables (cumplen además con infraestructura sanitaria y apego a las PSAs). Este señalamiento, además, está en armonía con los límites microbianos establecidos en otros países (Sagoo *et al.*, 2003; Anónimo, 1978).

Esta situación general contrasta con la que suele reportarse para otras empresas en las cuales las hortalizas se exponen a diversas fuentes de contaminación en el campo: contacto con estiércol no tratado, agua contaminada, trabajadores infectados, contenedores, herramientas sucias y presencia de animales (FDA, 2008) (primeras empresas Mx/Mx del Cuadro 20). Resulta concluyente en principio: el apego a las PSAs generalmente excluye la presencia de patógenos en las hortalizas.

Cuadro 19. Criterios microbiológicos del Laboratorio de Servicio de Salud Pública para el aseguramiento de la calidad microbiológica de algunas muestras de alimentos listos para su consumo en el punto de venta. Reino Unido

Patógeno	Criterio de calidad microbiológica			
	Satisfactorio	Aceptable	No satisfactorio	Inaceptable/ potencialmente peligroso
<i>E. coli</i>	< 20 UFC/g	20 a < 100 UFC/g	≥1 00 UFC/g	No aceptable
<i>L. spp</i>	< 20 UFC/g	20 a < 100 UFC/g	≥100 UFC/g	No aceptable
<i>L. monocytogenes</i>	< 20 UFC/g	20 a < 100 UFC/g	NA	≥100 UFC/g
<i>Campylobacter spp</i>	Negativo en 25 g			Detectado en 25 g
<i>Salmonella</i>	Negativo en 25 g			Detectado en 25 g
<i>E. coli</i> O157:H7	Negativo en 25 g			Detectado en 25 g

Fuente: Sagoo *et al.*, 2003.

Cuadro 20. Incidencia de *E. coli* y *Salmonella* en hortalizas según el lugar de producción.

P/C ¹	# Emp ²	Hortalizas producidas	Incidencia (%)		Observaciones	Fuente
			EC	Salm ³		
MX /MX ⁴	4	Lechuga, chicoria, jitomate y brócoli	7.3	5	Detección de animales silvestres en área de cultivo y reservorios de agua	Ruiz (2007)
			12	9.3		
MX /MX	1	Zanahoria	58	9.4	Abuso de las violaciones a las PSAs. Detección de aves muertas en reservorio de agua	Rangel (2009)
					Detección de animales silvestres en área de cultivo y empacadora.	
MX/ EEUU	1	Zanahoria	19	4	Buena infraestructura y apego a las PSAs	Orozco (2008)
MX/ EEUU	1	Jitomate	3.6	3	Buena infraestructura y apego a las PSAs	Castañeda (2010)
EEUU/ EEUU	32	Apio	3.5	0.5	Buena infraestructura y apego a las PSAs	Mukherjee <i>et al</i> (2004)
EEUU/ EEUU	32	Jitomate, lechuga, pimiento morrón, pepino, brócoli, calabaza, manzana, fresa	4.3	1.5	Empresas orgánicas certificadas. Buena infraestructura sanitaria y apego a las PSAs	Mukherjee <i>et al</i> (2004)
CAN / CAN	NE ⁵	Jitomate y pepino	0	0	Estudio de 3.5 años de duración. Empresas certificadas.	Luedtke <i>et al</i> (2003)
MX/ EEUU	10	Espárrago, pepino, jitomate, lechuga, brócoli, pimiento morrón	4.2	0	Empresas certificadas. Buena infraestructura sanitaria.	Estudio actual

¹ Lugar de producción / Lugar de comercialización del producto

² Número de empresas

³ *Salmonella*

⁴ MX, México; EEUU, Estados Unidos; CAN, Canadá

⁵ NE, No especificado

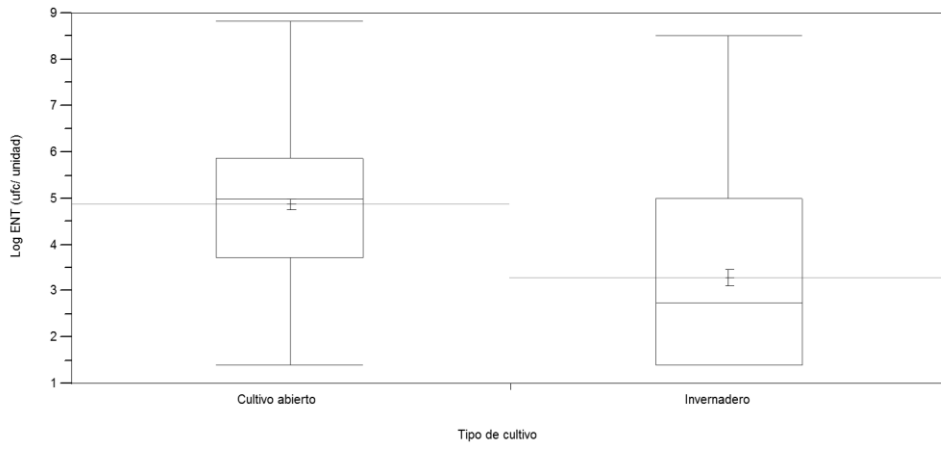
5.2.1.1 Incidencia de microorganismos indicadores según el tipo de cultivo

Diversos estudios muestran que el cultivo en invernadero protege mayormente la calidad microbiana de las hortalizas que el cultivo a cielo abierto. Por ejemplo, Luedtke *et al.* (2003) reportaron que de 246 muestras de hortalizas (jitomates y pepinos) cultivadas en invernadero ninguna resultó positiva a *E. coli* o *Salmonella*, mientras que productos cultivados a cielo abierto como brócoli, lechuga, calabaza y col tuvieron una prevalencia de *E. coli* de 0, 12.5, 2.78 y 5.88%, respectivamente (Mukherjee *et al.*, 2006).

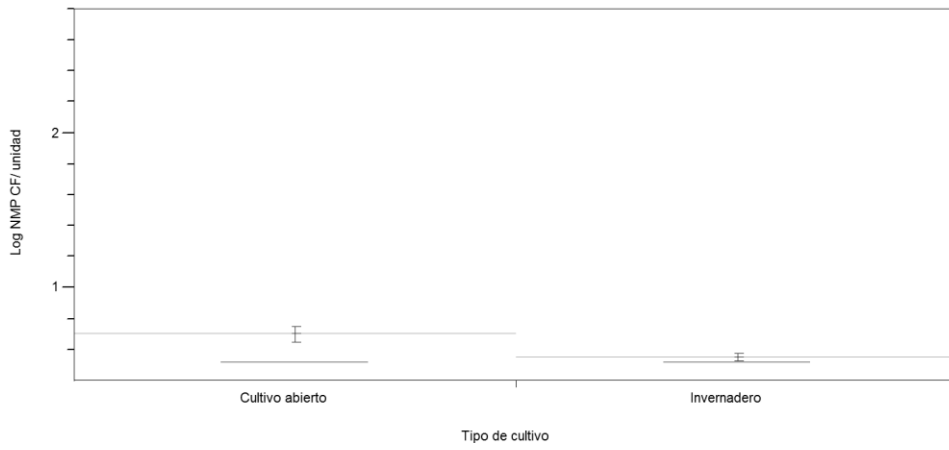
Los resultados de nuestro estudio muestran que el nivel de contaminación por *E. coli* en las hortalizas en ambos ambientes puede llegar a ser muy bajo.

Es notable que las poblaciones de *Enterobacteriaceae* se encuentren entre 1.4 y 8.8 log UFC/unidad, en tanto los CF y *E. coli* tienden a estar ausentes independientemente del ambiente de producción; por otra parte, aunque las concentraciones de unos y otros son reducidas, el análisis estadístico mostró una diferencia significativa entre los dos grupos microbianos. Sin embargo, no existe diferencia significativa con el contenido de *E. coli* para ambos tipos de cultivo (5.9% en cultivo abierto y 2.1% en invernadero) (Figura 14). Esta observación subraya la limitada confiabilidad en el uso de los coliformes fecales como indicadores de contaminación fecal.

1)



2)



3)

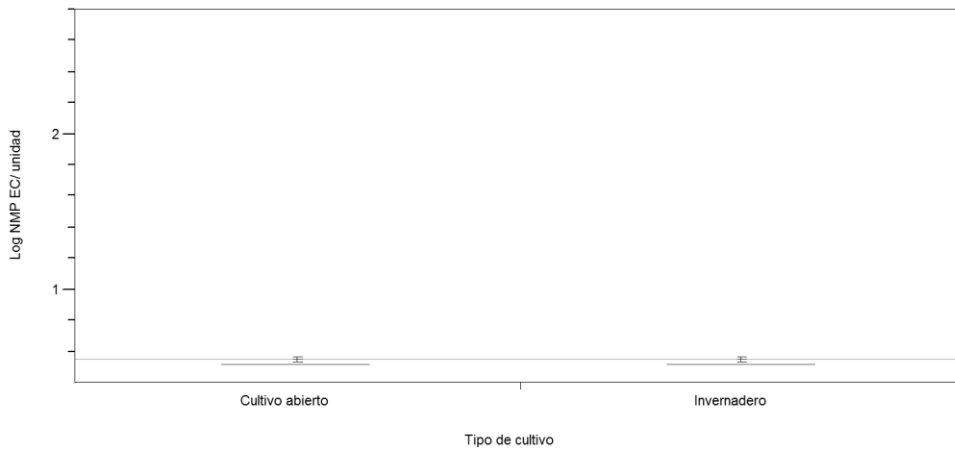


Figura 14. Resumen de carga de 1) *Enterobacteriaceae*; 2) coliformes fecales; 3) *E. coli* en hortalizas según el tipo de cultivo.

La mayoría de las muestras para cualquier tipo de cultivo, presentan niveles de CF y *E. coli* tan reducidos, que incluso la mediana se localiza por debajo del límite de detección (< 0.82 Log NMP/ unidad y Cuadro 21). Tales cifras pueden considerarse como la expresión del grado de protección que las empresas aplican durante la producción de las hortalizas, hasta el punto de diluir el efecto negativo de la empresa D por laborar con condiciones menos rígidas de operación en comparación con las demás empresas.

Cuadro 21. Resumen del contenido de *Enterobacteriaceae* (ENT), coliformes fecales (CF) y *E. coli* (EC) en hortalizas de 10 empresas según el tipo de cultivo.

Hortaliza	<i>Enterobacteriaceae</i>				Coliformes fecales				<i>E. coli</i>			
	Log UFC / unidad				Log NMP / unidad				Log NMP / unidad			
	N	min	med	máx	N	min	med	máx	N	min	med	máx
Cultivo abierto	181	1.40	5.00	8.83	97	0.52	0.52	2.60	169	0.52	0.52	2.38
Invernadero	132	1.40	2.76	8.53	128	0.52	0.52	2.68	143	0.52	0.52	2.68

5.2.1.2 Incidencia de microorganismos indicadores según el tipo de hortaliza

Si se examinan las poblaciones de *Enterobacteriaceae* entre los seis tipos de hortalizas, se advierte una gran variabilidad. Este grupo contempla microorganismos que no necesariamente tienen como hábitat el tracto intestinal. Es un indicador más relacionado con la flora gram negativa ambiental en las hortalizas que las bacterias mesófilas aerobias en lo referente a la protección contra fuentes de contaminación humana, animal o ambiental y a la eficiencia de los procesos de lavado y desinfección de las hortalizas, como se refiere más adelante con el espárrago.

El 4.3% de las hortalizas resultó positivo a *E. coli*. Los valores mayores de contaminación fecal pertenecen a pepino gourmet, pepino europeo brócoli y lechuga (Cuadro 22), situación que más adelante se comentará. De cualquier manera, 95.7% de las muestras tuvo poblaciones de *E. coli* por debajo del límite de detección (< 0.82 NMP /unidad), observación que apoya la buena calidad sanitaria de las hortalizas en general.

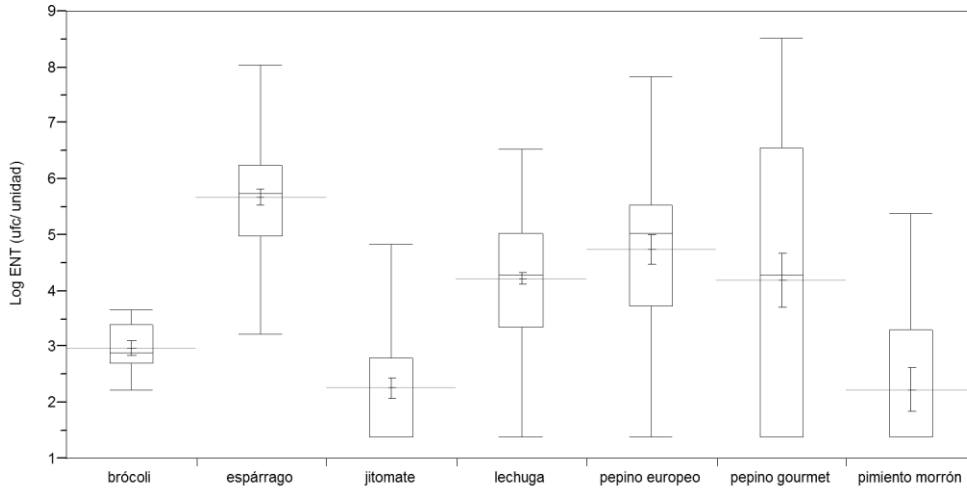
Una vez más, la flora bacteriana de cada tipo de las hortalizas se caracteriza por niveles de varios log UFC/unidad de *Enterobacteriaceae*, y de niveles reducidos de CF y *E. coli* (Figura 15 y Cuadro 23).

Cuadro 22. Incidencia de *E. coli* en hortalizas.

Hortaliza	% <i>E. coli</i> (+/N)*
Espárrago	1.3 (1/79)
Pepino gourmet	6.9 (2/29)
Pepino europeo orgánico	3.1 (1/32)
Lechuga	10.3 (8/78)
Brócoli	8.3 (1/12)
Jitomate orgánico	0 (0/23)
Jitomate convencional	0 (0/46)
Pimiento morrón	0 (0/13)

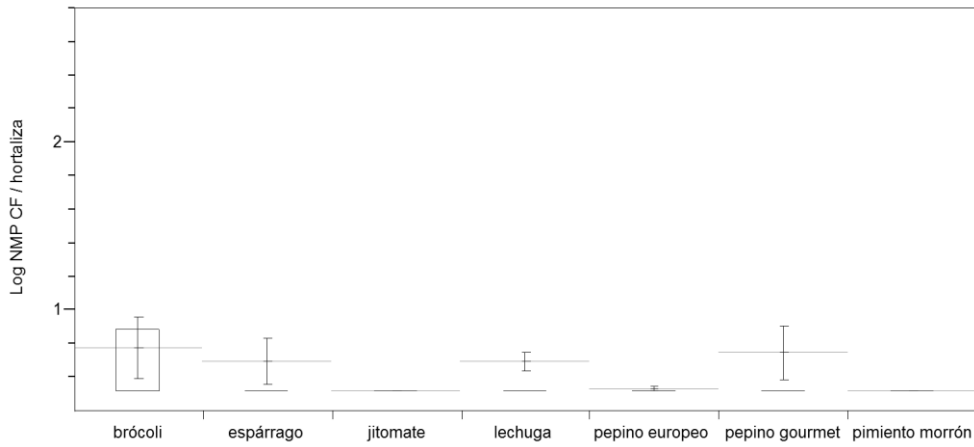
(+/N), muestras positivas/número total de muestras

1)



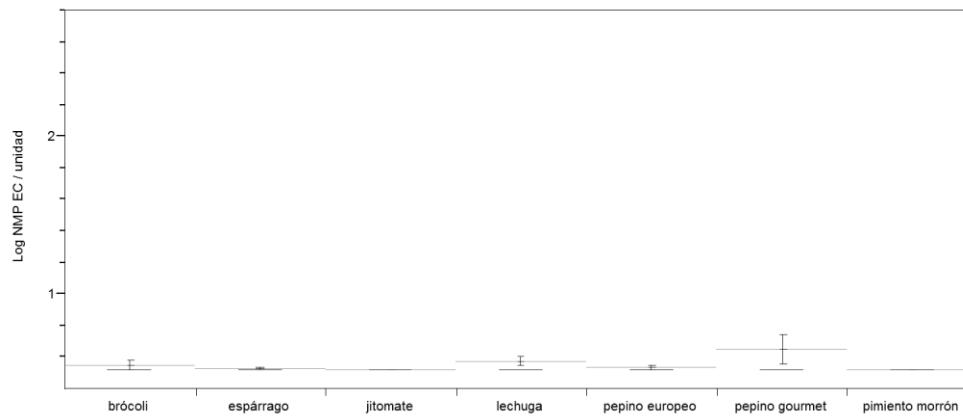
Enterobacteriaceae en hortalizas

2)



Coliformos fecales en hortalizas

3)



E. coli en hortalizas

Figura 15. Contenido de microorganismos indicadores según el tipo de hortaliza.
1) *Enterobacteriaceae*; 2) coliformos fecales; 3) *E. coli*.

Cuadro 23. Resumen de *Enterobacteriaceae* (ENT), coliformes fecales (CF) y *E. coli* en hortalizas de diez empresas.

Hortaliza	<i>Enterobacteriaceae</i> (Log UFC)				Coliformes fecales (Log NMP)				<i>E. coli</i> (Log NMP)			
	N	min	med	máx	N	min	med	máx	N	min	med	máx
Espárrago ^u	90	2.70	5.75	8.83	15	0.52	0.52	2.60	79	0.52	0.52	1.11
Lechuga ^g	80	1.40	4.30	6.54	72	0.52	0.52	2.38	78	0.52	0.52	2.38
Pepino europeo ^u	32	1.40	5.04	7.84	32	0.52	0.52	1.04	32	0.52	0.52	1.04
Pepino gourmet ^u	29	1.40	4.30	8.53	17	0.52	0.52	2.68	29	0.52	0.52	2.68
Brócoli ^g	11	2.23	2.90	3.67	10	0.52	0.52	2.38	12	0.52	0.52	0.89
Jitomate ^u	60	1.40	1.40	5.98	69	0.52	0.52	0.52	69	0.52	0.52	0.52
Pimiento morrón ^u	11	1.40	1.40	5.40	10	0.52	0.52	0.52	13	0.52	0.52	0.52

^g Log UFC/ g

^u Log UFC/ unidad

E. coli se detectó en el 1.8% de las hortalizas orgánicas (pepino europeo y jitomate), 2.6 veces menor que su incidencia entre las de cultivo convencional, aunque éstas diferencias no fueron significativas ($P < 0.05$). En contraste, algunos estudios insisten que las hortalizas orgánicas se encuentran más expuestas a la contaminación fecal. Por ejemplo, Mukherjee *et al.* (2004) analizaron F&H orgánicas y convencionales producidas en EE.UU. La mayor positividad a *E. coli* se encontraba entre las hortalizas orgánicas (seis veces mayor que las convencionales) con diferencia estadísticamente significativa, $P < 0.05$.

5.2.2 Incidencia de patógenos en los seis tipos de hortalizas

Salmonella spp no fue detectada en ninguna muestra de hortaliza (Cuadro 24), condición que no suele ser la regla. Estudios en empresas mexicanas productoras y exportadoras de hortalizas, que cuentan con infraestructura sanitaria aceptable y apego a las PSAs, han detectado *Salmonella* spp aunque con baja incidencia (Orozco, 2008; Castañeda, 2010). Mukherjee *et al*, (2006) estudiaron empresas productoras de hortalizas en EEUU durante dos años y no detectaron *Salmonella* en ninguna de las 2,029 muestras analizadas.

Las fuentes más importantes de patógenos durante la pre-cosecha es el agua de irrigación y el abono aplicado como fertilizante. Numerosos estudios han demostrado la sobrevivencia por largos periodos de *E. coli* O157:H7 y de *Salmonella* en abono (Matthews, 2006). Existe una gran controversia entre la calidad microbiana de productos hortícolas orgánicos *versus* los convencionales. Se ha sugerido que las F&H pueden contener elevada positividad de patógenos si los cultivos han sido fertilizados con estiércol (Castañeda, 2010).

En este estudio se analizaron muestras de composta de dos de las empresas, una productora de jitomate y la otra de pepino europeo. Sólo en la segunda se detectó *Salmonella*. Los niveles oscilaron entre 0.04 y >24 NMP *Salmonella*/g de composta. Aunque no se detectó *Salmonella* en el pepino europeo, el riesgo de contaminación es considerable.

L. monocytogenes fue detectada en lechuga y jitomate con una positividad global de 9.4% (8/85) (Cuadro 25). Este microorganismo es ampliamente ubicuo, por lo que no es sorprendente su detección en hortalizas frescas (Rocourt y Cossart, 1997). Una de las razones de la importancia de *L. monocytogenes* en F&H es la “tolerancia cero” que EE.UU. mantiene como política para productos de importación. La incidencia del patógeno en un producto determinado, podría sugerir una contaminación intermitente y asociada a la formación de biopelículas en el equipo que tiene contacto directo con las hortalizas (Prazak *et al.*, 2002).

Cuadro 24. Incidencia de *Salmonella* spp en hortalizas colectadas en las diez empresas.

Hortaliza	N	Positividad (%)
Espárrago	78	0 (0/78) ¹
Lechuga	63	0 (0/63)
Pepino europeo orgánico	32	0 (0/32)
Pepino gourmet	26	0 (0/26)
Brócoli	12	0 (0/12)
Jitomate orgánico	29	0 (0/29)
Jitomate	43	0 (0/43)
Pimiento morrón	17	0 (0/17)
Total	300	0 (0/300)

¹ muestras positivas/ muestras analizadas

Cuadro 25. Incidencia de *L. monocytogenes* hortalizas colectadas en las diez empresas.

Hortaliza	N	Positividad (%)
Espárrago	15	0 (0/15) ¹
Lechuga	17	35.3 (6/17)
Pepino europeo	4	0 (0/4)
Pepino gourmet	16	0 (0/16)
Brócoli	6	0 (0/6)
Jitomate	27	7.41(2/27)
Pimiento morrón	-	-
Total	85	9.41 (8/85)

¹ muestras positivas/ muestras analizadas

Las hortalizas se contaminan con *L. monocytogenes* principalmente a partir de la tierra en que se cultivan (Al-Ghazali y Al-Azawi 1990; Renterghem *et al.*, 1991). Aún así, la incidencia en las hortalizas es baja. Por ejemplo, Heisick *et al* (1989) analizaron mil muestras de hortalizas crudas y sólo 50 mostraron la presencia de *L. monocytogenes*; siendo negativas muestras de brócoli, zanahoria, coliflor, lechuga, champiñón y jitomate. En otro estudio, Simón *et al.* (1992) analizaron pepinos con el porcentaje de positividad de *L. monocytogenes*, en pepinos fue de 2.2, col 1.2 y rábanos 14.4%. En general reportan 7.8% de positividad a *L. monocytogenes* en verduras crudas.

Fernández *et al* (1999) en un estudio realizado en una empresa productora de brócoli precocido y congelado, detectaron la presencia de *Listeria* spp en 11 de 101 muestras de brócoli crudo; sólo 3 correspondieron a *L. monocytogenes*. La positividad al patógeno, sin embargo, se elevó a 35% en el producto precocido y congelado. Esta contaminación se asoció básicamente a deficiencias en el proceso de enfriamiento con agua clorada previo a la congelación.

5.2.3 Incidencia de indicadores en superficies con contacto directo con las hortalizas en las diez empresas

Las superficies que entran en contacto con las hortalizas desde el cultivo hasta el empaque pueden aportar microorganismos indeseables. Algunas de las principales fuentes de contaminación son las manos y guantes de los trabajadores, herramienta de corte, contenedores y mesas en la zona de empaque.

En nuestro estudio se investigó la incidencia de *Enterobacteriaceae*, coliformes fecales, *E. coli* y *Salmonella* spp en materiales asociados a la producción y empaque de hortalizas. En el Cuadro 26 se especifica el tipo de muestras colectadas en cada empresa.

Cuadro 26. Tipos de superficies analizadas en cada una de las diez empresas.

Empresa	SUPERFICIE				
	Manos	Guantes	Herramienta de corte	Contenedores	Mesas
A	✓				
B	✓	✓	✓	✓	✓
C	✓		✓	✓	
D		✓	✓		✓
E		✓		✓	
F	✓	✓	✓	✓	✓
G	✓		✓	✓	
H	✓		✓	✓	✓
I	✓		✓		
J		✓	✓	✓	

Según se indicó, se había observado congruencia entre la ejecución de las PSAs y la calidad microbiológica de las hortalizas. En general la incidencia de ENT en las superficies varió considerablemente (<2.18 a 8.29 Log UFC/unidad), mientras que los CF y *E. coli* mostraron rangos de <0.52 a >3.38 Log UFC/unidad para ambos grupos. La incidencia de CF fue del 20 y de *E. coli* de 6.8% (todos, valores mayores a 0.82 NMP/ unidad, Figura 16) lo que sugiere que en general las

condiciones sanitarias de trabajo podrían considerarse aceptables (Ruiz, 2007).

Hay que subrayar que los resultados y comentarios siguientes tienen un valor limitado considerando el reducido número de muestras disponibles. No se trata pues, de una imagen absolutamente consistente de la realidad objeto de estudio.

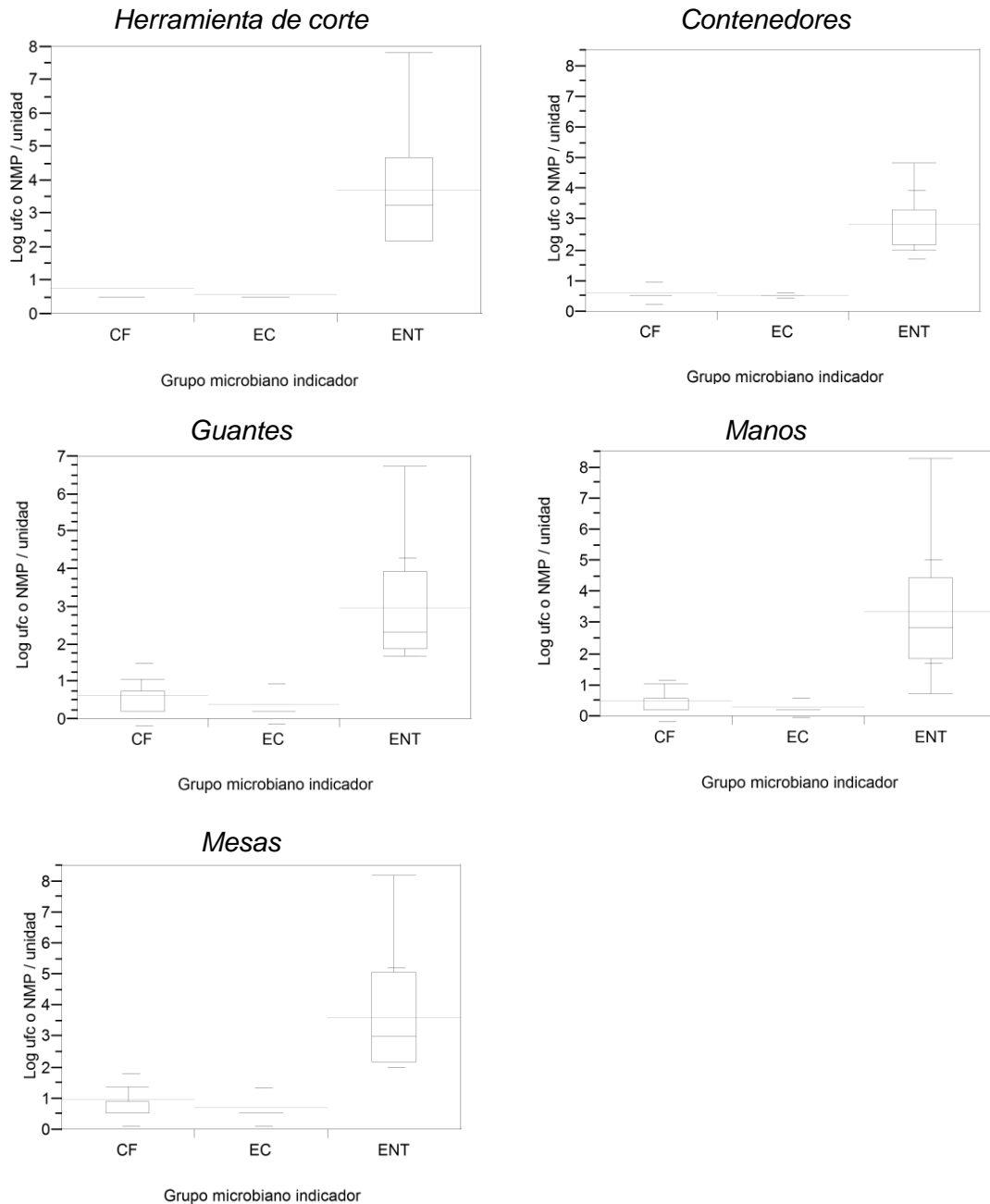


Figura 16. *Enterobacteriaceae* (ENT), coliformes fecales (CF) y *E. coli* (EC) en superficies con contacto directo en la producción de hortalizas de las diez empresas exportadoras.

En general, las cargas microbianas en las diferentes superficies siguen patrones semejantes a los de la empresa F (Figura 17).

La empresa D presentó el mayor número de muestras de superficies con diferencias significativas en el contenido de los microorganismos indicadores en comparación con las demás empresas, incluso de contaminación fecal por *E. coli*, situación que se asocia bien con una mayor frecuencia de violaciones a las PSAs.

La carga de ENT en los contenedores fue de 2.8 Log UFC/400 cm² con diferencias menores entre empresas, exceptuando a los contenedores de la empresa B que mostraron la mayor carga de ENT (4.2 Log UFC ENT/400 cm²).

Sin embargo, la contaminación por *E. coli* sólo se detectó en los contenedores de las empresas F (11%) y H (5%). Estos materiales en ambas empresas, no fueron almacenados adecuadamente; por ejemplo, en la empresa F estaban expuestos al medio ambiente y durante las visitas se detectó la presencia de animales dentro del invernadero y del rancho (tlacuaches, liebres y perros).

Muchos de los manejadores de los alimentos, en parte influenciados por antecedentes culturales, asumen que ya que las hortalizas se originan a través del suelo, no habrá diferencia entre el equipo de corte si es o no higienizado y almacenado adecuadamente (Angelillo *et al.*, 2001; Brackett, 1999). Una de las formas de minimizar el riesgo de contaminación es recurriendo a herramientas de acero inoxidable (tijeras, cuchillos, mesas) o de plástico (contenedores) de fácil limpieza (Pabrua y William, 2004). Si la higienización es nula o deficiente, estas herramientas pueden diseminar al patógeno independientemente del material con el que están fabricados.

En los resultados de nuestro estudio destacan las empresas B y D por mostrar mayores diferencias en la incidencia de los tres grupos microbianos ENT, CF y *E. coli* en herramientas de corte en comparación con las demás empresas (Cuadro 27).

Cuadro 27. Mediana de ENT, CF y *E. coli* en herramienta de corte de 8 empresas.

Empresa	Log UFC ENT/ unidad	Log NMP CF/ unidad	Log NMP EC/ unidad
B	4.87 ^a ± 0.29*	1.28 ^b ± 0.18	0.52 ^b ± 0.09
C	4.05 ^b ± 0.28	0.58 ^c ± 0.12	0.58 ^b ± 0.08
D	5.60 ^a ± 0.44	2.06 ^a ± 0.20	1.20 ^a ± 0.13
F	2.76 ^{cd} ± 0.35	0.52 ^c ± 0.15	0.52 ^b ± 0.11
G	2.23 ^d ± 0.42	0.52 ^c ± 0.17	0.52 ^b ± 0.13
H	2.93 ^{cd} ± 0.42	0.74 ^c ± 0.17	0.74 ^b ± 0.13
I	3.34 ^{bc} ± 0.32	0.52 ^c ± 0.13	0.52 ^b ± 0.09
J	2.18 ^{cd} ± 0.54	0.52 ^c ± 0.25	0.52 ^b ± 0.18

^{a,b,c,d} Letras iguales entre columnas no existe diferencia significativa (P<0.05) carga del indicador en herramienta de corte

* Log medias ± desviación estándar

En 90.9% de las muestras de superficie de mesas y 100% de las de guantes positivas a *E. coli* provenían de la empresa D. Los rangos de positividad fueron de 0.9 a 3.38 Log NMP/400 cm² de mesa y de 1.07 a 3.08 Log NMP/guante (Figura 18). Las demás empresas tuvieron valores menores al límite de detección (0.82 Log /unidad) para mesas y guantes.

Los muestreos de brócoli tuvieron lugar en la temporada de lluvia. Generalmente el suelo de las tablas de cultivo se torna lodoso, aumentando la probabilidad de que los trabajadores resbalen, ensucien los materiales que manejan y transporten microorganismos indeseables.

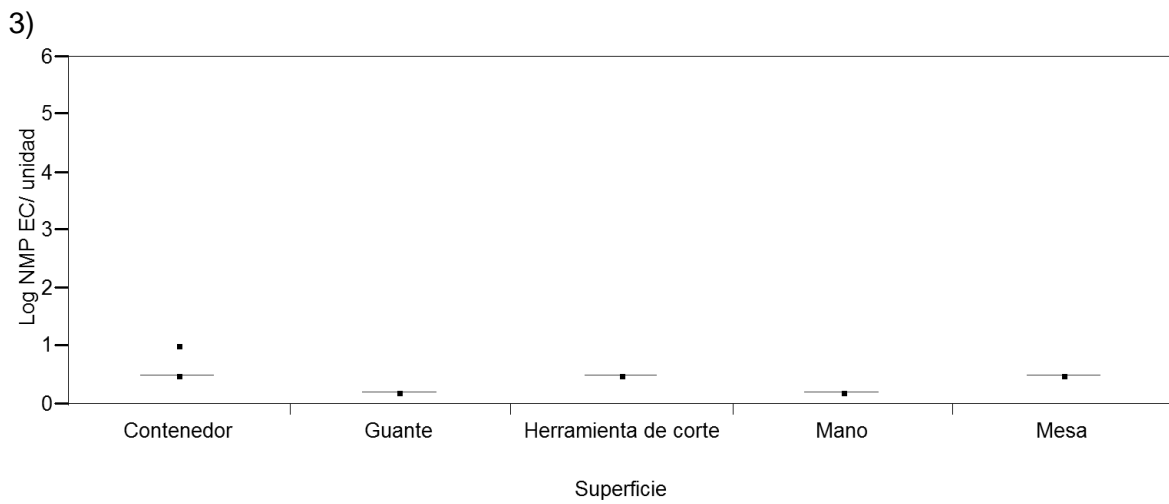
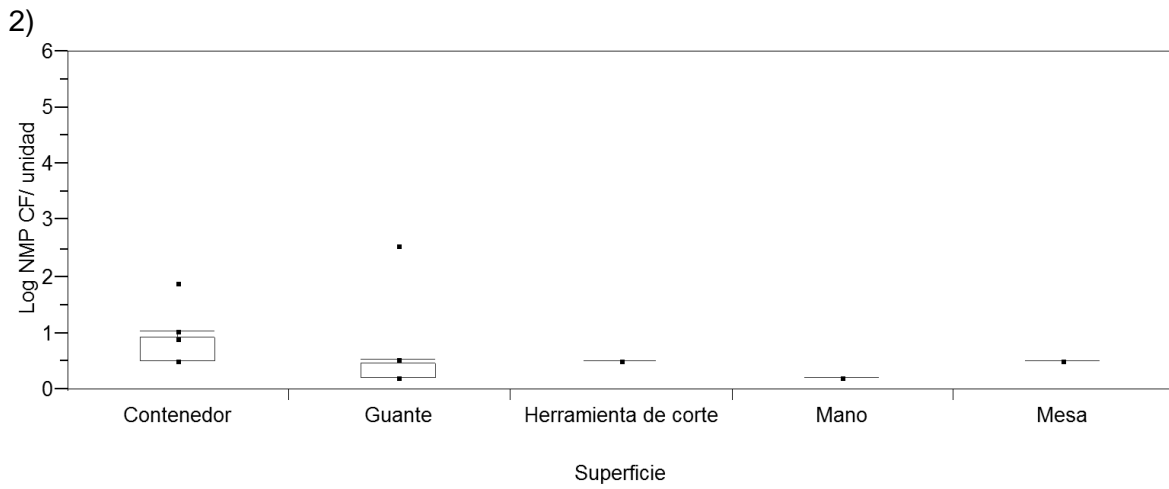
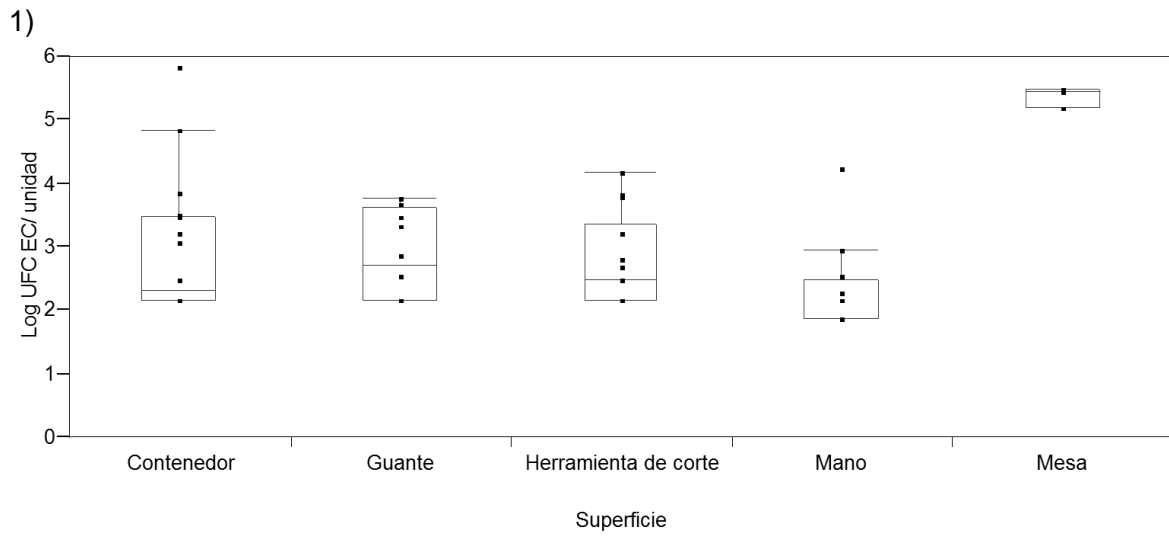
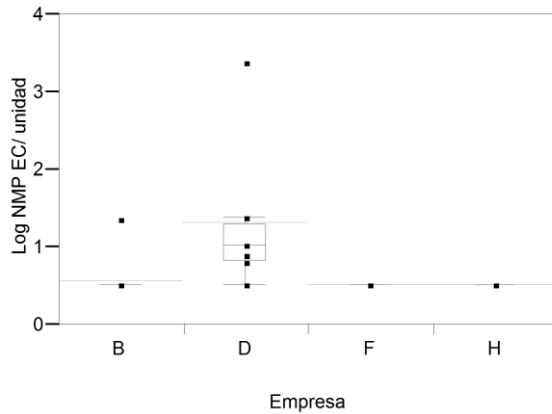


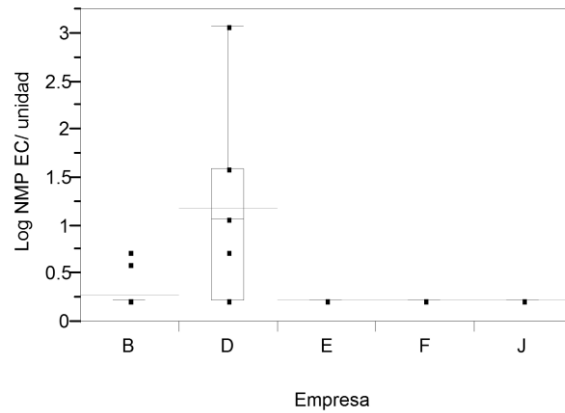
Figura 17. Resumen de los grupos indicadores en cinco tipos de superficies de la empresa F. 1) *Enterobacteriaceae*; 2) coliformes fecales; 3) *E. coli*.

En las manos, la incidencia de *E. coli* fue de 4.1%. La concentración de los diferentes microorganismos indicadores fue de 3.4 Log UFC ENT/mano, < 0.52 Log NMP CF/mano y 0.3 Log NMP *E. coli*/mano. El 60% de las muestras de manos positivas a *E. coli* provenían de la empresa C (Figura 18).

Mesas



Guantes



Manos

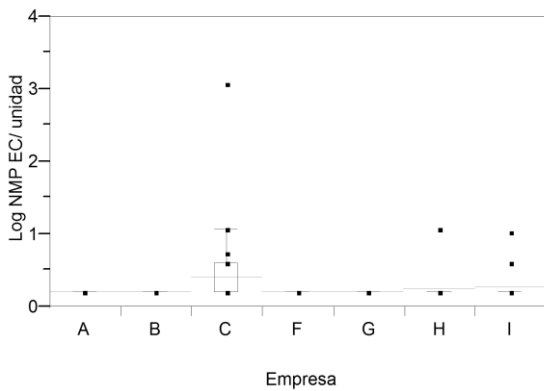


Figura 18. Resumen de contenido de *E. coli* en tres superficies de las empresas..

Mejorar las prácticas de higienización de las manos de los trabajadores es crítico para la reducción de enfermedades transmitidas por los alimentos (Green *et al.*, 2006). Es conocido que los manejadores de alimentos pueden propagar enfermedades a través del contacto de agentes patógenos del tracto gastrointestinal con las manos a objetos que tengan contacto con los alimentos o directamente a estos. Guzewich (1999), encontró que de 81 brotes de ETAs atribuidos a alimentos contaminados por trabajadores 89% de esos brotes la

transmisión de patógenos fue mediante las manos de los trabajadores. Un lavado adecuado puede significar la reducción a la transmisión de patógenos a los alimentos o a otros objetos (Montville *et al.*, 2002; Michaels *et al.*, 2004). Cuando son alimentos que no son listos para consumir se minimiza el peligro de contaminación al usar barreras como guantes y utensilios (Green *et al.*, 2006). No obstante, algunos profesionales creen que el uso de guantes promueve prácticas deficientes de lavado de manos (Fendler *et al.*, 1998; Lynch *et al.*, 2005; Green y Selman, 2005).

Entre las superficies colectadas en cultivo abierto y en invernadero no se encontró diferencia significativa en la incidencia de *E. coli* (media por debajo del límite de detección, es decir, menor a 0.82 NMP/unidad, Figura 19). No obstante, los valores máximos encontrados del microorganismo fueron detectados en superficies que se muestrearon en cultivo abierto (Cuadro 28). Esta situación es congruente con la deficiente o nula higienización en algunas superficies y a las malas prácticas agrícolas que fueron detectadas sobre todo en la empresa D, productora de brócoli.

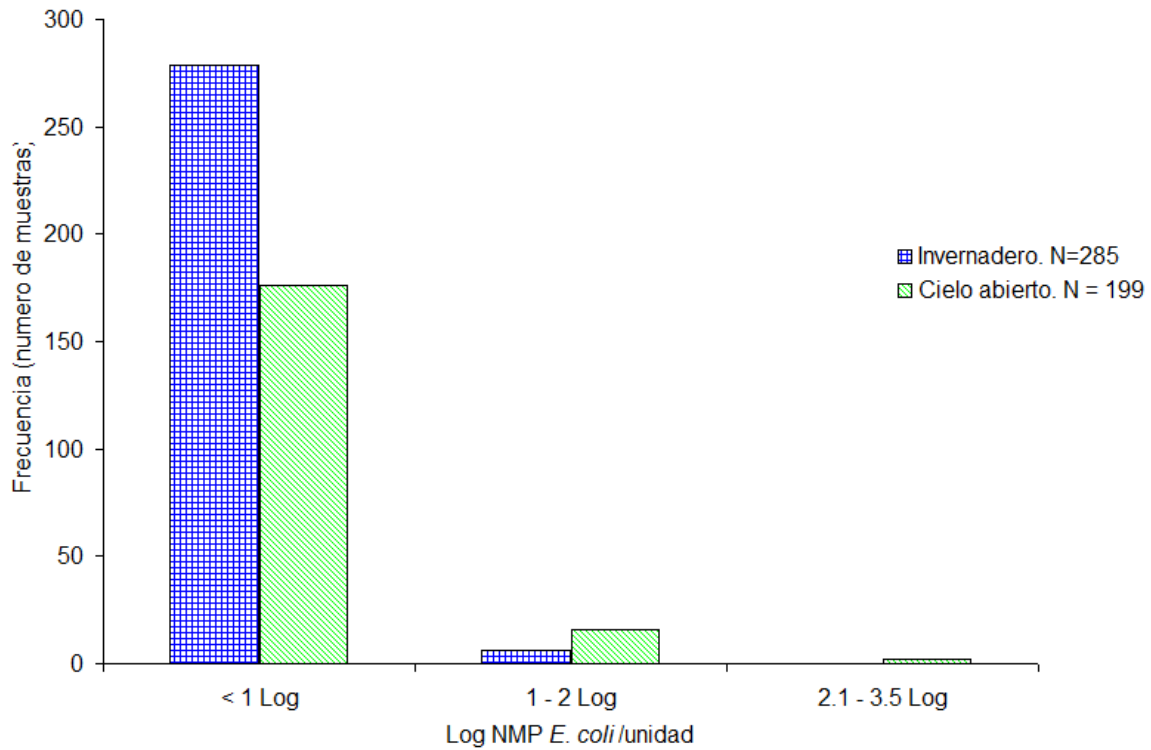


Figura 19. Frecuencia de *E. coli* en contenedores, herramienta de corte, manos, guantes y mesas según el tipo de cultivo: invernadero o cultivo abierto. Rangos expresados en Log NMP/unidad.

Cuadro 28. Resumen de ENT, CF y *E. coli* en superficies según el tipo de cultivo.

Cultivo	<i>Enterobacteriaceae</i> (Log UFC/ unidad)				Coliformes fecales (Log NMP/ unidad)				<i>E. coli</i> (Log NMP/ unidad)			
	N	min	med	máx	N	min	med	máx	N	min	med	máx
Abierto	182	1.70	3.23	8.29	167	0.22	0.52	3.38	199	0.22	0.52	3.38
Invernadero	288	0.74	2.28	8.04	221	0.52	1.65	3.08	285	0.22	0.52	1.89

5.3 Asociación entre las prácticas sanitarias de operación y los niveles de microorganismos indicadores y patógenos en las hortalizas y en materiales asociados a su cultivo y empaque.

La buena infraestructura sanitaria en conjunto con la ejecución de las PSAs deben cumplirse con mayor rigurosidad en aquellas empresas dedicadas a la exportación (aunque no limitarse a ellas) de F&H como estrategias para mejorar la situación sanitaria durante su producción. La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) es la dependencia gubernamental facultada para expedir documentos que sirven de base para la aplicación de estas PSAs y PSO, así como normar, verificar y certificar los sistemas de reducción de riesgos de contaminación física, química y microbiológica durante la producción primaria (FDA, 2001). La SAGARPA también está facultada para que los sitios de producción de estas hortalizas sean objeto de evaluación, auditorías, verificación y certificación del cumplimiento de estas prácticas sanitarias a través de normas oficiales, disposiciones legales aplicables o lo requerido por las autoridades de otros países. La libre comercialización de productos agrícolas mexicanos está condicionada al cumplimiento de requisitos que en materia de Sistemas de Reducción de Riesgos le requieren otros países. Su cumplimiento es un requerimiento técnico obligado para la distribución de esos productos en el mercado (SAGARPA, 2010).

Uno de los requisitos para obtener el certificado como empresas exportadoras consiste en comprobar que los procedimientos de higienización de las hortalizas y superficies que tengan contacto directo con ellas sea eficiente. Esta eficiencia generalmente se valora en términos de una disminución de 3 a 5 logaritmos de determinados grupos indicadores.

En este trabajo se estudió el comportamiento de los microorganismos indicadores en las hortalizas o materiales antes y después de que se llevaran a cabo algunas prácticas de trabajo como:

- El uso de jergas para la limpieza del pepino europeo y jitomate en las empresas H y J.

- La eficiencia del procedimiento de lavado y desinfección del espárrago
- Comportamiento de las densidades de microorganismos indicadores en pepino gourmet antes y después la remodelación del piso en el área de empaque.
- Eficiencias de los procedimientos de higienización de superficies en las empresas

5.3.1 Limpieza de pepino europeo y jitomate con jerga antes de su empaclado

Durante esta operación no es raro incurrir en maniobras que pueden perjudicar la imagen microbiana de los productos.

Al pepino europeo (empresa H) y al jitomate (empresa J) se les retira el polvo de la superficie con jergas. El contenido microbiano de estos trapos se muestra en la Figura 20.

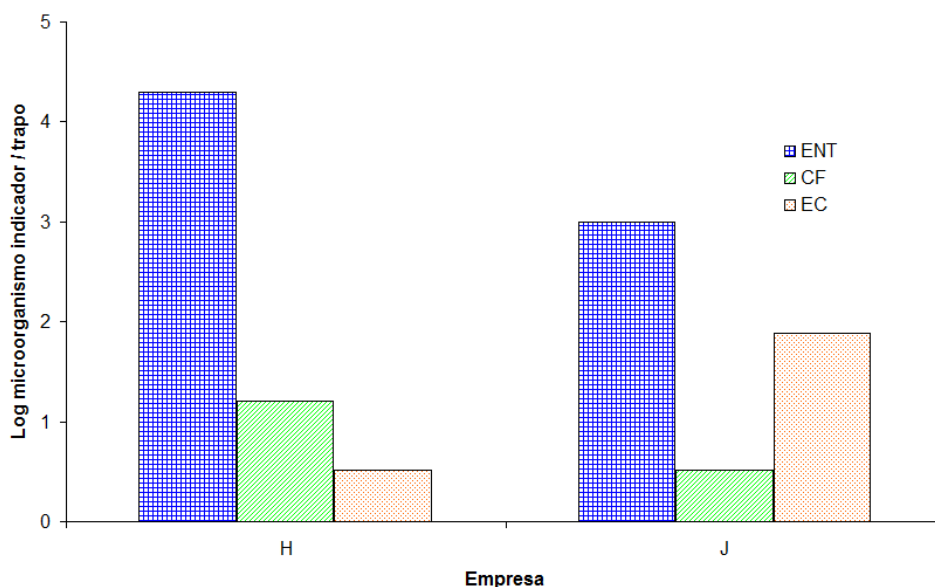


Figura 20. Contenido de microorganismos indicadores en jergas utilizadas para remover el polvo del jitomate y del pepino europeo (empresa H y J) justo antes de su empaclado.

Los fomites se definen como materiales inanimados que circunstancial y temporalmente suelen encontrarse contaminados por un microorganismo de interés (Fernández- Escartín, 2008). Con el tiempo, los trapos llegan a acumular materia orgánica, y con la humedad que se va incorporando, se facilita la proliferación de microorganismos constituyendo reservorios activos de gérmenes indeseables. Esta situación no se limita a las hortalizas durante su empaclado. Por ejemplo, Enríquez *et al.* (1997) detectaron *Salmonella* en 15% de los trapos usados en cocinas de hogares en EE.UU., mientras que en Holanda,

Beumer *et al.* (1996) reportaron que los mayores reservorios de *L. monocytogenes* en el ambiente de los hogares fueron precisamente los trapos de cocina (47%).

En nuestro estudio se muestrearon las hortalizas durante su cultivo y empaque. Dos productos fueron objeto especial de valoración, el espárrago y el pepino gourmet porque son las únicas dos hortalizas que reciben un tratamiento de lavado y desinfección.

5.3.2 Lavado y desinfección del espárrago

El espárrago se cosecha en la temporada de lluvia (junio a septiembre), por lo que es común que llegue a la empacadora con una carga inaceptable de tierra; por lo que es necesario someterlo a un tratamiento de lavado y desinfección (Figura 21).

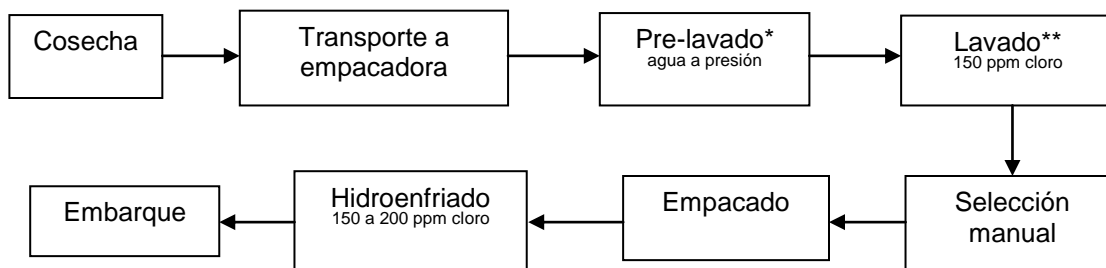


Figura 21 Proceso de cosecha-empaque del espárrago.

* Sólo se lleva a cabo el pre-lavado cuando el espárrago cuenta con gran cantidad de lodo

** Recirculación del agua de lavado aproximadamente durante 1.5 h

El espárrago se deposita dentro de contenedores de plástico perforados. Se hace pasar agua a presión entre los contenedores que se encuentran apilados y se vierte el contenido de cada uno en una banda que los transporta y somete a un baño por aspersión con agua clorada (150 ppm) aproximadamente por 10 segundos. Esta agua recircula alrededor de hora y media antes de ajustar de nuevo el contenido de cloro libre. A continuación se seleccionan según su calidad comercial (tamaño, grosor e integridad), se corta parte del tallo (que tuvo contacto con la tierra) y se colocan en cajas de plástico. El espárrago empacado se desinfecta con agua clorada por aspersión (cloro a 150-200 ppm durante 15 minutos, 4- 6°C).

En esta empresa (A), (durante dos muestreos) se determinó las poblaciones de bacterias en la tierra, espárrago en cultivo, espárrago recién lavado y espárrago recién desinfectado. En el primer muestreo no había llovido cuando se colectaron las muestras, situación contraria en el segundo muestreo. En ambos casos, aun existiendo diferencia en el contenido de materia extraña en los espárragos, el lavado no disminuyó la carga de ENT de forma significativa ($P < 0.05$) con respecto al espárrago en cultivo; sin embargo, la diferencia sí fue significativa para este grupo indicador entre los espárragos muestreados durante el cultivo respecto al empacado y desinfectado (Cuadro 31). Se recomienda en general una reducción mínima de 3 a 5 logaritmos en el contenido bacteriano (Sapers *et al.*, 2006).

La media de ENT en el espárrago durante el cultivo fue de 6.40 (Log/espárrago), y en el empacado y desinfectado de 4.40, es decir, 2 logaritmos de disminución (Figura 22).

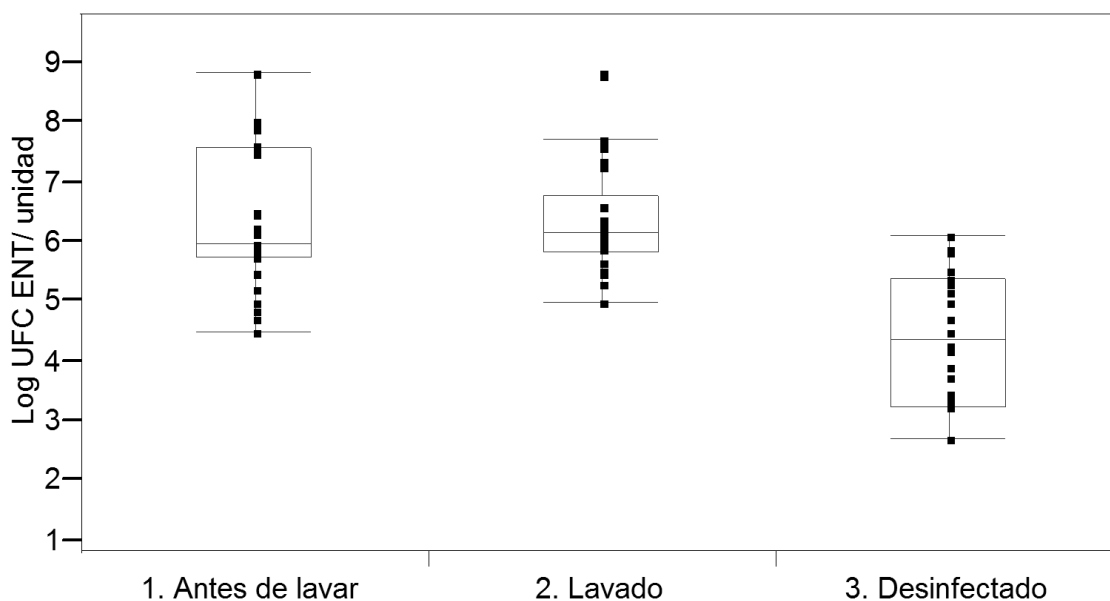


Figura 22. Reducción de las poblaciones de *Enterobacteriaceae* durante el proceso de cosecha-empacado del espárrago en la empresa A.

Cultivo, lavado y desinfectado se refiere a los espárragos colectados durante esa parte del procedimiento.

El proceso de lavado de las hortalizas lleva implícita la posibilidad de provocar una contaminación cruzada, especialmente cuando el agua es reusada o recirculada (Luo *et al.*, 2011). Por lo tanto, la presencia de un agente germicida en el agua de lavado es crítica para prevenir por un lado, la sobrevivencia, por otro la transferencia del patógeno. Atención especial merece cuidar que la materia orgánica no interfiera en la efectividad del tratamiento.

Al medir la concentración de cloro del agua de lavado al inicio del proceso y monitorearla durante la hora y media en la que recircula, en la empresa A (durante el lavado del espárrago), se encontró que a los 30 minutos de iniciado el proceso ya no era posible detectar cloro libre. No se observó una disminución de la carga de *Enterobacteriaceae* en el espárrago después de su lavado. Por lo que el ajuste de la concentración inicial y la frecuencia del monitoreo resultan esenciales para garantizar una operación exitosa de lavado- desinfección.

El cloro es ampliamente utilizado por la industria que produce hortalizas y ensaladas, permitiendo tan solo un impacto mínimo en su calidad nutricional y sensorial (Liu *et al.*, 2002). Cuando las hortalizas son puestas en contacto con el sistema de lavado, el aumento repentino de materia orgánica proveniente de los tejidos de la planta ocasionará una disminución rápida del ácido hipocloroso. Si la demanda de cloro excede la disponibilidad se propicia la contaminación cruzada mencionada. Aumentar la concentración de cloro en el sistema puede estar indicada, si bien se favorece la formación de bioproductos tóxicos que podrían afectar la salud de los trabajadores de esa área (Gil *et al.*, 2009). Por estas razones, la mayoría de los sistemas que utilizan cloro para la desinfección de las hortalizas procuran mantener la concentración de cloro con límite de 200 ppm.

5.3.2.1 Población de *Enterobacteriaceae* en pepino gourmet durante la remodelación del área de empaque

En la empresa B, productora de pepino gourmet, se llevó a cabo una remodelación del piso del área de empaque a partir de la tercera visita (seis en total). La remodelación consistió en lijar el piso para re-cementar. Aparentemente el polvo liberado y suspendido en el aire no sólo afectó el área de empaque, sino el de cosecha (Figura 23). El aumento en la población de ENT fue de casi 5 logaritmos (2.25 a 7.21 Log UFC ENT/pepino), mientras que la incidencia de *E. coli* pasó de 0 al 16.7% con niveles promedio de 2.48 log NMP *E. coli*/ pepino.

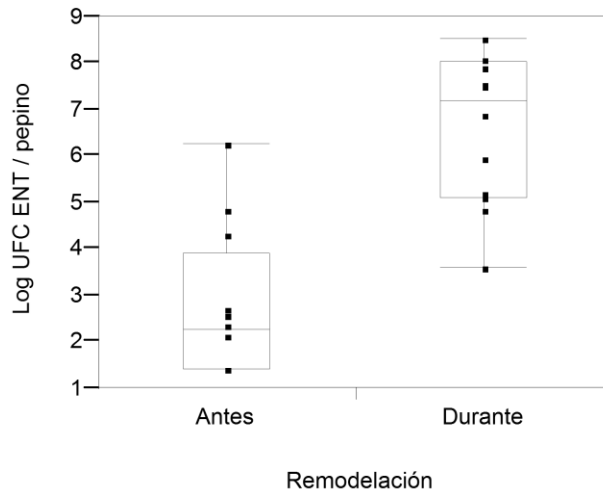


Figura 23. *Enterobacteriaceae* en pepino gourmet antes y durante la remodelación del área de empackado.

En la práctica, podría desconocerse el antecedente de la obra de remodelación al efectuar los muestreos y de la propia hortaliza con el propósito de valorar las prácticas de trabajo que ahí se realizan. La consecuencia sería una interpretación errónea de los factores que determinan una elevación en el contenido del grupo indicador de los materiales examinados ajenos a la verdadera situación prevalente en el sitio implicado. Es claro que el acto de muestreo por sí solo (y fuera de contexto) debe evitarse en todos los casos.

5.3.3 Lavado y desinfección de contenedores, manos, guantes, herramientas de corte y mesas

En general la reducción de la carga de ENT fue similar o menor a un logaritmo después del lavado y/o desinfección de las superficies (Cuadro 29). Los guantes y herramientas de trabajo no mostraron diferencia significativa entre la carga de ENT antes y después del lavado y desinfección (Cuadro 29).

Cuadro 29. *Enterobacteriaceae* en superficies antes y después del proceso de lavado y desinfección de superficies.

Cultivo	N	Antes	Media*		Reducción*
			N	Lavado y desinfectado	
Contenedor	58	2.92 ^a ± 1.25**	52	2.38 ^b ± 0.40	0.54
Guante	14	3.37 ^a ± 1.39	12	3.05 ^a ± 0.93	0.32
Herramienta de corte	38	3.06 ^a ± 1.39	40	3.16 ^a ± 1.18	-0.1
Mano	44	3.34 ^a ± 1.26	48	2.58 ^b ± 0.84	0.76
Mesa	15	3.33 ^a ± 1.21	18	2.30 ^b ± 0.35	1.03

^{a,b} Letras iguales en renglones no existe diferencia significativa ($P < 0.05$) de carga del indicador en superficies antes o después de su higienización.

* Log UFC ENT/ unidad

** Log media ± desviación estándar

Los CF y *E. coli* estuvieron en la mayoría de los casos por debajo del límite de detección, incluso antes de aplicar el tratamiento de higienización. La incidencia de *E. coli* antes del tratamiento fue del 7.1 y de CF del 10.5% (niveles de 0.9 a 3.38 Log NMP/ unidad). Las superficies desinfectadas tuvieron una positividad de *E. coli* de 5.9% y de CF de 8.33% con niveles de 1.07 a 2.56 Log NMP/unidad. No existe diferencia significativa en la incidencia de *E. coli* como consecuencia de la higienización ($P < 0.05$), pero si es menor el grado de contaminación.

Es evidente lo innecesario de incluir a los CF en adición a la *E. coli* para la valoración de la calidad sanitaria de las superficies. Durante varias décadas los CF han sido utilizados como indicadores de contaminación fecal. Sin embargo, la capacidad de fermentar la lactosa con producción de gas a temperaturas de 44 - 44.5 °C no es un parámetro consistente para identificar microorganismos provenientes del tracto intestinal o de las heces fecales (Kornachi y Johnson, 2001). Bacterias como *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp y

Citrobacter freundii, por ejemplo, pueden colonizar sustratos ajenos al tracto intestinal (Kenittel *et al.*, 1977; Splittstoesser *et al.*, 1980; Cox *et al.*, 1988; Ruiz, 2007). Por tal razón, el empleo de *E. coli* adquiere mayor significado que los CF para este propósito (APHA, 1992). Por otra parte, las ENT son mucho más abundantes que CF en las superficies de trabajo y hortalizas. Mientras más elevadas las poblaciones microbianas de un cierto grupo en un material, son mayores los márgenes para evaluar la relación entre los cambios en la concentración, y los factores que contribuyen a tales cambios (en muchos casos las PSAs). Resumiendo, existen buenas razones para prescindir de los CF y recurrir a las ENT y la *E. coli* como microorganismos indicadores de eficacia de algunas prácticas de trabajo y de posible exposición directa o indirecta a la materia fecal en los materiales que tienen contacto con los alimentos.

En los resultados de nuestro estudio destacan las empresas B y D por mostrar mayores diferencias significativas en la incidencia de los tres grupos microbianos ENT, CF y *E. coli* en herramientas de corte (Figura 24). En la empresa B, la irregularidad del lavado y desinfección de las herramientas no fue frecuente y en la D, era muy marcado el comportamiento inadecuado de los trabajadores durante la cosecha. Estos resultados también se observaron en las mesas de empaque y guantes.

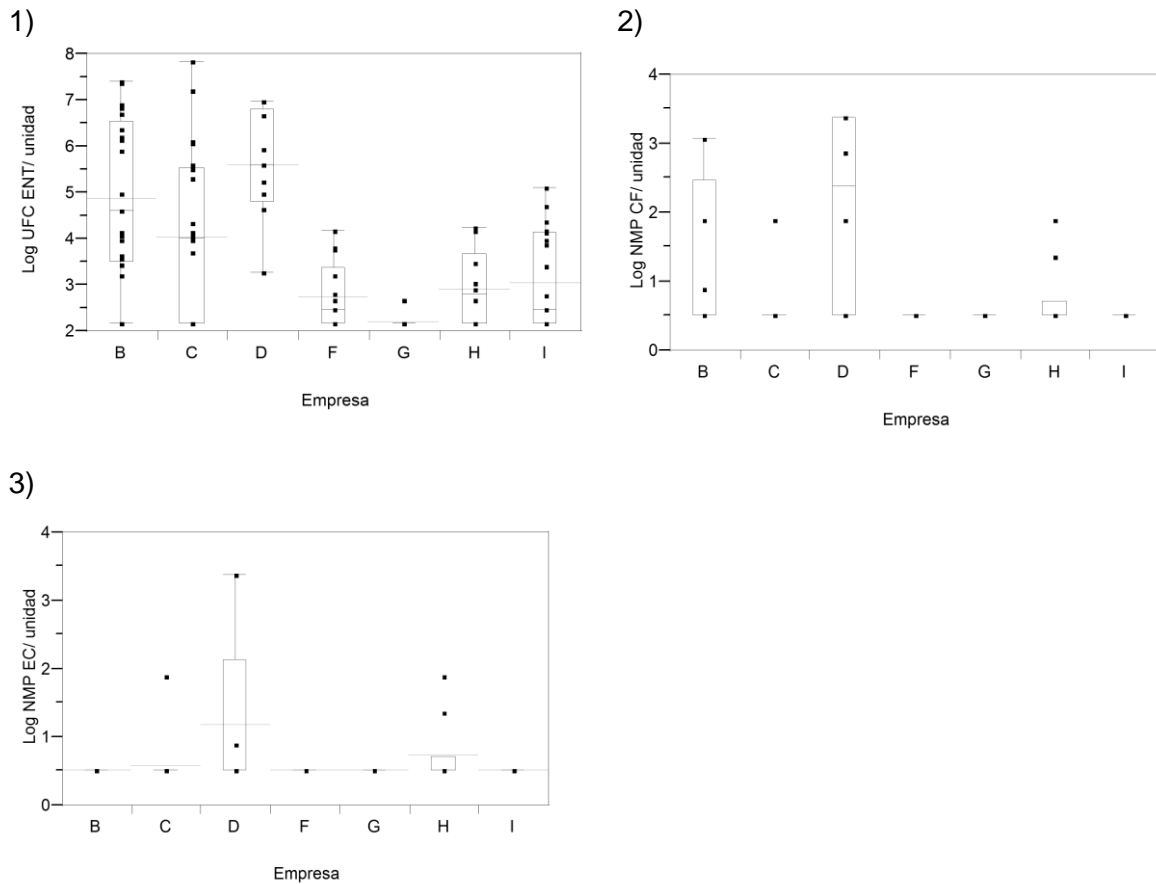


Figura 24. Resumen de la carga de microorganismos indicadores en la herramienta de corte de siete empresas.
 1) Enterobacteriaceae; 2) coliformes fecales; 3) *E. coli*.

A primera vista podría esperarse que la diferencia observada entre la frecuencia de *E. coli* (como indicador de contaminación objetable en las hortalizas) es congruente con el nivel de protección que provee el invernadero con respecto al que se observa durante el cultivo a cielo abierto. El análisis estadístico muestra sin embargo, que dicha diferencia (5.32 contra 2.05%) no es significativa ($P < 0.05$). Una postura racional al respecto es reconocer la protección que provee el invernadero contra dicha contaminación. Podría plantearse que un incremento en los valores de N condujera a un nivel de significancia estadística entre las dos poblaciones de *E. coli* en las hortalizas.

Como en el caso de los materiales inertes, en las hortalizas no se detectó la presencia de *Salmonella* en 315 muestras. Esta condición se observó tanto en

presencia como en ausencia de *E. coli*. El señalamiento anterior también es aplicable si las hortalizas provienen de cultivos en invernadero o en cielo abierto (Cuadro 30). La ausencia de *Salmonella* no excluye obligadamente la eventualidad de que haya ocurrido una contaminación fecal, lo que es explicable. Por un lado, la materia fecal que llegara a contaminar las hortalizas podría encontrarse libre de *Salmonella*. Por otra parte, es posible una contaminación lejana en el tiempo que ha propiciado la inactivación del patógeno por acción de factores ambientales tales como desecación, acción de la luz UV o temperatura adversas al patógeno (Collins, 1971; Brandl *et al.*, 2002; Gruzdev *et al.*, 2010). En estas condiciones, aún es posible el hallazgo de *E. coli* de origen fecal, que puede detectarse (con resultados negativos para *Salmonella*) partiendo del hecho que la concentración del indicador suele estar presente en niveles mucho más elevados del patógeno. Generalmente se acepta que el cultivo en invernadero protege mayormente a las hortalizas que a las cultivadas a cielo abierto; en este estudio se encontró que es posible mantener una calidad sanitaria similar en las hortalizas para ambos tipos de cultivo.

Cuadro 30. Porcentaje de *E. coli*, *Salmonella* en las hortalizas y violaciones a las prácticas sanitarias agrícolas y de operación de las diez empresas según el tipo de cultivo

Tipo de cultivo	N*	<i>E. coli</i> (%) [†]	<i>Salmonella</i> (%)	Violaciones a las PSAs	
				n [‡]	%
Abierto	169	5.32 ^a	0	7/98	7.14 ^a
Invernadero	146	2.05 ^a	0	20/171	11.70 ^a
Total	315	3.81	0	27/269	10.04

^a Letras iguales entre % *E. coli* o de violaciones a las PSAs según el tipo de cultivo, no existe diferencia significativa (P<0.05)

* Muestras de hortalizas analizadas

[†] La muestra se consideró positiva cuando Log NMP *E. coli* ≥ 0.82

[‡] Violaciones detectadas/número máximo de violaciones posibles

La verificación de las prácticas sanitarias de trabajo implica una selección cuidadosa de los microorganismos indicadores idóneos. Como se ha señalado, la detección/ cuantificación de *E. coli* permite evidenciar maniobras o situaciones que sugieran directa o indirectamente una contaminación fecal. Tanto la frecuencia como la densidad de *E. coli* en las superficies de trabajo, fueron en general de bajo nivel. En tales condiciones, puede intentarse una asociación entre el grado de exposición a la contaminación fecal (en términos de *E. coli*) y las violaciones a las PSAs observadas.

Durante el muestreo se estimó de manera visual el grado de suciedad. Siguiendo una escala visual del 1 al 4, donde 1 significa suciedad nula y, 2, 3, 4; baja, media y alta respectivamente. En las Figuras 25,26, 27, 28 y 29 se advierte el nivel de asociación entre el grado de suciedad en diversos materiales y la población de *E. coli*. La frecuencia del indicador en la mayoría de las muestras de superficies (manos, guantes, mesas, contenedores y herramienta de corte) muestran niveles de *E. coli* menores a 7 células/unidad independientemente del grado de suciedad. Más aún, muestras visiblemente limpias llegan a contener poblaciones de *E. coli* más elevadas que aquellas con alto nivel de suciedad aparente. Aparentemente no existe una relación entre el grado de suciedad y la presencia de *E. coli*.

En la mayoría de las muestras de superficie en su conjunto no se detectó *E. coli* (93.2% con niveles menores al límite de detección, esto es 0.82 Log *E. coli*/unidad). Excepcionalmente se obtuvieron valores máximos de *E. coli*, que si embargo no sobrepasan 3.5 Log NMP/unidad independientemente del grado de suciedad (Figuras 25, 26, 27, 28 y 29). Es interesante destacar que los máximos niveles de *E. coli* se detectaron en superficies de la empresa D, justamente la que mostró la mayor frecuencia de violaciones a las prácticas sanitarias. Es notorio que el patrón de distribución cuantitativo de *E. coli*, se mantiene muy próximo entre las diferentes superficies valoradas.

Es pertinente dejar establecido que los términos suciedad y materia fecal no tienen equivalencia que les de validez dentro de la valoración de las PSAs. La presencia de materia fecal en un sustrato puede ser insignificante y aportar

números inaceptables de *E. coli*, sin que esta condición pueda ser detectada visualmente. La suciedad más bien, debe entenderse (en su connotación más amplia) como la expresión de una sanidad inadecuada ajena o no a la presencia de materia fecal. No por eso ha de ser tolerable, y debe de ser evitada rigurosamente dentro de un programa de sanidad. Materia extraña en el equipo y otras superficies pueden estar presentes en ausencia de materia fecal. En este caso es pertinente recurrir a los grupos microbianos indicadores de deficientes PSAs o de procesos de higienización en los materiales como las *Enterobacteriaceae* y eventualmente los organismos coliformes que resultan más sensibles que la *E. coli*. Tal es la situación de los resultados de los procesos de lavado y desinfección de hortalizas y superficies de trabajo en las empresas estudiadas. Las Figuras 25, 26, 27, 28 y 29 muestran la baja incidencia de *E. coli* en los diferentes materiales (medianas menor al límite de detección, 0.82 Log NMP *E. coli*/unidad) independientemente del grado de suciedad. Si se desea conocer el efecto de los procesos de higienización, llega a ser notorio cuando se cuantifica el grupo de las *Enterobacteriaceae* (Cuadro 29), caso contrario cuando sólo se apoya con la determinación de las poblaciones de *E. coli*.

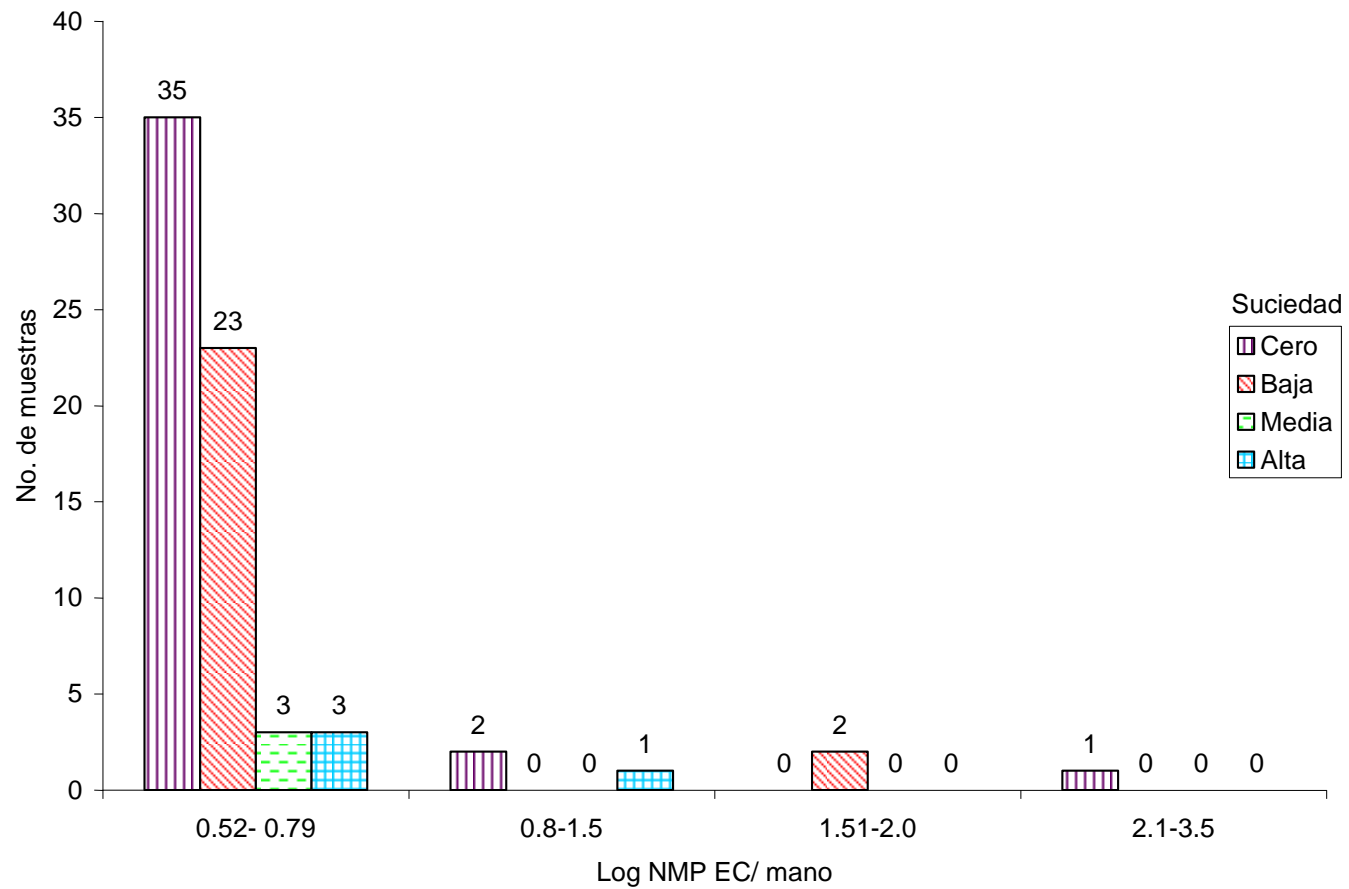


Figura 25. Distribución de *E. coli* en manos según el grado de suciedad.



Figura 26. Distribución de *E. coli* en guantes según el grado de suciedad.

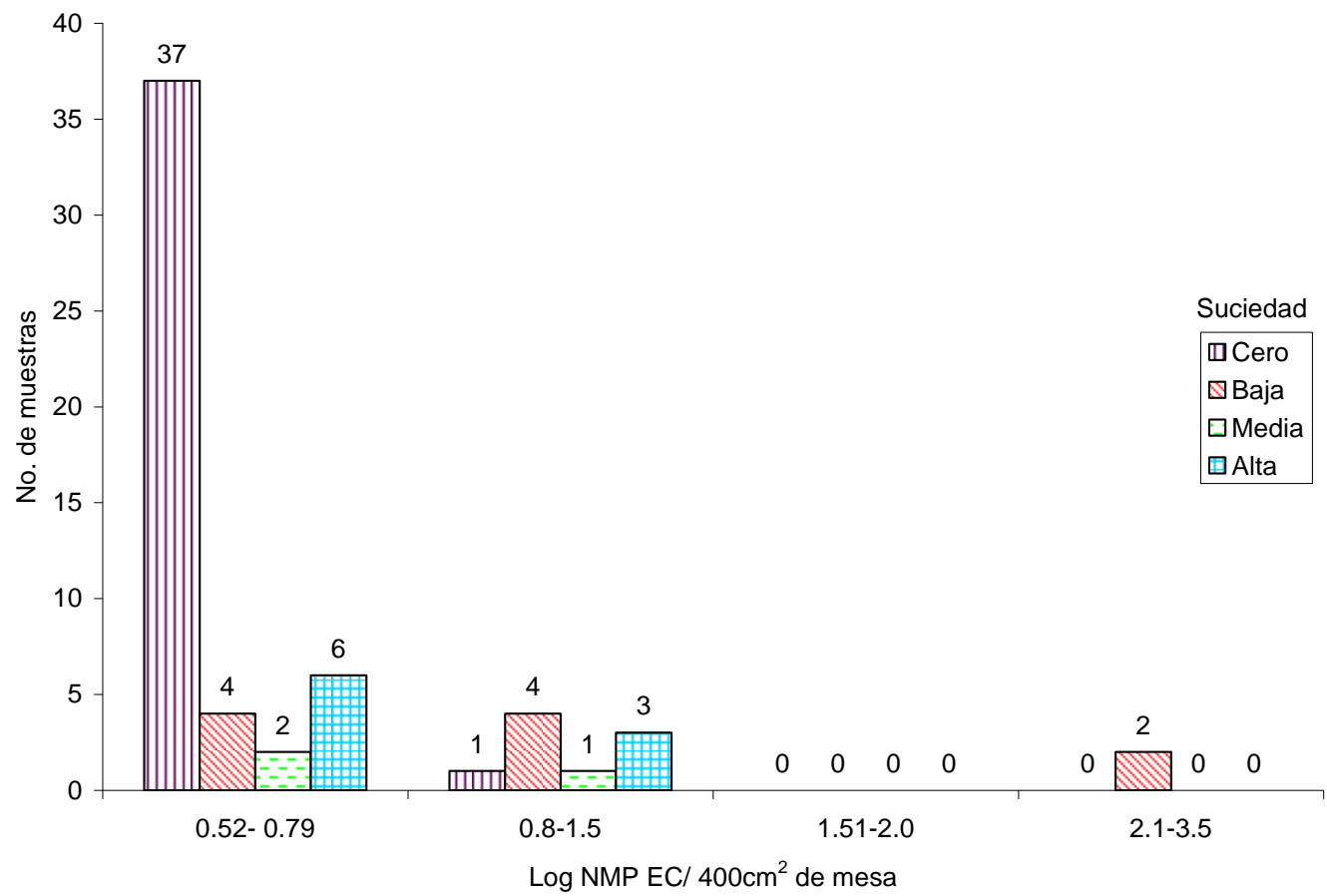


Figura 27. Distribución de *E. coli* en mesas según el grado de suciedad.

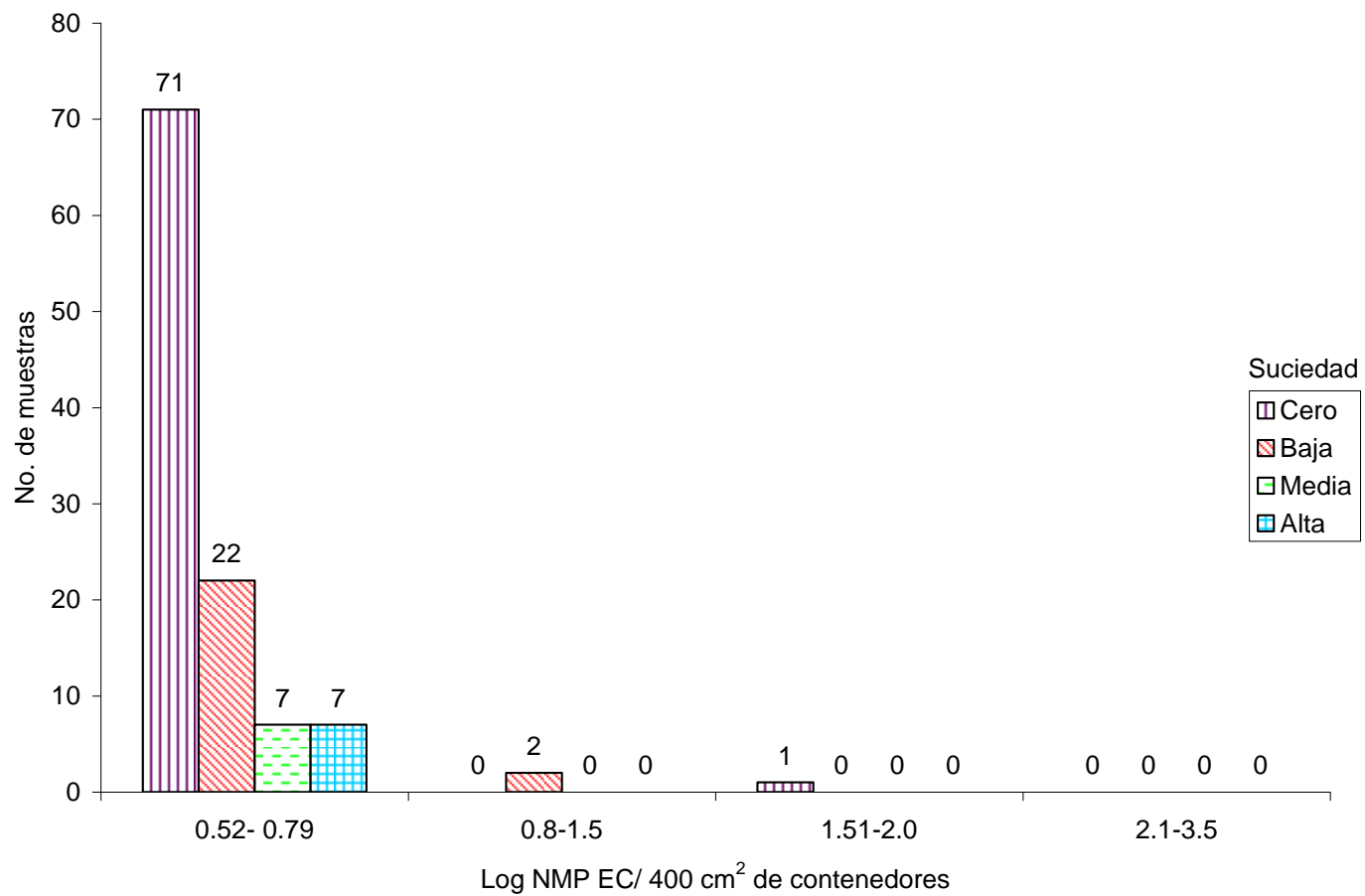


Figura 28. Distribución de *E. coli* en contenedores según el grado de suciedad.

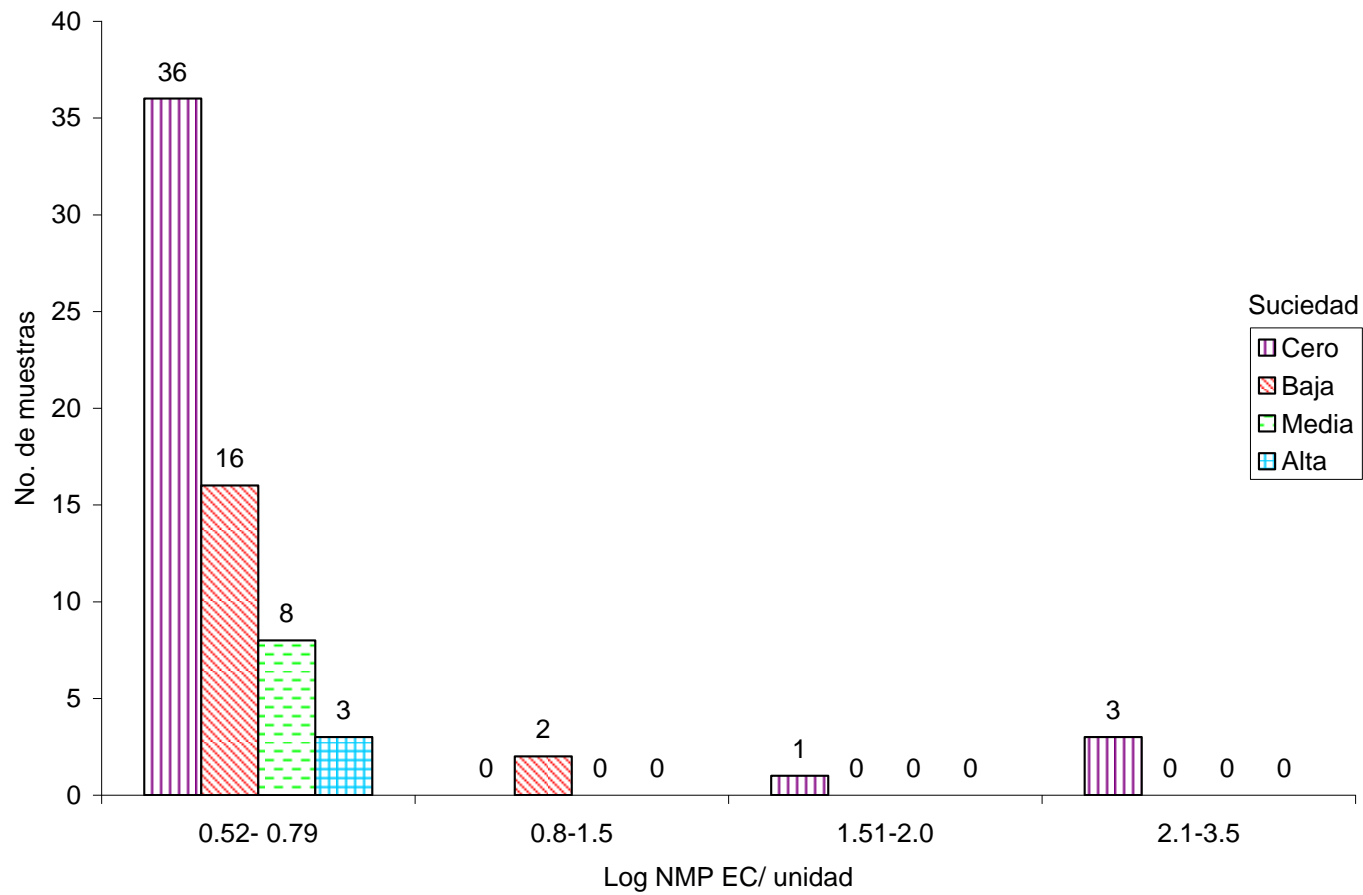


Figura 29. Distribución de *E. coli* en herramientas de corte según el grado de suciedad.

6 CONCLUSIONES

No se detectó *Salmonella* spp en ninguna muestra de hortaliza ni de superficie. Este resultado negativo puede estar determinado por:

- la ausencia del patógeno en las hortalizas o en la materia fecal.
- el bajo número de hortalizas analizadas por empresa. Efectivamente las hortalizas resultaron negativas al patógeno, lo que no excluye la eventual contaminación por materia fecal dentro de las tablas de cultivo.
- el patógeno podría encontrarse en muy bajos números más allá de los límites de detección con las técnicas de análisis seguidas: cultivo tradicional y PCR.
- la hortaliza podría haberse contaminado con el patógeno, y al tiempo del análisis se habría inactivado.

Por tanto, la *Salmonella* no constituye un parámetro confiable de verificación de las PSAs en lo referente a su hallazgo en los materiales. El resultado negativo no es concluyente, es decir, no implica inocuidad en las F&H.

La frecuencia de *E. coli* en las hortalizas y superficies que con ellas tienen contacto directo tienden a ser congruentes con la incidencia de las violaciones a las PSAs en donde se involucra directa o indirectamente la contaminación fecal.

No fue significativamente diferente ($P < 0.05$) la incidencia de *E. coli* en hortalizas procedentes de cultivo abierto respecto a las de invernadero.

Es pertinente recurrir a grupos microbianos con significado más general, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* y eventualmente organismos coliformes. Es decir, como indicadores de deficientes PSAs o de procesos de lavado y desinfección, estos grupos bacterianos resultan más sensibles que la *E. coli*, tomando en cuenta una abundancia mayor en los materiales, previo a los tratamientos descontaminantes.

El apego a las especificaciones que establece SAGARPA para minimizar el riesgo de contaminación por patógenos en las hortalizas, que hace énfasis en la disponibilidad de una infraestructura sanitaria, ejecución de PSAs y las PSO, y

capacitación al personal que interviene en el proceso de cultivo-empaque, promueve la inocuidad de las hortalizas.

El enfoque más consistente para procurar la inocuidad microbiana de las F&H continua siendo la aplicación de PSAs apoyadas con pruebas de laboratorio de verificación en etapas o localidades críticas a lo largo del proceso de elaboración hasta el producto empacado.

El trabajo presenta algunas limitaciones:

- sólo se incluyen empresas que en general siguen prácticas sanitarias de trabajo
- un reducido y diferente número de visitas entre las empresas
- un limitado número de observaciones y muestras analizadas

Los resultados de este estudio resultan de utilidad como base de datos o referencia con valor para la planeación y ejecución de un programa con objetivos similares que se lleve a cabo en mayor escala.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., y Viñas, I. 2008. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprout from retail establishments. *Intern. J. Food Microbiol.*, 123:121-129.
- Al-Ghazali, M., y Al-Azawi, S. 1990. *Listeria monocytogenes* contamination crops grown on soil treated with sewage sludge cake. *J. Appl. Bacteriol.*, 69:642-647.
- Andrews, W. S., Russell, F., Jhon, S., y Stan, B. 2001. *Salmonella. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Fourth edition. American Public Health Association.
- Angelillo, I. F., Foresta, M. R., Scozzafava, A. M., y Pavia, M. 2001. Consumers and foodborne diseases: knowledge, attitudes and reported behavior in one region of Italy. *Int. J. Food Microbiol.*, 64:161-166.
- Anónimo 1978. *Microorganisms in Foods. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Specific Applications*. 2nd ed. University of Toronto. Ontario, Canada.
- APHA. 1992. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4° edition. Pouch Downnes Keith Ho., Washington, DC.
- Aznar R., Alarcón B. 2002. On the specificity of PCR detection of *Listeria monocytogenes* in food: a comparison of published primers. *J. Appl. Microbiol.*, 25: 109-119.
- Bean, N. H., Goulding, J. S., Daniels, M. T., y Angulo, F. J. 1997. Surveillance for foodborne outbreaks United States. *J. Food Prot.*, 60:1265-1286.
- Bean, N., y Griffin, P. 1990. Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987 pathogens, vehicles, and trends. *J. Food Prot.*, 53:804-817.
- Beatty, M. E., Adcock, P. M., Smith, S. W., Quinlan, K., Kamimoto, L. A., Rowe, S. Y. 2006. Epidemic diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin. Infect. Dis.*, 42:329-334.

- Becker, G. S. 2010. U.S. food and agricultural imports: safeguards and selected issues. Congressional Research Service.
- Besser, R. E. 1993. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *J. Am. Med. Assoc.*, 269:2217-2220.
- Beuchat, L. R. 1996. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *J. Food Prot.*, 59(2):204-216.
- Beuchat, L. R. 1998. Surface Decontamination of Fruits and Vegetables Eaten Raw: A Review. WHO/FSF/FOS/98.2. Food Safety Unit, World Health Organization, Geneva.
- Beuchat, L. R. 1999. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces applied to lettuce and the effectiveness of chlorinated water as a disinfectant. *J. Food Prot.*, 62:845.
- Beuchat, L. R., y Ryu, J. H. 1997. Produce handling and processing practices. *Emerg. Infect. Dis.*, 3(4):459-465.
- Beuchat, L. R., Nail, B. V., Adler, B. B., y Clavero, M. R. 1998. Efficacy of spray application of chlorinated water in killing pathogenic bacteria on raw apples, tomatoes, and lettuce. *J. Food Prot.*, 61:1305-1311.
- Beuchat, L. R. 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes Infect.* 4:413-423.
- Beumer, R.R., Griffel, M.C., Spoorenberg, E. and Rombouts, F.M., 1996. *Listeria* species in domestic environments. *Epidemiol. Infect.* 117:437-442.
- Bihn, E. A., y Gravani, R. B. 2006. *Role of Good Agricultural Practices in Fruit and Vegetable Safety*. In K. R. Matthews, *Microbiology of Fresh Produce* (pág. 21-53). Washington DC. ASM Press.
- Blackman, R., y Frank, J. 1996. New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruit and vegetables. *Trends Food Sci.*, 7:179-187.

- Brackett, R. E. 1999. Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens in produce. *Postharv. Biol. Technol.*, 15:305-311.
- Brandl, M. T., y Mandrell, R. E. 2002. Fitness of *Salmonella enterica* serovar Thompson in the cilantro phyllosphere. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 68:3614-3621.
- Bryan, F. 1978. Factors that contribute to outbreaks of foodborne disease. *J. Food Prot.*, 41:816-827.
- Burnett, A. B., Iturriaga, M., Escartín, E., Pettigrew, C. A., y Beuchat, L. R. 2004. Influence of variations in methodology on populations of *Listeria monocytogenes* recovered from lettuce treated with sanitizers. *J. Food Prot.*, 64:742-750.
- Buzby, J. C., Roberts, T., Jordan-Lin, C. T., y Mc Donald, J. M. 1996. Bacterial foodborne disease: medical costs and productivity losses. Washington, DC, USA: USDA, Agricultural Economic Report 741.
- Caldwell, K. N., Adler, B., Anderson, G. L., Williams, P. L., y Beuchat, L. R. 2003. Ingestion of *Salmonella enterica* serotype Poona by a free-living nematode, *Caenorhabditis elegans*, and protection against inactivation by produce sanitizers. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 69:4103-4110.
- Castañeda, J. A. 2010. Incidencia de *Salmonella* y *Escherichia coli* en apio durante su cultivo, empaque, comercialización y consumo. Comportamiento de *Salmonella* en jugo de apio. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.
- CDC. 1975. *Salmonella typhimurium* outbreak traced to a commercial apple cider. New Jersey: MMWR. 24:87-88.
- CDC. 1996. Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for foodborne disease outbreaks United States, 1988-1992. *Morb. Mortal. Weekly Rep. Pub. Health Serv.*, A. Atlanta, Ga. MMWR 45/No SS-5.

CDC, Mayo de 2000. Foodborne illness- adding fresh fruits and vegetables to the equation. Recuperado el 25 de Abril de 2010, de Food Safety. Throughout the Food System: <http://foodsafety.psu.edu>

.CDC. 2001. Analysis and Evaluation of Preventive Control Measures for the Control and Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh-Cut Produce. Descargado Abril 2010.

<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFoodProcesses/ucm091265.htm>

CDC, Noviembre de 2002. Multistate Outbreaks of *Salmonella* Serotype Poona Infections Associated with Eating Cantaloupe from Mexico - United States and Canada, 2000- 2002. Recuperado en Mayo de 2011. Atlanta, Ga. MMWR 51(46):1044-1047.

CDC. Octubre de 2011. Multistate Outbreak of Listeriosis Associated with Jensen Farms Cantaloupe --- United States, August--September 2011. Recuperado en Octubre de 2011. Atlanta, Ga. MMWR 60(39);1357-1358.

Clark, M. Diciembre de 2009. Food Poison Journal. Recuperado el 25 de Abril de 2010, de Outbreak of human *Salmonella* Typhimurium infections associated with contact with water frogs:

<http://www.foodpoisonjournal.com/2009/12/articles/foodborne-illness-outbreaks/outbreak-of-human-Salmonella-typhimurium-infections-associated-with-contact-with-water-frogs/>

Collins, F. M. 1971. Relative susceptibility of acid-fast and non-acid-fast bacteria to ultraviolet light. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 21:411-413.

Cook, K. A., MSPH, Dobbs, T., Hlady, G., Wells, J., Barrett, T. 1998. Outbreak of *Salmonella* serotype Hartford infections associated with unpasteurized orange juice. *J. Am. Med. Assoc.*, 280:1504-1509.

Cox, L., Keller, N., y Schothorst, M. 1988. The use and misuse of quantitative determinations of *Enterobacteriaceae* in food microbiology. *J. Appl. Microbiol.*, 237S-249S.

- CSPI, C. F. Diciembre de 2009. Outbreak alert! analyzing foodborne outbreaks 1998-2007. Recuperado el 12 de Julio de 2010
<http://cspinet.org/new/pdf/outbreakalertreport09.pdf>.
- Davies, R. H., y Wray, C. 1996. Seasonal variations in the isolation of *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* from environmental samples. *J. Vet. Med.*, B43:119-127.
- Díaz, S. R., y Vernon, C. J. 1999. Inocuidad microbiológica de frutas frescas y mínimamente procesadas. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 2:133-136.
- Dohlman, E., y Gehlhar, M. September de 2007. U.S. trade growth: a new beginning or a repeat of past? Amber Waves. Obtenido de U.S. Department of Agriculture:
<http://www.ers.usda.gov/AmberWaves/September07/Features/USTrade.htm>
- Domínguez A. Torner N., Ruiz L., Martínez A., Bartolomé R., Sulleiro E., Teixidó A., Plasencia A. 2006. Foodborne *Salmonella*-caused outbreaks in Catalonia (Spain), 1990 to 2003. *J. Food Prot.*, 70(1):209-213.
- Doyle, M. P., y Erickson, M. C. 2008. *Imported Foods. Microbiological Issues and Challenges*. ASM Press, Washington, DC.
- Edwards, P. R., y Ewing, W. H. 1972. *Identification of Enterobacteriaceae*. 3th edition. Georgia, USA: Ed. Burgess. Publishing Company.
- Enríquez, C. E., Enríquez-Gordillo, R., Kennedy, D. I., and Gerba, C. P. 1997. Bacteriological survey of used cellulose sponges and cotton dishcloths from domestic kitchens. *Dairy, Food and Environ Sanit.*, 17:2-24.
- Erickson, M., Liao, J., Payton, A., Riley, D., Webb, C., Davey, L., 2010. Preharvest internalization of *Escherichia coli* O157:H7 into lettuce leaves, as affected by insect and physical damage. *J. Food Prot.*, 73:1809-1816.
- FDA. Septiembre de 2001. Recuperado el 21 de Abril de 2010, de <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFoodProcesses/ucm091050.htm>

- FDA. Febrero de 2008. Guidance for Industry: Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards of Fresh-cut Fruits and Vegetables.
- FDA/CFSSAN. Septiembre de 2001. Analysis and evaluation of preventive control measure for the control and reduction / elimination of microbial hazards on fresh-cut produce. Recuperado el 25 de Abril de 2010, de U.S. Food and Drug Administration. Department of Health y Human Services:
<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFoodProcesses/ucm090977.htm>
- Fendler, E., Dolan, M., y Williams, R. 1998. Handwashing and gloving for food protection. Part I: examination of the evidence. *Dairy Food Envir. Sanit.*, 18:814-823.
- Fenlon, D. R. 1985. Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. *J. Appl. Bacteriol.*, 59:537–544.
- Fernández Escartín, E. 2008. *Microbiología e Inocuidad de los Alimentos*. Querétaro. Ed. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.
- Fernández Escartín, E. 1981. *Microbiología Sanitaria. Agua y Alimentos. Volumen I*. Ed. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco. México.
- Fernández Escartín, E., Pérez, B. M., Álvarez, M., 1999. Riesgos a la Salud Asociados a la Contaminación, Supervivencia y Desarrollo de *Listeria monocytogenes* en el Procesamiento de Brócoli Precocido y Congelado en Pantas del Bajío. Cuaderno de trabajo. Ed. Sistema de Investigación Miguel Hidalgo. Área de Alimentos. Querétaro, México.
- Foley, D., Euper, M., Caporaso, F., y Prakash, A. 2004. Irradiation and chlorination effectively reduces *Escherichia coli* O157:H7 inoculated on cilantro (*Coriandrum sativum*) without negatively affecting quality. *J. Food Prot.*, 67:2092-2098.
- Gagliardi, J., Millner, P., Lester, G., y Ingram, D. 2003. On farm and postharvest processing sources of bacterial contamination to melon rinds. *J. Food Prot.*, 66: 82-87.

- Gast, K., y Holt, K. 2000. Agricultural water. Kansas State University Agricultural experiment station and cooperative extension service. Obtenido de www.oznet.ksu.edu.com
- Geldreich, E. E. 1970. Applying bacteriological parameters to recreational water quality. *J. Amer. Water. Works Ass.* 62:113-120.
- Gil, M. I., Allende, A., López-Gálvez, F., y Selma, M. V. 2009. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: problems and solutions. *Intern. J. Food Microbiol.*, 134:37-45.
- Green, L., y Selman, C. 2005. Factors impacting food workers' and managers' safe food preparation practices: a qualitative study. *Food Prot. Trends*, 25:981-990.
- Green, L. R., Selman, C. A., Radke, V., Ripley, D., Mack, J. C., Reimann, D. W. 2006. Food worker hand washing practices: an observation study. *J. Food Prot.*, 69(10):2417-2423.
- Greig, J. D., Todd, E. C., Bartleson, C. A., y Michaels, B. S. 2007. Outbreaks where food workers have been implicated in spread of foodborne disease. Part 1. Description of the problem, methods, and agents involved. *J. Food Prot.*, 70(7):1752-1761.
- Gruzdev, N., Pinto, R., y Sela, S. 2010. Effect of desiccation on tolerance of *Salmonella enterica* to multiple stresses. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 77:1667-1673.
- Guzewich, J. A. 1999. Evaluation of risks related to microbiological contamination of ready-to-eat food by food preparation workers and the effectiveness of interventions to minimize those risks. Recuperado en enero de 2010 de: <http://www.cfsan.fda.gov/~ear/rterisk.html>
- Harris, L. J., Uesugi, A. R., Danyluk, M. D., y Mandrell, R. E. 2007. Isolation of *Salmonella enteritidis* phage type 30 from a single almond orchard over a 5-year period. *J. Food Prot.*, 70(8):1784-1789.

- Heisick, J. E., Wagner, D. E., Nierman, M. L., y Peeler, J. T. 1989. *Listeria* spp. found on fresh market produce. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 55:1925-1927.
- Ho, J., K. N. Shands, G. Friedland, P. Echlin, y D. W. Fraser. 1986. An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. *Arch. Intern. Med.* 146:520-524.
- Huang, S. 2004. Global trade patterns in fruits and vegetables. Agriculture and trade Report. Number WRS-04-06. USDA. www.ers.usda.gov.
- INEGI, I. N. 2010. Anuario estadístico del comercio exterior de los Estados Unidos Mexicanos 2009. México.
- Jaquette, Cynthia, B., Beuchat, L. R., y Mahon, B. 1996. Efficacy of chlorine and hat treatment in killing *Salmonella Stanley* inoculated onto alfalfa seeds and growth and survival of the pathogen during sprouting and storage. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 62:2212-2215.
- Jerardo, A. 2003. Import share of U.S. food consumption stable at 11 percent. Recuperado el 5 de 03 de 2007, de USDA:
<http://www.ers.usda.gov/publications/fau/july03/fau7901/fau7901.pdf>
- Johnston, L. M., Jaykus, L.-A., Moll, D., Martínez, M. C., Anciso, J., Mora, B. 2005. A field study of the microbiological quality of fresh produce. *J. Food Prot.*, 68 (9): 1840-1847.
- Keith, P. D. 2001. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Ed. American Public Health Association. Washington, DC.
- Kenittel, M. D., Seidler, R. J., Eby, C., y Cabe, L. M. 1977. Colonization of the botanical environment by *Klebsiella* isolates of pathogenic origin. *J. Appl. Microbiol.*, 34:557-563.
- Kirk, M., Fullerton, K., y Gregory, J. 2008. Fresh produce outbreaks in Australia 2001-2006. In: 2008 International Conference on Emerging Infectious Diseases Program and Abstracts Book. , 49–50. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention.

- Koneman, E. W., Allen, S. D., Dowell, R., y Sommers, H. M. 1983. *Diagnóstico Microbiológico*. Buenos Aires, Argentina: Ed. Médica Panamericana.
- Kornacki, J. L., y Johnson, J. L. 2001. *Enterobacteriaceae, Coliforms, and Escherichia coli as Quality and Safety Indicators*. En a. K. In F. P. Downes (Ed.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (págs. 69–82). Washington, DC, EE.UU: American Public Health Association.
- Lee, A. 1978. What constitutes an infective dose of a food poisoning organism. *Food Technol Austral.*, 30:335-338.
- Leyer, G. J.-L. 1995. Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 61:3752-3755.
- Liu, T., K.Liljebelke, Bartlett, E., Hofacre, C., Sánchez, S., y Maurer, J. 2002. Application of nested polymerase chain reaction of *Salmonella* in poultry environment. *J. Food Prot.*, 65:1227-1232.
- Lu, Y., y Wu, C. 2010. Reduction of *Salmonella enterica* contamination on grape tomatoes by washing with thyme oil, thymol, and carvacrol as compared with chlorine treatment. *J. Food Prot.*, 73:2270-2275.
- Lundén, J., Markkula, A., Hellström, S., y Korkeala, H. 2000. Adaptive and cross adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. *Int. J. Food Microbiol.*, 82:265-272.
- Luedtke, A. N., Chapman, B., y Powell, D. A. 2003. Implementation and analysis of an on-farm food safety program for the production of greenhouse vegetables. Research note. Ontario Canada. *J. Food Prot.*, 66(3):485-489
- Luo, Y., Nou, X., Yang, Y., Alegre, I., Turner, E., Feng, H. 2011. Determination of free chlorine concentrations needed to prevent *Escherichia coli* O157:H7 cross-contamination during fresh-cut produce wash. *J. Food Prot.*, 74(3):352-358.

- Lynch, R., Phillips, M., Elledge, B., Hanumanthaiah, S., y Boatright, D. 2005. A preliminary evaluation of the effect of glove use by food handlers in fast food restaurants. *J. Food Prot.*, 68:187-190.
- Lynch, M. 2006. Surveillance for foodborne disease outbreaks, United States 1998-2007. Atlanta: MMWR.
- Mafu, A., Goulet, J., y Magny, P. 1990. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. *J. Food Prot.*, 53:742-746.
- Marler, B. Julio de 2011. MarlerBlog. Recuperado el 25 de Julio de 2011, de Chronology of the *E. coli* O104:H4 Outbreak Investigation - The German EHEC Task Force Final Results: <http://www.marlerblog.com/legal-cases/chronology-of-the-e-coli-o104h4-outbreak-investigation---the-german-ehec-task-force-final-results/>
- Marler, C. 2010. *E. coli* bacteria: what are they, where did they come from, and why are some so dangerous? Recuperado el 25 de Abril de 2010, de Surveillance y Analysis on *E. coli* news y Outbreaks: <http://www.about-ecoli.com/>
- Marteau, S. A., Rosato, M., Albertino, J., y Ripoli, J. 1998. Quality of water wells in an agricultural area in the city of La Plata, Argentina. *Water, Air, y Soil Pollution*, 106:447-462.
- Matthews, K. R. 2006. *Microorganisms Associated with Fruits and Vegetables*. Washington DC: ASM Press.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C. 1999. Food-Related Illness and Death in the United States. Vol 5, No. 5, September- October.
- Michaels, B., Keller, C., Blevins, M., Paoli, G., Ruthman, T., Todd, E. 2004. Prevention of food worker transmission of foodborne pathogens: risk assessment and evaluation of effective hygiene intervention strategies. *Food Service Techn.*, 4:31-49.

- Miller, L. G. 1994. *Escherichia coli* O157:H7 acid-tolerance and survival in apple cider. *J. Food Prot.*, 57:460-464.
- Montville, R., Chen, Y., y Schaffner, D. 2002. Risk assessment of hand washing efficacy using literature and experimental data. *J. Food Microbiol.*, 73:305-313.
- Mossel, D. A., y P., V. N. 1990. *Staphylococcus aureus* and related staphylococci in foods: ecology, proliferation, control and monitoring. *J. Appl. Microbiol.*, 123S–145S.
- Mukherjee, A., Speh, D., Dyck, E., and Diez-Gonzalez, F. 2004. Preharvest evaluation of coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157:H7 in organic and conventional produce grown by Minnesota farmers. *J. Food Prot.*, 67(5):894-900.
- Mukherjee, A., Speh, D., Jones, A., Buesing, K., and Diez-Gonzalez F. 2006. Longitudinal Microbiological Survey of Fresh Produce Grown by Farmers in the Upper Midwest. . *J. Food Prot.*, 69(8):1928-1936.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., y Pfaller, M. A. 2006. *Microbiología Médica*, 5° edición. Ed. Elsevier Mosby.
- OMS. 2005. *Manual de Bioseguridad en el Laboratorio*. 3° edición. Ediciones de la OMS. Suiza.
- Orozco, L. R. 2008. Rastreo de la fuente de *Salmonella* en jitomate durante su producción en invernaderos hidropónicos. Tesis de Doctorado. Ed. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.
- Pabrúa, F. F., y William, J. 2003. Challenges, progress and solutions in produce safety. *Food Safety Magazine*, 49-52.
- Paulson, D. 2000. Handwashing, gloving, and disease transmission by the food preparer. *Diary Food Environ. Sanit.*, 20:838–845.
- Paulson, D. 1996. To glove or to wash: current controversy. Jun/July: 60-64.

- Peeler, J. T., y Maturin L. J. 1992. *Aerobic plate count*. In: *Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual*. 7th Ed. AOAC International. USA. pp 17-26.
- Pirovani, M. E., Güemes, D. R., y Piagentini, A. M. 2006. *Lavado Desinfección con Soluciones Cloradas. Una Etapa para Mejorar la Calidad Microbiológica de Vegetales de Hoja Frescos Cortados*. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina
- Prazak, A. M., Murano, E. A., Mecado, I., y Acuff, G. R. 2002. Prevalence of *Listeria monocytogenes* during production and postharvest processing of cabbage. *J. Food Prot.*, 65(11):1728-1734.
- Puig-Durán. 1999. *Ingeniería, Autocontrol y Auditoría de la Higiene en la Industria Alimentaria*. AMV-Ediciones. España
- Ramaswamy, V., Cresence, V. M., Rejitha, J. S., Lekshmi, M. U., Dharsana, K. S., Prasad, S. P. 2007. *Listeria*- review of epidemiology and pathogenesis. *J Microbiol Inmunol Infect.*, 40:4-13.
- Rangel, D. M. 2009. Incidencia y fuentes de contaminación de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y bacterias indicadoras en zanahoria a lo largo del cultivo, acondicionamiento y empaquetado en dos empresas productoras. Tesis de Maestría. Querétaro. Ed. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.
- Rendtorf, F. R. 1954. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. *Am. J. Hyg.*, 59:209–220.
- Renterghem, V., B. Huysman, F., Rygole, R., y Verstraete, W. 1991. Detection and prevalence of *Listeria monocytogenes* in the agricultural ecosystem. *J. Appl. Bacteriol.*, 71:211-217.
- Rico Romero, L. 2003. Perfil de contaminación microbiana de una planta productora de jitomate hidropónico. Tesis de maestría. Ed. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.

- Rocourt, J., y Cossart, P. 1997. *Listeria monocytogenes*. En M. Doyle, L. R. Beuchat, y T. M. Montville, *Food Microbiology: Fundamentals and frontiers*. Washington D.C. ASM Press. p. 337-352
- Ruiz, A. M. 2007. Fuentes y mecanismos de contaminación de *Salmonella* hacia frutas y hortalizas durante su cultivo y cosecha. Tesis de Maestría. Ed. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.
- SAGARPA. 2010. Retos y oportunidades del sistema agroalimentario de México de los próximos 20 años. México.
- SAGARPA(a). 2010. Lineamientos generales para la operación y certificación de sistemas de reducción de riesgos de contaminación en la producción primaria de alimentos de origen agrícola. México.
- Sagoo, S. K., Little, C. L., Ward, L., Gillespie, I. A., y Mitchell, R. T. 2003. Microbiological study of ready-to-eat salad vegetables from retail establishments uncovers a national outbreak of salmonellosis. *J. Food Prot.*, 66:403-409.
- Sapers, G. M., Gorny, J. R., y Yousef, A. E. 2006. *Microbiology of Fruits and Vegetables*. Taylor y Francis Group. Edit. CRC Press.
- Sapers, G. M., Solomon, E. B., y Matthews, K. R. 2009. *The Produce Contamination Problem: Causes and Solutions*. Elsevier.
- Schlech, W. F., P. M. Lavigne, R. A. Bortolussi, A. C. Allen, E. V. Haldane, A. J. Wort, A. W. Hightover, S. E. Johnson, S. H. King, E. S. Nicholls, y C. V. Broome. 1983. Epidemic listeriosis- evidence for transmission by food. *N. Engl. J. Med.* 308:203-206.
- Scott, T. M., Rose, J. B., Jenkins, T. M., Farrah, S. R., y Lukasik, J. 2002. Microbial source tracking: current methology and future directions. *Appl. Environ. Micriobiol.*, 68(12):5796-5803.
- Secretaría de Salud(a), S. 2000. NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos

a que debe someterse el agua para su potabilización. Diario Oficial de la Federación.

Secretaría de Salud(b), S. 1995. NOM-131-SSA1-1995, Bienes y servicios. Alimentos para lactantes y niños de corta edad. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Diario Oficial de la Federación.

Seeliger, H., Jones, D. 1986. *Listeria* spp. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Vol 2. 9th ed. Williams Wilkins, Baltimore p.556-570.

SENASICA. 2010. Lista de verificación del cumplimiento de los requisitos técnicos para la certificación en sistemas de reducción de riesgos de contaminación en la producción primaria de alimentos de origen agrícola.pdf. México: SAGARPA.

Sewell, A.M. y Farber J.M, 2001. Foodborne outbreaks in Canada linked to produce. *J. Food Prot.* 64: 1863-1877.

SFA-DGAFR, D. G. 2011. Evolución de las exportaciones agroalimentarias. México: SAGARPA.

Shumway, R., Azari, A., y Johnson, P. 1989. Estimating mean concentrations under transformtation for environmental data with detection limits. *Technometrics*, 31:347-356.

SIAP. 2009. Breves monografías agrícolas. Recuperado el 26 de Abril de 2010, de <http://w4.siap.gob.mx/AppEstado/Monografias/Hortalizas/ChileVM.html>

SIAP, S. D. Abril de 2010. Tomate rojo (jitomate). Recuperado el 25 de Abril de 2010, de SAGARPA:

http://www.siap.sagarpa.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=264&Itemid=99

Sidhu, M. S., Sorum, H., y Holck, A. 2002. Resistance to quaternary ammonium compounds in food-related bacteria. *Microb. Drug Resist.*, 8:393-399.

- Silvapalasingam, S., Friedman, C., Cohen, L., y Tauxe, R. 2004. Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States. *J. Food Prot.*, 67:2342-2353.
- Simón, M., Tarrago, C., and Ferrer. M.D. 1992. Incidence of *Listeria monocytogenes* in fresh foods in Barcelona (Spain). *Int. Food Microbiol.* 16:153-156.
- Smith, J. L. 1995. Factors involved in the emergence and persistence of foodborne diseases. *J. Food Prot.*, 58(6):696-708.
- Smith, M. A. (FDA). 2011. Produce safety: A global concern. [Videoclíp].
- Splittstoesser, D. F., Queale, D. T., Bowers, J. L., y Wilkison, M. 1980. Coliform content of frozen blanched vegetables packed in the United States. *J. Food Safety*, 2:1.
- Steele, M., Mahadi, A., y Odumeru, J. 2005. Microbial assessment of irrigation water used for production of fruit and vegetables in Ontario Canada. *J. Food Prot.*, 68:1388-1392.
- Swanson., K. M., Petran, R. L., y Hanlin, J. H. 2001. *Most Probable Number Technique Cap 6 Culture Methods for Enumeration of Microorganism. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.* Ed. American Public Health Association. pp. 59 - 61.
- Tauxe, R., Kruse, H., Hedberg, C., Potter, M., Madden, J., y Wachsmuth, K. 1997. Microbial hazards and emerging issues associated with produce a preliminary report to the national advisory committee in microbiologic criteria for foods. *J. Food Prot.*, 60:1400-1408.
- Todd, E. C., Michaels, B. S., Greig, J. D., Smith, D., y Bartleson, C. A. 2010. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 8. Gloves as barriers to prevent contamination of food by workers. Review. *J. Food Prot.*, 73(9):1762-1773.
- U. S. Food and Drug Administration. 2000. Report of the FDA retail food program database of foodborne illness risk factors. U.S. Food and Drug

Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition. Washington, D.C.

Ukuku, D., y Fett, W. 2002. Relationship of cell surface charge and hidrophobicity to strength of attachment of bacteria to cantaloupe rind. *J. Food Prot.*, 65:1093-1099.

Uljas, H. E., y Ingham, S. C. 1999. Combinations of intervention treatments resulting in 5-Log₁₀-unit reductions in numbers of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* DT104 organisms in apple cider. *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 65:1924-1929.

USDA. Junio de 1999. Fruit and Vegetable Agricultural Practices. Obtenido de US. Department of Agriculture- National Agricultural Statistics Service: <http://usda,mannlib,cornell.edu/reports/nassr/other/pcu-bb/agfv0601.pdf>

USDA. 2011. Global Agricultural Trade System Online. Recuperado el 24 de Marzo de 2011, de Department of Commerce, U.S. Census Bureau, Foreign Trade Statistics: <http://www.fas.usda.gov/gats/default.aspx>

USDA. Septiembre de 2006. *Salmonella* questions and answers. Recuperado el 25 de Abril de 2010, de Foodborne Illness y Disease: http://www.fsis.usda.gov/fact_sheets/Salmonella_questions_y_answers/index.asp

USDA. 2004. USDA Agricultural baseline projections to 2013. USDA.

Vignoli, R. 2008. *Esterilización, Desinfección, Antiseptia. In: (Org). Temas de Bacteriología y Virología Médica.* Ed. Montevideo. Oficina del libro FEFMUR, v. 1, p. 705.

Weise, E. Marzo de 2010. USA pays price for food-borne illness: \$152B a year. Recuperado el 20 de marzo de 2011, de USA today: http://www.usatoday.com/news/health/2010-03-03-food-borne-illness_N.htm

Weiss, J., y H. P. R. Seelinger. 1975. Incidence of *Listeria monocytogenes* in manure. *Appl. Environ. Microbiol.* 30:29-32.

WHO. 2010. Initiative to estimate the global burden of foodborne diseases.
Recuperado el Febrero de 2010, de:

http://www.who.int/foodsafety/foodborne_disease/ferg/en/print.html.

Wood, R. C., C. Hedberg y K. White. 1991. A multistate outbreak of *Salmonella javiana* infections associated with raw tomatoes. In 40th Annual conference. CDC Epidemic Intelligence Service. Dept. of Health and Human services, Public Health Service. Atlanta, U.S., pp 69

Anexo A

1. Formato para registro de las condiciones que pueden afectar significativamente la inocuidad de las hortalizas

LISTA DE VERIFICACIÓN

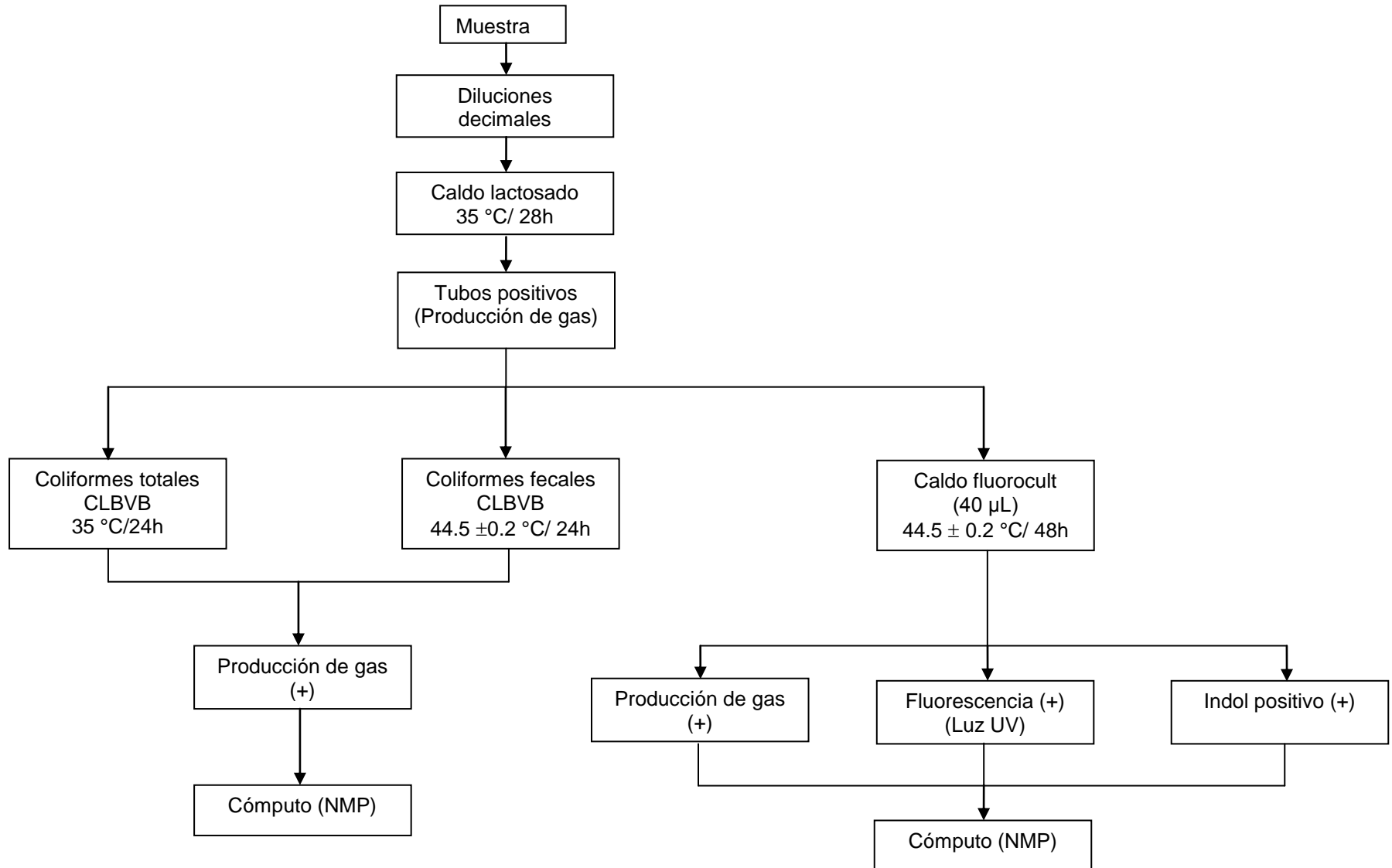
VISITA NUM: _____ FECHA: _____
INVERNADERO: _____

<i>ETAPA/PROCEDIMIENTO/ACCION</i>	SI	NO
<i>AREA DE CULTIVO</i>		
1. Predio colindante con crianza de animales sin protección o insuficiente		
2. Uso de fertilizantes orgánicos		
3. Restos de alimentos o sus empaques		
4. Materia fecal o animal		
5. Presencia de animales		
<i>COSECHA</i>		
6. Equipo sucio		
7. Material sucio		
<i>SANITARIOS</i>		
8. Instalación en área separada del área de cultivo y empaque		
9. Una instalación sanitaria por cada 20 trabajadores		
10. Equipamiento con agua potable, jabón líquido, papel higiénico, toallas de papel, cesto de basura con bolsa plástica y gel antibacteriano		
<i>INSTALACIONES EN EMPACADORA</i>		
11. Tapetes sanitarios con germicida		
12. Lavabos con agua potable, jabón líquido, toallas de papel, gel antibacteriano		
13. Bandas transportadoras aparentemente limpias		
14. Materia orgánica en recovecos		
15. Trampas para fauna nociva		
<i>VESTIMENTA</i>		
16. Aseo del personal (aparente)		
17. Calzado exclusivo dentro del invernadero		
18. Ausencia de lavado de manos después de ir al baño o al reanudar actividades		
19. Uso de guantes, cofia y/o mandil		

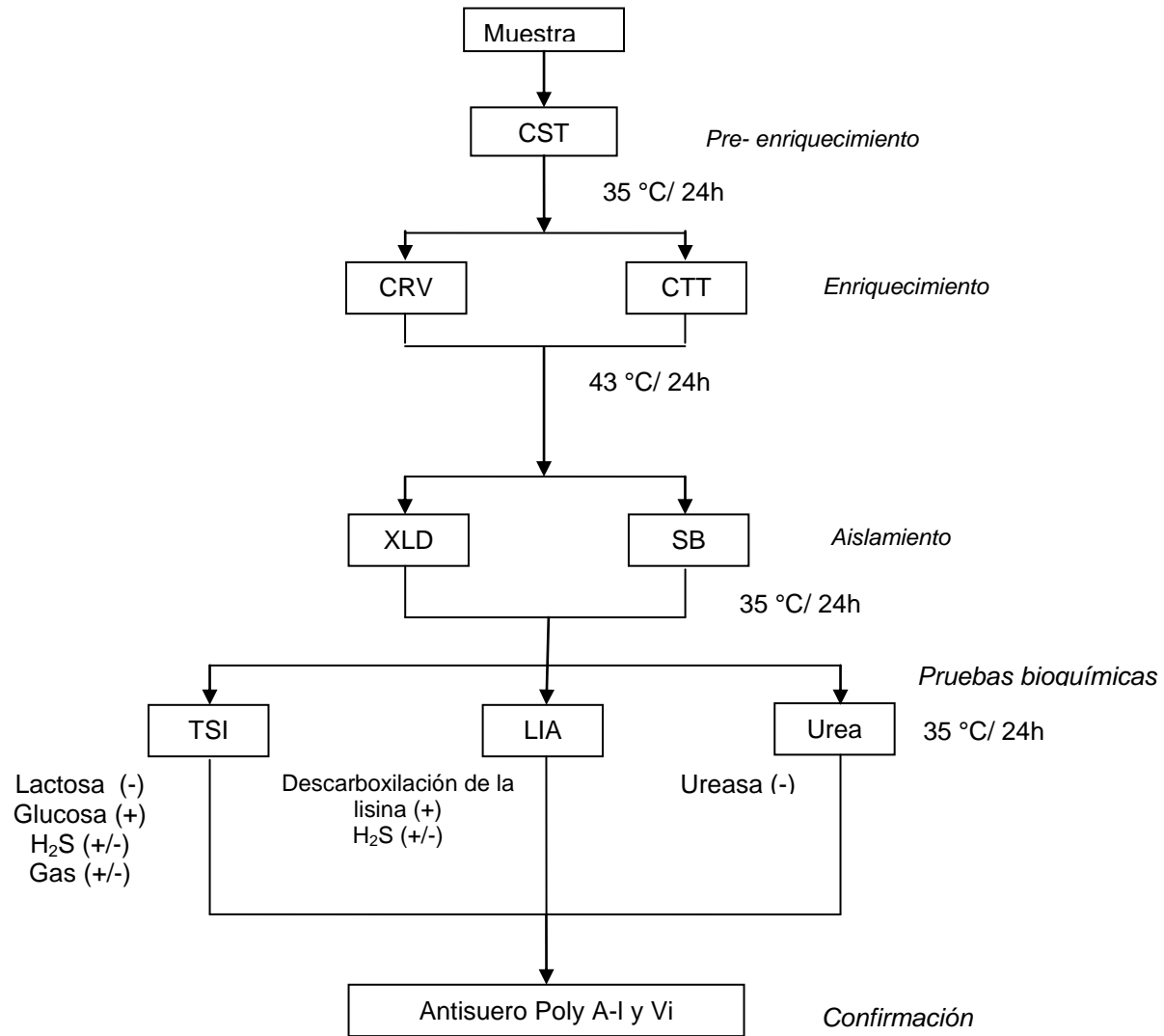
Notas: escribir al reverso de la hoja las observaciones

Anexo B

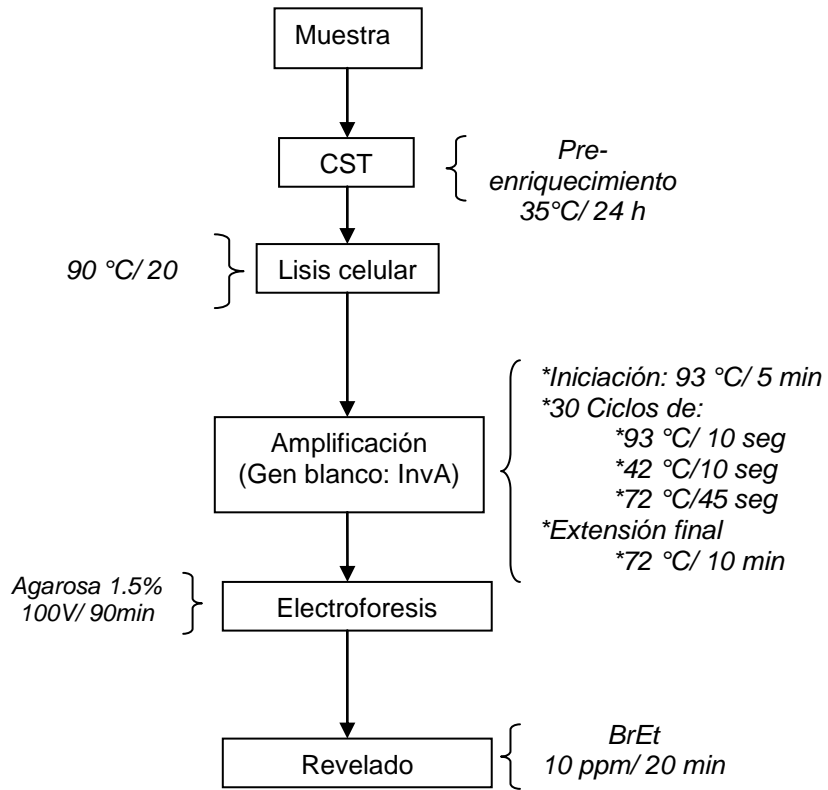
1. Recuento de coliformes totales, fecales y *E. coli* por la técnica del NMP



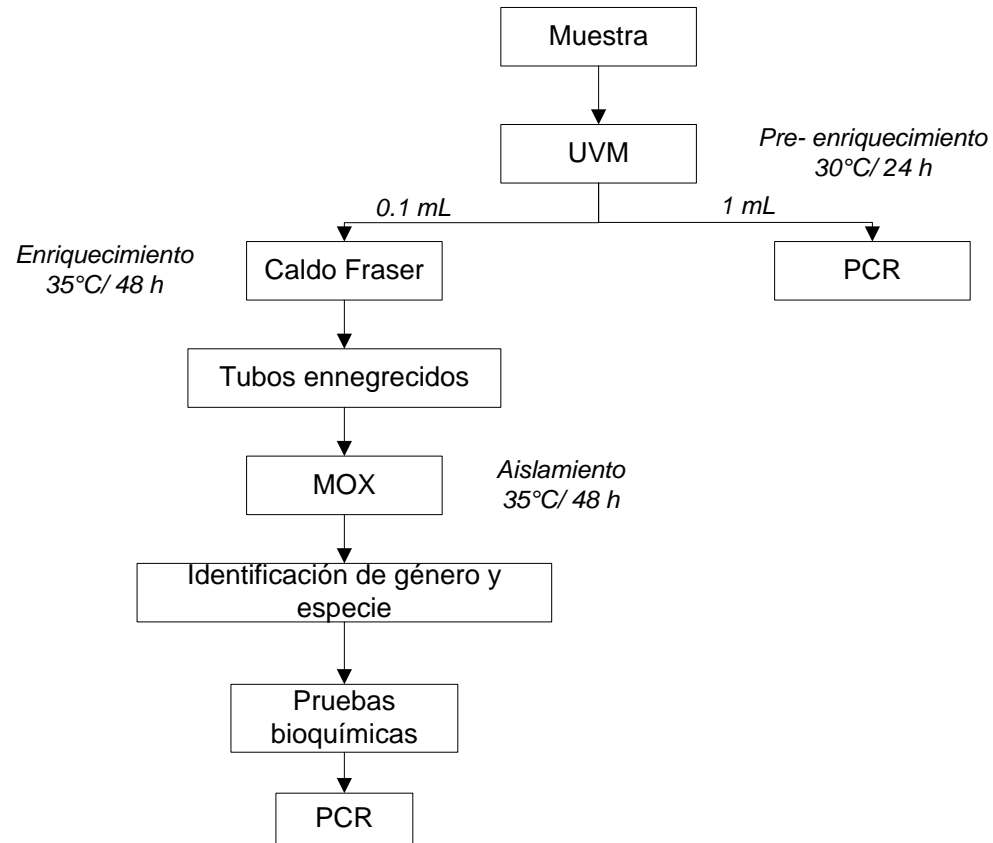
2. Técnica tradicional para la detección y aislamiento de *Salmonella* spp



3. Detección de *Salmonella* spp mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (Liu *et al.*, 2002)



4. Detección de *Listeria* spp y *L. monocytogenes* (APHA, 1992).



5. Técnica de reacción en cadena de la polimerasa. Especificaciones para *L. monocytogenes* (Alzar y Alarcón, 2002).

