

CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y AISLAMIENTO DE *SHIGELLA FLEXNERI* EN VEGETALES FRESCOS DEL ÁREA METROPOLITANA DE COSTA RICA, 2001-2002

Kenia Barrantes

Sección Infección Nutrición, Instituto Investigaciones en Salud (INISA),
Universidad de Costa Rica. Correo electrónico: kbarrate@cariari.ucr.ac.cr
Dirección postal: Apartado postal 2600 Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
Teléfono: (506) 207-3050 /207-3227/207-3292 - Fax: (506)207-5130

Rosario Achí

Sección Infección Nutrición, Instituto de Investigaciones en Salud (INISA),
Universidad Costa Rica

Silvia Bolaños

Sección Infección Nutrición, Instituto de Investigaciones en Salud (INISA),
Universidad Costa Rica

Milagro Cerdas

Unidad de Poscosecha Centro de Investigaciones Agronómicas,
Universidad de Costa Rica-Consejo Nacional de Producción (CNP)

Ximena Cortés

Sección Infección Nutrición, Instituto de Investigaciones en Salud (INISA),
Universidad Costa Rica

Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar la calidad microbiológica de vegetales (lechuga y tomate) que se producen y se comercializan en el Área Metropolitana de Costa Rica. Se determinó la presencia de los patógenos *Shigella sp.* y *Salmonella ssp.* así como de indicadores de vida útil (recuento aerobio mesófilo) y de contaminación general y fecal (coliformes totales y fecales). De 107 muestras de vegetales analizadas, se obtuvo un aislamiento positivo por *Shigella flexneri*. En cuanto a indicadores, el recuento aerobio mesófilo demostró niveles mayores de 10^5 UFC/g en el 72% de las muestras. En coliformes totales el 80 % de las muestras presentó niveles entre 10 y 10^5 UFC/g, y en un 12% niveles mayores de 10^5 UFC/g. En cuanto a coliformes fecales, el 40% de las muestras fueron positivas con niveles entre 10 y 10^5 UFC/g.

Aunque los datos obtenidos no muestran una relación estadísticamente significativa, sí permiten evidenciar una tendencia hacia mayor contaminación en época seca que en época lluviosa, con valores más elevados en todos los indicadores, lo que implica un riesgo potencial para la salud del consumidor. Del mismo modo, *Shigella sp.* se ha asociado a brotes originados de alimentos frescos alrededor del mundo. Su aislamiento en este estudio y la prevalencia del agente en el país,

nos permiten postular la hipótesis de que ésta podría ser una vía de transmisión relevante y de la necesidad de realizar estudios que permitan determinar su frecuencia en productos frescos.

Palabras clave:

Enfermedades transmitidas por Alimentos (ETA), inocuidad alimentaria, *Shigella flexneri*, productos frescos, coliformes fecales (CT).

Introducción

A pesar de los avances significativos y la existencia de nuevas tecnologías para la preparación de alimentos inocuos, millones de personas alrededor del mundo continúan enfermándose cada año por el consumo de alimentos contaminados.^(1,2,3,4) La seguridad microbiológica de los alimentos es un tema complejo que afecta áreas tan relevantes como la salud pública y el desarrollo económico. Entre los diversos aspectos que contribuyen a la complejidad de este tema, se pueden mencionar el cambio en los patrones de consumo de las poblaciones, el origen geográfico de los alimentos, la globalización de las fuentes alimentarias y la introducción inadvertida de patógenos a nuevas áreas.^(5,6,7)

De acuerdo a la Organización Mundial del Comercio (OMC), durante el 2002 los productos agrícolas representaron aproximadamente el 42,5% de todas las exportaciones mundiales de productos primarios, siendo los países no desarrollados los principales productores⁽⁷⁾. Este incremento refleja el mayor consumo de productos frescos (vegetales como las frutas y hortalizas), que ha permitido también la introducción de patógenos en las importaciones alimentarias, aumentando la frecuencia de brotes epidémicos en distintos países alrededor del mundo. Por ejemplo, en EEUU, en los últimas 3 décadas, la proporción de brotes de ETAS por consumo de vegetales frescos pasó de 0,7% en la década de los 70s a 6% en los 90s.⁽⁸⁾ En Latinoamérica y el Caribe, la red SIRVETA (Sistema de Información Regional para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos) registró entre 1993 y 2002, 181 brotes alimentarios por consumo de frutas y hortalizas contaminadas, afectando a más de 5000 personas⁽⁹⁾. Se considera, sin embargo, que existe un subregistro considerable con relación al número real de casos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en los países desarrollados se registran menos del 10% de los casos reales de ETA, mientras que en países en vías de desarrollo este registro es probablemente menor al 1% de los casos reales^{”(2)}

En este estudio preeliminar se evaluó la calidad microbiológica de vegetales provenientes de una zona determinada del Área Metropolitana. Se utilizó indicadores de vida útil (recuento aerobio mesófilo), de contaminación general y fecal (recuento de coliformes totales y coliformes fecales). Además se determinó la presencia de protozoarios y helmintos de importancia médica y de las bacterias patógenas *Salmonella* y *Shigella*.

Materiales y métodos

1. Recolección de muestras

Entre agosto 2001 y mayo 2002 se recolectaron 107 muestras de vegetales (89 lechugas y 25 tomates), para el análisis de calidad microbiológica, en el Laboratorio de Bacteriología del INISA. Del total de muestras, 43 fueron recolectadas directamente de productores y 64, de diferentes intermediarios (supermercados, mercados, ferias del agricultor y verdulerías), todos estos ubicados en el Gran Área Metropolitana de Costa Rica, provincias de Cartago y San José. El muestreo fue

facilitado por la Unidad de Poscosecha del Centro de Investigaciones Agronómicas, por medio del Convenio entre la Universidad de Costa Rica y el Consejo Nacional de la Producción.

Las muestras de productores se recolectaron en bolsas plásticas estériles, y las provenientes de intermediarios, en el empaque facilitado por el propio local comercial. El traslado se realizó de forma inmediata al Laboratorio de Bacteriología del INISA, transportando las muestras en hielo.

La recolección de muestras se realizó tanto durante época lluviosa (Agosto a Diciembre 2001, 54 muestras) como época seca (Enero a Mayo 2002, 53 muestras) a fin de comparar la calidad microbiológica de acuerdo con la estación.

2. Análisis microbiológicos:

Las muestras fueron analizadas por presencia/ausencia de *Salmonella*, *Shigella* (25 gramos), recuento aerobio mesófilo y recuento de coliformes ⁽¹¹⁾. Para *Salmonella* y *Shigella* se realizó pre-enriquecimiento, enriquecimiento y cultivo diferencial de acuerdo al protocolo de referencia. Los aislamientos característicos, observados en los medios de cultivo (agar T7, agar DC y agar XLD), se confirmaron por pruebas bioquímicas y serología, utilizando un antisuero polivalente para *Salmonella* (poly O y VI, DIFCO) y antisueros monovalentes para *Shigella* (Reagensia, Suecia), para *S.dysenteriae* (serogrupos A1, A2 y A3), *S. flexneri* (serogrupo B), *S. boydii* (serogrupos C1, C2 y C3) y *S. sonnei* (serogrupo D). Para el recuento aerobio mesófilo, recuento de coliformes fecales y totales, se pesó 10 g. de muestra en 90 ml de agua peptonada estéril (pH: 7,0), y se realizaron diluciones decimales. Para coliformes fecales y coliformes totales se utilizó el Agar Bilis Rojo Violeta, con incubación durante 24 horas a 44,5°C (C.fecales) y a 35°C (C.totales). Para el recuento aerobio mesófilo, se empleó el Agar Estándar con cloruro de trifeniltetrazolium al 0,5% y se incubó por 48 horas a 35°C. ⁽¹¹⁾

Resultados

Otras investigaciones en vegetales frescos han señalado que los niveles de recuento aerobio mesófilo pueden ir de 10^2 a 10^5 UFC/g ^(12,13), por lo que se tomó este criterio para clasificar los resultados en dos grupos (Cuadro 1).

En el recuento aerobio mesófilo se encontró niveles mayores de 10^5 UFC/g en el 72% de las muestras.

En los resultados de la cuantificación de coliformes totales, el 80% de las muestras presentó un recuento entre 10 y 10^5 UFC/g, y recuentos mayores de 10^5 UFC/g en el 12% de éstos. En cuanto a coliformes fecales, el 40% de las muestras fueron positivas con niveles entre 10 y 10^5 UFC/g (Cuadros 2 y 3).

El análisis de los datos se realizó empleando el paquete STATA 8.0 con la prueba-t para variancias desiguales (I.C.=95%). Se comparó el resultado de cada indicador microbiológico por época seca y lluviosa sin obtener valores significativos de p de acuerdo a la época del año: recuento aerobio mesófilo (p=0,2674), coliformes totales (p=0,1375), coliformes fecales (p=0,8203) y *Escherichia coli* (p=0,4240). Sin embargo se observó un incremento de UFC/g en los coliformes totales durante la época seca, con logaritmos mayores a 5 (Figura 1). Los coliformes fecales también mostraron recuentos positivos (10 a 10^5 UFC/g) en época seca (52,8%, 28 muestras) con respecto a la época lluviosa (27,8%, 15 muestras)(Cuadro 3, Figura 2).

De 43 muestras con coliformes fecales, en 15 no se pudo analizar *E. coli*, y en las 28 muestras restantes, 12 presentaron recuentos positivos (de 10 a 100 UFC/g, datos no mostrados).

En ninguna de las muestras analizadas se logró detectar la presencia de protozoarios o helmintos de importancia médica. No se encontró muestras positivas por *Salmonella* spp., en tanto que en una lechuga proveniente de una verdulería, se identificó una colonia sospechosa por *Shigella* sp., que presentó el perfil bioquímico característico y una aglutinación fuerte con el anticuerpo específico para *S. flexneri*.

Discusión

En los últimos años, diversos informes han señalado el aumento en el consumo de frutas frescas y vegetales ⁽¹²⁾, lo que a la vez representa un riesgo potencial para la salud pública por su asociación a brotes de ETA. A pesar del conocimiento que existe sobre el comportamiento de patógenos en la producción de alimentos, existe poca información sobre su implicación a nivel de pre-cosecha ⁽¹³⁾. Aunque numerosas variables pueden influir, la OMS señala la necesidad de realizar investigación y evaluación continua relacionada con estos productos y su papel como vías de transmisión de agentes productores de ETA ⁽¹⁴⁾.

En el presente trabajo, se evaluó la calidad microbiológica de vegetales crudos (lechugas y tomates), de algunas zonas de alta producción y de lugares de venta, así como su potencial implicación en la transmisión de agentes patógenos específicos.

De los resultados obtenidos se observó que un 40% ⁽⁴³⁾ de las muestras, mostró recuentos positivos de coliformes fecales y 12 fueron positivas por *E. coli*. La presencia en los alimentos, de bacterias de origen entérico como los coliformes fecales y específicamente *E. coli*, se asocia a contaminación fecal en este tipo de producto ⁽¹³⁾. Por lo tanto, su presencia en alimentos de consumo crudo constituye un riesgo potencial para la salud.

El uso de agua residual no tratada para la irrigación, así como de fertilizantes a base de excremento durante la cosecha, representan los principales factores de contaminación asociados a ETA por consumo de este tipo de alimento ⁽¹⁵⁾. La contaminación en las muestras durante la época seca podría estar relacionada al uso de agua contaminada para riego durante esta estación. Sin embargo, no se puede excluir que la diferencia observada se deba al azar, por lo que se hace necesario estudios utilizando un mayor número de muestras.

Shigella se ha asociado a brotes originados de alimentos frescos. En Noruega, Suecia y Reino Unido, se han asociado al consumo de lechugas importadas del sur de Europa y brotes más recientes en EEUU se han presentado por consumo de lechuga, perejil y cebollas verdes ^(11, 12, 16).

Diversos estudios clínicos a nivel nacional han demostrado que *Shigella* es un agente común en Costa Rica ^(17, 18). En los últimos años se han publicado trabajos que señalan la posible asociación de esta bacteria a brotes de origen hídrico ^(19, 20). Sin embargo, no se cuenta con mucha información con respecto a su transmisión por medio de alimentos.

El aislamiento de *Shigella flexneri* obtenido en este estudio y la prevalencia del agente en el país, nos permiten postular la hipótesis de que ésta podría ser una vía de transmisión relevante y la necesidad de realizar estudios que permitan determinar la frecuencia de esta bacterias y otros agentes asociados a ETA, en productos frescos.

Bibliografía

- 1- World Health Organization. Pollution-related diseases kill millions of children a year.(publicación periódica en línea) 9 May 2002 (4 pantallas). Se encuentra en: URL: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/release36/en>
- 2- World Health Organization. Food Safety and Foodborne Illness.(publicación periódica en línea) September 2000. Fact sheet N°237.(4 pantallas). Se encuentra en URL:<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>. Acceso:4 noviembre del 2003
- 3- Kaferstein F.K., Motarjemi Y. and Bettcher D.W. Foodborne disease control: A transnational challenge. Special issue. *Emerg Infect Dis.*1997; 3(4):1-9.
- 4- Centers of Disease Control and Prevention. Preliminary FoodNet data on the incidence of foodborne illnesses-United States, 2003 (Sitio en Internet). Se encuentra en URL:http://www.cdc.gov/FoodNet/annual/2003/2003_report. Acceso: 10 de Julio, 2004
- 5- Satcher D. Food safety: a growing global health problem. *JAMA.*2000; 283(14):1-2.
- 6- Altekruse S, Cohen M and Swerdlow D. Emerging foodborne diseases. Perspectives. *Emerg. Infect. Dis.* 1997; 285-291.
- 7- Institute of Food Technologies. Emerging microbiological food safety issues: implications for control in the 21st century.
- 8- International Atomic Energy Agency. Determination of human pathogen profiles in food by quality assured microbial assays. Proceedings of a final Research Coordination Meeting held in Mexico City, 2002. January 2005, IAEA-TECDOC-1431. 83-95.
- 9- Sivapalasingam S, Friedman CR, Cohen L and Tauxe RV. Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *Food Prot.* 2004; 67(10): 2342-53.
- 10- INNPAZ OPS/OMS. SIRVETA (Sistema de Información Regional para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos) (Sitio en Internet). Disponible en URL: <http://www.panalimentos.org>. Acceso: 7 de enero, 2005
- 11- AOAC. Compendium of methods for the microbiological examination of food. 4ta edición, 1998. American Public Health Association.
- 12- Johannessen GS, Loncarevic S and Kruse H. Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. *Int. J. Food Prot.* 2002; 77: 199-204.
- 13- Harris LJ, Farber JN, Beuchat LR, Parish ME, Suslow TV, Garreth EH et al. Outbreaks associated with fresh produce: incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce: Chapter III Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.
- 14- Estrategia Mundial de la OMS para la inocuidad de los alimentos: alimentos más sanos para una salud mejor. Organización Mundial de la Salud, 2002.
- 15- Steele M and Odumeru J. Irrigation water as source of foodborne pathogens on fruit and vegetables. *Food Prot.* 2004; 67(12): 2839-49.
- 16- CDC. An outbreak of *Shigella sonnei* infection associated with consumption of iceberg lettuce. Dispatches. *Emerg. Infect. Dis.* 1999; 1(1): 565-8.

- 17- Achí R. et al. Immunomagnetic separation and PCR detection show *Shigellae* to be common faecal agent in children from urban marginal communities of Costa Rica. *J. Infect.* 1996;32:211-218.
- 18- Achí R and Lindberg A. Rapid and sensitive detection of *Shigella sonnei* in feces by the use of an O-specific monoclonal antibody in immunomagnetic separation-polymerase chain reaction combined assay. *Clin. Microbial. Infect.* 1996; 2: 55-58.
- 19- Barrantes K, Pardo V y Achí R. Brote de diarrea asociado a *Shigella sonnei* debido a contaminación hídrica, San José, Costa Rica, 2001. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas.* 2004; 25 (1 y 2): 15-22.
- 20- Valiente C y Mora D. El papel del agua para consume humano en los brotes de diarrea reportados en el período 1999-2001 en Costa Rica. *Revista Costarricense de Salud Pública.* 2001: 26-40.

Cuadro 1. Resultados del recuento aerobio mesófilo (RA) según época del año, Área Metropolitana, Costa Rica, 2001-2002

RT(log) UFC/g	Total		Época lluviosa		Época seca	
	Frecuencia (%)		Frecuencia (%)		Frecuencia (%)	
102 a 105	30	28	5	27,8	15	28,3
Más de 105	77	72	39	72,2	38	71,7
TOTAL	107	100	54	100	53	100

Cuadro 2. Resultados del recuento de coliformes totales (CT) según época del año, Área Metropolitana, Costa Rica, 2001-2002

CT(log) UFC/g	Total		Época lluviosa		Época seca	
	Frecuencia (%)		Frecuencia (%)		Frecuencia (%)	
Menos de 10	8	7,5	1	1,9	7	13,2
10 a 105	86	80,4	50	92,6	36	67,9
Más de 105	13	12,1	3	5,6	10	18,9
TOTAL	107	100	54	100	53	100

Cuadro 3. Resultados del recuento de coliformes fecales (CF) según época del año, Área Metropolitana, Costa Rica, 2001-2002

CF(log) UFC/g	Total		Época lluviosa		Época seca	
	Frecuencia (%)		Frecuencia (%)		Frecuencia (%)	
Menos de 10	64	59,8	39	72,2	25	47,2
10 a 105	43	40,2	15	27,8	28	52,8
TOTAL	107	100	54	100	53	100

Figura 1. Recuento de coliformes totales en 107 muestras de vegetales del Área Metropolitana de Costa Rica, según época del año, 2001-2002

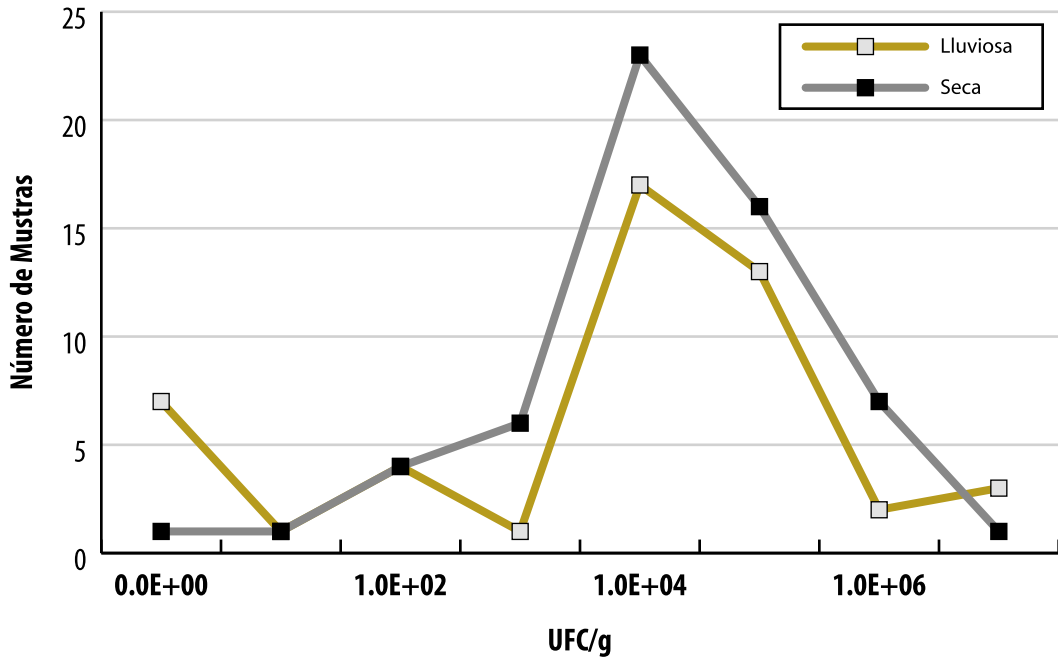


Figura 2. Recuento de coliformes totales en 107 muestras de vegetales del Área Metropolitana de Costa Rica, según época del año, 2001-2002

