UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

FACULTAD DE MICROBIOLOGIA

Recuento microbiológico y presencia de enteropatógenos en vegetales cultivados y comercializados en el Area Metropolitana.

Proyecto de graduación presentado a la Facultad de Microbiología, como requisito parcial para optar por el grado académico de Licenciatura en Microbiología y Química Clínica.

Silvia Elena Bolaños Alfaro

Tutora: Dra. Kenia Barrantes Jiménez.

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

2002

Informe Final de Práctica Dirigida de Graduación presentado a la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el Título de ***Licenciada en Microbiología y Química Clínica y grado profesional de Doctora en Microbiología y Química Clínica.***

El Tribunal Examinador estuvo integrado por los siguientes miembros:

Dra. Libia Herrero Uribe
Presidenta

Dra. Kenia Barrantes Jiménez

Dra. Rosario Achí Araya

Dra. Ma. Laura Arias Echandi

Dra. Eugenia Corrales Aguilar

DEDICATORIA

A mi familia por la confianza y el apoyo que me han brindado durante todos estos años, por sus consejos con los que he logrado ser lo que hoy soy.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por iluminarme y darme fortaleza para culminar un proyecto más en mi vida.

A la Dra. Kenia Barrantes y la Dra. María del Rosario Achí, por quienes la realización de este proyecto fue posible: Gracias por su amistad, por sus consejos y por todas sus enseñanzas.

Al Sr. Jorge Quesada, por su preocupación y por su valiosa ayuda en el trabajo de laboratorio y en la recolección de las muestras.

Al Instituto de Investigaciones en Salud (INISA) por financiar la realización del proyecto.

Al Convenio Post-Cosecha –Universidad de Costa Rica- Consejo Nacional de la Producción por el financiamiento de la compra de muestras.

A Milagro Cerdas, por el apoyo en el muestreo y en la definición de criterios de muestreo, a nivel de productores.

A todo el personal del INISA, por su amistad y hacerme sentir una más de ustedes durante la realización de este proyecto.

A todos mis compañeros, por tantos años de mutuo apoyo compartido.

A mis amigos, por su incondicional apoyo y su gran disponibilidad a través de todos estos años.

Finalmente, gracias a todos por creer en mí.

RESUMEN

El consumo de vegetales es una práctica impulsada como parte de una dieta sana, sin embargo, por la forma en que estos alimentos se cultivan, cosechan, comercializan y consumen, constituyen una fuente de microorganismos importantes en salud pública. En Costa Rica, en 1999 se registraron de 826 casos de intoxicaciones asociadas a aguas contaminadas y alimentos. Dentro de los microorganismos patógenos relacionados con brotes diarreicos asociados a vegetales se encuentran coccidios y bacterias como *Shigella y Salmonella.* En los últimos 5 años en nuestro país se ha relacionado a *Salmonella* como agente responsable del 0.2% del total de cuadros diarreicos, siendo frecuentemente asociada a alimentos como pollo, huevos y sus derivados, mientras que *Shigella* ha sido señalado como responsable del 0.03% de los cuadros diarreicos a nivel nacional, asociado a aguas contaminadas y afectando principalmente a niños menores de 5 años. Los coccidios, también son microorganismos capaces de generar problemas diarreicos.

En este estudio se propone determinar la calidad microbiológica de la lechuga y el tomate cultivados y comercializados en el Area Metropolitana, comparando la calidad del producto en el punto de cosecha y de venta, tanto en época seca como en lluviosa. Para lograr el objetivo propuesto se evaluó la calidad microbiológica de 111 vegetales cosechados y comercializadas en diferentes puntos del Area Metropolitana. El muestreo se realizó en dos etapas (seca y lluviosa) con el fin de determinar la calidad microbiológica según estacionalidad. Las muestras fueron evaluadas por medio de recuento total aerobio, de coliformes totales, de coliformes fecales y de *E. coli*. Además se realizó la búsqueda de presencia de *Salmonella* y *Shigella*, así como helmintos y protozoarios de importancia médica.

El recuento total aerobio obtenido se traduce en una vida media disminuida para estos productos. Los vegetales estudiados presentan una calidad microbiológica regular, pues existe evidencia de problemas, siendo en el caso de coliformes fecales, donde se presentan mayor cantidad de recuentos elevados. Esto indica problemas de manipulación y almacenamiento.

Hay mayor contaminación en las muestras obtenidas durante la época seca, en relación a las obtenidas en época lluviosa. Esto se explica por el uso de fuentes más contaminadas que la lluvia para irrigación..

Con respecto a la clasificación de las muestras según origen, se puede apreciar un aumento en la contaminación de las muestras provenientes de intermediarios con respecto a las obtenidas del productor, siendo los expendios más contaminados las verdulerías y los mercados y los menos contaminados los supermercados, así se evidencia que a mayor manipulación del vegetal, mayor contaminación.

Se observó ausencia de protozoarios y helmintos de importancia médica, así como de *Salmonella sp* y una única muestra fue positiva por *Shigella flexneri.* La asociación de estos microorganismos a productos vegetales es baja y esta dada principalmente por irrigación con aguas contaminadas, por lo que bajo un supuesto de que el agua utilizada para el riego de los vegetales analizados tenga una calidad microbiológica aceptable, puede explicarse el hecho de haber obtenido tan baja positividad. El aislamiento de *Shigella* a pesar de ser único, marca un evento importante en el estudio de las ETA's, pues su búsqueda no es un estudio que se realice de rutina en los laboratorios de alimentos aunque este microorganismo tiene una baja dosis infectante y una alta patogenicidad.

INDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN..... 1

OBJETIVOS..... 11

Objetivo general..... 11

Objetivos específicos..... 11

METODOLOGÍA..... 12

Recolección de muestras..... 12

Procedimiento..... 15

RESULTADOS..... 20

DISCUSION..... 30

CONCLUSIONES..... 38

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS..... 40

ANEXO 1 42

INTRODUCCION

El consumo de vegetales es una práctica muy impulsada como parte de una dieta balanceada, esto por ser un alimento bajo en calorías y rico en ácido ascórbico, carotenos y fibra dietética, además de poseer características anticarcinogénicas (13). Sin embargo, por la forma en que estos alimentos se cultivan, cosechan, comercializan y consumen, los vegetales constituyen una fuente de microorganismos importantes en salud pública.

Cambios en el procesamiento industrial, en la demografía y en los hábitos alimenticios, permiten que las frutas y los vegetales frescos se conviertan en un importante vehículo potencial de infecciones de importancia en salud pública.

Avances en el cultivo, el proceso, el empaque y las ventas a escala global, han permitido que la industria de frutas y vegetales supla a los consumidores de productos de calidad durante todo el año, pero algunas metodologías, también introducen un incremento en el riesgo de enfermedad humana asociada a bacterias patógenas, hongos, parásitos y algunos virus.

La epidemiología de las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA's) es influenciada por los cambios globales, introduciendo modificaciones para el control y eliminación de microorganismos patógenos. Esto puede realizarse siguiendo un adecuado sistema de vigilancia completo, desde la materia prima hasta el punto de consumo.

La contaminación de frutas y vegetales frescos puede ocurrir en diferentes puntos de su procesamiento: en el sembradío, durante la recolección, en el envío, en la comercialización o en casa; de modo tal que la contaminación puede tener causas pre-cosecha y post-cosecha.

En el grupo de las causas pre-cosecha se incluyen factores como: contacto con el suelo, aguas de irrigación, agua utilizada para la aplicación de productos fungicidas, herbicidas, cercanía de animales domésticos o salvajes (mamíferos, reptiles, aves), disposición de materia fecal, manipulación humana.

La presencia de microorganismos patógenos en el suelo puede ser resultado de la aplicación de heces de animales sin tratar como fertilizantes, de modo que a partir del suelo, la fruta o el vegetal se contamina con el microorganismo. Si no se toman medidas sanitarias adecuadas, este permanecerá viable hasta el punto de consumo.

El agua de irrigación es otra vía importante de contaminación para este tipo de productos. Si existe un tratamiento inapropiado de efluentes o un mal manejo posterior al tratamiento, éstas entran en contacto con aguas negras, introduciendo microorganismos. Por ejemplo se ha observado viabilidad de quistes de *Entamoeba histolytica* en tomates y lechugas durante una semana; además de huevecillos de *Ascaris* que permanecen viables hasta por un mes (2).

Entre las causas de contaminación post-cosecha destacan: limpieza de manos del manipulador del producto, del equipo de trabajo, de los contenedores para carga y transporte, la presencia de animales, sistema inapropiado de almacenaje (temperatura, exposición al polvo, condiciones físicas), inadecuado sistema de empaque, agua de lavado o enjuague de mala calidad, y la contaminación cruzada (5). Además al ser un producto de consumo crudo, las condiciones higiénicas del sitio donde se consume y del mismo consumidor son de gran importancia.

En los Estados Unidos, según estudios realizados, se observa la aparición y la reemergencia de algunos patógenos, por ejemplo: desde 1942 el número de agentes etiológicos asociados a alimentos se ha incrementado en más de cinco veces. De acuerdo a datos del Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) las enfermedades transmitidas por alimentos han causado un estimado de 325000 hospitalizaciones, 76 millones de casos de problemas gastrointestinales y 5000 muertes anualmente. Se estima un costo médico de más de $1 billón anual (4).

En nuestro país, durante el curso del año 1999 se registró un total de 826 casos de intoxicaciones asociadas a aguas contaminadas y a diversos tipos de alimentos, afectando a personas entre los 15 y los 24 años de edad en su mayoría (7).

La rápida aparición y diseminación de patógenos involucrados en enfermedades relacionadas a alimentos se afecta por diversos factores, relativos tanto al patógeno en sí, como a la susceptibilidad del hospedero (6). Dentro de los microorganismos patógenos comúnmente relacionados con brotes diarreicos asociados a vegetales se encuentran

Lamblia intestinalis, Entamoeba histolytica, coccidios como *Cyclospora, Cryptosporidium* y los microsporidios; además de bacterias *como Escherichia coli, Shigella, Salmonella, Yersinia y Listeria.* La presente investigación busca encontrar la frecuencia de estos enteropatógenos en vegetales como lechuga y tomate, cultivados y comercializados en el área metropolitana de nuestro país. Entre los microorganismos que nos interesa destacar se encuentran:

1. *Salmonella*

Esta bacteria pertenece al grupo de la enterobacterias, es un bacilo gram negativo, no esporulado, peritrico, aerobio facultativo, oxidasa negativo, que produce H_2S, no utiliza la lactosa como fuente de energía, pero si la glucosa por lo que su patrón en TSI es K/A, no posee una ureasa en su batería enzimática, es mesófila (rango de temperatura de crecimiento de 5 –45°C) y capaz de crecer en un amplio rango de pH (4.5 –9) (9).

Dentro su género hay 7 especies de importancia médica, *S. indica, S. arizonae, S. cholerasuis, S. salamae, S. houtenae, S. bongori, S. diarizonae* (10).

Con respecto a su epidemiología es importante especificar que su modo de transmisión es fecal-oral, se multiplica en alimentos y aguas. Su dosis infectante es de 10^5 a10^9 bacterias, pero según la composición del alimento puede variar, de modo que en alimentos proteicos puede ser infectantes en dosis menores (17).

Salmonella sp se ha encontrado habitando intestino de animales y seres humanos, sin considerarse flora normal; se ha asociado a alimentos proteicos como carnes y huevos, chocolates, aditivos artificiales como colorantes, y fuentes de agua (17).

Esta bacteria produce cuadros de fiebre entérica, enterocolitis y septicemia. La fiebre entérica se caracteriza por picos febriles, manchas rojizas en la piel y desórdenes digestivos, ya sea diarrea o constipación. La enterocolitis es un cuadro con náusea y vómito, malestar general, ligera fiebre y diarrea mal oliente (9).

En estudios realizados entre los años 1996 - 1999 en Huesca, España la tasa media anual de casos de salmonelosis para ese periodo fue de 95 en 10^5 habitantes (15).

En los últimos 5 años en nuestro país se ha asociado a *Salmonella* como agente responsable del 0.2% de los cuadros diarreicos, siendo frecuentemente aislada de diferentes tipos de alimentos como pollo, mayonesa, frutas y vegetales y a aguas contaminadas. Sólo en el año de 1999, se dieron un total de 34 casos de salmonelosis afectando de modo similar a hombres que a mujeres dándose una relación de 16/18; por otro lado se observó como el grupo etario más afectado el comprendido entre los 25 y 34 años de edad (7).

2. Shigella

Shigella es una bacteria perteneciente al grupo de la enterobacterias. Es un bacilo gram negativo, no esporulado, no móvil, aerobio facultativo, oxidasa negativo, no utiliza la lactosa como fuente de energía, pero si la glucosa por lo que su patrón en TSI es K/A,

mesófilo (rango de temperatura de crecimiento 5 –45°C), crece en rango de pH de 4.8 a 9.3 (12).

Este género esta constituido por cuatro grupos de importancia médica, la agrupación se realiza según serotipos por antígenos somáticos, del siguiente modo: serotipos A, B, C y D asociados a *S. dysenteriae, S. flexneri, S. boydii y S. sonnei* respectivamente. *S flexneri* es la especie más asociada a patología, seguida por *S. sonnei*, y en menor proporción se observan casos relacionados a *S. boydii* y *S. dysenteriae.* (12); siendo esta última la especie más virulenta del género.

Shigella habita intestino de primates y seres humanos, sin considerarse flora normal, además se ha asociado sobretodo a aguas contaminadas y a algunos alimentos con alta tasa de humedad como papas. Sin embargo en nuestro país no existen datos sobre la presencia de este patógeno en este tipo de alimentos (10).

Shigella es una bacteria enteroinvasora de transmisión fecal-oral, capaz de producir cuadros diarreicos de inicio abrupto que evoluciona a pequeñas deposiciones frecuentes con sangre, moco y abundantes leucocitos; generalmente es una afección autolimitante (9).

La alta incidencia de casos de shigelosis se puede explicar por su capacidad de resistir el pH gástrico, de modo tal que presenta dosis infectantes tan bajas como 100 – 500 UFC; y en algunos casos hasta 10 UFC (9).

Según algunos estudios se han demostrado que la incidencia de shigelosis alrededor del mundo es de 164.7 millones de episodios anuales. De estos. 1.5 millones de casos se dan en países desarrollados, y los 163.2 millones restantes en países en desarrollo; la mayoría de esos casos se asocia a niños menores de 5 años(12). Otro importante grupo de personas afectadas es constituido por los viajeros, se considera que anualmente se producen alrededor de 580 mil casos de diarrea del viajero asociado a shigelosis. Otro dato importante es que se observan casos secundarios en un 26 a 30% de las familias con niños con diarrea causada por este agente etiológico (12).

En los últimos 5 años en nuestro país se ha asociado a *Shigella* como agente responsable del 0.03% de los cuadros diarreicos, asociado a aguas contaminadas. Sólo en el año de 1999, se dieron un total de 40 casos de shigelosis afectando de modo similar a hombres y a mujeres dándose una relación de 23/17; por otro lado se observó como el grupo etario más afectado el comprendido entre los 1 y 14 años de edad. (7)

3. Coccidios

Los Coccidios son un grupo de esporozoarios pertenecientes a la clase Coccidia, a la cual pertenece el orden Eimeriida. El zigoto de estos microorganismos es un esporoquiste que está incluido dentro de un ooquiste. La forma de esta última estructura es un elemento de juicio para su diferenciación taxonómica, pero para su clasificación hasta género es importante determinar el número de esporoquistes y esporozoitos dentro del ooquiste. Dentro de los géneros de importancia médica se encuentran *Isospora, Cyclospora* y *Cryptosporidium* (3).

En Costa Rica se considera que aproximadamente un 1% de la población puede tener la infección por *Isospora*. Aunque la mayoría de las infecciones son subclínicas, en algunos casos se observa diarrea con moco, acompañada de anorexia, vómito y dolor abdominal (3).

La infección humana con criptoporidios ha sido descrita en los cinco continentes, tanto en países desarrollados como en países en vías desarrollo, siendo los niños los más afectados (16). En Costa Rica se estima que el 4.3% de los niños con diarrea tienen criptosporidiosis, sin embargo la incidencia varia según condiciones o características de la población, llegando hasta un 63% en guarderías (3).

La transmisión de este microorganismo puede darse de persona a persona por contacto con materiales contaminados, o ingesta de aguas y alimentos contaminados con materia fecal (18). En un estudio realizado en nuestro país en 1995 se demostró la presencia de este microorganismo en el 5% de los vegetales frescos obtenidos en ferias del agricultor(14).

El cuadro asociado a esta infección es la diarrea profusa y acuosa, puede tener moco, pero raramente leucocitos o sangre, además se acompaña de dolor abdominal, vómitos, nauseas y fiebre baja, algunas veces puede observarse pérdida de peso.

Por otro lado, en Estados Unidos, *Cyclospora*, se ha descrito como causa de varios brotes relacionados a la ingestión de frutas frescas (fresas y frambuesas) y aguas contaminadas (16). El cuadro clínico presenta diarrea acuosa con frecuentes deposiciones,

nauseas, anorexia, dolor abdominal, fatiga, pérdida de peso, y fiebre ligera; en imunosupresos se observan cuadros muy prolongados (de meses) mientras que en personas inmunocompetentes la sintomatología es aguda (18).

4. Coliformes

El grupo de los coliformes incluye bacilos Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativas, no esporulados, productores de ácido y gas a partir de glucosa y lactosa (17).

Este grupo esta compuesto principalmente por miembros de los géneros *Escherichia, Citrobacter, Enterobacter* y *Klebsiella*. Incluye además otros géneros presentes en materia fecal, así como provenientes de otras fuentes, como suelo, agua y granos. El grupo de los coliformes fecales incluye organismos con mayor probabilidad de haberse desarrollado en intestino, y se caracterizan por su capacidad de fermentar lactosa y producir gas a temperaturas de 44.5 a 45.5^{o}C (17).

Dentro del grupo de los coliformes, existen especies capaces de multiplicarse a temperaturas de refrigeración, resistir la desecación, persistir en agua, suelo y alimentos por largos periodos de tiempo; lo cual es muy importante de tener en cuenta cuando se trata de alimentos de consumo no inmediato (10).

La recuperación de coliformes en alimentos tiene menos impacto interpretativo que la recuperación de *E. coli*, pues este grupo puede agrupar géneros no entéricos como *Serratia, Erwinia* y *Aeromonas*. Pero su presencia sigue siendo un útil indicador de la

contaminación fecal directa o indirecta, además de ser un exitoso indicador de la potabilidad del agua (17).

Muchas enfermedades transmitidas en los alimentos son de carácter intestinal, de modo que la recuperación de estos microorganismos indica la posibilidad de que existan en el alimento agentes etiológicos de este tipo de enfermedades.

Por otro lado, la ausencia de coliformes en un alimento, es indicativo de buenas condiciones higiénicas, pero no de inocuidad.

Actualmente, los nuevos problemas de enfermedad alimentaria requieren de nuevas estrategias de control y prevención, para asegurar que los alimentos tanto en casa como en la industria son seguros para el consumo. Para ello se necesita reconocer los factores asociados a la producción y al procesamiento que favorecen la proliferación de microorganismos y con ello proponer o implementar medidas para asegurar la inocuidad de los alimentos, sin desatender la demanda de comidas frescas por parte de los consumidores(6).

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la calidad microbiológica de la lechuga y el tomate cultivados y comercializados en el Area Metropolitana, comparando la calidad del producto en el punto de cosecha y de venta, tanto en época seca como en lluviosa.

Objetivos Específicos

- Determinar el recuento total aerobio de lechugas y tomates cultivados y comercializados en el Area Metropolitana.
- Evaluar la contaminación de esos productos por medio de indicadores como el recuento de coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli.*
- Analizar la presencia de enteropatógenos como *Salmonella* y *Shigella* en dichos vegetales.
- Analizar la contaminación de esos vegetales por helmintos y protozoarios parásitos como *Cryptosporidium* y *Cyclospora*.

METODOLOGÍA

1. Recolección de muestras

Se evaluó la calidad microbiológica de 111 vegetales; 68 muestras adquiridas directamente del productor y ubicadas en el área de Cartago y 43 productos comercializados en diferentes puntos de venta, tales como plazas (Cenada y Mayoreo), verdulerías, mercados, supermercados y ferias del agricultor ubicadas en el Area Metropolitana.

La obtención de las muestras fue facilitada por el convenio Post-cosecha-Universidad de Costa Rica-Consejo Nacional de la Producción. Las muestras de productores fueron recolectadas directamente de la huerta en bolsas estériles y trasladadas de inmediato al laboratorio para su análisis, mientras que las muestras de intermediarios (verdulerías, mercados, supermercados y plazas) se trasladaron en la bolsa que fue facilitada por el mismo local comercial.

Igualmente, se recolectó información sobre características del local (aseo, cadena de frío), o sobre la finca (fuente de riego, presencia de animales, disposición de excretas y tratamiento previo a la entrega de la muestra), con el fin de determinar la influencia de estas características sobre la contaminación de las muestras por medio de un cuestionario preparado para productores y otro para intermediarios.(Anexo 1)

El muestreo se realizó en dos etapas con el fin de diferenciar la calidad microbiológica entre la época lluviosa (agosto-noviembre) y la época seca (diciembre – abril). El cronograma exacto de la recolección de muestras se presenta en el cuadro 1.

Cuadro_1

EPOCA LLUVIOSA

Fecha de colecta	Origen	Número	Producto
08/2001	Productor	3	lechugas
09/2001	Mercado	2	lechugas
	Productor	8	lechugas
10/2001	Mercado	5	lechugas
	Supermercado	2	lechugas
	Productor	11	lechugas
	Mayoreo	2	lechugas
11/2001	Productor	1	tomate
	Verdulería	2	lechugas
	Verdulería	3	tomates
	Supermercado	1	lechuga
	Supermercado	3	tomates
	Mercado	1	lechuga
	Mercado	3	tomates
	Plaza	3	lechugas
	Plaza	4	tomates
EPOCA SECA			
01/2002	Productor	8	lechugas
	Supermercado	1	lechuga
	Mercado	3	
	Mercado	2	tomates
	Verdulería	2	lechugas
	Verdulería	2	tomates
02/2001	Productores	6	lechugas
	Supermercado	1	lechuga
	Supermercado	1	tomate
	Mercado	2	lechugas
	Mercado	6	tomates
03/2001	Verdulería	8	lechugas
04/2002	Productor	6	lechugas
05/2002	Plaza	4	lechugas
	Ferias del Agric	5	lechugas

2. Procedimiento

Una vez obtenida la muestra, en un lapso no mayor a 24 horas se siguió la metodología descrita en el *Compedium of methods for the microbiological of foods* (17) y el *FDA- CSA-Bacteriological Analytical Manual* (8), con los respectivos controles.

Recuento total aerobio

Se empleo la técnica de recuento en placas de petri de la siguiente manera:

- De cada muestra se realizó una dilución madre 10^{-1}, al pesar 10 gramos de muestra y agregar 90 ml de buffer (agua peptonada estéril al 0.1% pH 7.0, marca Oxoid), esto se homogenizó por 30 segundos en el stomacher (marca Seward).
- A partir de la primera dilución se realizaron las siguientes diluciones 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} en buffer estéril.
- Se colocó 1 ml de cada dilución en placas de petri estériles y se le agregó el medio Agar Estándar (Oxoid) con cloruro de trifeniltetrazolium TTC (1 ml de TTC al 5% en 100 ml de medio) , rotando la placa en forma de ocho para lograr una buena distribución de la muestra.
- Se incubaron las placas durante 48 horas a 37° C.
- Se procedió al conteo de las colonias obtenidas dentro del rango contable (entre 25 y 250 UFC por plato) y se realizó el cálculo correspondiente multiplicando por el factor de dilución correspondiente para obtener el recuento final reportado como UFC de coliformes/ gramo de alimento.

Recuento de coliformes totales, coliformes fecales y *E. coli*.

- De cada muestra se realizó una dilución madre (10^{-1}) al pesar 10 gramos de muestra y agregar 90 ml de buffer estéril (agua peptonada estéril al 0.1% pH 7.0, marca Oxoid) esto se homogenizó por 30 segundos en el stomacher.(marca Seward)
- A partir de la primera diluciones realizaron las siguientes diluciones: 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} en buffer estéril.
- Se colocó 1ml de la dilución madre 10^{-1} en un petrifilm para recuento de *E. coli* (marca 3M) y se incubó en cámara húmeda a 44°C por 24 horas.
- Luego se continuó el procedimiento inoculando por duplicado 1 ml de cada dilución en placas de petri estériles, y se le agregó por vaciado el medio Bilis Rojo Violeta (Oxoid), rotando la placa en forma de ocho para lograr una buena distribución de la muestra. Una vez solidificado el medio se le coloca una sobrecapa para evitar que bacterias como *Klebsiella* y *Proteus* formen colonias gigantes que interfieran con el conteo de los coliformes.
- Se incubaron durante 24 horas, un juego de placas a 37° C y el otro juego a 44°C para recuperar los coliformes totales y coliformes fecales respectivamente.
- Se procedió al conteo de las colonias de coliformes de acuerdo al rango contable (entre 25 y 250 UFC por plato), las colonias típicas de coliformes son de 0.5mm, color vino y con un halo de precipitación alrededor; mientras que las colonias típicas de *E. coli* en petrifilm son de color azul oscuro, con o sin gas.

- Finalmente se realizó el cálculo correspondiente multiplicando por el factor de dilución correspondiente para obtener el recuento final y reportarlo en UFC de coliformes/ gramo de alimento.

Presencia de *Salmonella*

- De cada muestra se preparó una solución de pre-enriquecimiento al pesar 25 gramos de la muestra y agregarle 250 ml de Caldo Lactosado estéril (Oxoid), en bolsas estériles. Esta solución se incubó durante 24 horas a 37°C.
- Después de el pre-enriquecimiento en Caldo Lactosado, se utilizaron dos medios para realizar un enriquecimiento selectivo, el Caldo Tetrationato y el Caldo Selenito (ambos marca Difco), para tal fin se le agregó 1 ml del pre-enriquecimiento a 10ml cada uno de los medios. En el caso de el Tetrationato se le agregó 0.2 mL de I-KI concentrado justo antes de agregar la muestra, esto con el fin de oxidar el medio para lograr su selectividad. Todo se incubó 24 horas a 37°C.
- Luego se inocularon los enriquecimientos en medios selectivos diferenciales. Se usaron Agar Desoxicolato Citrato (DC) y Agar Xilosa Lisina Desoxiglicolato (XLD) para el aislamiento de colonias sospechosas.(colonia rosada claro traslucida con o sin punto negro en DC y rosada con o sin punto negro en XLD). Todo se incubó 24 horas a 37°C.
- Seguidamente, se procedió a la caracterización bioquímica a partir de las colonias sospechosas, para esto se inoculó Agar Triple Azúcar y Hierro (TSI) y se incubó 24 horas a 37°C.

- Posteriormente, a aquellas muestras que dieron el patrón característico de *Salmonella* en TSI (K/A con H_2S) se continuaron analizando por utilización de urea, y las pruebas IMV_IC (Indol, rojo de metilo, Voges Proskauer y Citrato). El patrón sospechoso para esta bacteria es urea negativo y el IMV_IC (- + - +).
- Finalmente a las colonias con bioquímica sospechosa se les realizó pruebas serológicas con un antisuero polivalente para *Salmonella* (Difco)

Presencia de *Shigella*

- De cada muestra se preparó una solución de enriquecimiento al pesar 25 gramos de la muestra y agregarle 250 ml de Caldo GN (para Gram negativos, marca Difco), en bolsas estériles. Esta solución se incubó durante 24 horas a 37°C.
- Después de el enriquecimiento en GN, estos se inocularon en medios selectivos diferenciales. Se usaron placas de Agar Deoxiglicolato Citrato (DC), Agar Xilosa Lisina Deoxiglicolato (XLD) y Agar Tergitol 7 (T7) para el aislamiento de colonias sospechosas (todo de marca Oxoid). Las colonias sospechosas son rosado claro traslúcida en DC y rosado oscuro en XLD y en T7. Todos estos medios se incubaron 24 horas a 37°C.
- Seguidamente, se procedió a la caracterización bioquímica, para lo cual las colonias sospechosas obtenidas en cada placa, se repicaron en Agar TSI y se incubaron 24 horas a 37°C**.**
- Finalmente, a aquellas muestras que dieron el patrón característico de *Shigella* (K/A sin H_2S) se les realizó pruebas serológicas con antisueros específicos, con el fin de lograr la identificación de la bacteria aislada.

Búsqueda de helmintos y protozoarios

- De cada muestra se realizó un enjuague agregando 30 ml de buffer (agua peptonada estéril al 0.1% pH 7.0) a 30 gramos de muestra; después de homogenizar esta suspensión, se procedió a traspasar 10 ml de la misma a tubos de vidrio estériles que se dejaron sedimentando durante 5 horas.
- Pasado el tiempo, los tubos se centrifugaron durante 10 minutos a 1200 x g.
- Posteriormente se procedió a descartar el sobrenadante, se resuspendió el botón formado y se realizó un examen directo con solución salina y lugol en el microscopio de luz.
- Para la búsqueda de *Cryptsoporidium y Cyclospora* se realizó la tinción de ácido resistencia descrita a continuación
    - Realización del frotis a partir del botón de sedimento obtenido tras la centrifugación.
    - Fijación del frotis con metanol durante 5 minutos.
    - Tinción con fucsina carbólica durante un minuto.
    - Lavado con agua.
    - Decoloración con alcohol ácido al 15%.
    - Lavado con agua.
    - Contratinción con azul de metileno durante un minuto.
    - Lavado con agua.
    - Secado de la lámina y revisión al microscopio de luz a 40X y 100X.

RESULTADOS

1. Presencia de enteropatógenos: *Salmonella* y *Shigella*

En las 111 muestras de vegetales, se obtuvo ausencia de *Salmonella sp.* y una única muestra fue positiva por *Shigella flexneri* lo cual representa el 0.9 % de los vegetales estudiados.

2. Indicadores de vida media y contaminación

Los indicadores de vida media y contaminación presentados en el cuadro 2, evidencian que los vegetales en general presentan contaminación bacteriana de hasta $1.1x10^7$ UFC/g. Este recuento total se traduce en una vida media disminuida, también se observan recuentos de coliformes totales ($8.7x10^5$ UFC/g), coliformes fecales ($2.0x10^3$ UFC/g) y de *E. coli* ($1.0X10^1$), son sugestivas de mala manipulación y un mal almacenamiento de las muestras, además de indicar contaminación fecal.

Cuadro 2.MODA Y PROMEDIO DE LAS 111 MUESTRAS DE VEGETALES

	RECUENTO TOTAL (UFC/g)	COLIFORMES TOTALES (UFC/g)	COLIFORMES FECALES (UFC/g)	*E. coli* (UFC/g)
PROMEDIO (%)	$1.1X10^7$	$8.7X10^5$	$2.0X10^3$	$1.0X10^1$
MODA	$1.1X10^7$	$2.3X10^5$	$\prec 10$	$\prec 10$

En los cuadros 3 a 6, se muestra un distribución en cuanto a los niveles de positividad de los índices de vida útil y de manipulación y contaminación, obtenidos según las muestras analizadas, clasificándose por su origen y época de recolecta de cada muestra.

Cuadro 3. INDICADORES DE VIDA UTIL E HIGIENE EN VEGETALES DE PRODUCTORES ADQUIRIDOS DURANTE LA EPOCA LLUVIOSA

LOGARITMO	RECUENTO TOTAL		COLIFORMES TOTALES		COLIFORMES FECALES		**E. coli**	
	FRECUENCIA	PORCENTAJE (%)	FRECUENCIA	PORCENTAJE (%)	FRECUENCIA	PORCENTAJE (%)	FRECUENCIA	PORCENTAJE (%)
⩽10	0	0	1	4.3	22	95.7	17	94.4
10^1	0	0	0	0	1	4.3	1	5.5
10^2	0	0	2	8.7	0	0	0	0
10^3	0	0	2	8.7	0	0	0	0
10^4	1	4.3	10	43.5	0	0	0	0
10^5	3	13.1	8	34.8	0	0	0	0
10^6	15	65.2	0	0	0	0	0	0
10^7	4	17.4	0	0	0	0	0	0
10^8	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	23	100	23	100	23	100	18	100

Cuadro 4. INDICADORES DE VIDA UTIL E HIGIENE EN VEGETALES DE PRODUCTORES ADQUIRIDOS DURANTE LA EPOCA SECA

LOGARITMO	RECUENTO TOTAL		COLIFORMES TOTALES		COLIFORMES FECALES		**E. coli**	
	FRECUENCIA	PORCENTAJE (%)	FRECUENCIA	PORCENTAJE (%)	FRECUENCIA	PORCENTAJE (%)	FRECUENCIA	PORCENTAJE (%)
⩽10	0	0	1	5	12	60	16	84.2
10^1	0	0	0	0	4	20	2	10.5
10^2	0	0	2	10	3	15	1	5.3
10^3	0	0	1	5	1	5	0	0
10^4	0	0	7	35	0	0	0	0
10^5	4	20	6	30	0	0	0	0
10^6	14	70	3	15	0	0	0	0
10^7	2	10	0	0	0	0	0	0
10^8	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	20	100	20	100	20	100	19	100

Cuadro 5. INDICADORES DE VIDA UTIL E HIGIENE EN VEGETALES DE INTERMEDIARIOS ADQUIRIDOS DURANTE LA EPOCA LLUVIOSA

LOGARITMO	RECUENTO TOTAL		COLIFORMES TOTALES		COLIFORMES FECALES		**E. coli**	
	FRECUENCIA	PORCENTAJE (%)	FRECUENCIA	PORCENTAJE (%)	FRECUENCIA	PORCENTAJE (%)	FRECUENCIA	PORCENTAJE (%)
⩽10	0	0	0	0	18	58.1	24	82.8
10^1	0	0	1	3.2	2	6.5	5	17.2
10^2	0	0	2	6.5	7	22.6	1	5.3
10^3	1	3.2	4	12.9	3	9.7	0	0
10^4	2	6.5	13	41.9	1	3.2	0	0
10^5	5	16.1	8	25.8	0	0	0	0
10^6	10	32.2	2	6.5	0	0	0	0
10^7	11	35.5	1	3.2	0	0	0	0
10^8	2	6.5	0	0	0	0	0	0
TOTAL	31	100	31	100	31	100	29	100

Cuadro 6. INDICADORES DE VIDA UTIL E HIGIENE EN VEGETALES DE INTERMEDIARIOS ADQUIRIDOS DURANTE LA EPOCA SECA

LOGARITMO	RECUENTO TOTAL		COLIFORMES TOTALES		COLIFORMES FECALES		**E. coli**	
	FRECUENCIA	PORCENTAJE (%)	FRECUENCIA	PORCENTAJE (%)	FRECUENCIA	PORCENTAJE (%)	FRECUENCIA	PORCENTAJE (%)
⩽10	0	0	6	16.7	14	43.7	24	96
10^1	0	0	1	2.7	2	6.3	1	4
10^2	2	5.7	1	2.7	3	9.4	1	5.3
10^3	6	17.4	0	0	0	0	0	0
10^4	1	2.9	11	30.6	5	15.6	0	0
10^5	3	8.6	10	27.8	8	25	0	0
10^6	11	31.4	4	11.1	0	0	0	0
10^7	12	34.2	3	8.3	0	0	0	0
10^8	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	35	100	36	100	31	100	25	100

Según lo establecido para la evaluación de la calidad microbiológica de los vegetales, se espera un valor menor a 10^3 UFC/g en lo que se refiere a coliformes fecales, y un recuento negativo en lo que respecta a *E. coli* (17).

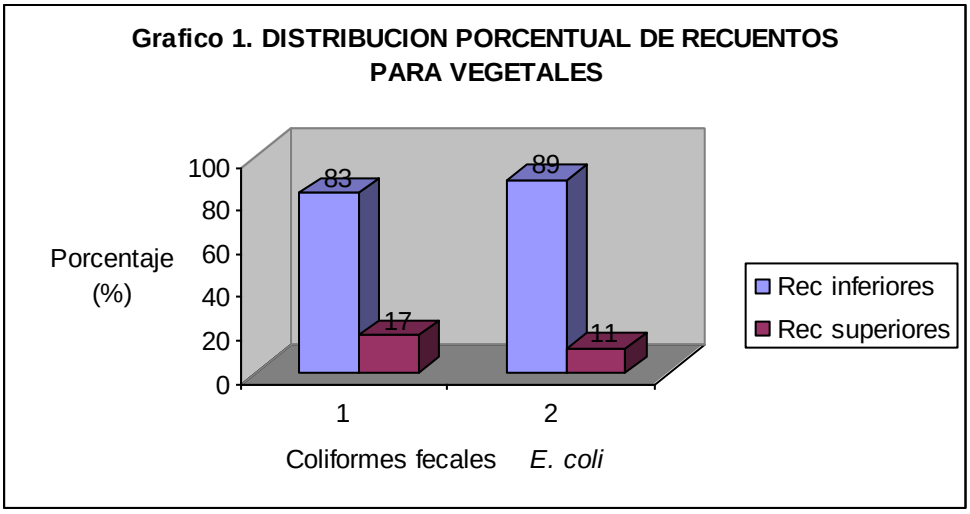
En el gráfico 1 y los cuadros 7 y 8, se muestra que en la mayoría de los casos, los vegetales están cumpliendo con lo indicado por las normas establecidas, sin embargo existe incumplimiento de las mismas en todos los recuentos, siendo en el caso de coliformes fecales, donde se presentan mayor cantidad de recuentos sobre el nivel permitido(10^3 UFC/g).

Cuadro 7. Distribución porcentual de recuentos de Coliformes Fecales en vegetales.

	Frecuencia	Porcentaje (%)
Recuentos □10^3 (UFC/g)	18	17
Recuentos □10^3 (UFC/g)	89	83
Total	107	100

Cuadro 8. Distribución porcentual de recuentos de *E. coli* en vegetales.

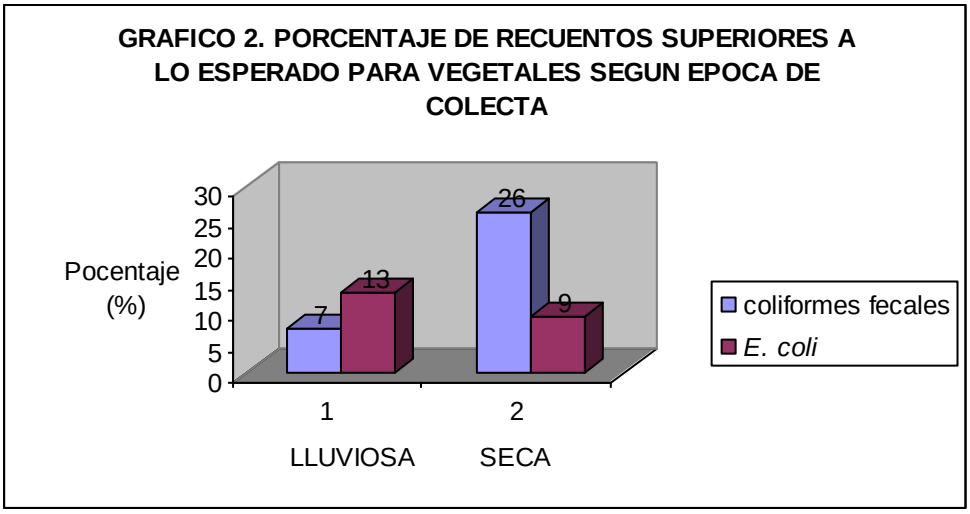
	Frecuencia	Porcentaje (%)
Recuentos positivos (UFC/g)	10	11
Recuentos negativos (UFC/g)	82	89
Total	92	100



Un aspecto importante a resaltar es la tendencia a aumentar la positividad en las muestras obtenidas durante la época seca, en relación a las obtenidas en época lluviosa; como se evidencia en el gráfico 2 y el cuadro 9, esta positividad es tal, que llega a superar los niveles esperados, en todos los recuentos.

Cuadro 9. Distribución de recuentos según época de colecta.

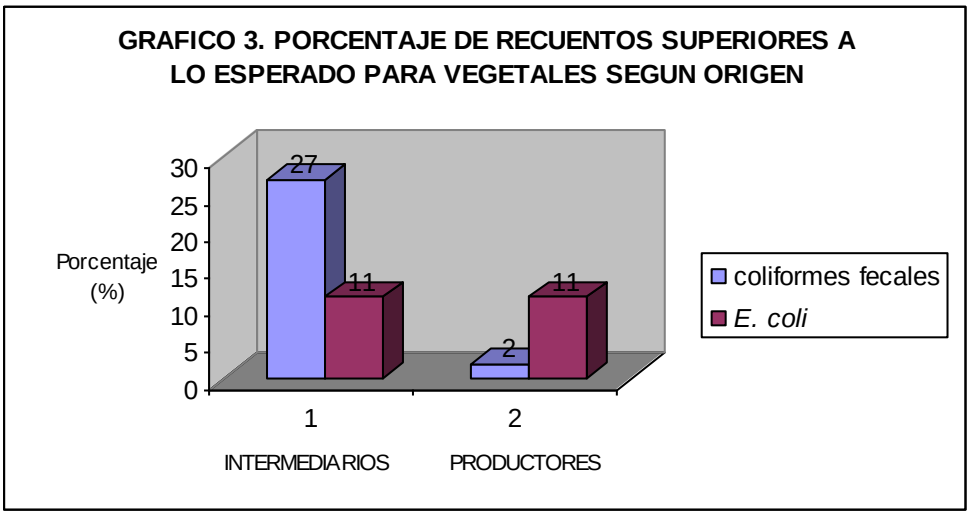
	Coliformes Fecales			*E. coli*		
	□10^3 (UFC/g)	Porcentaje (%)	n	□10^1 (UFC/g)	Porcentaje (%)	n
Epoca Lluviosa	4	7	54	6	13	48
Epoca Seca	14	26	53	4	9	45



Con respecto a la clasificación de las muestras según origen, se puede apreciar en el gráfico 3 y el cuadro 10, un aumento en los recuentos de las muestras provenientes de intermediarios con respecto a las obtenidas directamente del productor.

Cuadro 10. Distribución de recuentos según fuente de colecta.

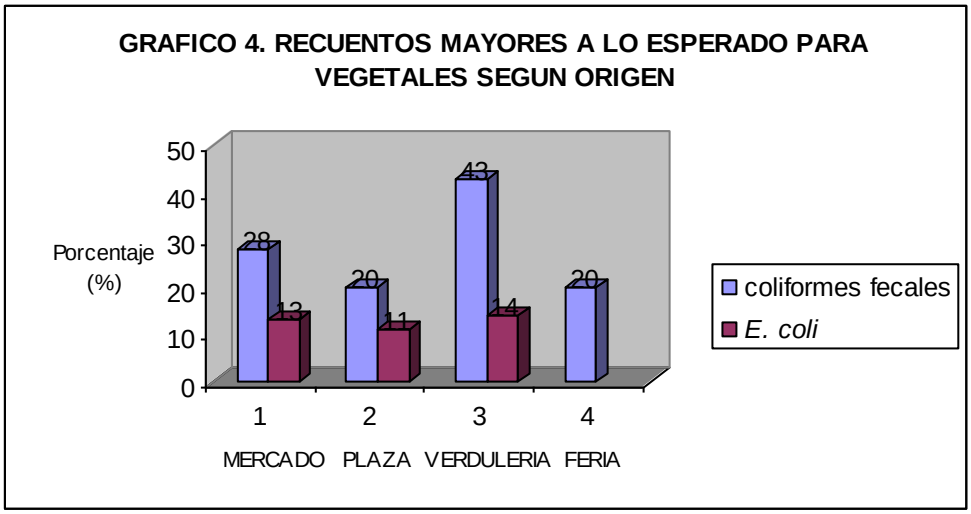
	Coliformes Fecales			*E. coli*		
	□10^3 (UFC/g)	Porcentaje (%)	n	□10^1 (UFC/g)	Porcentaje (%)	N
Productores	1	2	42	4	11	36
Intermediarios	17	27	64	6	11	55



Al realizar una clasificación más minuciosa de la procedencia de las muestras, como lo presenta el gráfico 4 y el cuadro 11, se observa que los expendios que presentan mayor grado de contaminación son las verdulerías, seguido por los mercados, luego las plazas, las ferias del agricultor presentaron baja contaminación y los expendios menos contaminados fueron los supermercados. Así, por ejemplo en el caso de los recuentos de coliformes fecales, se observa como las verdulerías representan el 43% de los casos con recuentos superiores a la norma de higiene para vegetales, los mercados alcanzan el 28% de esos casos.

Cuadro 11. Distribución de recuentos según fuente de colecta.

	Coliformes Fecales			*E. coli*		
	□10^3 (UFC/g)	Porcentaje (%)	n	□10^1 (UFC/g)	Porcentaje (%)	n
Mercado	7	28	25	3	13	23
Plaza	2	20	10	1	11	9
Verdulería	7	43	16	2	14	14
Feria del agric.	1	20	5	0	0	0
Supermercados	0	0	9	0	0	9



3. Búsqueda de protozoarios y helmintos de importancia médica

En la búsqueda de este tipo de microorganismos, no se obtuvo ningún resultado positivo en las 111 muestras analizadas, ni el montaje directo con solución salina y lugol, ni en las preparaciones teñidas con la técnica de ácido resistencia.

4. Estudio cualitativo de las condiciones del lugar donde se adquirieron las muestras.

Según este estudio y como se evidencia en el cuadro 12, se determinó que en un 41.9% de las fincas productoras de vegetales, se observó la presencia de animales, como perros y gallinas, cerca de la zona de cultivo.

Además, como lo indica el cuadro 13, en solo un 25.6% de los sembradíos, existe evidencia de un lugar cercano y adecuado para la disposición de excretas humanas, lugares como casas de habitación o talleres mecánicos, que se presume podrían prestar el servicio sanitario.

Cuadro 12. PRESENCIA DE ANIMALES ALREDEDOR

	FRECUENCIA	PORCENTAJE (%)
SI	18	41.9
NO	25	58.1
TOTAL	43	100

Cuadro 13. EXISTENCIA DE UN LUGAR CERCANO PARA DISPOSICIÓN DE EXCRETAS

	FRECUENCIA	PORCENTAJE (%)
SI	11	25.6
NO	32	74.4
TOTAL	43	100

Cuadro 14. CLASIFICACION DE CADA PUNTO DE VENTA SEGÚN HIGIENE

	FRECUENCIA	PORCENTAJE (%)
BUENA	12	18
MALA	55	82
TOTAL	67	100

Con respecto a la higiene de cada punto de venta, en el caso de los intermediarios, el cuadro 14 nos muestra como en cuanto a higiene el 18% de los expendios obtuvo una calificación de buena, mientras que un 82% una de mala. Esta clasificación se hizo mediante los datos recolectados a partir de la encuesta correspondiente (ver anexo) tomando en cuenta la higiene del sitio donde su ubica el producto, como de las manos del manipulador y del contacto o no de este último con dinero. Si el manipulador o el estante se encuentra sucio o si hay contacto con el dinero la higiene del expendio se cataloga como mala, mientras que si tanto el estante como el manipulador están limpios y no hay contacto

con el dinero, la higiene del expendio recibe una calificación de buena. Cabe mencionar que el contacto con el dinero por parte del manipulador del vegetal, fue negativo únicamente en el caso de los supermercados y de una verdulería. Otro factor importante a tener en cuenta, es que la cadena de frío se mostró presente en sólo en 2 supermercados y en 2 verdulerías, lo cual representa un 0.06% de las muestras de provenientes intermediarios.

Sin embargo, es pertinente aclarar que estos datos de estudio cualitativo de las condiciones en que se encontraban las muestras a la hora de la recolección, no mostraron una relación significativa con el aumento de contaminación biológica presente en el vegetal.

DISCUSIÓN

1. Presencia de enteropatógenos: *Salmonella* y *Shigella*

Salmonella es una bacteria de trasmisión fecal oral. Su relación con las ETA's esta muy asociada a productos proteicos como diversos tipos de carnes, siendo las aves y sus derivados la fuente animal de transmisión más importante, especialmente si se han mantenido sin refrigeración durante bastante tiempo. Actualmente los cáscaras de huevo y los huevos líquidos congelados, son considerados una fuente importante de infección por *Salmonella* (10).

Su asociación con productos vegetales, esta dada principalmente por el uso de aguas contaminadas para la irrigación, teniendo una frecuencia menor en relación con aves, huevos y productos derivados, como la mayonesa , chocolates, confitería, rellenos y lustres de repostería entre otros (17).

Teniendo en cuenta esta baja frecuencia y bajo un supuesto de que el agua utilizada para el riego de las muestras de vegetales analizados tenga una calidad microbiológica aceptable, puede explicarse el hecho de no haber obtenido ningún aislamiento positivo de este microorganismo. Para poder asegurar esta explicación, sería pertinente realizar una evaluación microbiológica de las aguas de riego.

Aunque se han registrado brotes de shigelosis asociadas a alimentos, la mayor parte de estas infecciones están relacionadas a aguas contaminadas con materia fecal (17). El hecho de que sólo se haya obtenido un aislamiento positivo de este patógeno, lo que

representa el 0.9 % del muestreo, también puede relacionarse al riego con aguas de calidad aceptable, en la mayoría de los casos. Este aislamiento, a pesar de ser único, marca un evento importante en el estudio de las ETA's, pues la búsqueda de *Shigella* no es un estudio que se realice de rutina en los laboratorios de alimentos y este microorganismo tiene una baja dosis infectante y una alta patogenicidad. (9)

2. Indicadores de vida media y contaminación

Los recuentos de indicadores de vida media obtenidos, evidencian que los vegetales cultivados y comercializados en el área metropolitana presentan una contaminación bacteriana de hasta $1.1x10^7$ UFC/g. Este recuento total aerobio se traduce en una corta vida media del producto.

El recuento total aerobio es un importante parámetro utilizado como indicador de vida útil no específico, además, tiene gran importancia como elemento sugestivo de que el alimento esté implicado en una intoxicación alimentaria, pues la mayoría de los patógenos de origen alimentario, son capaces de crecer en las condiciones propiciadas en un recuento total, tales como humedad, potencial de oxidación-reducción, temperatura y pH (17). En el caso de los vegetales, al ser un producto que está en contacto directo con la tierra, y ser esta la fuente de contaminación que contiene mayor cantidad de microorganismos, se espera que este recuento sea bastante elevado(10).

Otros factores que a nivel de finca contribuyen a la carga bacteriana es la presencia de animales cerca del área de cultivo, así como poca evidencia de un lugar cercano y

adecuado para la disposición de excretas humanas, lugares como casas de habitación o talleres mecánicos, que se presume podría prestar el servicio sanitario.

Con respecto a los indicadores de contaminación obtenidos, en la mayoría de los casos se observa como los vegetales sí cumplen las expectativas en lo que a índices bacteriológicos de higiene se refiere, aunque existen casos donde los recuentos bacteriológicos superan los valores esperados.

Es conocido, que con el incremento de la producción de cultivos, se ha generalizado la aplicación de plaguicidas como una práctica habitual en la agricultura tradicional, con el tiempo y el mal uso de estos productos se ha llegado a una dependencia de los mismos (1). El abuso de estos productos , es capaz de actuar sobre la flora bacteriana normal del vegetal de modo tal que la disminuye, este evento es una explicación alterna a la baja cantidad de microorganismos presentes en los vegetales analizados. Para poder afirmar que este práctica es la causante de la disminución de microorganismos, se recomendaría un estudio que evidencie la cantidad de residuos del agroquímico en los vegetales.

Sin embargo, es importante resaltar la positividad más allá de las expectativas en todos los recuentos bacteriológicos, así tenemos un 17% de los recuentos de coliformes fecales superan las 10^3 UFC/g y el 11% de los recuentos para *E. coli* son positivos.

Estos recuentos son sugestivos de mala manipulación y mal almacenamiento de las muestras, además de indicar contaminación fecal, pues según lo establecido para la evaluación de la calidad microbiológica de los vegetales, se esperan valores menores a 10^3

UFC/g en lo que se refiere a coliformes fecales y un recuento negativo en lo que respecta a *E. coli*.(17)

La importancia de la positividad de los recuentos bacteriológicos de coliformes radica en que dentro de ese grupo de microorganismos existen especies capaces de multiplicarse a temperaturas de refrigeración, otros capaces de resistir la desecación, otros de persistir en agua, suelo y alimentos por largos periodos de tiempo; lo cual es muy importante de tener en cuenta cuando se trata de alimentos de consumo no inmediato (10). Por lo tanto la recuperación de estos microorganismos indica la posibilidad de que existan en el alimento agentes etiológicos de las ETA's (10).

Es importante resaltar que la positividad de los recuentos más allá de lo esperado en las muestras obtenidas durante la época seca, es más pronunciada que las obtenidas en época lluviosa, así tenemos como un 7% de los recuentos de coliformes fecales que igualan o superan las 10^3 UFC/g en época lluviosa y un 26% en seca; en cuanto a recuentos de *E. coli* se observa una positividad de 13 y 9% respectivamente.

Este fenómeno se explica por la necesidad del productor de buscar fuentes alternas a la lluvia para irrigar sus productos; fuentes como ríos, quebradas, pozos, acequias, entre otros. En las aguas naturales se encuentran bacterias pertenecientes a los géneros *Pseudomonas, Chromobacterium, Proteus, Micrococcus, Bacillus*, y como contaminantes los géneros *Enterococcus, Streptococcus* y *Escherichia* (10). Todos estos microorganismos hacen su contribución al recuento total aerobio, así como *Escherichia* eleva también los recuentos de coliformes en las muestras.

Otro aspecto asociado al uso de agua, es la realización de lavado o remojo de los vegetales, esta práctica suele realizarse con agua estancada de modo que la reutilización de esa misma porción de agua se convierte en fuente de contaminación, además, se favorece la distribución de microorganismos desde una zona dañada hasta el resto del vegetal.

Con respecto a la clasificación de las muestras según origen, se observó, un evidente aumento en los recuentos de las muestras provenientes de intermediarios con respecto a las obtenidas directamente del productor.

Un 2% de los recuentos de coliformes fecales que superan o igualan las 10^3 UFC/g en muestras de productores y un 27% en intermediarios, en cuanto a recuentos de *E. coli* se observa una positividad de 11% en ambos casos. En este punto es importante aclarar que el número de muestras analizadas según origen, no es el mismo, de modo tal que para colilfomes fecales fueron 43 y 64 muestras de productores e intermediarios respectivamente, mientras que para *E. coli* se analizaron 36 y 55 muestras respectivamente.

Los recuentos según origen de la muestra presentados anteriormente, suponen problemas de contaminación post-cosecha como pueden ser inadecuada limpieza de manos manipulador del producto, del equipo de trabajo, de los contenedores para carga y transporte, la presencia de animales, sistema inapropiado de almacenaje (temperatura, exposición al polvo, condiciones físicas), inadecuado sistema de empaque, agua de lavado o enjuague de mala calidad y la contaminación cruzada (5).

Datos obtenidos en las encuestas para evaluar las condiciones de procesamiento de las muestras, indica que solamente un 0.02% de las muestras se encontraban en cámaras de refrigeración, además en únicamente un 0.08% de los casos no hubo contacto con dinero por parte del mismo manipulador del vegetal. En general, la higiene de los sitios de recolección de muestras se obtuvo una calificación de buena en el 18% de los expendios, un 82% de regular y un 18% de mala. Lo cual contribuye aún más a la carga bacteriana del vegetal.

Sin embargo, es pertinente aclarar que estos datos de estudio cualitativo de las condiciones en que se encontraban las muestras a la hora de la recolección, no mostraron una relación significativa con el aumento de contaminación biológica presente en el vegetal.

Al realizar una clasificación más minuciosa de la procedencia de las muestras, se observa que los expendios que presentan mayor grado de contaminación son las verdulerías, seguido por los mercados, luego las plazas (Cenada y Mayoreo), las ferias del agricultor se observaron poco contaminadas y los expendios menos contaminados fueron los supermercados. Por ejemplo en el caso de los recuentos de coliformes fecales, se observa como las verdulerías representan el 43% de los casos con recuentos superiores a la norma de higiene para vegetales (10^3), los mercados alcanzan el 28% , las plazas el 20%, las ferias del agricultor 20% y los supermercados 0% de esos casos.

Si tomamos en cuenta que el proceso normal para que un vegetal llegue al estante de una verdulería o de un mercado, implica usualmente un paso por una plaza, esta última presenta un menor grado de manipulación, por lo que es de esperar que presente recuentos menores a los observados en mercados y verdulerías.

Por otro lado llama la atención la baja positividad de los recuentos obtenidos a partir de las muestras de ferias del agricultor; estos eventos se caracterizan por tener malas condiciones sanitarias , pues no poseen un lugar adecuado para la disposición de excretas, e incluso la disponibilidad de agua potable es baja. Aunque por otro lado, los vegetales de la feria del agricultor, de manera similar a los de las plazas, han tenido una cadena de manipulación relativamente bajo, además de que por el hecho de que las ferias se realizan los fines de semana, sólo se realizó un muestreo de 5 lechugas en ellas; mientras que se recolectaron 25 muestras en mercados, 16 en verdulerías, 13 en plazas y 9 en supermercados.

3. Presencia de protozoarios y helmintos de importancia medica.

La trasmisión de este tipo de microorganismo puede darse de persona a persona por contacto con materiales contaminados o ingesta de aguas y alimentos contaminados con materia fecal (3).

Sin embargo en las muestras analizadas, no se obtuvo ningún resultado positivo por presencia de este tipo de microorganismos. En estudio realizado por Monge y colaboradores en 1995 (13), se observó en las lechugas analizadas la presencia de: *Endolimax nana* en el 2.5%, *Entamoeba coli* en el 1.3%, *Entamoeba histolytica* en el 5.2%

y *Cryptosporidium sp* en el 2.5%; mientras que en tomate se observó presencias de *Cryptosporidium sp* en un 1.2% y ausencia de los demás parásitos.

Sin embargo, hay que tomar en cuenta que la investigación realizada por Monge y colaboradores, se realizó con un total de 80 muestras, todas provenientes únicamente de ferias del agricultor, mientras que en el presente estudio se analizaron únicamente 5 muestras de ese origen, de modo que los resultados obtenidos en un estudio, no invalidan los obtenidos en el otro.

CONCLUSIONES

En general, según todos los datos obtenidos en la presente investigación se puede afirmar que los vegetales cultivados y comercializados en el Area Metropolitana poseen una calidad microbiológica regular, las posibles hipótesis que explican lo anterior incluyen el uso de fuentes de riego de adecuada calidad microbiológica y el uso indiscriminado de agroquímicos.

El recuento total aerobio promedio para vegetales cultivados y comercializados en el Area Metropolitana es de $1.1x10^7$ UFC/g, este recuento indica que la vida útil de este tipo de productos es baja.

Unicamente un 17 % de los vegetales tienen un recuento de coliformes y sólo un 11% de los vegetales tienen un recuento de *E. coli* positivo. Estas cifras indican que en la mayoría de los casos, la calidad microbiológica de los vegetales se encuentra dentro de los límites aceptables.

El recuento promedio de coliformes fecales y el de *E. coli* para dichos productos es de $2.0x10^3$ y $1.0x10^1$ UFC/g respectivamente, con ello se evidencia que si hay existencia problemas en la higiene y en la manipulación de los vegetales.

La positividad más allá de lo esperado en los recuentos de coliformes fecales ($\square 10^3$ UFC/g) y de *E. coli* (≥10 UFC/g) de los vegetales durante la época lluviosa, representan un 7 y 13 % respectivamente. Mientras que época seca representan un 26 y 9 %

respectivamente. De este modo se evidencia una mayor contaminación en la época seca, esto puede explicarse por el uso de fuentes de irrigación diferentes a la lluvia durante esa época.

La positividad más allá de lo esperado en los recuentos de coliformes fecales, y de *E. coli* de los vegetales provenientes de productores, representan un 2 y 11 % respectivamente. Mientras provenientes de intermediarios un 27 y 11 % respectivamente. De este modo se evidencia como una mayor manipulación del vegetal, esta relacionada a un aumento en la contaminación del mismo.

Los indicadores de contaminación bacteriana muestran como los expendios que presentan mayor contaminación son las verdulerías, seguidos por los mercados, luego las plazas, y finalmente las ferias del agricultor, mientras que las muestras provenientes de supermercados no presentan recuentos superiores a lo esperado, de este modo se evidencia nuevamente como una mayor manipulación del vegetal, esta relacionada a un aumento en la contaminación del mismo.

Los vegetales dieron un 0.9% de resultados positivos en cuanto a la presencia de *Shigella* y ningún resultado positivo en cuanto a la presencia de *Salmonella*, por lo que se observa como este tipo de alimento, aunque es capaz de transmitir este tipo de patógenos, no es una fuente de común de los mismos.

Los vegetales no dieron resultados positivos en cuanto a la presencia de protozoarios y helmintos de importancia médica

BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta, P. de Leon, L. "Sistemas alternativos y calidad social" Producción Hortícola .1993.
2. Beuchat, L.; Ryu, J. " Produce handling and processing practices". Emerging Infections Disease.3(4), 1997.
3. Castro, A.; Chinchilla, M.; Guerrero, O.; Reyes, L. Información complementaria. San José, Costa Rica: UCR, 2000.
4. "CDC data provides the most complete estimate on foodborne disease in United States". Emerging Infetions Disease. 5(5),1999
5. Cerdas, M. Diagnostico en el manejo post-cosecha de lechuga (*Lactua sativa*) a nivel de productores e intermediarios. San José, Costa Rica: UCR, 1998.
6. "Conference of foodborne pathogens: Implications and Control". Emerging Infections Disease. 3(2),1997.
7. Costa Rica. Ministerio de Salud. Boletín de enfermedades de declaración obligatoria. 1196-2000. San José, C.R.:Unidad de estadística. 2000
8. FDA-cfsan. Bacteriological analytican manual on line. Accesible en www. cfsan.fda.gov/ eban/bam-toc.htlm.
9. Forbes, B.; Sahm, D.; Weissfeld, A. Diagnostic microbiology. 10 ed. St Louis, USA: Mosby. 1998.
10. Frazier, W.C.; Westhoff, D.C. Microbiología de alimentos. 3 ed. Zaragoza, España: Editorial Acribia. 1978.
11. Glenn, E.; Antillón, F. Manual de procedimientos de laboratorio. San José, C.R.: Facultad de Microbiología. UCR. 1995.

12. Kotloff, K. L.; Winickoff, J. P..; Ivanoff, B.; Clemens, J. D.;Swerdlow, D. L.; Sansonetti, P. J.: Adak, G. K.; Levine, M. "Global burden of *Shigella* infectios: implications for vaccine development and control strategies" Boletín de la Organización Mundial de la Salud. 77(8), 1999.
13. Monge, R. "Estacionalidad de parásitos y bacterias intestinales en hortalizas que se consumen en Costa Rica". Revista Biología Tropical. 44(2),1996.
14. Monge, R.; Chinchilla, M. "Presence of crytos oocystts in fresch vegetables". Journal of foods protecction. 59(2), 1995.
15. Perez, I.; Rezusta, A.; Mairal P.; Larrosa A.; Herrera D.; Martinez F. "Estudio comparativo de infección por *Salmonella* y *Campylobacter* en Huesca, 1996 – 1999" . Revista Española de Salud Pública.(5), 2001.
16. Sterling, Ch.; Ortega, Y. "*Cyclospora*: an enigma worth unraveling". Emerging Infection Disease. 5(1), 1999.
17. Vanderzant, C.; Splittstoesser,D. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 2 ed. Washington, USA: APHA. 1992.
18. Villegas, H.; Galdino, M. "Diarreas por *Cyclospora*". Semana epidemiológica. Ministerio de Salud, Organización Panamericana de la Salud.(19),1996.

.

ANEXO 1

Código INISA

Localización _____ Fecha Muestreo

Producto empacado_____ Producto a granel _____

1-Hay cadena de frío?
a-Si No

2-Higiene del manipulador:
a-Guantes b-Contacto dinero c-Limpieza manos d-Ropa limpia

3-Lugar donde se encuentra el producto:
Tipo de material:_____

Limpieza Buena b-Regular c-Mala

RESULTADOS

Recuento total _____

Recuento de Coliformes totales _____

Recuento de Coliformes fecales _____

Recuento de *Escherichia coli* _____

Salmonella _____

Shigella _____

Parásitos _____

Nombre Productor Código INISA

Localización Fecha Muestreo

Observaciones Lugar

1- Fuente de agua:
a-Riego b-Aplicación químicos c-Lavado

2- Tipo de abono:
a-orgánico b-químico

3- Hay animales cerca? a- Si b-No
perros gatos gallinas otros

4- Excretas o disposición de excretas cerca?

5- Cuál es el tratamiento previo del producto?
a-lavado agua b-agua y cloro c-agua y sal

6- Condiciones de manipulación y almacenamiento
a-guantes b-caja c-nevera d-tarimas e-estañones

RESULTADOS

Recuento total _____

Recuento de Coliformes totales _____

Recuento de Coliformes fecales _____

Recuento de *Escherichia coli* _____

Salmonella _____

Shigella _____

Parásitos _____