



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**"INCIDENCIA DE *Listeria monocytogenes* EN ZANAHORIA
CRUDA Y EQUIPO EN UNA PLANTA PROCESADORA"**

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

DAN EMANUEL PÉREZ CAMERO

DIRIGIDA POR

Dr. EDUARDO FERNÁNDEZ ESCARTÍN

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2010.

**BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

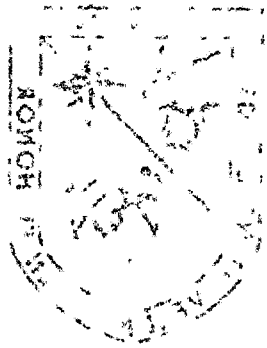
No. Adq: H 73806

No. Título _____

Clas TS

635.13

P438i



GRUPO Y EQUIPO DE INVESTIGACIONES EN NEUROLOGIA Y PSICOPATOLOGIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES Y ENSEÑANZA EN NEUROLOGIA Y PSICOPATOLOGIA

TRABAJO DE INVESTIGACION

CONFECCION DE TRABAJO DE INVESTIGACION

QUIMICO EN EL MENÚ

PRESENTA

DAVID ANTONIO PEREZ CAMERO

DIRIGIDA POR

J. EDUARDO BERRAVALDES ESCOBAR

CENTRO DE INVESTIGACIONES Y ENSEÑANZA EN NEUROLOGIA Y PSICOPATOLOGIA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

"INCIDENCIA DE *Listeria monocytogenes* EN ZANAHORIA CRUDA Y EQUIPO EN UNA PLANTA PROCESADORA"

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

DAN EMANUEL PÉREZ CAMERO

DIRIGIDA POR

Dr. EDUARDO FERNÁNDEZ ESCARTÍN

SINODALES

Dr. EDUARDO FERNÁNDEZ ESCARTÍN
DIRECTOR

Dra. MONSERRAT HERNANDEZ ITURRIAGA
SINODAL

Dra. SOFIA MARIA ARVIZU MEDRANO
SINODAL

M. en C. BEATRIZ LILIANA ALVAREZ MAYORGA
SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página.
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1. Las hortalizas y la importancia de su consumo	3
II.2. Factores de riesgo en la contaminación en frutas y hortalizas	4
II.2.1 En precosecha	5
II.2.1.1 Agua de riego	5
II.2.1.2 Sobrevivencia de los patógenos en frutas y Hortalizas	6
II.2.2 En poscosecha	7
II.3. Microbiología de frutas y hortalizas	8
II.4 <i>Escherichia coli</i>	8
II.5 <i>Listeria spp</i>	9
II.5.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	10
II.5.2 Listeriosis	12
II.5.3 Incidencia	14
II.5.4 Alimentos asociados a listeriosis	15
II.5.5 Poblaciones sensibles	17
II.6 Métodos de detección	18
II.6.1. Método de amplificación PCR	19
II.7 Zanahoria (<i>Daucus carota</i>)	20
II.7.1 Origen	20
II.7.2 Morfología y taxonomía	20
II.7.3 Requerimientos de clima y suelo	21
II.7.4 Valor nutricional	21

II.7.5 Índices de cosecha	22
II.7.6 Índices de calidad	22
II.7.7 Importancia económica y distribución geográfica	22
II.7.8 Producción nacional	23
III. HIPÓTESIS	25
IV. OBJETIVOS	26
IV.1 General	26
IV.2 Específicos	26
V.- METODOLOGÍA	27
V.1 Materiales	27
V.1.1 Equipo	27
V.1.2 Medios de cultivo	28
V.1.3 Soluciones	28
V.1.4 Reactivos y colorantes	28
V.2 Métodos	29
V.2.1 Descripción de las condiciones de empaque en la planta procesadora	29
V.2.2 Obtención de muestras	30
V.2.3 Preparación de muestras	30
V.2.4. Procesamiento de las muestras (grupos indicadores)	31
V.2.4.1 Bacterias mesófilas aerobias.	31
V.2.4.2 <i>Escherichia coli.i</i>	32
V.2.5 Detección de <i>Listeria</i> spp	33
V.2.5.1 Determinación de <i>L. monocytogenes</i> por PCR	36
V.2.5.2 Validación de PCR para la determinación de <i>L. monocytogenes</i> .	37
V.2.5.3 Evaluación de la técnica USDA Y FDA para determinar <i>L. monocytogenes</i> en zanahoria	37
V.2.5.3.1 Preparación del inóculo	37

V.2.5.3.2 Validación de la técnica de PCR para la detección de <i>L. monocytogenes</i> en zanahoria y torundas con 2 técnicas (USDA y FDA).	37
VI. RESULTADOS	39
VI.1 Estudio observacional	39
VI.1.2 Descripción de condiciones de empaque	40
VI.2 Distribución de BMA en zanahorias y superficies de diferentes puntos en el proceso de empackado	43
VI.2.1 Zanahorias	43
VI.2.2. Superficies de equipo	44
VI.3 Incidencia de <i>E. coli</i> en zanahoria	46
VI.4 Incidencia de <i>E. coli</i> en superficies.	47
VI.5 Estudios preliminares de <i>L. monocytogenes</i>	49
VI.5.1 Validación de la técnica de PCR en cultivo puro	49
VI.5.2 Efecto del nivel de inóculo en la recuperación por la técnica de la USDA Y FDA.	50
VI.5.3 Validación de la técnica de PCR para la detección de <i>Listeria monocytogenes</i> en zanahorias y torundas por la técnica de la USDA Y FDA.	52
VI.6 Incidencia de <i>L. monocytogenes</i> durante el empaque de zanahoria	53
VI.7 Capacidad de la PCR contra la técnica tradicional para identificar cepas <i>L. monocytogenes</i> .	58
VII. DISCUSIÓN.	59
VII.1 Estudio observacional.	59
VII.1.2 Descripción de condiciones de empaque.	60
VII.2 Distribución de BMA en zanahorias y superficies de diferentes puntos en el proceso de empackado.	64
VII.2.1 Zanahorias.	64
VII.2.2. Superficies de equipo.	65

VII.3 Incidencia de <i>E. coli</i> en zanahoria.	67
VII.4 Incidencia de <i>E. coli</i> en superficies.	69
VII.5 Estudios preliminares de <i>L. monocytogenes</i> .	72
VII.5.1 Especificidad de PCR en cultivo puro.	72
VII.5.2 Efecto del nivel de inóculo en la recuperación por la técnica de la USDA Y FDA.	72
VII.5.3 Validación de la técnica de PCR para la detección de <i>Listeria monocytogenes</i> en zanahorias y torundas por la técnica de la USDA Y FDA.	73
VII.6 Incidencia de <i>L. monocytogenes</i> durante el empaque de zanahoria	74
VII.6.1 Recomendaciones	79
VII.7 Capacidad de la PCR contra la técnica tradicional para identificar cepas <i>L. monocytogenes</i>	80
VIII. CONCLUSIONES	81
IX. BIBLIOGRAFÍA	82

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		Página
1	Diferencias entre las especies del genero <i>Listeria</i> (ICMSF, 1996).	12
2	Valor nutricional de la zanahoria en 100 g de sustancia comestible (IICA, 2007).	21
3	Principales países productores de zanahoria en el mundo (FAO, 2007).	23
4	Producción Agrícola de zanahoria en México 2007 (SAGARPA, SIAP, 2007).	24
5	Diagrama de flujo de la planta procesadora; producción, acondicionamiento y empaque de zanahoria.	39
6	NMP de <i>E. coli</i> en 60 muestras de zanahorias en empaque.	46
7	NMP de <i>E. coli</i> en superficies de la empacadora.	47
8	Recuperación de <i>Listeria</i> spp por la técnica USDA y FDA.	51
9	Numero de muestras analizadas para <i>Listeria monocytogenes</i> en las diferentes áreas de proceso de empacado en zanahoria	53
10	Positividad a <i>L. monocytogenes</i> en muestra de zanahoria, superficies y residuos en 6 estudios.	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Fuentes y mecanismos de contaminación con microorganismos patógenos en frutas y hortalizas (Beuchat y Ryu, 1997)	4
2	Recuento de BMA por la técnica vaciado en placa (Peeler y Maturin, 1992)	31
3	Recuento de <i>E. coli</i> por la técnica de NMP (Feng y col., 1998)	32
4	Investigación de <i>Listeria</i> y <i>L. monocytogenes</i> en zanahoria mínimamente procesada y materiales relacionados a su empaque.	35
5	Exterior de la planta empacadora.	40
6	Entrada de acceso con sus respectivas trampas contra roedores.	40
7	Pisos resistentes de cemento.	41
8	Deficiencias en la rejilla de drenaje.	41
9	Residuos de raíces y materia orgánica en rodillos y bandas transportadoras de zanahoria en la zona: a) Lavado, b) Desinfección, c) Enfriamiento, d) Selección por tamaño.	42
10	Vestimenta inadecuada, falta de guantes, cubre bocas y bata.	42
11	Medianas de BMA en puntos del proceso de producción de zanahoria integra.	44
12	Medianas de BMA en las superficies a lo largo del proceso de producción.	45
13	Especificidad de los iniciadores por técnica de PCR para <i>L. monocytogenes</i> .	49
14	Sensibilidad de la técnica PCR para dos tipos de caldos.	52
15	Positividad a <i>L. monocytogenes</i> por muestreo longitudinal	54
16	Positividad a <i>L. monocytogenes</i> en muestras de zanahoria cruda y superficies según muestreo.	55

17	Positividad a <i>Listeria</i> spp diferente de <i>L. monocytogenes</i> , y <i>L. monocytogenes</i> en zanahorias.	56
18	Positividad a <i>Listeria</i> spp diferente de <i>L. monocytogenes</i> , y <i>L. monocytogenes</i> en superficies.	57
19	Positividad a <i>L. monocytogenes</i> mediante PCR y técnica tradicional	58

RESUMEN

Listeria monocytogenes es un patógeno ambiental transmisible por alimentos. Aunque la incidencia de la listeriosis es baja, tiene una elevada letalidad 30%. Se estudio la incidencia de grupos indicadores (BMA y *E. coli*) así como de *Listeria* spp. y *Listeria monocytogenes* en zanahoria durante su acondicionamiento y empaclado. Seis muestreos longitudinales realizados en una planta empacadora de zanahoria con volumen de producción de 90 ton al día. Se colectaron 287 muestras de zanahoria y superficies diversas. *Listeria monocytogenes* se determinó por cultivo (USDA) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para lo cual se realizaron pruebas preliminares para validar ambas metodologías. *Listeria* spp diferente a *L. monocytogenes* se detecto 10% en zanahorias y 13% en superficies. *L. monocytogenes* se detecto en 4.6% en zanahorias y en todas las superficies muestreadas de maquinaria y equipo con una incidencia de 19.5% de las cuales 34% pertenecen a muestras positivas de superficies de la cámara de frio. La desinfección disminuye al máximo la incidencia del patógeno (0%), sin embargo, este vuelve a detectarse en 1 de cada cuatro zanahorias ya empacadas y refrigeradas. Esto sugiere la existencia de fuentes de contaminación dentro de la empacadora. Los resultados nos sugieren que *L. monocytogenes* se encuentra establecida e instalada dentro del área de producción. Sin buenas prácticas de sanitización de maquinaria y equipo, la reducción de *Listeria monocytogenes* en la zanahoria es improbable.

"Tu ciencia es maravillosa para mí; Alta es, no lo puedo comprender".

Salmos 139:6

I. INTRODUCCIÓN

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) representan uno de los problemas de salud pública más importantes, con repercusiones que inciden en el ámbito económico, político y social. Existen alimentos de origen animal (cárnicos o lácteos) que con mayor frecuencia se involucran en brotes de ETAs; sin embargo, alimentos como frutas y hortalizas también participan como vehículos de microorganismos patógenos aunque en menor escala.

Las frutas y hortalizas tienden a presentar una alta carga microbiana, a consecuencia de diversos factores que actúan tanto en el campo, como en las *prácticas de manejo después de la cosecha*. Destacando el tipo de agua de irrigación y la manipulación en las diversas etapas del ciclo productivo. Existen patógenos que pueden ser transportados por las frutas y hortalizas; como por ejemplo, *Listeria monocytogenes*, que provoca una enfermedad de gran importancia aunque con baja morbilidad, muestra una alta tasa de letalidad alrededor del 23% en los grupos susceptibles y personas inmunosuprimidas.

Dicha bacteria puede sobrevivir por largos períodos en los alimentos, en las plantas de procesamiento y en ambientes refrigerados y ser transmitida al humano a través de la ingesta de alimentos que se contaminan durante cualquier paso de la cadena de consumo o de producción. Actualmente el desarrollo tecnológico que ha permitido extender la vida útil de los productos refrigerados, la intensificación de los intercambios de productos, las distintas prácticas de alimentación, y preparación de los productos alimenticios ha aumentado el riesgo asociado con *L. monocytogenes*. De allí el interés que existe por excluir este microorganismo de la cadena de producción de alimentos, mantener las condiciones que inhiban su multiplicación y procurar su inactivación.

Por lo expuesto, es esencial poseer información veraz y reproducible que permita desarrollar programas destinados a producir alimentos seguros o de bajo riesgo hacia el humano, eliminando los peligros microbianos asociados al consumo

de vegetales mínimamente procesados. Sin embargo, en México la información al respecto es muy limitada o nula. Por ello, el interés central de este trabajo consiste en conocer la microbiología de la zanahoria, evaluar la incidencia de *L. monocytogenes* en la hortaliza durante el proceso de empaclado y así derivar información indispensable para desarrollar medidas objetivas tendientes a disminuir o controlar la presencia de dicho patógeno.

II.- ANTECEDENTES

II.1 Las hortalizas y la importancia de su consumo

Las hortalizas se definen como plantas herbáceas, de ciclo anual o bianual, cuyos productos presentan un alto contenido de agua, un bajo contenido energético, una corta vida útil después de la cosecha y cuyo propósito es la alimentación ya sea en su estado natural o procesado (García y col., 2002).

Las hortalizas frescas son una parte esencial de la dieta humana y el beneficio para la salud que resulta de su consumo habitual está ampliamente comprobado (Siller y col., 2002).

En países como EE.UU., debido al auge de algunas enfermedades ligadas a excesos o desequilibrios en la dieta, el mayor consumo de frutas y hortalizas está ampliamente recomendado (FDA, 1998).

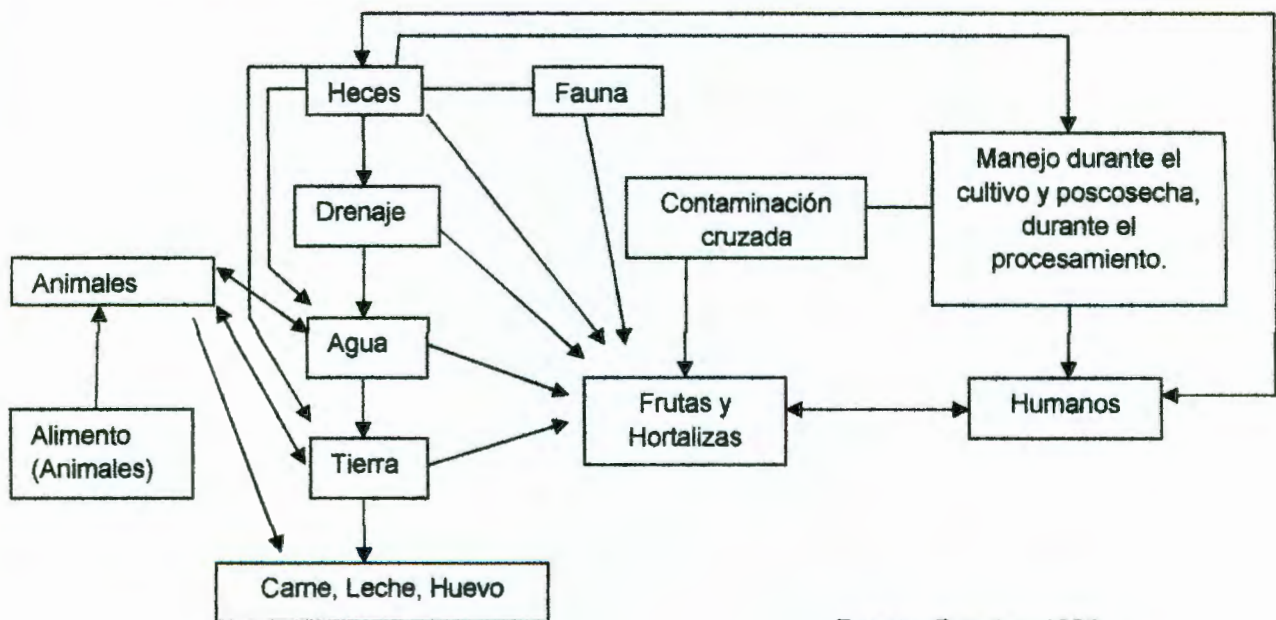
Las hortalizas al ser ingeridas crudas, aportan nutrientes básicos para los procesos vitales del organismo humano tales como sales minerales, vitaminas, proteínas, antioxidantes, enzimas, levaduras y agua biológicamente disponible, con muy pocas calorías. En general, favorecen la fluidez natural de la sangre y reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares, y debido a la preponderancia de elementos alcalinos neutralizan ácidos, contribuyendo a mantener la reacción básica del organismo. Aportan fibra que estimula naturalmente el peristaltismo intestinal y combate el estreñimiento, y las sales alcalinas, vitaminas, enzimas y clorofila compensan la baja de vitalidad orgánica, principalmente en invierno, debido a la menor exposición solar y el mayor consumo de alimentos cocinados (García y col., 2002).

En México, hortalizas como la zanahoria están ampliamente difundidas en la población y su producción alcanza volúmenes importantes en la agricultura; durante el 2007, se produjeron 408,128 toneladas (SIAP, 2007).

II.2 Factores de riesgo en la contaminación de frutas y hortalizas.

Existen prácticas en el cultivo de hortalizas, que propician que este grupo de alimentos se convierta en vehículo potencial de microorganismos patógenos (Monge y col., 1996) situación que se presenta en supermercados, tiendas, puestos de mercados o cosechadas a nivel familiar (Harris y Cullor, 2002). Se incrementa más aún el riesgo, si personas enfermas o portadoras de los agentes patógenos participan en dichas labores (OPS/OMS, 1998).

En el campo el suelo, abono, animales, equipo agrícola y las manos del personal requerido para recolectar, clasificar, atar y envasar son fuentes que contribuyen al número de microorganismos y su distribución en el producto (ICMSF, 1981; Limongelli y col., 199; Beuchat y Ryu, 1997; Bihn y col., 1999). En consecuencia se deben controlar las fuentes de contaminación, y tener presente que pueden ser diversas (Figura 1) y operar en forma simultánea o alternada (Beuchat y Ryu, 1997).



Fuente: Beuchat 1996

Figura 1. Fuentes y mecanismos de contaminación con microorganismos patógenos en frutas y hortalizas.

II.2.1 En precosecha

Normalmente las hortalizas no deben ser causa de problemas de salud pública (Acevedo y col., 2001). Sin embargo, al actuar como vehículos, es posible la transmisión de bacterias patógenas desde las hojas, por contaminación directa con heces de animales, uso de estiércol como abono o por la irrigación de los cultivos cosechas con aguas de desagüe sin tratar o parcialmente tratadas (Limongelli y col., 1991; Diane, 1995; Beuchat y Ryu, 1997; Echandi y Antillón, 2000; Fernández, 2000; Acevedo y col., 2001; García y col., 2002;).

II.2.1.1 Agua de riego

La presencia de microorganismos en los productos agrícolas de consumo humano está relacionada directamente con la calidad microbiológica del agua de riego (Castro de Esparza, 1991; Fasciolo y col., 1998). Debido a que todas las variedades de agua, naturales o no, son vehículos potenciales de microorganismos a los alimentos, según sus antecedentes o procedencia puede aportar agentes patógenos o deterioradores (Fernández, 2008).

Es así que los niveles de contaminación existentes en la producción de frutas y hortalizas están en función del uso del recurso hídrico. La utilización de aguas residuales para el riego en zonas de cultivo, era una práctica común en muchos países de América Latina (Vaz da Costa- Vargas y col., 1991; OPS/OMS, 1998). Este tipo de aguas actúa como fuente de contaminación debido a que transportan materia fecal con microorganismos patógenos que son excretados por personas enfermas o portadores sanos. Una de las bacterias patógenas de mayor interés en aguas residuales sin tratar es *Salmonella* spp. (Limongelli y col., 1991).

La persistencia de bacterias entéricas en el agua depende de una variedad de factores ambientales que incluyen temperatura, pH, luz solar, sustancias orgánicas disueltas, ligación a partículas, asociación con vectores y la presencia de sales y otros solutos. La temperatura es probablemente el factor más importante,

con una supervivencia más duradera a menores temperaturas. La mayoría de las bacterias entéricas son menos estables cuando el pH es >6 y <9 . La presencia de materia orgánica y sedimentos ayuda a la supervivencia protegiendo a las bacterias de otros efectos ambientales. Un mayor contenido de humedad en los suelos también ayuda en su persistencia en el medio ambiente (Reynolds, 2002).

II.2.1.2 Supervivencia de los patógenos en frutas y hortalizas

La contaminación microbiológica de las hortalizas toma mayor importancia al considerar que el tiempo de supervivencia de los microorganismos patógenos puede ser prolongado (semanas o meses) particularmente cuando éstos se encuentran en las áreas más húmedas del vegetal y protegidas de la desecación y de los rayos directos del sol, como suele ocurrir en la lechuga y la col. Se ha demostrado que la frecuente contaminación del suelo por repetidas aplicaciones de agua contaminada o por heces de animales, contrarresta los factores ambientales adversos y permite que los agentes patógenos permanezcan viables en la tierra por dos meses o más (Monge y col., 1996). Se debe considerar como factores adicionales la lluvia antes de la cosecha (Limongelli y col., 1991), el pH del suelo (Castro de Esparza, 1991) y agua (Monge y col., 1996)

Los períodos de supervivencia de los microorganismos, además de reflejar variaciones entre cepas, están muy influenciados por factores climáticos (Vaz da Costa-Vargas y col., 1991; Fasciolo y col., 1998). El calor (Limongelli y col., 1991), la alta irradiación solar (Vaz da Costa-Vargas y col., 1991) y la baja humedad del aire (Fasciolo y col., 1998) favorecen la muerte de los patógenos.

También incide el período de tiempo entre el último riego y la cosecha ya que un mayor período favorece la obtención de productos agrícolas de mejor calidad bacteriológica (Fasciolo y col., 1998). De esta manera, los organismos patógenos que llegan con las aguas residuales sobreviven en el suelo y plantas por períodos de tiempo suficientemente largos como para ser transportados a los mercados e ingeridos por individuos sanos y susceptibles, produciendo en ellos

enfermedad, a menos que se realicen efectivos procedimientos de desinfección (Beuchat y Ryu, 1997).

II.2.2 En poscosecha

Después de la cosecha, en el empaque, en los contenedores y vehículos utilizados para el transporte, almacenamiento, equipo de empaque y exhibición para la venta existen muchas ocasiones para que los microorganismos contaminen las frutas y hortalizas (ICMSF, 1981; Limongelli y col., 1991; Beuchat y Ryu, 1997; Bihn y col., 1999). El daño causado a las frutas y hortalizas durante el transporte, enfriamiento y mercadeo, conlleva la liberación de algunos nutrientes que favorecen el desarrollo microbiano; por ello, la manipulación puede ser una de las causas más importantes de contaminación en poscosecha y es válida para todos los productos agrícolas, incluso para aquellos irrigados con aguas limpias (Castro de Esparza, 1991).

Cualquier hortaliza expandida al menudeo puede estar contaminada, pues a pesar de existir una red de distribución establecida en la cual los agricultores recurren a la intervención de intermediarios mayoristas, existe a la vez una red paralela de minoristas, informales y ambulantes que aprovechando su cercanía a las áreas agrícolas, compran en las mismas parcelas y revenden en los mercados vecinos. De esta manera, no es posible establecer el origen del producto comprado por el consumidor final y se confunde lo contaminado y lo limpio. Esta situación se agrava por la suciedad y la falta de higiene de los embalajes de exhibición, almacenes y puestos de venta, que terminan igualando la calidad microbiológica de los productos que vienen de charcas más limpias con aquella antihigiénica de los que proceden de huertas regadas con aguas residuales (Jay, 2000).

Por todo esto, las hortalizas constituyen una fuente de microorganismos patógenos que pueden ser transferidos a otros alimentos (ICMSF, 1981) o bien *contaminar las manos de los manipuladores, equipos y utensilios que se utilizan durante su procesamiento, propiciando una contaminación cruzada y mayor*

difusión de ETAs (Castro de Esparza, 1991; Hobbs y Roberts, 1997; Fernández, 2000).

II.3 Microbiología de frutas y hortalizas

Desde el punto de vista de salud pública, la calidad microbiológica de las hortalizas frescas destinadas al consumo crudo es muy importante. Se ha destacado que la mayoría los brotes de enfermedades relacionadas con el consumo de hortalizas están asociados con la contaminación superficial del producto por el agente etiológico, como consecuencia de los sistemas de manejo utilizados en el cultivo, tratamiento, embalaje o transporte al mercado (ICMSF, 1981; Fasciolo y col., 1998; Fernández, 2008).

Normalmente, las hortalizas frescas albergan una población diversa de microorganismos, siendo frecuentes niveles de $10^5 - 10^7$ UFC/g. Entre el 80 - 90% de las bacterias son bacilos Gram negativos, predominando especies de *Pseudomonas*, *Enterobacter* o *Erwinia* (Acevedo y col., 2001).

Entre las bacterias patógenas que han sido asociadas con el consumo de hortalizas frescas se pueden mencionar a *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enterohemorrágica, especies de *Salmonella*, *L. monocytogenes* las cuales están descritas por la OMS como una significativa amenaza a la salud pública (Echandi y Antillón, 2000).

II.4 *Escherichia coli*

Es la especie más asociada a materia fecal ya que su hábitat natural primario es el tracto intestinal del hombre y animales de sangre caliente, llegando a números que van de 10^5 a 10^9 microorganismos/g de heces (OPS/OMS, 1998; ICMSF, 1999; García y col., 2002; Feng y Weagant, 2002).

Por lo tanto, la presencia de este microorganismo en un alimento indica generalmente una contaminación directa o indirecta de origen fecal (Hobbs y

Roberts, 1997; OPS/OMS, 1998; ICMSF, 1999; Feng y Weagant, 2002) y lo convierte en el único microorganismo indicador válido en el análisis de los vegetales frescos (Vaz da Costa-Vargas y col., 1991; ICMSF, 1999).

La enumeración de *E. coli* y sus niveles detectados en los alimentos pueden estar influenciados por factores como la multiplicación del microorganismo, su muerte o inactivación o su adherencia a las partículas del alimento. En muchos casos, los recuentos de *Enterobacteriaceae* no guardan relación con la cuantía de la contaminación originada a partir de fuentes fecales, debido a que pueden multiplicarse en algunos alimentos mientras que tienden a disminuir en otros y en el agua (ICMSF, 1999).

Con todo, la simple presencia de *E. coli* o un recuento de coliformes fecales indicará una contaminación fecal, sugiriendo una falta general de limpieza en el manejo del alimento y/o un almacenamiento inadecuado (ICMSF, 1999; Feng y Weagant, 2002). Es importante destacar, que el hallazgo de *E. coli* en un alimento no constituye una connotación directa de la presencia de un patógeno, sino que implica únicamente un cierto riesgo de que pudiera estar presente (Hobbs y Roberts, 1997; ICMSF, 1999), es decir, su hallazgo no guarda siempre una estrecha correlación con la presencia de salmonelas o de otros microorganismos patógenos (ICMSF, 1999).

II.5. *Listeria* spp

El género *Listeria* se compone de seis especies divididas en dos líneas de descendencia: i) *L. monocytogenes*, y las especies *L. innocua*, *L. ivanovii* (subespecies *ivanovii* y subespecies *londiniensis*), *L. welshimeri* y *L. seeligeri*; ii) *L. grayi* (*L. murrayi* fue incluida recientemente en esta especie) (Capita y col., 2000; Jay, 2000). *Listeria* es una bacteria anaerobia facultativa, catalasa positiva y oxidasa negativa, hidroliza la esculina en pocas horas, pero no la urea ni la gelatina; no produce indol ni sulfuro de hidrógeno. El contenido de guanina-citosina de su ADN es bajo, entre el 36% y 38% (Monge y col., 1999).

De las seis especies, sólo tres de ellas producen beta hemólisis en agar sangre: *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* y *L. ivanovii*; mientras que esta última especie produce una zona amplia de hemólisis, *L. monocytogenes* produce zonas estrechas que generalmente no exceden el borde de la colonia (Astudillo y col., 1994). *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* son positivas frente la prueba de CAMP con *Staphylococcus aureus*, mientras que *L. innocua* es negativa (Jay, 2000).

En el género *Listeria* sólo son consideradas virulentas las especies *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*, siendo *L. monocytogenes* la que más preocupa para la salud pública, por lo que concierne a infecciones alimentarias en humanos (Crespo y col., 1999).

II.5.1 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes es un bacilo corto, Gram positivo, no esporulado, que mide entre 0.4 μm a 0.5 μm de diámetro y de 0.5 μm a 2 μm de largo, pueden ser curvos, con tendencia a agruparse en cadenas cortas, de extremos redondeados, y en algunas ocasiones puede tomar la forma de cocobacilos. En cultivos viejos suelen aparecer formando filamentos de 6 mm a 20 mm de longitud. En los preparados teñidos a menudo adoptan una disposición en empalizada (Jay, 2000).

Es una bacteria aerobia y anaerobia facultativa, pero su proliferación mejora cuando los cultivos se incuban con reducción de dióxido de carbono entre 5 y 10%. La temperatura mínima de desarrollo de este microorganismo psicrótrófo, es de 1.1 °C +/- 0.3 °C, la óptima de 30 a 37°C, y la máxima de 45°C. *L. monocytogenes* es relativamente resistente al calor si se encuentra en concentraciones del orden de 10^5 a 10^6 UFC/mL (Jay, 2000).

L. monocytogenes puede crecer en un intervalo de pH amplio, desde 4,1 hasta alrededor de 9,6; sin embargo, el óptimo fluctúa entre 7.2 y 7.6. Este microorganismo es la segunda especie patógena transmitida por alimentos, después de los estafilococos, que es capaz de crecer en valores de actividad de

agua (a_w) menores de 0.93 (Lawrence y Gilmour, 1994; Jay, 2000; Doyle, 2001; Remacha y col., 2002). *L. monocytogenes* es resistente a concentraciones elevadas de NaCl (30%) (Jay, 2000).

Desde el punto de vista nutricional no es exigente, crece bien en muchos medios de cultivo como por ejemplo agar triptosa, agar chocolate y agar sangre (Astudillo y col., 1994.). Son necesarias por lo menos cuatro vitaminas del grupo B (biotina, riboflavina, tiamina, ácido teicoico) y aminoácidos como la cisteína, glutamina, valina, isoleucina y leucina. Hidroliza la esculina y crecen en presencia de 10 a 40% (p/v) de bilis (Doyle, 2001).

Entre 20 y 25°C es móvil por medio de 4 flagelos peritricos, pero a 37°C sólo forma un flagelo polar. Posee una motilidad característica tipo “tumbling” o “volteo”, es decir, mediante un lanzamiento rápido combinado con saltos y rotación (De Curtis y col., 2002).

Tiene la capacidad de fermentar carbohidratos formando ácidos como la ramnosa no así el manitol y la xilosa (Cuadro 1), es catalasa positivo, oxidasa negativo, Voges Proskauer positivo, rojo de metilo positivo e indol negativo, no produce ácido sulfhídrico, no reduce el nitrato y produce β -hemólisis en agar sangre, debido a su producción de listeriolisina O (exotoxina hemolítica y citolítica) (Jay, 2000).

Cuadro 1. Diferencias entre las especies del genero *Listeria* spp

Especies <i>Listeria</i>	Fermentación de Carbohidratos			Hemolisis
	M	X	R	
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	+	+
<i>L. innocua</i>	+	-	V	-
<i>L. ivanovii</i>	-	+	-	+
<i>L. welshimeri</i>	-	+	V	-
<i>L. seeligeri</i>	-	+	-	+
<i>L. grayi</i>	+	-	V	-

M, manitol; X, D-xilosa, R, L-ramnosa.

"+" fermenta el azúcar en cuestión y produce gas.

"V" puede o no fermentar el azúcar en cuestión.

"-" No fermenta el azúcar en cuestión ni produce gas.

Fuente: Adaptación ICMSF, 1996

II.5.2 Listeriosis

La listeriosis es una enfermedad causada por *L. monocytogenes*, que no presenta una sucesión única de síntomas ya que el curso de la enfermedad depende del estado del hospedador (Laciar y col., 1999). Su emergencia sucede a partir de 1981, con la puesta en evidencia de su transmisión alimentaria (FAO/OMS, 2000; Remacha y col., 2002).

La listeriosis puede ser transmitida a través del contacto con animales, infección cruzada o contaminación cruzada, entre recién nacidos en el hospital o bien a través de la ingesta de alimentos contaminados (Bell y Kyriakydes, 2000).

Una persona con listeriosis puede presentar síntomas parecidos a la gripe, tales como fiebre, dolor muscular, tensión de cuello, cansancio y escalofríos, algunas veces síntomas gastrointestinales como diarrea, náuseas y dolores abdominales (Rocourt y Cossart, 2001). En las personas adultas no embarazadas, *L. monocytogenes* tiene un tropismo específico hacia el sistema nervioso central. La listeriosis invasiva (infecciones por *L. monocytogenes* graves), en personas adultas, se manifiesta como septicemia o como meningoencefalitis secundaria a

una bacteriemia, produciéndose síntomas tales como dolor de cabeza, confusión, pérdida de equilibrio o convulsiones (ICMSF, 2001).

Para algunos el desarrollo de la enfermedad puede ocurrir aproximadamente entre 3 a 70 días después de la exposición. La listeriosis es una enfermedad de baja morbilidad, pero alta letalidad (20 a 30% de los casos), y es la tercera causa más frecuente de meningitis bacteriana en recién nacidos, tras la originada por estreptococos del grupo B y *E. coli*; la listeriosis evoluciona bajo la forma de casos esporádicos que a veces se incrementan en pequeños brotes y aún hasta en verdaderas epidemias. La mayoría de los casos de listeriosis humana son esporádicos donde la fuente y la vía de infección generalmente no se conocen, aunque, se considera que los alimentos contaminados son la principal vía de transmisión (Rocourt y Cossart, 2001).

La listeriosis invasiva es una enfermedad relativamente rara pero a menudo grave, por lo general con tasa de incidencia de 4 a 8 casos por 1 000 000 personas (Capita y col., 2000).

Dentro de las manifestaciones de listeriosis invasiva se encuentran las infecciones en el embarazo, que puede ocurrir en cualquier trimestre del embarazo pero con mayor frecuencia en el primero. La listeriosis materna puede precipitar el parto y esto provocar la muerte fetal o un parto de pretérmino de un feto infectado. La granulomatosis infantiséptica, es otra forma de invasión, que se produce por la transmisión transplacentaria del microorganismo, en donde el lactante presenta abscesos o granulomas diseminados en múltiples órganos (Jay, 2000).

También pueden producirse infecciones focales tales como lesiones cutáneas. Se ha observado granulomatosis en veterinarios como resultado del contacto directo con animales infectados y en trabajadores de laboratorio, como resultado de una inoculación directa accidental (Rocourt y Cossart, 2001). Otros síndromes clínicos descritos son la osteomielitis, peritonitis, endocarditis, artritis séptica (ICMSF, 1996). Dentro de las manifestaciones no invasivas se encuentra la

gastroenteritis que se da en huéspedes normales que consumen alimentos contaminados con *L. monocytogenes* (Doyle, 2001).

II.5.3 Incidencia

Aunque la mayoría de los casos de listeriosis se dan de forma esporádica, en los últimos años ha despertado un mayor interés debido a los brotes ocurridos en distintos países asociados al consumo de determinados alimentos.

Según Ellin Doyle en el 2001, aproximadamente, 76 000 000 de casos de enfermedad alimentaria se estima que ocurren cada año en los EE. UU y de ellos, aproximadamente 2 500 casos (<1%) son causados por *L. monocytogenes*; sin embargo la listeriosis es responsable de aproximadamente 27.6% del total de las muertes atribuidas a enfermedades alimentarias (Doyle, 2001). Aunque no se trata de una infección de notificación obligatoria, los datos de una vigilancia activa, en EE. UU muestran tasas de infección anual entre 1982 y 1986 de 7.4 casos por millón de habitantes, correspondientes a 1850 casos anuales con 425 muertes atribuibles. La mayoría de los casos se concentran en la población menor de un mes y mayor de 60 años (Crespo y Vélez, 1999).

Desde 1990, en los Estados Unidos, el número de casos ha disminuido 44% y el número de muertes relacionadas con listeriosis a 48%. La listeriosis es notificada principalmente en países industrializados. Los predominios en África, Asia y América del sur, se desconocen o son bajos, posiblemente debido a los modelos de consumo, diferentes hábitos dietéticos, diferencias en la sensibilidad del hospedero, tecnologías diferentes, diferencias en la elaboración y almacenaje de los alimentos (Rocourt y Cossart, 2001).

Aunque la exposición a *L. monocytogenes* es frecuente, la listeriosis invasiva es rara. Se calcula que una significativa proporción de la población (3 a 10%) es portadora de *Listeria* en su tracto gastrointestinal pero no muestran signos de la

enfermedad, desconociéndose el riesgo de enfermedad clínica en ellos (Doyle, 2001; Rocourt Cossart, 2001)

Desde 1981, las investigaciones epidemiológicas se han centrado en la transmisión de listeriosis por medio de los alimentos, sin embargo; se han descrito dos vías de transmisión insólitas: la listeriosis contraída en los hospitales, la cual se encuentra en forma esporádica, principalmente en niños compañeros de cuarto, por medio del uso de algún material contaminado, y las infecciones cutáneas primarias observadas mayormente en granjeros y veterinarios, por la manipulación de fetos bovinos o de vacas presuntamente infectados (Rocourt y Cossart, 2001)

II.5.4. Alimentos asociados a listeriosis

Los brotes se han asociado o se han relacionado epidemiológicamente con el consumo de quesos frescos de tipo hispano; quesos de pasta blanda o semiblanda y madurados con mohos, perros calientes (hot dogs), lengua de cerdo en gelatina, productos cárnicos elaborados, paté, salami, leche con chocolate pasteurizada, leche pasteurizada, leche no pasteurizada, mantequilla, camarones cocidos, mejillones ahumados, pescado ahumado, ensalada de papas, hortalizas crudas y ensalada de col.

En general, los alimentos implicados presentan concentraciones de *L. monocytogenes* superiores a 10^3 CFU/g (FDA/CFSAN, 2002), pero en algunos casos la concentración de *L. monocytogenes* en el alimento implicado ha sido considerablemente menor. No obstante, estas estimaciones están sujetas a gran incertidumbre porque la concentración efectiva del patógeno en la porción de alimento consumida por una persona infectada puede haber sido considerablemente diferente (Jay, 2000). Los brotes de enfermedad humana debidos a la transmisión de microorganismos patógenos a través de las verduras, son generalmente consecuencia de la contaminación por aguas residuales, aguas con materia fecal, agua contaminada para la refrigeración o para el lavado, o la consecuencia de una manipulación no higiénica. *L. monocytogenes* está muy

difundida en la tierra, donde puede persistir durante mucho tiempo, por lo que los vegetales crudos son vehículos potenciales de listeriosis humana. Uno de los primeros brotes relacionados con verduras, se dio en Canadá (1980), debido a una ensalada de coles, donde las coles habían sido conservadas en refrigeración por un período prolongado, factor que originó el crecimiento de *L. monocytogenes*. Dichas coles se habían cultivado en campos en los que habían pastado ovinos cuya materia fecal contaminó la tierra con *L. monocytogenes* (ICMSF, 2001).

Se ha detectado *L. monocytogenes* en hortalizas tales como tomates, lechugas, jugo de lechuga, pepinos, judías, coliflores, brócolis, rábanos en los cuales la contaminación es variable y se ve influenciada por el lugar de cultivo, la zona de recolección, los abonos, la temperatura, los procedimientos de lavado y el contacto con el suelo (ICMSF, 2001; Jay, 2000) .

La producción de hortalizas tanto para consumo nacional como para la exportación ha mostrado un importante crecimiento en muchos países tales como EE. UU y Canadá. En particular, tienen un mercado muy apreciado, entre los países importadores, el brócoli y los espárragos, pero para poder ser aceptados, deben cumplir con todas las normas microbianas, por ejemplo, la ausencia de microorganismos patógenos tales como *L. monocytogenes* en cualquier porción de 25 g (Fernández, 1999).

En la industria alimentaria uno de los rubros que ha mostrado mayor desarrollo es el de las verduras crudas empacadas en cortes, que se han hecho populares en los supermercados, en los autoservicios de ensaladas en los restaurantes, y para la preparación de diversos tipos de alimentos. Sin embargo, las nuevas técnicas de procesamiento y envasado han aumentado el riesgo asociado con *L. monocytogenes*, debido a su carácter ubicuo y gran adaptación a las condiciones del medio (Fernández, 1999; De Curtis y col., 2002). Esto se ve demostrado en un estudio realizado en Venezuela, en el que se analizaron muestras de vegetales mínimamente procesados, detectándose un 25% de

muestras contaminadas con el género *Listeria* y 9% con *L. monocytogenes* (De Curtis y col., 2002).

Monge y Arias-Echandi realizaron un estudio en 50 ensaladas de vegetales frescos con el fin de detectar la presencia de *L. monocytogenes*, encontrando un 32% (16/50) de *Listeria* spp, de las cuales, 8% (10/16) eran *L. monocytogenes*. La presencia de este microorganismo podría representar un riesgo potencial para la salud pública ya que la dosis infectiva no ha sido bien establecida (Monge y Arias-Echandi, 1999).

II.5.5. Poblaciones sensibles

La listeriosis es considerada como una infección oportunista que con mayor frecuencia afecta a mujeres embarazadas, fetos, recién nacidos, personas de edad avanzada, y personas con enfermedades subyacentes graves como por ejemplo aquellos con terapia inmunosupresiva, pacientes con SIDA y con condiciones crónicas que deterioran el sistema inmunitario como por ejemplo la cirrosis, trasplante de órganos y hemodiálisis (ICMSF, 1996; FAO/OMS, 2000; Jaradat y Bhunia, 2003).

Los recién nacidos pueden adquirir la infección a través de la madre de dos formas: las madres embarazadas, que son colonizadas con la bacteria en el tracto digestivo tras la ingesta de alimentos contaminados, pueden desarrollar una infección asintomática o una enfermedad parecida a la gripe con fiebre, mialgia o dolor de cabeza (De Curtis y col., 2002). Dicha bacteria es transmitida al feto a través de la placenta y las consecuencias para el feto son más graves, incluyendo aborto espontáneo, muerte del feto, nacimiento prematuro, septicemia neonatal grave y meningitis (Doyle, 2001).

En pacientes enfermos que reciben terapia inmunosupresora, se debilita la resistencia a la infección y también puede alterarse los mecanismos de defensa intestinal, lo que favorece la invasión de las listerias. Aunque las personas

saludables pueden consumir alimentos contaminados sin llegar a enfermar, en ellos el riesgo de infección es mayor y pueden contraer listeriosis probablemente después de volver a comer alimentos contaminados con incluso una pequeña cantidad de bacteria (Rocourt y Cossart, 2001).

II.6 Métodos de detección

El análisis microbiológico de alimentos es necesario para obtener la seguridad como la calidad de los alimentos. Los métodos microbiológicos convencionales están basados en medios de cultivo específicos para aislar y enumerar las células bacterianas viables. Estos métodos son sensibles, de bajo costo y proporcionan información cualitativa sobre el número y naturaleza de los microorganismos presentes en las muestras de alimentos. Sin embargo, los métodos convencionales requieren varios días para la obtención de resultados ya que se basan en la habilidad de los microorganismos de multiplicarse y formar colonias visibles. Además, la preparación de medio de cultivo como de placas, el recuento de las colonias y la caracterización bioquímica hacen de estos métodos técnicas muy laboriosas. La industria alimentaria requiere métodos rápidos para obtener información adecuada sobre la posible presencia de patógenos en las materias primas y en el producto final, para el control del proceso de elaboración y para el monitoreo de las prácticas de higiene y limpieza.

Los microorganismos tales como la *Salmonella* y *L. monocytogenes* son dos de los principales patógenos transmitidos por los alimentos (Williams y Golden, 2001) siendo los cuadros de salmonelosis y listeriosis más frecuentes en los últimos años, por lo que planes preventivos como HACCP por ejemplo, son una medida efectiva para prevenir los brotes. Se requiere una rápida detección y cuantificación del patógeno mediante pruebas microbiológicas durante la verificación de la inocuidad del alimento (Choi y Hong, 2003).

II.6.1.Método de amplificación PCR

La técnica más utilizada para la amplificación de ADN en el análisis microbiológico de alimentos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Dependiendo de las circunstancias específicas (región del gen, sistema de detección, muestra de alimento), los límites de detección conseguidos por la mayoría de sistemas PCR se encuentran entre las 10 y 10⁴ ufc/g (Sheu y col., 1998).

La comparación de los métodos de PCR con los métodos tradicionales de cultivo en la detección de microorganismos patógenos en alimentos indica que la PCR es una técnica de mayor sensibilidad. Esto puede ser debido a que las células no viables que no son cultivables sí pueden ser detectadas mediante técnicas de ácidos nucleicos (Pedersen y Jacobsen, 1993). La diferencia entre células cultivables y las no cultivables pero aun viables, puede realizarse mediante un enriquecimiento previo (Sheu y col., 1998)

Un método cuantitativo muy utilizado para detectar *L. monocytogenes* en alimentos es la PCR, basado en la amplificación del ADN. Los genes frecuentemente usados para la detección por PCR de *L. monocytogenes* son tres: el gen *iap* que codifica para la principal proteína extracelular que está asociada con la invasión de células fagocíticas, el gen *hlyA* que codifica para el factor de virulencia listeriolisina O, y el gen *prf* que codifica para una proteína que regula la expresión de los factores de virulencia (Kuhn y Goebel, 1989).

Pese a sus desventajas al comparar los métodos de cultivo tradicionales respecto del PCR, estas técnicas tradicionales son fundamentales. Son un índice para la validación de nuevas técnicas y permite disponer de la cepa en estado puro. Esta metodología de cultivo corresponde a la prueba oficial para el análisis de alimentos recomendada por la FDA, las normas ISO y otras entidades a nivel internacional.

II.7 Zanahoria (*Daucus carota*).

II.7.1 Origen.

La zanahoria (*Daucus carota*) tiene su origen botánico en Asia Menor, donde puede encontrársela en estado espontáneo, y de cuya forma original, a partir de selecciones iniciales realizadas en el siglo XVII, proceden las formas actuales (Maroto, 1989). Es una planta de clima frío pero cultivada también en regiones tropicales y subtropicales, especialmente en grandes altitudes (IPGRI, 1998).

II.7.2 Morfología y Taxonomía

Familia: *Umbelliferae*. Nombre científico: *Daucus carota* L.

Planta: bianual. Durante el primer año se forma una roseta de pocas hojas y la raíz. Después de un período de descanso, se presenta un tallo corto en el que se forman las flores durante la segunda estación de crecimiento.

Sistema radicular: raíz napiforme, de forma y color variables. Tiene función almacenadora, y también presenta numerosas raíces secundarias que sirven como órganos de absorción. Al realizar un corte transversal se distinguen dos zonas bien definidas: una exterior, constituida principalmente por el floema secundario y otra interior formada por el xilema y la médula.

Las zanahorias más aceptadas son las que presentan gran proporción de corteza exterior, ya que el xilema es generalmente leñoso y sin sabor. Flores: de color blanco, con largas brácteas en su base, agrupadas en inflorescencias en umbela compuesta. Fruto: diaquenio soldado por su cara plana (IICA, 2007).

II.7.3 Requerimientos de clima y suelo

Clima: La temperatura mínima de crecimiento está en torno a los 9°C y un rango óptimo está entre 16 -18°C. Soporta heladas ligeras; en reposo las raíces no se ven afectadas hasta -5°C lo que permite su conservación en el terreno.

Suelos: Prefiere los suelos arcillo-calizos, aireados y frescos, ricos en materia orgánica bien descompuesta y en potasio, con pH comprendido entre 5,8 y 7. Los terrenos compactos y pesados originan raíces fibrosas, de menor peso, calibre y longitud, incrementándose además el riesgo de podredumbres (IICA, 2007).

II.7.4 Valor Nutricional.

Las cualidades nutritivas de las zanahorias son importantes, especialmente por su elevado contenido en beta-caroteno (precursor de la vitamina A), pues cada molécula de caroteno que se consume es convertida en dos moléculas de vitamina A. En general se caracteriza por un elevado contenido en agua y bajo contenido en lípidos y proteínas (Cuadro 2) (IICA, 2007).

Cuadro 2. Valor nutricional de la zanahoria en 100 g de sustancia comestible

Agua (g)	88.6
Carbohidratos (g)	10.1
Lípidos (g)	0.2
Calorías (cal)	40
Vitamina A (U.I.)	2.000-12.000 según variedades
Vitamina B1 (mg)	0.13
Vitamina B6 (mg)	0.19
Vitamina E (mg)	0.45
Ácido nicotínico (mg)	0.64

Fuente: IICA, 2007

II.7.5 Índices de Cosecha

En la práctica, las decisiones de cosecha en zanahorias están basadas en diversos criterios dependiendo del mercado y punto de venta. Las zanahorias son típicamente cosechadas en un estado inmaduro cuando las raíces han alcanzado suficiente tamaño para llenar la punta y desarrollar un adelgazamiento uniforme. La longitud puede usarse como índice de madurez en la cosecha de zanahorias para procesado (cortadas y peladas), de acuerdo a la eficiencia de proceso deseado (Trevor y col., 2009)

II.7.6 Índices de Calidad

Existen muchas propiedades visuales y organolépticas que diferencian las diversas variedades de zanahoria para mercado fresco y mínimo proceso. En general, las zanahorias deberían ser:

Firmes (no flácidas o lacias). Rectas con un adelgazamiento uniforme desde los 'hombros' hasta la 'punta'. Color naranja brillante. Debería haber pocos residuos de raicillas laterales, ausencia de "hombros verdes" o "corazón verde" por exposición a la luz solar durante la fase de crecimiento, bajo amargor por compuestos terpénicos. Alto contenido de humedad y azúcares reductores es deseable para consumo fresco.

Defectos de calidad incluyen falta de firmeza, forma irregular, aspereza, desarrollo pobre de color, partiduras o grietas, corazón verde, quemado de sol y calidad pobre del corte de tallo (Trevor y col., 2009).

II.7.7 Importancia económica y distribución geográfica.

El cultivo de la zanahoria ha experimentado un importante crecimiento en los últimos años, tanto en superficie, como en producción, ya que se trata de una de las hortalizas más producidas en el mundo. China es el mayor productor seguida por EE.UU. (Cuadro 3), México ocupa el decimotercer lugar (IICA, 2007).

Cuadro 3. Principales países productores de zanahoria en el mundo (2002)

Clasificación.	Países	Producción (ton)
1	China	6.611.984
2	EE. UU	1.900.000
3	Federación de Rusia	1.520.000
4	Polonia	900.000
5	Reino Unido	700.400
6	Japón	690.300
7	Italia	600.000
8	Francia	481.697
9	Ucrania	465.000
10	Alemania	430.000
11	España	400.000
12	India	350.000
13	México	341.412
14	Indonesia	320.000
15	Canadá	290.000
16	Australia	265.000
17	Nigeria	231.000
18	Marruecos	198.000
19	Colombia	177.009

Fuente: IICA, 2007

II.7.8 Producción nacional

Desde el punto de vista de producción según el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), con información de las Delegaciones de la SAGARPA (2007), la producción nacional de la zanahoria tuvo una superficie sembrada de 14, 295.52 hectáreas, con una producción de 390,114.42 Ton., y una

venta de 1,920.39 \$/Ton (Cuadro 4). En Guanajuato que es el segundo estado con la mayor producción la zanahoria seguido de Zacatecas tuvo una superficie sembrada de 3,471 hectáreas, con una producción de 86,374 Ton. y una venta de 1,495.48 \$/Ton, (SIAP, 2007) dándonos una idea de la importancia de este producto.

Cuadro 4. Producción Agrícola de zanahoria en México 2007

Ubicación	Sup. Sembrada (Ha)	Sup. Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	PMR (\$/Ton)	Valor Producción (Miles de Pesos)
Aguascalientes	131.00	131.00	2,392.00	18.26	2,350.5	5,622.40
Baja California	183.50	177.50	2,817.98	15.88	3,462.0	9,755.92
Baja California Sur	7.25	7.25	113.50	15.66	7,449.7	845.55
Chihuahua	24.50	24.50	444.50	18.14	1,607.6	714.60
Coahuila	216.00	216.00	6,503.00	30.11	2,217.7	14,421.77
Distrito Federal	54.00	54.00	1,307.00	24.20	2,247.8	2,938.00
Durango	16.00	16.00	288.00	18.00	3,000.0	864.00
Guanajuato	3,471.50	3,471.50	86,374.00	24.88	1,495.4	129,170.4
Jalisco	147.00	147.00	2,659.00	18.09	1,717.2	4,566.10
México	2,694.50	2,691.50	60,720.91	22.56	2,476.1	150,355.8
Michoacán	239.00	239.00	5,643.85	23.61	2,467.9	13,928.71
Morelos	54.00	54.00	1,296.00	24.00	2,000.0	2,592.00
Nuevo León	308.00	308.00	8,485.00	27.55	2,780.9	23,596.50
Puebla	2,594.00	2,588.00	66,881.98	25.84	2,372.0	158,646.0
Querétaro	858.00	858.00	27,940.00	32.56	1,271.3	35,521.85
San Luis Potosí	50.27	43.02	588.30	13.68	1,037.0	610.11
Sonora	114.00	114.00	2,370.40	20.79	2,771.3	6,569.30
Tamaulipas	40.00	40.00	1,600.00	40.00	8,000.0	12,800.00
Tlaxcala	73.00	73.00	2,072.00	28.38	884.94	1,833.60
Veracruz	149.00	149.00	6,789.00	45.56	1,500.0	10,183.50
Zacatecas	2,871.00	2,871.00	102,828.0	35.82	1,591.3	163,636.5
	14,295.52	14,273.27	390,114.4	27.33	1,920.3	749,172.7

Fuente: (SIAP, SAGARPA, 2007).

III. HIPÓTESIS:

1.- Bajo las condiciones ambientales que labora la planta empacadora es posible el aislamiento de *L. monocytogenes* en zanahorias y superficies asociadas a su empaque.

2.- La falta de un sistema establecido de saneamiento en maquinaria y equipo de la planta empacadora puede favorecer a la formación de reservorios de *L. monocytogenes*.

3.- La detección de *Listeria monocytogenes* mediante PCR a partir de zanahoria y superficies de una planta empacadora, conduce a resultados equivalentes a la técnica tradicional de cultivo.

IV. OBJETIVOS

IV.1 General

Determinar la incidencia de *Listeria monocytogenes* durante el acondicionamiento de zanahoria cruda y superficies asociadas a su empaque

IV.2 Específicos

- Establecer una descripción general de la planta empacadora de zanahoria.
- Determinar la presencia de grupos indicadores en zanahoria, equipo y personal de empaque
- Determinar la incidencia de *L. monocytogenes* en zanahoria y materiales asociados a su empaque por medio de dos técnicas (PCR y cultivo).
- Comparar la capacidad de la PCR para identificar *L. monocytogenes* con respecto a la técnica de cultivo.

V. METODOLOGIA

V.1 Materiales

V.1.1 Equipo

Autoclave eléctrica de mesa, 121 °C (Market-Forge, Sterilimatic)

Balanza analítica digital, 120g x 0.0001g (Sartorius)

Baño María de precisión de 43 ± 0.2 °C, Modelo 251 (Precisión Scientific)

Bloque térmico 100 °C

Bolsas de polietileno en rollo sin marca comercial, diferentes tamaños

Bolsas de polietileno estériles capacidad 252 ml (Whirl - Pack)

Campana de flujo laminar (Alder y Veco)

Centrifuga de mesa (Hermle)

Cuba de electroforesis y fuente de poder

Cuenta colonias (Québec Reichert-Jung)

Gradilla para tubo eppendorf

Homogenizador (Stomacher, Seward 400)

Horno para esterilización (Shel-lab)

Incubadora de 35° (Pecision Scientific, Seward 400)

Incubadora de 30° (Pecision Scientific, Seward 400)

Kit de pipetas para PCR. Rangos: 200-1000 μ l, 20-200 μ l, 5-40 μ l, 0.5-10 μ l

Microscopio luminoso (Leica)

Potenciómetro, modelo 410 (Orion)

sistema Kodak EDAS 290

Termociclador (Techne TC-512)

Tubos eppendorf estériles de 1.5 ml (COSTAR)

Tubos para PCR 0.2 ml estériles (COSTAR)

Vortex, modelo G650 Scientific Industries Inc (Daiger Vortex Genie 2)

Micropipetas 5-1000 μ l (Labsystems)

Unidades de filtración (Millipore)

V.1.2 Medios de cultivo

Agar cuenta estándar (ACE), (Bioxon)

Agar soya tripticasa (AST), (Bioxon)

Agar cloruro de litio-feniletanol-moxalactamo (LPM), (Oxoid)

Agar Oxford modificado (MOX), (Oxoid)

Agar soya tripticasa con extracto de levadura (AST-EL), (Bioxon)

Base Caldo Rojo Fenol (CRF), (Bioxon)

Base Caldo Rojo Fenol mas Manitol (CRFM) (Merck Darmstadt)

Base Caldo Rojo Fenol mas Xilosa (CRFX) (Sigma)

Base Caldo Rojo Fenol mas Ramnosa (CRFR) (Sigma)

Caldo de enriquecimiento de la Universidad de Vermont (UVM)

Caldo de enriquecimiento para Listeria (LEB), (Oxoid)

Caldo de enriquecimiento secundario Fraser (CF)

Caldo Soya Trypticaseina (CST), (Bioxon)

Medio de SIM, (Bioxon)

V.1.3 Soluciones

Solución Citrato ferrico amoniacal 5%(Bioxon)

Solución de colistina 10 mg/L (Sigma)

Solución Moxalactamo 20mg/L (Sigma)

V.1.4 Reactivos y colorantes

Agarosa para biología molecular (Sigma)

Agua destilada estéril

Alcohol Etilico al 95% (Gram)

Buffer TAE 1X

Antisuero monovalente para *L. monocytogenes* serotipo O:1 y O:4, (DIFCO)

Coloración de Gram (cristal violeta, safranina, lugol)

Marcador de peso molecular (Invitrogen)

Rojo de metilo, (Sigma)

V.2 Métodos

4.2.1 Descripción de las condiciones de empaque en la planta procesadora

Se realizaron 8 visitas periódicas a la planta procesadora de zanahoria en la ciudad de San José Iturbide del estado de Guanajuato.

En cada ocasión se realizó un estudio observacional de eventos, maniobras, practicas de trabajo y operaciones. Con el objetivo de encontrar fuentes potenciales de contaminación que pudieran comprometer la inocuidad microbiana de la zanahoria en la empacadora. Los lineamientos para reducir riesgos de contaminación están divididos en buenas prácticas agrícolas (BPA) y buenas prácticas de manufactura (BPM). El trabajo es dirigido al estudio las Prácticas Agrícolas Sanitarias en el empaque. Las condiciones sanitarias de operación incluyen los siguientes tópicos (SENASICA, 2002):

- ✓ Instalaciones
- ✓ Diseño y construcción de la planta
- ✓ Equipo
- ✓ Limpieza y sanidad
- ✓ Fuente de agua
- ✓ Protección a la fuente de agua
- ✓ Recepción del producto
- ✓ Control de plagas
- ✓ Practicas de proceso
- ✓ Pruebas microbiológicas

En cada visita se registró el nivel de cumplimiento a las prácticas sanitarias agrícolas durante el empacado. Se seleccionaron los siguientes eventos como las más significativas por su impacto en la inocuidad de los productos agrícolas:

- 1.- Fauna doméstica y silvestre en o próxima al reservorio de agua (<200 m)
- 2.- Facilidades para el lavado de manos: agua, jabón, toallas desechables.
- 3.- Presencia de residuos de alimentos: en el área de empaque.
- 4.- Presencia heces fecales (<200 m): humanas, animales.
- 5.- Herramienta y otros materiales dentro de las áreas de empaque.

V.2.2. Obtención de las muestras

Las muestras de zanahoria y superficies de equipo proceden de una empacadora. Estas muestras se obtuvieron de los distintos puntos del proceso de empaque de este producto, lo que se realizará de acuerdo a un plan de muestreo. Para *L. monocytogenes* el Reglamento Sanitario de los Alimentos es relevante la categoría en que se encuentra el microorganismo, catalogado como un patógeno de tolerancia cero; una muestra positiva sería suficiente para poder rechazar el producto.

Se realizaron 9 muestreos longitudinales con un total de 469 muestras. Se recolectó 144 unidades de zanahoria, 325 de superficie de equipo asociados a su empaque entre los meses de diciembre del 2008 y marzo del 2009. Cada unidad experimental de zanahoria consistió de tres zanahorias crudas enteras y las unidades experimentales de superficie de equipo consistieron en torundas e hisopos muestreando una superficie de 100 cm². Las muestras fueron transportadas en bolsas de polietileno; se refrigeraron y se procesaron dentro de las 24 horas de ser recolectadas en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos del Departamento de Investigación y Posgrado de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Querétaro.

V.2.3 Preparación de muestras

Zanahorias: a cada unidad experimental en bolsa de polietileno, se le adiciono 1 mL de tiosulfato de sodio al 3% para neutralizar el cloro.

Torundas de muestreo de reservorios, superficies, manos y guantes de trabajadores: Se muestrearon 100 cm² de superficies y 2 manos o un par de guantes con torunda de gasa estéril (3 por 4 cm) frotando enérgicamente. Ésta se depositó en bolsa con 30 mL de caldo de pre-enriquecimiento estéril y se homogenizó por 1 min a velocidad normal en un homogenizador mecánico.

V.2.4. Procesamiento de las muestras (grupos indicadores)

V.2.4.1 Bacterias mesófilas aerobias.

A cada muestra experimental se homogenizaron en 90 ml de AP, se prepararon diluciones decimales y se efectuó el recuento de BMA (Peeler y Maturin, 1992). El recuento fue por la técnica vaciado en placa utilizando ACE e incubando a 22°C/24-48 h (Figura 2).

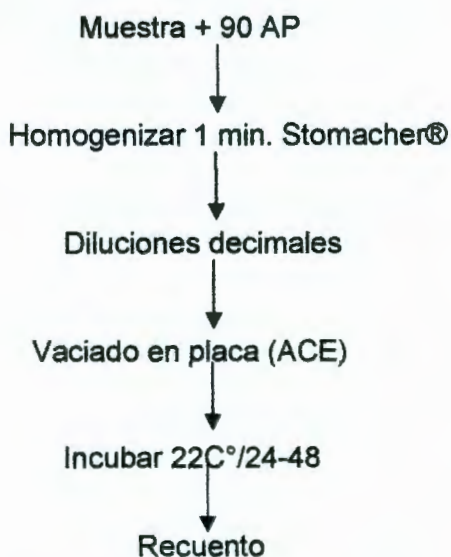


Figura 2. Recuento de BMA por la técnica vaciado en placa.

V.2.4.2 *Escherichia coli*. (Feng y col., 1998). Se siguió la técnica del número más probable (NMP) (Figura 3).

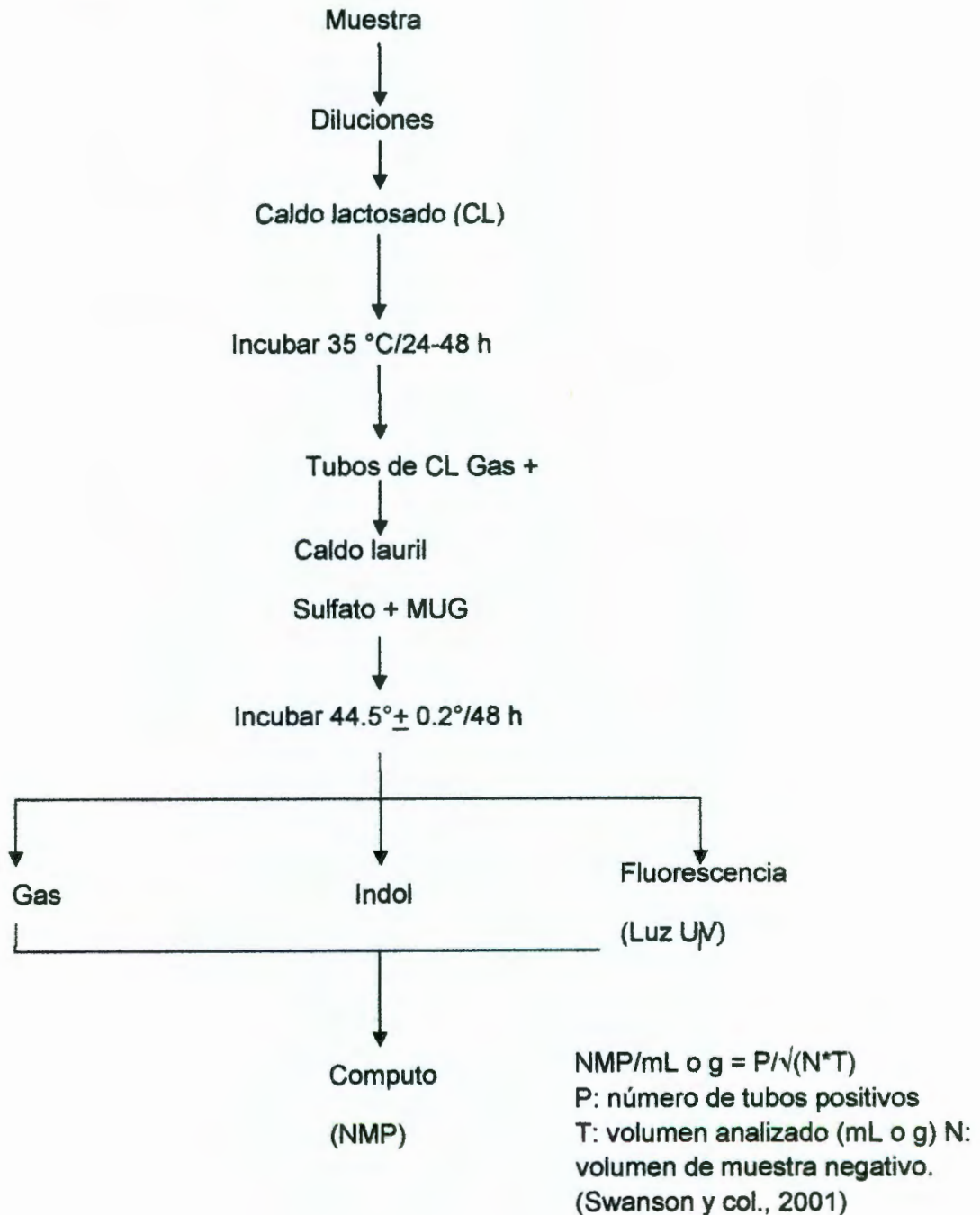


Figura 3. Recuento de *E. coli* por la técnica de NMP.

La confirmación se realizó en CLS+MUG a 44.5 ± 0.2 °C durante 48 h. Este caldo permite comprobar la presencia de *E. coli* mediante tres pruebas: 1) la producción de gas a partir de la lactosa, 2) producción de indol por la utilización del triptófano, 3) la actividad de la enzima β -glucuronidasa sobre el sustrato MUG (4-metilumbeliferil D-glucurónido). Este ingrediente al ser hidrolizado por la enzima referida produce 4-metilumbeliferona que fluoresce al exponerse a la luz ultravioleta con longitud de onda 366 nm.

V.2.5 Detección de *Listeria*

Se empleó la técnica de la USDA. Primer enriquecimiento: a cada unidad experimental se le adicionó caldo UVM esta muestra se combinó con 150 ml del medio de enriquecimiento para zanahoria, 20 ml para torundas y 3 ml para hisopos en caldo UVM dentro de una bolsa. Se homogenizó de forma manual agitando la bolsa enérgicamente por 1 min (para zanahorias); se usó el stomacher para homogenizar las torundas y se encubaron a 30°C por 48 h (Figura 4). Segundo enriquecimiento: Transcurridas las 48 horas, se tomó 0.1 mL del caldo del primer enriquecimiento y se colocó en un tubo de ensayo que contenía 10 mL de caldo Fraser adicionado con Citrato Férrico de Amonio al 5% y se llevó a incubación a 35°C por 24 a 48 horas. La diferrización es facilitada al incluirse el Citrato Férrico de Amonio al final de la preparación del medio. Todas las especies de *Listeria* hidrolizan la esculina, este resultado es dado por la formación del 6-7 dihidroxicoumarin que reacciona con los iones férricos.

Aislamiento de colonias sospechosas, los tubos positivos muestran un obscurecimiento del caldo Fraser, debido a la hidrólisis de la esculina. Se tomó una asada del caldo de cada muestra, y se sembró por estrías en agar MOX y en agar LPM. Las placas se incubaron a 35°C por 24 a 48 horas. Transcurrido este tiempo se seleccionaron de 2 a 3 colonias sospechosas (tomando en cuenta las colonias características para cada tipo de medio), y se sembró en AST con 0.6% de extracto de levadura, incubándose a 30 °C por 24 a 48 horas. *L. monocytogenes* se identificó mediante pruebas bioquímicas de las cepas aisladas.

Se observó la morfología microscópica a través de la tinción de Gram. Movilidad en Medio Semisólido: Se Inoculó por picadura recta en medio semisólido SIM, se incubó por 1 día a temperatura de 22°C, y se observó la movilidad de la bacteria Las especies de *Listeria* son móviles, dando un crecimiento típico en forma de paraguas.

Fermentación de carbohidratos: Se inoculó una asada tomada del AST con 0,6% de extracto de levadura, en tubos que contenían caldo rojo fenol con 1% de carbohidrato (ramnosa, manitol y xilosa) y se incubó a 35 °C por 2 días. Una coloración amarilla indica una prueba positiva. Se consulto el cuadro 1 y se determino la diferencia de especies del genero *Listeria*. Prueba de hemólisis: a partir del AST con 0.6% de extracto de levadura se sembró en placas de agar sangre de carnero al 5%, se incubó por 24 a 48 horas, y se observó el tipo de hemólisis.

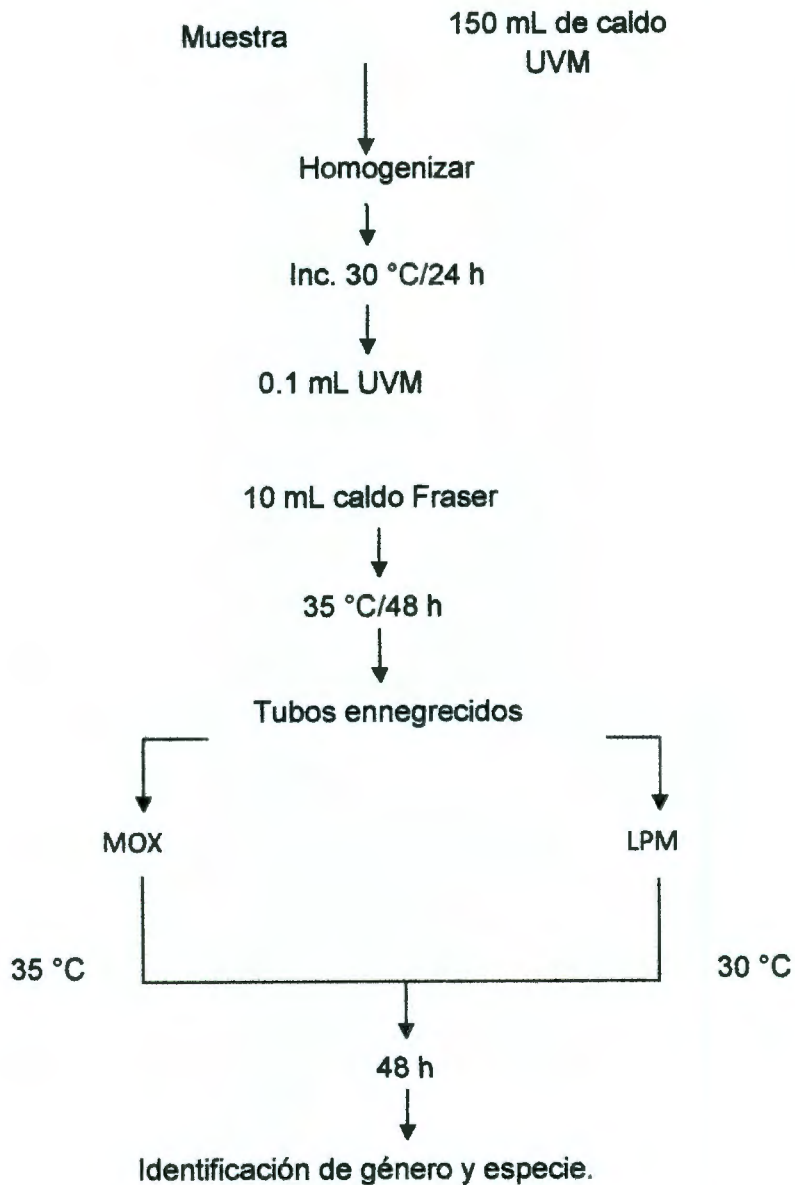


Figura 4. Investigación de *Listeria* y *L. monocytogenes* en zanahoria mínimamente procesada y materiales relacionados a su empaque.

V.2.5.1 Determinación de *L. monocytogenes* por PCR

Una vez realizado el primer enriquecimiento para listeria (caldo UVM) se realizó en forma paralela la extracción de ADN. Para ello 1 ml de cada caldo de pre-enriquecimiento cultivado, fue depositado en tubos Eppendorf que fueron centrifugados a 4500 rpm por 15 min. Se decantó y se le agregó 1 ml de agua destilada estéril, y se resuspendió con la ayuda de vortex, los tubos se llevan a 94°C (ebullición) por 20 min con el fin de conseguir la lisis de estas bacterias sin dañar su ADN. Las pequeñas porciones de los elementos estructurales son sedimentados, mientras que el ADN se mantiene en el sobrenadante, y es recuperado con ayuda de una micropipeta y se depositarlo en un tubo nuevo.

Para la amplificación por PCR se estableció un juego de partidores que copian una región de 702 pb del gen *HlyA* de la hebra molde, este gen codifica para la proteína hemolisina O, principal factor de virulencia. Dichos partidores constan de la siguiente secuencia LM1: CCTAAGACGCCAATCGAA; LM2: AAGCGCTTGCAACTGCTC (Aznar, 2002).

Las muestras fueron amplificadas de acuerdo al siguiente programa: desnaturalización inicial por 5 min a 94°C, seguido por 35 ciclos que consistieron en: 30 seg/94°C, 45 seg/50°C, 45 seg/72°C. La extensión final fue realizada a 72°C por 5 min.

Los geles fueron sometidos a 100 volts 75 mAm en buffer TAE a una concentración de 1X durante 1 hora y 30 min. Se cargaron con 3.5 µl del amplificado y 1 µl de la solución colorada de mayor densidad (10X Blue Juice). La visualización de los productos de amplificación se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y bromuro de etidio (1 ppm); las bandas se visualizaron en un transiluminador UV. Se utilizo un marcador molecular de 50 pb.

V.2.5.2 Validación de PCR para la determinación de *L. monocytogenes*.

Se determinó la especificidad de los iniciadores de *L. monocytogenes*. Para ello se emplearon cultivos puros de *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seelegeri*, *L. welshimeri* y otras 11 cepas de especie distintas a *L. monocytogenes*, algunas Gram (+) y otras Gram (-).

V.2.5.3 Evaluación de la técnica USDA y FDA para determinar *L. monocytogenes* en zanahoria.

V.2.5.3.1 Preparación del inóculo

La activación de las cepas se realizó transfiriendo una asada de cada una de las cepas a caldo soya tripticasa suplementado con rifampicina (100 ppm) y se incubaron a 35°C por 24 h. se realizaron dos transferencias sucesivas cada 24 h y a las 18-20 h de incubación del último cultivo, las células se cosecharon por centrifugación a 3500 X g/ 15 min.

Los paquetes celulares se lavaron dos veces con solución salina isotónica, resuspendiéndose después en esta misma solución. Se mezclaron volúmenes iguales de cada cepa y se prepararon diluciones decimales en DP para obtener el nivel de inóculo deseado. El recuento de la suspensión celular se realizó en AST suplementado con rifampicina (100 ppm) mediante la técnica de vaciado en placa. Las placas se incubaron a 35°C por 24 h.

V.2.5.3.2 Validación de la técnica de PCR para la detección de *L. monocytogenes* en zanahoria y torundas con 2 técnicas (USDA y FDA).

Se evaluó la sensibilidad de estas dos técnicas para la recuperación de *L. monocytogenes* (FDA y USDA) en zanahoria y muestras de superficie. Se inocularon 0, 1,5, 50, 100 UFC de *L. monocytogenes* en zanahoria y torundas, con 5 repeticiones cada muestra. Se dejaron secar en la campana de flujo laminar durante 20 min. Posteriormente para zanahoria se pre-enriquecieron con 150 ml de

cada uno de los caldos: caldo UVM y caldo LEB. Para torundas se pre-enriquecieron con 20 ml de cada uno de los caldos.

Existen estudios acerca del efecto inhibitor de algunos compuestos de la zanahoria hacia el género *Listeria* (López y col., 2005). En consecuencia, se planteó el siguiente razonamiento: si se incubaba la zanahoria como tal, esta podría desprender compuestos en el caldo de pre-enriquecimiento que pudieran inhibir al microorganismo. Por tal razón se valoraron dos formas de recuperación de *L. monocytogenes*.

- Sumergir las zanahorias en el caldo de pre-enriquecimiento durante las 48 horas de incubación que señala la técnica.
- Frotando la zanahoria en el caldo de pre-enriquecimiento durante un minuto y retirarla previo a la incubación.

Se incubaron las muestras, UVM a 35° C y LEB a 30°C por 48 h y se realizó recuento en ASTR mediante la técnica de vaciado en placa. Las placas se incubaron a 35°C por 24 h. Se verificó que los inóculos probados amplificaran de forma aceptable al PCR.

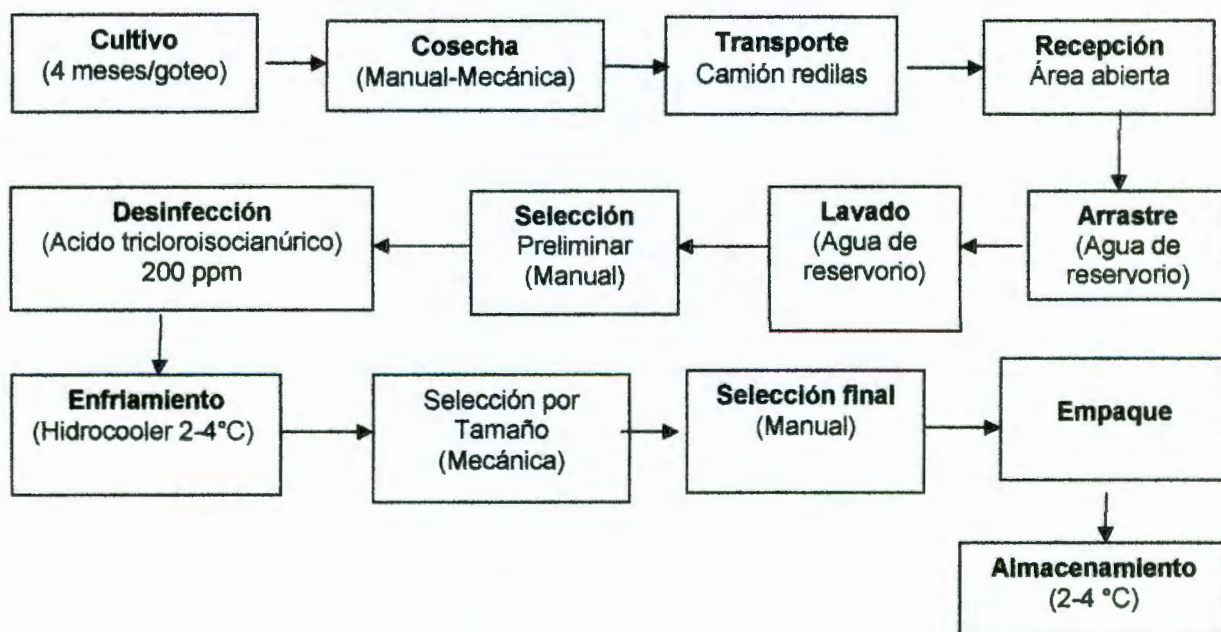
VI RESULTADOS

VI.1 Estudio observacional

El estudio se realizó en el área de empaque. La intención fue detectar violaciones a las practicas sanitarias dentro de la planta procesadora de zanahoria. Los propietarios de esta empresa participan en el Subprograma de Inocuidad de Alimentos, del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), operado por los Comités Estatales de Sanidad Vegetal (CESAVE) e implementan prácticas sanitarias agrícolas. La empresa cuenta con el certificado de inocuidad "PrimusLabs" otorgado por el sistema Primuslab y el control de calidad de CESAVEG, por haber aprobado una auditoria en sus políticas, procedimientos y propiedad física en un 93% satisfaciendo la categoría de "Excelente".

Se realizó el diagrama de flujo, en base a la observación (Cuadro 5), y una descripción de la planta procesadora en base a las condiciones sanitarias de operación que señala SENASICA.

Cuadro 5. Diagrama de flujo de la planta procesadora: producción, acondicionamiento y empaque de zanahoria.



VI.1.2 Descripción de condiciones de empaque

La construcción de la planta empacadora cuenta con un diseño exterior funcional facilitando su mantenimiento y operación de limpieza. Su contorno se encuentra en su mayoría pavimentado existiendo zonas que solo constan de grava, lo que evita la formación de lodo y de maleza (Figura 5). En su perímetro cuenta con barreras físicas y trampas que impiden el ingreso de fauna silvestre y doméstica al área de empaque (Figura 6).



Figura 5. Exterior de la planta empacadora.



Figura 6. Entrada de acceso con sus respectivas trampas contra roedores.

Dentro de los servicios básicos, existe uno que es vital para el adecuado funcionamiento de una instalación de esta naturaleza. Se trata de los servicios higiénicos. Estos servicios consideran tanto la parte de funciones fisiológicas normales como lo relativo al aseo personal. La empacadora consta de servicios sanitarios accesibles y aptos para su uso. El lugar de su ubicación se encuentra aislado de la zona de producción, empaque y almacenamiento. Es un aspecto que se debe considerar en el sentido de que ningún servicio higiénico debe tener comunicación directa a la sala de proceso.

Una vez dentro de la zona de producción, es imperativo el lavado de manos. Los servicios sanitarios están equipados para el buen desarrollo de lavado y secado de manos; cuentan con lavabos, jabón líquido, toallas de papel y dispensador de gel que contiene alcohol desnaturalizado.

Los pisos están hechos con materiales durables, fáciles de limpiar (Figura 7). El piso es resistente para soportar el movimiento del producto, así como resistentes a los detergentes que se utilizan para el saneamiento. El piso cuenta con sistema de drenaje, sin embargo presenta defectos en la rejilla que lo recubre (Figura 8).



Figura 7. Pisos resistentes.

Figura 8. Deficiencias en la rejilla de drenaje.

Las bandas que transportan zanahorias así como los rodillos en la selección del área de empaclado, presentan grietas en la superficie. En las orillas de la banda albergan residuos como raíces y materia orgánica (Figura 9).

Los residuos no son removidos de manera continua y sistemática. La banda transportadora debe ser lisa y libre de grietas, esta condición promueve la formación de reservorios.

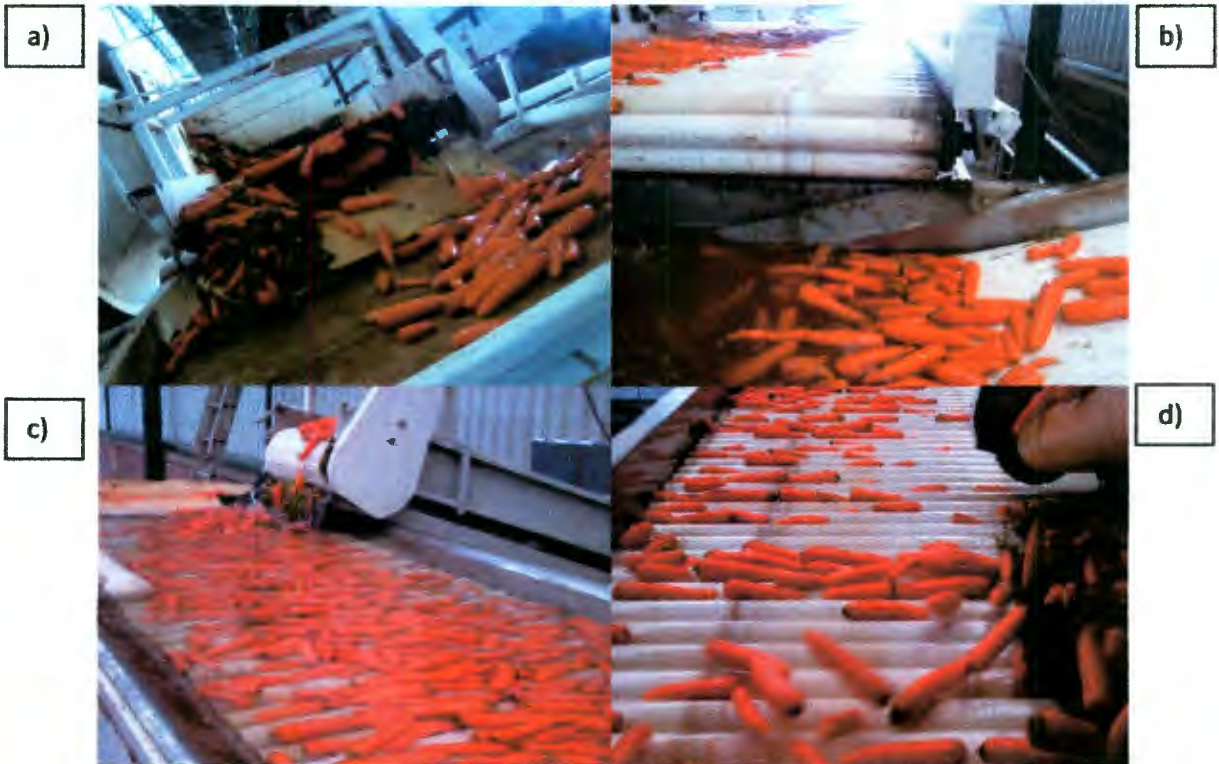


Figura 9. Residuos de raíces y materia orgánica en rodillos y bandas transportadoras de zanahoria en la zona: a) Lavado, b) Desinfección, c) Enfriamiento, d) Selección por tamaño.

La vestimenta del personal no se ajusta a los reglamentos establecidos utilizan camisetas y pantalones informales, aunque aparentemente limpios (Figura 10)



Figura 10. Vestimenta inadecuada, falta de guantes, cubre bocas y bata.

VI.2 Distribución de BMA en zanahorias y superficies en diferentes puntos en el proceso de empacado.

VI.2.1 Zanahorias

Para este estudio, se determinó la presencia de BMA como bacterias indicadoras, en 60 muestras de zanahorias, que fueron obtenidas de diferentes áreas del sistema de empacado.

La media aritmética, tiene un escaso significado debido a casos extremos que llegan a presentarse, desplazando considerablemente el valor central de las series de valores. Por otro lado, la mediana es una medida de posición central de un conjunto de datos ordenados de menor a mayor que permite apreciar mejor las tendencias.

En la Figura 10 se muestra las medianas de BMA en zanahorias según las etapas de proceso. El estudio de BMA nos va permitir evaluar la eficiencia de los tratamientos aplicados, revelando los defectos que lleva consigo un peligro potencial. El peligro no está necesariamente presente en la muestra examinada, pero es probable que pueda encontrarse en muestras paralelas. Este grupo además permite valorar cambios en la carga microbiana del producto, en el transcurso del proceso para el acondicionamiento de la zanahoria.

La zanahoria durante el arrastre muestra cifras de 7.9 log UFC/U (Figura 11). En la planta empacadora solamente se aplican a la zanahoria dos tratamientos para disminuir la carga microbiana: lavado y desinfección; su efecto es mínimo sobre BMA.

Después de lavar la zanahoria, la carga microbiana se reduce de 7.9 a 7.0 log UFC/U y al desinfectar de 7.0 a 5.8 UFC/U de BMA.

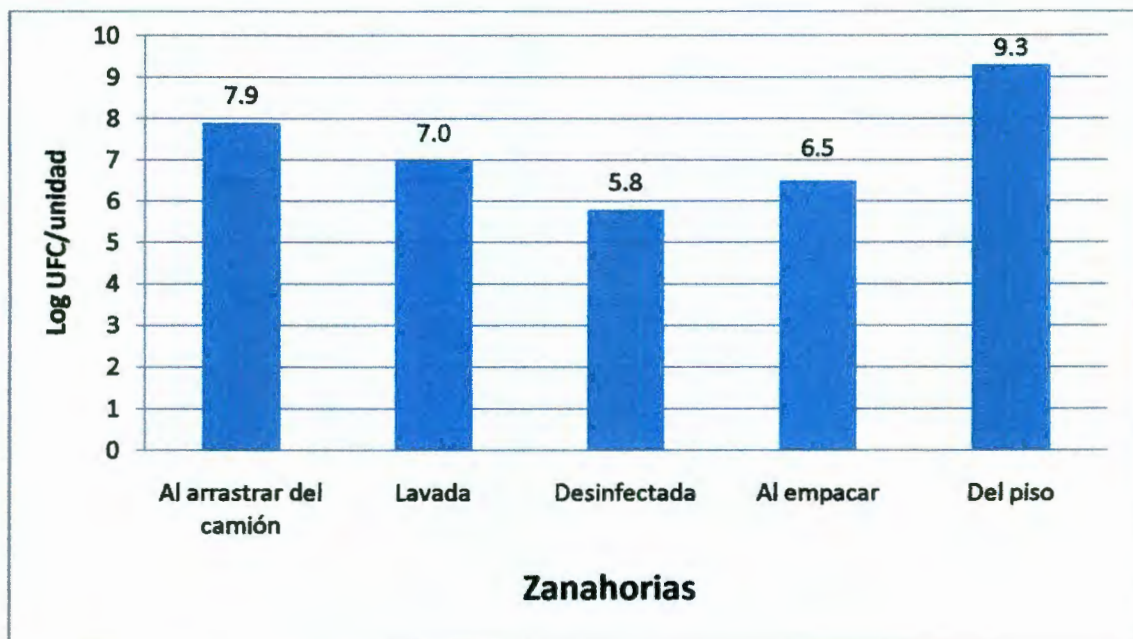


Figura 11. Medianas de BMA en puntos del proceso para el acondicionamiento de la zanahoria.

VI.2.2. Superficies de equipo

Todas las muestras presentaron niveles de carga microbiana arriba de los límites permitidos por la legislación sanitaria de México (NOM-093-SSA1-1994). Para superficies inertes la cuenta total de BMA debe ser $< 2.6 \log \text{ UFC/cm}^2$ en superficies. En este estudio el mínimo de BMA fue de $5.4 \log \text{ UFC/cm}^2$ para las bandas transportadoras (Figura 12).

Es de llamar la atención los residuos del hidrogenfriador y los rodillos del seleccionador de tamaño albergan una mayor cantidad de gérmenes (7.7 y 6.6 UFC/100 cm^2).

El contenido de BMA en los guantes y manos de los trabajadores en la etapa de empaque son de 5.7 y $6.0 \log \text{ UFC/100 cm}^2$, presentando valores superiores a los establecidos por la legislación sanitaria en México (NOM-093-SSA1-1994). La norma establece que la cuenta total de BMA para superficies vivas debe de ser $< 3.5 \log \text{ UFC/cm}^2$.

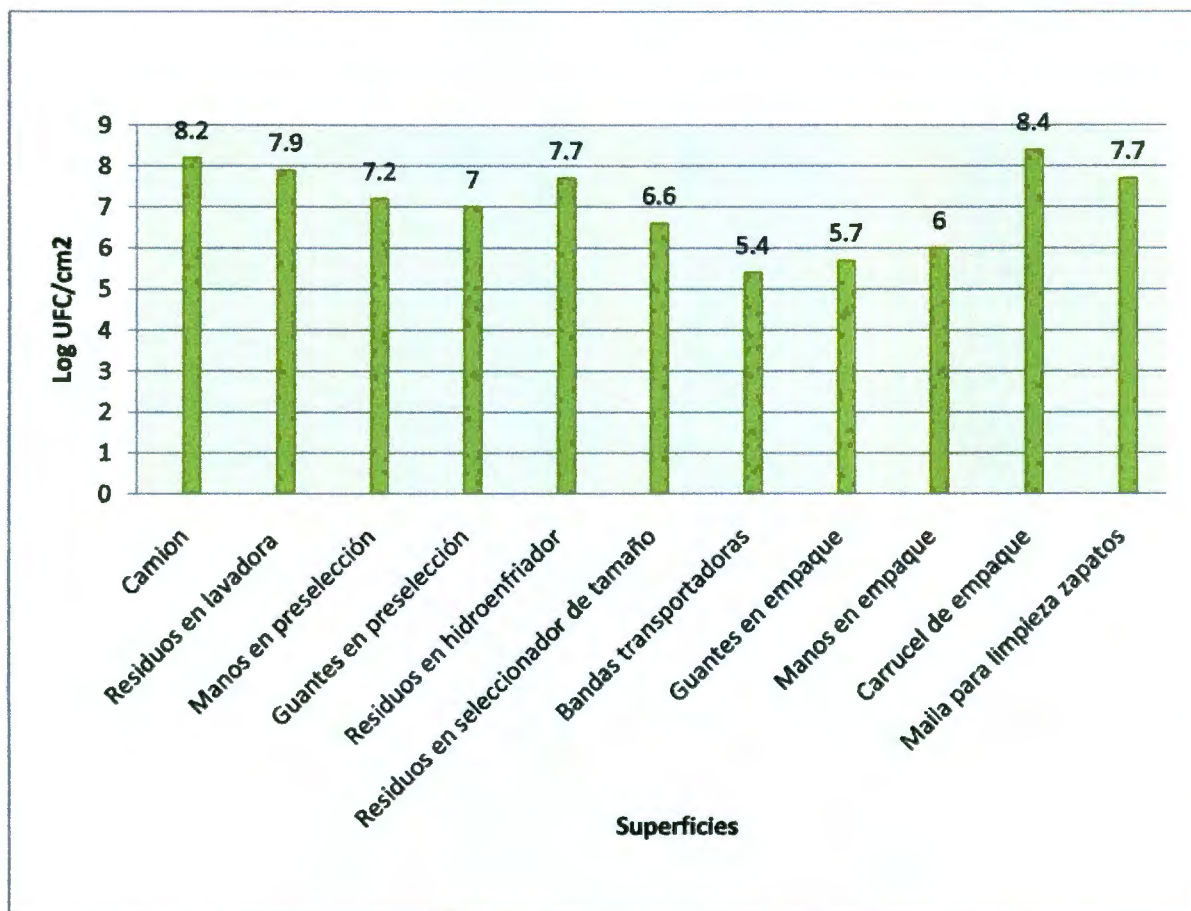


Figura 12. Medianas de BMA en las superficies a lo largo del proceso de producción.

En una empacadora de hortalizas, se puede utilizar el recuento de BMA para evaluar el nivel sanitario a lo largo del proceso. Para este fin, se tomaron muestras del producto antes y después de aquellas operaciones o tratamiento que puedan añadir o eliminar microorganismos. Los resultados pueden mostrar que una o dos operaciones determinadas, son principalmente responsables de la contaminación al producto.

VI.3 Incidencia de *E. coli* en zanahoria

Un total de 60 muestras de zanahoria cruda fueron analizadas para *E. coli*. Las muestras se obtuvieron de diferentes áreas de proceso del producto descrito en la metodología.

La zanahoria, es un producto que únicamente pasa por un proceso de desinfección (Ac. tricloroisocianurico 200ppm). Posterior a este paso no existe una etapa que pueda reducir o eliminar la presencia de *E. coli* u otros microorganismos en el producto terminado. Por tal razón es importante prevenir las posibles contaminaciones cruzadas posteriores a la desinfección.

Algunas zanahorias después de la desinfección presentan cargas elevadas a *E. coli* en comparación a las demás (Cuadro 6). Posterior al enfriamiento de la zanahoria se observa un incremento en la incidencia de *E. coli* al empacar y en almacenamiento. La incidencia global de *E. coli* en zanahoria fue de 67 %.

Cuadro 6. NMP de *E. coli* en 60 muestras de zanahorias, cultivo y empaque

Zanahorias	<i>E. coli</i>	
	+/n (%)	NMP
Arrastre	8/9 (89)	18.4 ¹ (<1.4-1225) ²
Lavada	8/9 (89)	3.9 (<1.4-77.5)
Desinfección	6/9 (67)	1.4 (<1.4-77.5)
Enfriada	2/9 (22)	<1.4 (<1.4-1.4)
Al empacar	6/9 (67)	1.4 (<1.4-77.5)
Almacenado	5/9 (56)	1.4 (<1.4-77.5)
Piso	5/6 (83)	3.9 (<1.4-4.2)
Total	40/60(67)	

¹ Mediana/ Unidad

² Límites (mínimo - máximo)

VI.4 Incidencia de *E. coli* en superficies

La mayoría de las superficies presenta *E. coli* aunque en números bajos (Cuadro 7). La incidencia elevada de *E. coli* nos sugiere una posible contaminación cruzada de las superficies del equipo hacia la superficie de la zanahoria.

Cuadro 7. NMP de *E. coli* en superficies de la empacadora.

Etapa	Superficies	<i>E. coli</i>	
		+/n (%)	NMP
Lavado	Residuos en lavadora	7/8(87)	<4.1 ¹ (4.1-15) ²
Selección preliminar	Manos/Guantes en preselección	3/6(50)	<4.1 (<4.1-4.1)
	Residuos de rodillos en preselección	3/4(75)	4.1 (<4.1-4.1)
	Banda superior en preselección	1/1(100)	15
Selección por tamaño	Residuos en seleccionador de tamaño	2/7(29)	<4.1 (<4.1-31.1)
	Alfombra en el seleccionador de tamaño	2/3(67)	4.1 (<4.1-4.1)
Selección manual	Bandas selección de producto	8/18(44)	<4.1 (<4.1-15)
	Canjilones	5/5(100)	31.1 (4.1-131.1)
	Alcantarillado junto a banda de empaque	1/2(50)	9.6 (<4.1-15)
Empaque	Manos/Guantes empacando	3/13(23)	<4.1 (<4.1-15)
	Volante	8/18(44)	<4.1 (<4.1-131)
	Residuos en volante	3/9(33)	<4.1 (<4.1-31.1)
	Cojinetes en empaque	3/4(75)	4.1(<4.1-15)
	Tarima	2/4(50)	<4.1(<4.1-15)
Otras superficies	Suelas zapato	3/9(33)	<4.1 (<4.1-4.1)
	Malla para limpieza de suelas	3/6(50)	4.1 (<4.1-131.1)
	Orificio en pared	2/2(100)	15 (15-31.1)
	Heces fecales junto a orificio	1/1(100)	520.6
	Manija servidor de papel seca manos	1/1(100)	4.1
	Tapete fuera de la empacadora	1/1(100)	31.1

¹ Mediana/ Unidad

² Limites (mínimo - máximo)

Para los canjilones la mediana fue de 31.1 NMP con positividad del 100% en 5 muestras para *E. coli*. Estas cifras se asocian con malas prácticas sanitarias por parte de los trabajadores.

La presencia de zanahoria en el piso era común. Los trabajadores las levantaban del piso y las colocaban dentro de los canjilones posterior a este paso se colocan la zanahorias en arpillas y se dirigen al mercado nacional.

Es de llamar la atención, la presencia de *E. coli* en la manija del servidor de papel seca manos, de manera que el lavado de manos resulta ineficiente porque al final de esta actividad existe una contaminación de del servidor a la mano del trabajador.

Una vez concluida la jornada de empacado los trabajadores realizan limpieza general de la planta. Para remover los residuos del equipo así como zanahorias que se estancaron, el personal sube sobre las bandas y rodillos del seleccionador de tamaño. Al bajarse algunos lo hacen deslizándose.

VI.5 Estudios preliminares de *L. monocytogenes*

VI.5.1 Especificidad de PCR en cultivo puro

Para evaluar la especificidad de los iniciadores de *L. monocytogenes* por la técnica PCR, se emplearon cultivos puros de *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seelegeri*, *L. welshimeri* y otras 11 especies de cepas y géneros distintos a *Listeria*, algunas Gram (+) y otras Gram (-) (Figura 13).

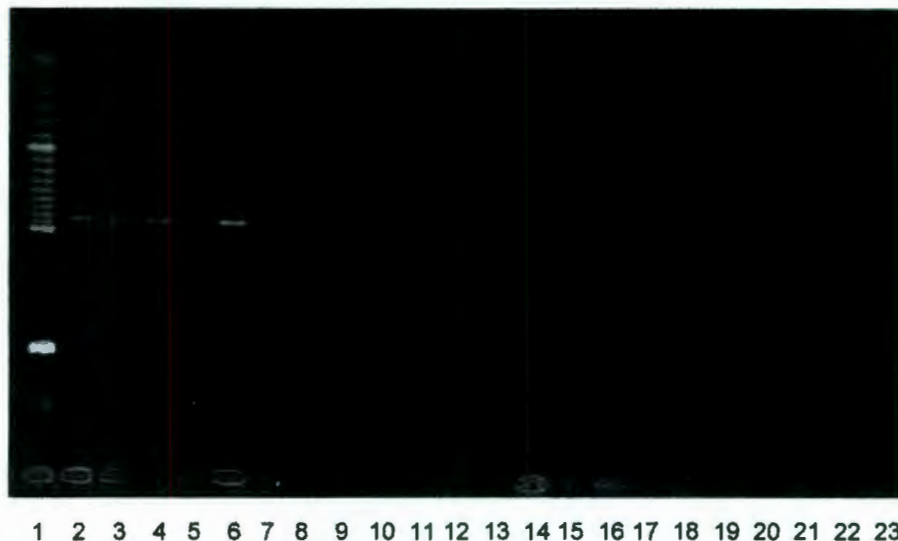


Figura 13. Especificidad de los iniciadores por técnica de PCR para *L. monocytogenes*.

Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TAE 1X. Teñido con 1 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio. Especificidad de la técnica de PCR. ADN de los microorganismos empleados en el estudio : Pozo 1: Marcador de peso molecular 50 b. pozo 2: *L. monocytogenes* Scott A, pozo 3: *L. monocytogenes* 101 M, pozo 4: *L. monocytogenes* 101 14, pozo 5: *L. monocytogenes* LCDC, pozo 6: *L. monocytogenes* V7 , pozo 7: *L. ivanovii*, pozo 8: *L. innocua*, pozo 9: *L. seeligeri*, pozo 10: *L. welshimeri*, pozo 11: *Rodococcus equi*, pozo 12: *Lb. Casei*, pozo 13: *Lb. ramnosus*, pozo 14: *Bacillus. cereus*, pozo 15 *Staphylococcus aureus*, pozo 16: *Staphylococcus epidermis*, pozo 17: *S. xylosus*, pozo 18: *Escherichia coli*, pozo 19, *Klebsiella pneumoniae*, pozo 20: *Salmonella typhimurium*, pozo 21: *Serratia marscensens*, pozo 22: Control negativo.

Los resultados evidenciaron la alta especificidad de los iniciadores probados en la técnica de PCR debido a que las cepas de ensayo de *Listeria monocytogenes* Scott A, 101 M, 101 14, LCDC y V7 (Figura 13 carril 2 al 6) mostraron bandas específicas para género y especie. Las cepas de *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seelegeri*, *L. welshimeri* no amplificaron, revelando la especificidad de la técnica para detectar los positivos reales únicamente para *L. monocytogenes*.

Por su parte, las cepas control de *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Rodococcus*, *Lb. casei*, *Lb. ramnosus*, *Staphylococcus. epidermis*, *S. xylosus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* y *Serratia marscensens*, no amplificaron; en consecuencia no aparecen bandas. Demostrando así la especificidad de la técnica para detectar negativos que verdaderamente son negativos así como detectar los positivos que realmente son positivos a la presencia de *L. monocytogenes*.

VI.5.2 Efecto del nivel de inóculo en la recuperación de *L. monocytogenes* por la técnica de la USDA Y FDA.

De acuerdo a la técnica descrita en la metodología se evaluó la sensibilidad de dos técnicas para la recuperación de *L. monocytogenes* (FDA y USDA) en zanahoria y muestras de superficie. Los inóculos probados fueron 100, 50, 5, 1 y 0 UFC / 3 zanahorias con 3 repeticiones cada inóculo.

Existen estudios acerca del efecto inhibitor de algunos compuestos de la zanahoria hacia el género *Listeria* (López y col., 2005). En consecuencia, se planteó el siguiente razonamiento: si se incubaba la zanahoria como tal, esta podría desprender compuestos en el caldo de pre-enriquecimiento que pudieran inhibir al microorganismo. La técnica de la FDA se recomienda para leche, productos lácteos y muestras ambientales. La técnica de la USDA se recomienda para la carne roja y carne de ave (cruda o lista para consumo) huevos y algunos vegetales.

Los resultados muestran una mayor sensibilidad por la técnica USDA (Cuadro 8). La técnica de la FDA a partir de 50 y 5 UFC sin retirar la muestra durante la incubación, alcanza 67% de recuperación. En contraste, la técnica de la USDA alcanza valores de hasta 100%, esto es, una mayor capacidad de recuperación del patógeno.

Durante la recuperación a partir de 1 UFC para muestras sin retirar del caldo de pre-enriquecimiento se encontraron valores de 67% para la técnica de la USDA; si se retira la zanahoria de la bolsa se obtiene un 33% de recuperación. La técnica de la FDA (también para un inóculo de 1UFC) condujo a la recuperación de 33% sin retirar la muestra del medio y nula recuperación al retirarse la muestra del medio.

Los resultados sugieren que a las 48 hr la muestra sumergida en el caldo de pre-enriquecimiento no desprende sustancias tóxicas para el microorganismo, que pudiera afectar su recuperación.

Cuadro 8. Recuperación de *Listeria* spp por la técnica USDA y FDA

Inóculo UFC (Coef. Var.)	<i>Listeria</i> + / n (%)			
	USDA		FDA	
	Sin retirar	Retirando	Sin retirar	Retirando
100 (9.4)	3 / 3 (100)	3 / 3 (100)	3 / 3 (100)	3 / 3 (100)
50 (8.1)	3 / 3 (100)	3 / 3 (100)	2 / 3 (67)	2 / 3 (67)
5 (53.9)	3 / 3 (100)	2 / 3 (67)	2 / 3 (67)	1 / 3 (33)
1 (34.6)	2 / 3 (67)	1 / 3 (33)	1 / 3 (33)	0 / 3 (0)
0	1 / 3 (33)	0 / 3 (0)	0 / 3 (0)	0 / 3 (0)

VI.5.3 Validación de la técnica de PCR para la detección de *Listeria monocytogenes* en zanahorias y torundas por la técnica de la USDA Y FDA.

Se verificó que los inóculos probados en la evaluación de las técnicas de cultivo (100, 50, 5, 1 y 0 UFC) permiten una amplificación aceptable mediante la PCR (Figura 14). Para las torundas, el PCR amplificó en el caldo LEB con inóculos de 100 y 50 UFC (carril 2 y 3) mientras que en el medio UVM se consiguió una amplificación hasta niveles de 5, 1 UFC (carriles 9 a 12) (Figura 14). Con las zanahorias la amplificación por PCR en el medio LEB resultó evidente con un inóculo de 100 UFC (carril 16) en tanto que en el medio UVM la reacción varía con inóculos 100, 50, 5 UFC (carriles 23 al 25).



28 27 26 25 24 23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1
Figura 14. Sensibilidad de la técnica PCR para dos tipos de caldos.

Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TAE 1X. Teñido con 1 µg/ml de bromuro de etidio. Sensibilidad de la Técnica de PCR. Pozo 1:Vacio, pozo 2: Torunda (T). LEB 100, pozo 3: T. LEB 50, pozo 4: T. LEB 5, pozo 5: T. LEB 1, pozo 6: T. LEB 0, pozo 7 : Vacio, pozo 8: Vacio, pozo 9: T. UVM 100, pozo 10: T. UVM 50, pozo 11: T. UVM 5, pozo 12: T. UVM 1, pozo 13: T. UVM 0, pozo 14: Vacio, pozo 15: Vacio, pozo 16: Zan LEB 100, pozo 17: Zan LEB 50, pozo 18: Zan LEB 5, pozo 19: Zan LEB 1, pozo 20: Zan LEB 0, pozo 21: Vacio, pozo 22: Vacio, pozo 23: Zan UVM 100, pozo 24: Zan UVM 50, pozo 25: Zan UVM 5, pozo 26: Zan UVM 1, pozo 27: Zan UVM 0, pozo 28: Marcador de peso molecular 50 b

VI.6 Incidencia de *L. monocytogenes* durante el empaque de zanahoria

En la empresa donde se investigó la incidencia de *L. monocytogenes*, se realizaron seis muestreos longitudinales. Las muestras de estudio se obtuvieron durante la temporada de producción (diciembre 2008 – Febrero 2009). En total se analizaron 282 muestras incluyendo zanahoria cruda, producto intermedio, almacenado así como muestras de superficies de equipo. (Cuadro 9).

Cuadro 9. Número de muestras analizadas para *L. monocytogenes* en las diferentes áreas de proceso de empackado en zanahoria

Área de producción	Muestras analizadas*	
	Zanahoria	Superficie
Acceso a la empacadora	---	6
Al descargar el camión	18	---
Tolva de lavado	---	15
Banda de preselección	---	17
Zona de desinfección	18	1
Zona de enfriamiento de producto	12	---
Rodillos de Sizer	---	32
Rodillos de Hidrocooler	---	14
Bandas de empaque	18	28
Zona de empacamiento	---	30
Cajas de empaque	---	15
Camara de frío	18	40
Total	84	198

* Numero de muestras analizadas en 6 muestreos longitudinales

--- No se analizaron muestras

La incidencia global del patógeno es de 24% (Cuadro 10). Específicamente en las zanahorias es de 4.6%, en superficies del área de proceso de la empacadora 19.5%.

Cuadro 10. Positividad a *L. monocytogenes* en muestra de zanahoria, superficies y residuos en 6 estudios.

Muestreo	Muestras colectadas	Muestras Positivas + / n		
		Zanahoria	Superficies	Total
1	52	0/12	8 /40	8(15.4%)
2	53	1 /12	10 /41	11(20.8%)
3	15	3 /15	0/0	3(20%)
4	54	4/15	9/38	13(24%)
5	55	3 /15	12 /41	15(27.3%)
6	53	2 /15	16/38	18(34%)
Total	282	13/282(4.6%)	55/282(19.5%)	68/282(24%)

La positividad promedio durante los seis muestreos es de 24%. Valor alto para una empresa empaadora cuyo propósito es la exportación. La positividad nos sigue la presencia de *L. monocytogenes* dentro de la planta. La incidencia de *L. monocytogenes* muestra una tendencia al incremento del primero al sexto estudio longitudinal (Figura 15).

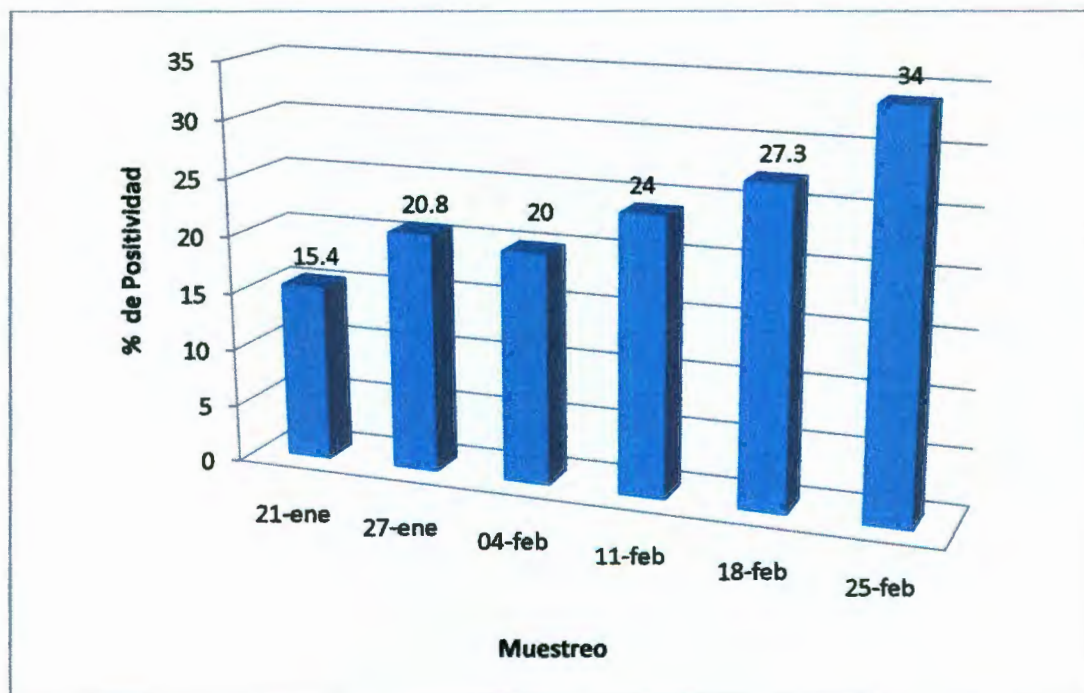


Figura 15. Positividad a *L. monocytogenes* por muestreo longitudinal.

La Figura 16 muestra una positividad variable de *L. monocytogenes*. Por ejemplo, para zanahorias encontramos un rango de 0 a 20% mientras que para superficies asociadas a su empaque el rango es de 15.3 a 30% de positividad para todos los muestreos.

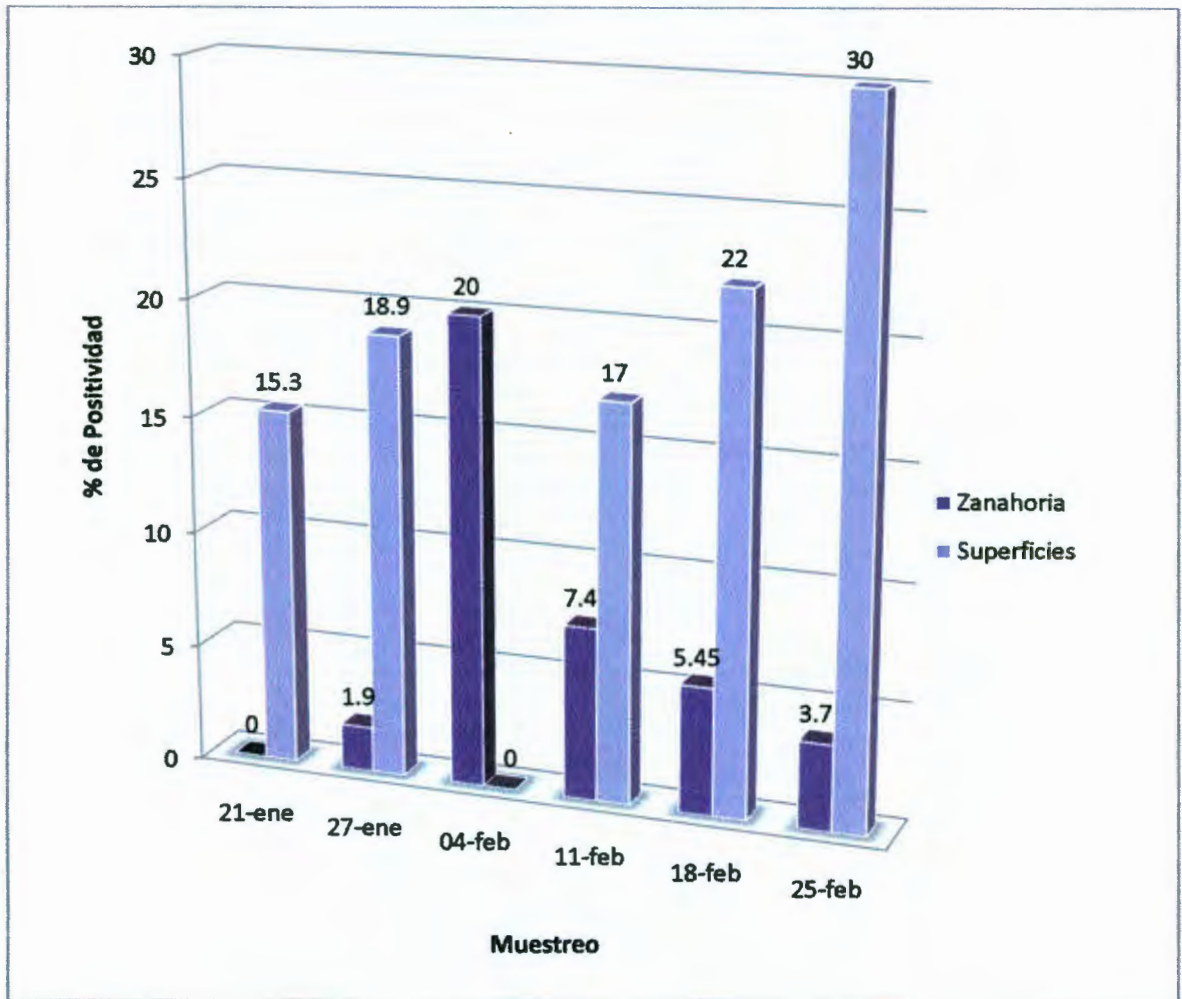


Figura 16. Positividad a *L. monocytogenes* en muestras de zanahoria cruda, y superficies según muestreo.

L. monocytogenes se detecto en 17 % de producto antes del acondicionamiento (Figura 17). La desinfección disminuye al máximo la incidencia del patógeno, sin embargo, este vuelve a detectarse en 1 de cada cuatro zanahorias ya empacadas y

refrigeradas lo que sugiere existen fuentes de contaminación dentro de la empacadora.

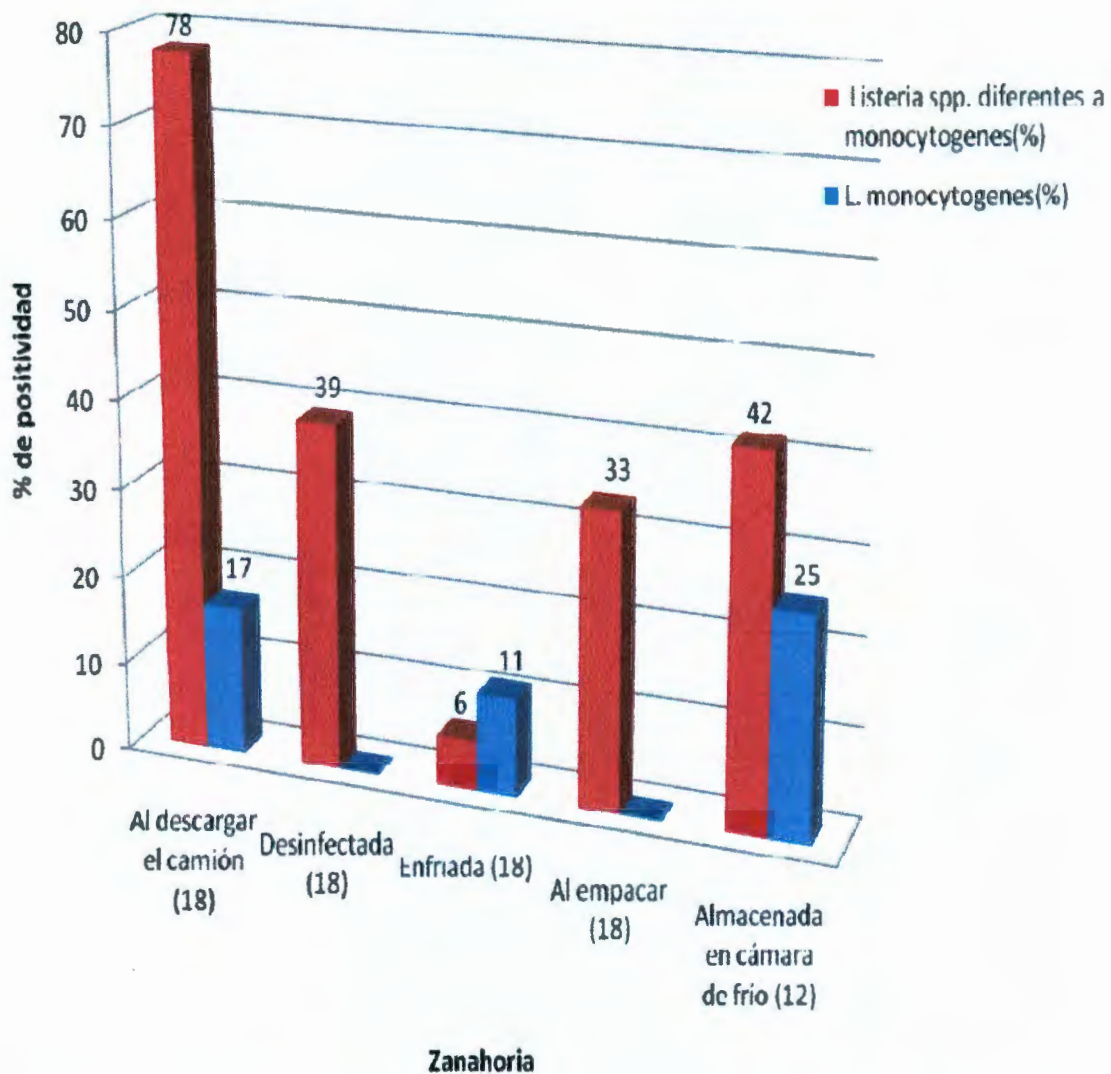


Figura 17. Positividad a *Listeria* spp diferente de *L. monocytogenes*, y *L. monocytogenes* en zanahorias.

Las muestras ambientales que presentan alta positividad corresponden a la manija de la entrada de cámara de frío (80%), sus paredes(40%) así como la puerta de entrada de la empacadora (60%) (Figura 18).

Entre las superficies que se destacan por presentar una alta positividad a *L. monocytogenes* se encuentran los rodillos del hidrogenfriador (47%), rodillos del seleccionador de tamaño (43%), bandas de empaque (27%)

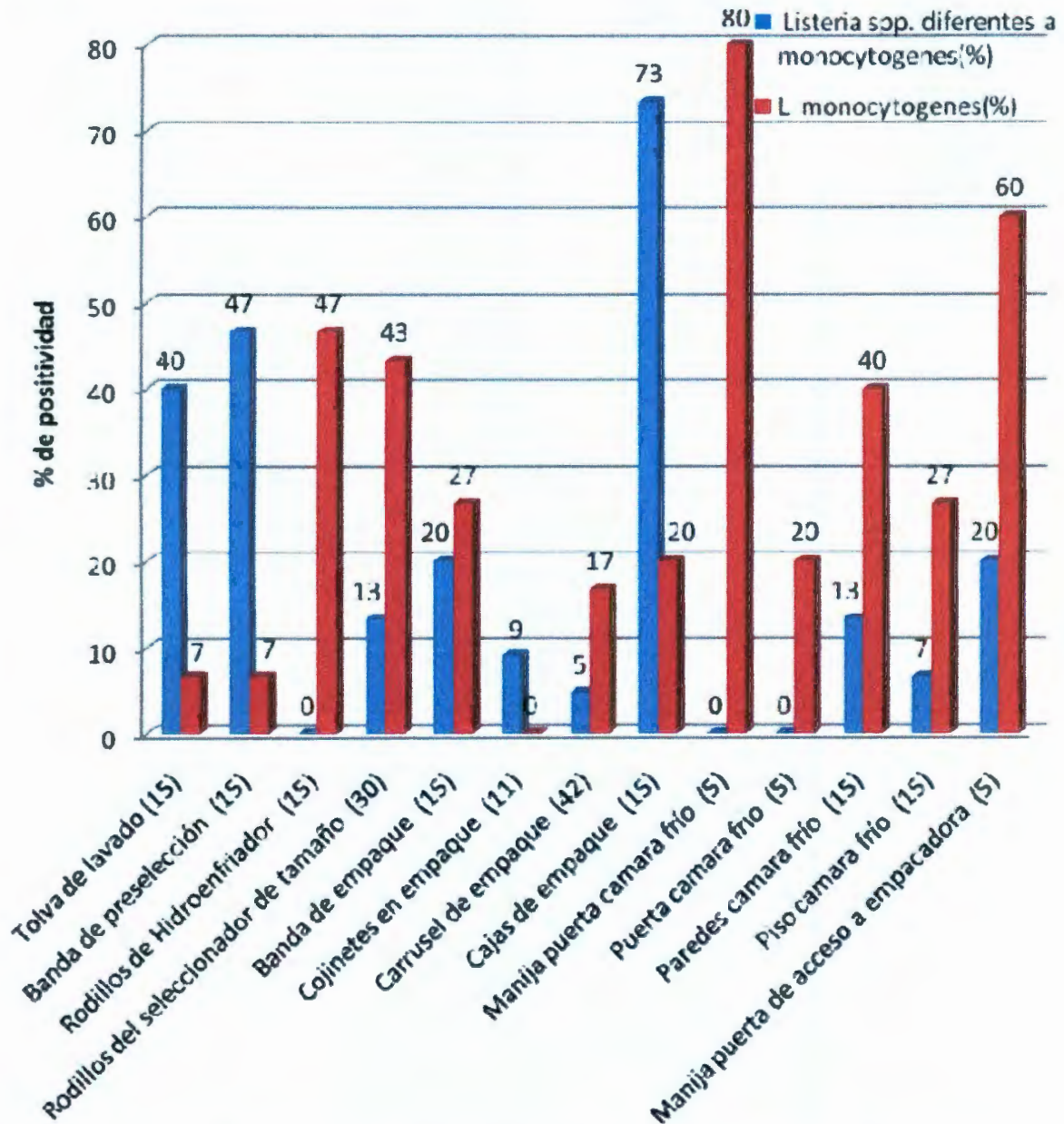


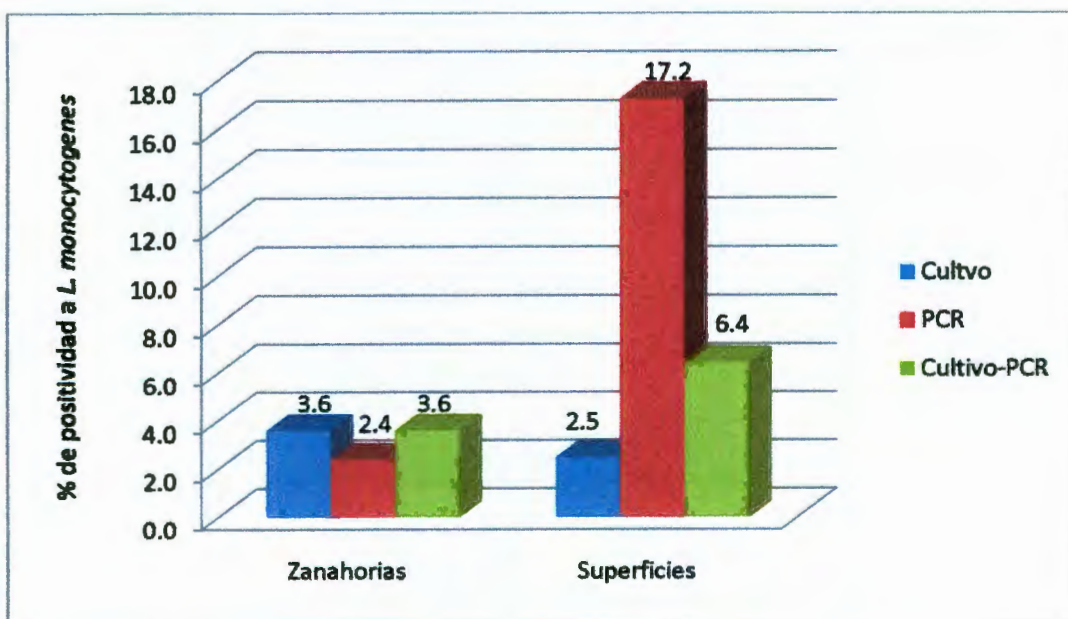
Figura 18. Positividad a *Listeria* spp diferente de *L. monocytogenes*, y *L. monocytogenes* en superficies.

Concluida la etapa de selección, el producto va dirigido a la zona de empaque. Es recibido en un "volante" que consiste en un carrusel, cuya función facilita la distribución de zanahoria en su bolsa de empaque.

La superficie del volante es una alfombra de textura rugosa y la mayor parte del tiempo se encuentra húmeda. El material empleado no es adecuado para el procesamiento de vegetales debido a su estructura dando lugar a ineficiente limpieza y desinfección. No se recomienda este material porque se constituye en un reservorio de microorganismos. El riesgo está en función de la contaminación de la zanahoria por encontrarse expuestas a la superficie del carrusel.

VI.7 Capacidad de la PCR y la técnica tradicional para identificar cepas *L. monocytogenes* a partir de zanahorias y superficies

Los resultados muestran en la identificación de *L. monocytogenes* en zanahoria no se nota una diferencia marcada entre la técnica PCR y cultivo tradicional, en contraste la detección del patógeno en superficies asociadas al empaque se encontró una mayor sensibilidad y especificidad con la técnica de PCR (17.2%) que por cultivo tradicional (2.5%) (Figura 17).



VII DISCUSIÓN

VII.1 Estudio observacional

La clave del éxito en las frutas y hortalizas, es un enfoque de mercado, que se vendan frescos o procesados. La calidad del producto, presentación y consistencia, son parte de los requisitos de cualquier comprador. Los sistemas de producción son responsables de la calidad del producto. Los sistemas de manejo poscosecha permiten mantener la calidad. Las empacadoras y su sistema de operación se deben diseñar y equipar para preparar el producto con las especificaciones y presentaciones solicitadas por los compradores.

Así mismo, las empacadoras y el equipo deben cumplir los requisitos de sanidad, medio ambiente e inocuidad alimentaria, los cuales varían según el mercado y el comprador. En casi todos los casos, un manejo pos-cosecha y un diseño de empacadora deficientes tendrán como consecuencia pérdidas financieras:

- Un manejo poscosecha inadecuado puede ocasionar una pérdida del producto del 100%.
- Una mala selección y presentación puede ocasionar rechazo por parte de los compradores.
- Tratamientos de poscosecha inadecuados pueden reducir drásticamente la vida de anaquel del producto, con pérdidas para los compradores y pérdidas posteriores para el vendedor.
- La falta de equipo, o la existencia de un equipo inapropiado ocasiona problemas de reducción de la productividad y ocasionará deterioro y aumento en los costos de manejo poscosecha (FINTRAC CDA, 2003).

El objetivo del estudio observacional es detectar los riesgos biológicos, químicos y físicos, que puedan poner en peligro la inocuidad del producto.

VII.1.2 Descripción de condiciones de empaque

Uno de los aspectos principales que se deben tener en cuenta en el procesamiento de alimentos, es que las condiciones ambientales en las cuales se realiza sean adecuadas. Muchas de tales condiciones ambientales son el reflejo del sentido común, pero algunas de ellas resultan de un análisis cuidadoso.

En términos generales la nave en donde se desarrollarán las actividades de empaque de la zanahoria debe tener condiciones que faciliten la limpieza y sanidad. Esto significa que serán preferibles los pisos de hormigón o de baldosas, las paredes pintadas con esmaltes lavables, y los techos rasos simples y fáciles de limpiar. Idealmente deben ser materiales livianos que no permitan la acumulación de elementos contaminantes como roedores, pájaros, o insectos. Siempre es mejor contar con condiciones de iluminación natural.

Un aspecto que se debe tener en cuenta es el de la ventilación. La empacadora idealmente debe ser bien ventilada, pero la calidad del aire de ventilación es un requisito a tener en cuenta. No es posible incorporar aire a la nave si este proviene de un ambiente contaminado por polvo, contaminantes gaseosos tóxicos, aire cargado de aromas extraños, etc. Por otra parte se debe tener presente que cada vez que entra aire a una habitación entrará con ese aire una cantidad importante de microorganismos que pueden ser, dependiendo del origen del aire, de muy variada naturaleza e impacto para el ser humano, desde los absolutamente banales hasta algunos de alta incidencia económica como ciertos hongos causantes de pudriciones.

Al entrar a la zona de proceso es imperativo el lavado de manos, seguido de la aplicación de gel que contiene alcohol desnaturalizado. El gel utilizado es un antiséptico de uso externo; germicida para manos, instantáneo con emolientes. El uso del gel no elimina la acción de lavado de manos; ayuda como auxiliar en la eliminación de microorganismos patógenos.

Adicionalmente existen carteles informativos que obligan al trabajador a lavarse las manos después de toser, estornudar, antes y después de ir al baño, al inicio y final de la jornada laboral.

Dentro de la empacadora, cada sección de la planta debe contar con infraestructura adecuada y sus elementos necesarios para un trabajo ordenado y eficiente. Los lugares donde se realizan las labores de producción, incluyen diversos procesos, desde la recepción, preselección de zanahoria, desinfección, enfriamiento, selección de tamaño hasta el almacenamiento de productos terminados. Además de las características nombradas, se debe considerar que los materiales especialmente de la zona limpia de las salas de proceso, deben ser fáciles de sanear. Debe evitarse la construcción que conduzca a la formación de focos de difícil acceso a la limpieza y que puedan constituirse en nidos de pájaros, focos de contaminación por roedores, insectos y, por supuesto, microorganismos.

Dentro de las condiciones de empaque es muy útil la existencia de un pequeño alero tipo galería, a la entrada del proceso donde se recibe el producto del campo. Este alero sirve para mantener la zanahoria protegida del sol y para eliminar la zanahoria que no se desea introducir a la sala de proceso por su volumen o por su naturaleza.

La sala principal donde se llevan a cabo los procesos no cuenta con una red de agua que permita disponer con el fluido en todo momento y en todos los puntos de la sala. Su construcción debe ser tal, que permita el saneamiento de los pisos. El agua de lavado y de proceso de la sala debe ser fácilmente eliminable por las vías normales de evacuación.

Es una condición importante que el agua de uso en el proceso sea potable, lo cual se puede conseguir de dos formas generales: mediante el uso de agua potable de la red pública o el uso de agua de pozo profundo potabilizada en la planta.

Es necesario que el personal que trabaja allí tenga las facilidades mínimas de espacio para realizar las labores en forma expedita y sobre todo segura. Existen varias operaciones que requieren de un cierto nivel de seguridad por la naturaleza misma del trabajo. Es importante que el personal cuente con las condiciones que le aseguren un trabajo de calidad, pues no se debe olvidar que lo que allí se procesa es un alimento para consumo humano.

Por otra parte, es importante tener en cuenta que ciertas operaciones por simples que se vean pueden causar serios daños a los operarios si no se manejan con el cuidado necesario. Un ejemplo se encontró en la planta procesadora, donde existen inadecuadas maniobras y movimientos con el uso de utensilios y equipo. Las herramientas empleadas se encuentran fuera de lugar indicado y muchas de las veces en contacto con el piso. Las herramientas deben someterse a un lavado e inspección periódico y mantenimiento adecuado.

En general la planta tiene una de las mayores capacidades de proceso en México. La capacidad instalada es de 90 ton al día. En promedio son 30 personas que realizan los trabajos de limpieza, selección de producto, empaclado y otros.

Dentro de la planta se observaron malas prácticas higiénicas de algunos de los trabajadores: no portaban la vestimenta adecuada para el desempeño de su labor (mandil, guantes, cubre bocas y zapatos adecuados). Los trabajadores deben vestir con ropa exclusiva para el desarrollo de sus actividades.

El uso de guantes los utiliza la mayoría de los trabajadores de selección de producto. Entre los empacladores solo el 30% usa guantes. En consecuencia es importante resaltar que el personal que manipula el producto puede ser una fuente de contaminación y convertirse en un vehículo dentro de la empacladora.

Los trabajadores deben seguir normas de higiene, entre las que destacan las siguientes:

- Lavarse cuidadosamente las manos y uñas antes de cualquier proceso.
- Para entrar a la zona de trabajo deben utilizar ropa adecuada, limpia y un delantal, de manera de aislar su ropa diaria de posible contacto con el producto.
- Utilizar cofia, o algún sistema que evita la caída de cabello sobre el producto en preparación.
- En lo posible se recomienda el uso de mascarillas, eliminando así cualquier contaminación por vía oral.
- Cada vez que entran o salen del trabajo, deben ponerse y sacarse el delantal y lavarse las manos cada vez que vuelvan de la sala de proceso.
- Mantener la zona de trabajo en condiciones de perfecta limpieza.
- Mantener sus uñas cortas y sin barniz, y evitar usar joyas durante su trabajo.

Con el estudio observacional no se puede saber en qué medida se están cumpliendo los beneficios de aplicar prácticas sanitarias. De esta forma tenemos que recurrir a la microbiología con el fin de valorar los beneficios de estas prácticas

VII.2 Distribución de BMA en zanahorias y superficies en diferentes puntos en el proceso de empaclado.

VII.2.1 Zanahorias

La presencia de microorganismos en los alimentos no significa necesariamente un peligro para el consumidor o una calidad deficiente de estos productos. La realidad es que muchos de los alimentos que consumimos a diario contienen levaduras inocuas, mohos y bacterias. La mayor parte de los alimentos se convierten potencialmente peligrosos para el consumidor sólo después de que han sido violados los principios de higiene, limpieza y desinfección. Una vez puestos de manifiesto los peligros, se realiza un estudio microbiológico para identificar los factores responsables o indicadores de una contaminación peligrosa.

Por esta razón se ha utilizado grupos de microorganismos, cuya enumeración o recuento se realiza con facilidad. La presencia de estos grupos en alimentos (en determinado número) indica que estuvieron expuestos a condiciones que pudieran introducir organismos peligrosos y/o permitir su multiplicación. Los grupos utilizados con estos fines se denominan microorganismos indicadores.

El contenido de BMA es afectado por factores de frecuencia incontrolables; por ejemplo la presencia de diminutas partículas de tierra o materia orgánica ajena a la planta en una cierta porción examinada, puede conducir a cifras extremas en los recuentos (Fernández, 2008). En el procesamiento de la zanahoria la etapa de arrastre se realizó con agua procedente del reservorio. De las características más importantes de este reservorio se pueden resaltar las violaciones a la malla, que permite el acceso a la fauna silvestre y doméstica. Se encuentra al aire libre y se ubica a 5 m de la carretera y expuesto a contaminación. Esta agua se utiliza para remover la zanahoria del camión a la etapa de lavado.

El proceso de desinfección reduce de 7.0 a 5.8 UFC/U de BMA (Figura11) esto es 1.2 UFC/U de BMA; lo que significa que el ácido tricloroisocianúrico a

200ppm usado como desinfectante reduce la carga bacteriana pero no lo suficiente; por lo tanto se requiere mayor tiempo de contacto.

Es de llamar la atención que la zanahoria que se cae al suelo presenta una carga de 9.3 log UFC/U (Figura 11), este resultado es indicador que en el suelo existe una mayor cantidad de gérmenes. Las herramientas o utensilios empleados muchas de las veces se encuentran en contacto con el suelo por tal motivo se debe de tener cuidado al manipular el las herramientas, evitando así contaminaciones hacia la zanahoria. Conforme el proceso evoluciona previo al empaque se aprecia un aumento en el contenido de BMA (Figura 12). El incremento podría asociarse con una recontaminación en las superficies del equipo, condiciones atmosféricas, etc. Adicionalmente los trabajadores tienen contacto con el producto antes de empacar.

Durante el desarrollo del trabajo, ocasionalmente se barre cerca de la zona de empaque, provocando levantamientos de polvo, lo que favorece el incremento de BMA a las superficies de equipo y producto previo al empaque.

VII.2.2 Superficies de equipo

La higiene de las superficies, equipos y utensilios, es uno de los pilares donde se asientan las buenas prácticas de manufactura. Los microorganismos patógenos pueden pasar de un alimento a otro por contacto directo o bien a través de quienes los manipulan, de las superficies de equipo o del aire (CAC/RCP, 1997).

Es importante subrayar el valor del lavado de manos con agua y jabón al iniciar la jornada de trabajo, después de ir al baño, al estornudar o toser así como usar guantes durante la etapa de empaque. El presente estudio mostró que el personal que labora dentro de la empresa no realiza frecuentemente el lavado de manos al cambiar de actividad y tener contacto con el producto. Adicionalmente, la acción de lavado de manos no se ejecuta de manera correcta. Tampoco se restringe el acceso del personal dentro del área de producción.

Tanto las superficies inertes, como las vivas, presentan una carga microbiana superior a la establecida por la norma mexicana (NOM-093-SSA1-1994) (Figura 12). Los altos valores obtenidos pueden asociarse con la contaminación del equipo a la zanahoria.

Los trabajadores creen en una ficticia seguridad, por el solo hecho de portar guantes. Se tiene la primicia que solamente lavando las manos o guantes al inicio de su jornada laboral es suficiente. Los resultados indican que es imperativo poner atención a la higiene del personal, especialmente en el lavado de manos o guantes, pues estos pueden convertirse en vehículos de transmisión de microorganismos al producto (Rosas, 2008). Este comportamiento debe ser satisfecho para cualquier empresa que elabora alimentos. En el área de empaçado ya no existe ninguna medida preventiva que pueda disminuir o eliminar la carga microbiana del producto.

Un factor limitante de esta empresa, es que carece de un laboratorio para realizar los análisis microbiológicos. Llevar a cabo los análisis en laboratorios externos encarece los costos de los mismos lo que limita el número de muestras por analizar y la frecuencia de muestreo.

Se han presentado problemas de higiene en los equipos de procesamiento, debido a que su diseño no facilita la limpieza. Existe el riesgo, que los microorganismos se quedan adheridos a las superficies y pueden sobrevivir (Aarnisalo, 2006).

Los resultados pueden mostrar que una o dos operaciones determinadas, son principalmente responsables de la contaminación al producto. La información permite dirigir esfuerzos a mejorar la limpieza y desinfección en las operaciones responsables, evitando la pérdida de tiempo, esfuerzo y dinero en otras fases u operaciones menos importantes.

La planta procesadora por su parte, puede utilizar recuentos de BMA para evaluar la eficiencia del lavado y desinfección a lo largo del proceso.

VII.3 Incidencia de *E. coli* en zanahoria

E. coli es un germen cuyo hábitat natural es el tracto entérico del hombre y de los animales (Fernández, 2000). La presencia de este microorganismo en un alimento indica generalmente una contaminación directa o indirecta de origen fecal. *E. coli* es el indicador clásico de la posible presencia de patógenos entéricos en el agua, en los moluscos, en los productos lácteos y en otros alimentos (Fernández, 2000).

Existe abundante bibliografía sobre los valores de *E. coli*, coliformes y de la familia completa de las *Enterobacteriaceae* como indicadores de contaminación de origen fecal. Una práctica común es utilizar las pruebas para coliformes, en los ensayos de “screening” o preliminares. Si de estas pruebas iniciales se deduce la posibilidad de contaminación fecal, los coliformes u otras *Enterobacteriaceae* se someten a posteriores estudios para determinar si entre ellos está presente *E. coli*.

En el Cuadro 6 en la etapa de desinfección se observan eventualmente cargas elevadas de *E. coli*. Este comportamiento puede deberse a diversos factores, existe la posibilidad que eventualmente algunas unidades tienen una carga inicial muy elevada y la etapa de desinfección no logra una reducción eficiente, o bien no todo el producto está en contacto con el germicida (ácido tricloroisocianúrico 200 ppm) el mismo tiempo lo que hace insuficiente este tratamiento (Hernández, 1999)

Una vez que la zanahoria evoluciona en el proceso posterior al enfriamiento existe un incremento en la incidencia de *E. coli* al empacar y en almacenamiento (Cuadro 6). Estos datos nos pueden sugerir que el incremento se debe a la posible contaminación cruzada del trabajador o superficies de equipo hacia el producto. La idea es fundamentada debido al posterior manejo y manipulación de la zanahoria por parte del personal, siendo una causa probable del aumento en su carga microbiana.

Dentro de la planta se observó la presencia de pájaros así como la presencia de sus respectivos nidos. Estos animales son bien conocidos como reservorios de diversos microorganismos de interés sanitario, entre ellos *Campylobacter* spp, *Salmonella*, *V. colerae*, *Listeria* spp y *E. coli* O157:H7 (Jones y col., 1978; Luechtfel y col., 1980; Lee y col., 1982; Fenlow, 1985; Quessy y Messier, 1992; Wallace y col., 1997).

El hallazgo de *E. coli* en las zanahorias no constituye una connotación directa de la presencia de un patógeno, sino que implica únicamente un cierto riesgo de estar presente. En otras palabras, la presencia de *E. coli* en los alimentos no guarda siempre una estrecha correlación con la presencia de salmonelas o de otros microorganismos patógenos.

En algunos alimentos como los mariscos, se ha encontrado una buena correlación de la presencia de *E. coli* con la de bacterias enteropatógenas (Fernández, 1982). Aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* no son patógenas, existen algunas que causan enfermedad como la *E. coli* O157:H7, cuya dosis mínima infectante es muy baja (10-100 células).

La norma mexicana (NOM-093-SSA1-1994) no considera a *E. coli* para evaluar la calidad higiénica o sanitaria de las hortalizas crudas. La presencia de *E. coli* en altos números sugiere contaminación fecal, ya que su hábitat natural primario es el tracto intestinal del hombre y animales de sangre caliente (Weagant, 2002).

Se deben mantener altos los estándares de limpieza e higiene durante el proceso, transporte y almacenamiento para este tipo de hortalizas. Ello es de suma importancia ya que estos son productos mínimamente procesados y que se consumen crudos sin tratamiento térmico alguno (Odumeru y col., 1997).

VII.4 Incidencia de *E. coli* en superficies.

En los alimentos naturales, en las superficies de los utensilios y equipo de las industrias de alimentos, varios tipos de *Enterobacteriaceae* persisten más que *E. coli*. Las especies de *Erwinia* y *Serratia*, se incluyen en los recuentos de *Enterobacteriaceae* y están asociadas con las hortalizas, porque son organismos comunes en el suelo y agua; sin embargo no indican contaminación fecal (Fernández 2000). De aquí que *E. coli* sea el único microorganismo indicador válido en el análisis de los alimentos vegetales frescos.

Eventualmente *E. coli* una vez presente en la maquinaria llega a establecerse y multiplicarse, actuando como reservorio. Este microorganismo ya no es de origen fecal. Sin embargo es un índice de un mal saneamiento del equipo. Altos valores del germen indican la posible presencia de *Salmonella*, patógeno que se ha visto relacionado en varios de los brotes de enfermedad causados por frutas y hortalizas.

La elevada incidencia de *E. coli* en las superficies se relaciona con una posible contaminación en las partes externas de las zanahoria. El recuento de *E. coli* en las superficies es bajo, sin embargo la presencia de este microorganismo indicador nos señala que existe una inadecuada limpieza y saneamiento del equipo.

La incidencia de *E. coli* en la malla de limpieza de suelas en zapatos es del 50% con una mediana de 4.1 y un máximo de 131 NMP. Es de llamar la atención el valor descrito, ya que es un tapete sanitario. La función primordial del tapete sanitario que contiene ac tricloroisocianurico es evitar que la contaminación exterior ingrese a la planta usando como vehículo la suela de los zapatos. Los resultados nos indican que el tapete sanitario no cumple con su función, esto nos puede sugerir que debe de existir un monitoreo frecuente y un cambio de este germicida para evitar una posible inactivación.

En la empresa se identificó una mala maniobra de parte del personal que labora en el área de empaque. Los trabajadores levantaban las zanahorias del piso y las colocaban dentro de los canjilones. Una vez llenas, eventualmente las introducían dentro de las arpillas con ayuda de los cojines de empaque y se colocaban en el área de producto terminado que va dirigido al mercado nacional.

El problema es lamentablemente porque la zanahoria dirigida al mercado nacional que evolucionó por todas las etapas del proceso (arrastre, desinfección, enfriamiento, etc) pero al final, durante el empaque se expone a contaminaciones. La zanahoria está en contacto con la superficie de los cojinetes que momentos antes había estado expuesta a la zanahoria procedente del piso. La acción elevará la carga bacteriana del producto terminado.

De acuerdo a su política y estándares, se realiza una limpieza y saneamiento de equipo al inicio y final de la jornada de trabajo. La realidad es diferente solo se realiza la limpieza de equipo, esto es la remoción de materia orgánica, zanahorias remanes del proceso. Esta acción de limpieza se realiza de manera inadecuada, el personal inconsciente se sube en las bandas transportadoras, así como en los rodillos del seleccionador de tamaño. Al termino de la limpieza el personal se desliza por los rodillos del seleccionador de tamaño. Adicionalmente, no se aplica un germicida de forma inmediata, promoviendo la contaminación.

La incidencia de *E. coli* demuestra la existencia de problemas por contaminación o sobrevivencia microbiana dentro de la planta empacadora. La solución de este tipo de problemas sanitarios en alimentos en general se fundamenta en la educación de los trabajadores, consumidores y del personal encargado del control sanitario de esta actividad.

Existe una pregunta que es importante plantear. ¿Un resultado negativo a la prueba de *E. coli* asegura la ausencia de patógenos entéricos? La respuesta depende de diversos factores tales como número y tamaño de muestras examinadas, sensibilidad del método utilizado, número de *E. coli* y de

microorganismos patógenos. En la literatura se encuentran diversos trabajos publicados sobre la relación entre la presencia de *E. coli* en alimentos y el riesgo de la existencia simultánea de *Salmonella* (Feng y col 1998). Sin embargo, se debe tener cuidado al emitir un juicio, debido a que existe la posibilidad de encontrar *Salmonella* y no *E. coli* como bacteria indicadora. Tal es el caso que reporta Ruiz (2007) en su trabajo de investigación, encontrando una prevalencia de 3% de *Salmonella* en jitomate y nula presencia de *E. coli*.

VII.5 Estudios preliminares de *L. monocytogenes*.

VII.5.1 Especificidad de PCR en cultivo puro.

La identificación de *L. monocytogenes* en zanahoria, de acuerdo a la técnica descrita en la metodología, requiere de pre-enriquecimiento. Tanto el microorganismo de interés como la flora asociada tienen oportunidad para desarrollarse. Si los iniciadores no son los adecuados podrían generarse amplificaciones inespecíficas y aparece más de una banda en la imagen de electroforesis.

Los iniciadores LM11, y LM2 utilizados en el ensayo de PCR permitieron la detección simultánea del género *Listeria* y de la especie *monocytogenes* (Figura 13). De esta manera se probó la especificidad de los iniciadores. Este hallazgo es importante ya que puede ocurrir casos donde se encuentre una asociación de *L. monocytogenes* con otras especies de listeria y con otros géneros bacterianos (Curiale 1994).

VII.5.2 Efecto del nivel de inoculo en la recuperación de *L. monocytogenes* por la técnica de la USDA Y FDA.

El proceso de pre-enriquecimiento es indispensable para la detección de diversos patógenos en los alimentos. El proceso permite restaurar el daño de bacterias que se encuentran lesionadas o estresadas facilitando así su desarrollo hasta niveles detectables a partir de números bajos. Los datos obtenidos nos sugieren que a las 48 hr la zanahoria sumergida en el caldo de pre-enriquecimiento no desprende sustancias tóxicas para el microorganismo que pudieran afectar su recuperación. La recuperación del microorganismo por la técnica de la USDA, es mayor que por la técnica de la FDA incubando la muestra en el caldo UVM (sin retirarlo) durante 48 hrs (Cuadro 8). Una posible explicación a la mayor recuperación de *L. monocytogenes* al preservar la zanahoria en el caldo de pre-enriquecimiento durante la incubación es debido a varios factores:

a) Al inocular las zanahorias con *L. monocytogenes*, la bacteria se adhiere a la superficie, una agitación de 1 min no logra un desprendimiento total de *L. monocytogenes* debido a la superficie de la hortaliza y al retirar la zanahoria del caldo de pre-enriquecimiento muy posiblemente estaremos retirando fracción del inóculo que se desea recuperar. No así para la zanahoria que se queda las 48 hrs en incubación.

b) Dadas las características de la zanahoria, esta proporciona al medio de pre-enriquecimiento componentes intrínsecos de la hortaliza, como lo son los carbohidratos, vitaminas, minerales, de manera que enriquecen el medio, promoviendo que *L. monocytogenes* se multiplique de mejor manera.

c) Es posible la que al preservar la zanahoria en el caldo de pre-enriquecimiento, esta expulse compuestos tóxicos para *L. monocytogenes*, pero estos compuestos se diluyen en el medio de pre-enriquecimiento provocando un menor efecto en la bacteria inoculada. Debido a que *L. monocytogenes* se encuentra en un medio de pre-enriquecimiento y temperatura óptima para su desarrollo por lo tanto el efecto de dichos compuestos nocivos al patógeno no afectan su desarrollo.

VII.5.3 Validación de la técnica de PCR para la detección de *Listeria monocytogenes* en zanahorias y torundas por la técnica de la USDA Y FDA.

Los inóculos probados (100, 50, 5, 1 y 0 UFC) para la evaluación de las dos técnicas permiten una amplificación aceptable mediante la PCR. En la comparación de técnicas FDA y USDA se optó por utilizar la técnica de la USDA por su mayor capacidad de recuperación de *L. monocytogenes* (Cuadro 8) y una mejor amplificación en la PCR con un inóculo menor (Figura 12). El estudio desarrollado nos va a ser de gran utilidad para evaluar la incidencia de *L. monocytogenes* en una planta empacadora de zanahoria.

VII.6 Incidencia de *L. monocytogenes* durante el empaque de zanahoria

En México muchas empresas procesadoras de alimentos, no tienen implementados sistemas para el control de *L. monocytogenes*. Las normas sanitarias normalmente no ponen mucho énfasis en este patógeno emergente y sólo piden su monitoreo en situaciones de crisis o afectaciones masivas de consumidores. Un insuficiente control epidemiológico y un seguimiento estricto de los mismos, impide disponer de estadísticas para tomar medidas de control y monitoreo efectivos.

El interés por ampliar el conocimiento sobre los riesgos de listeriosis asociados al consumo de alimentos, se traduce en la extensa información sobre la incidencia de *L. monocytogenes* en productos crudos como cocinados y procesados en industrias (Fernández 2000).

Las especies de *Listeria* están muy extendidas en el medio ambiente. Se han aislado del suelo, materia vegetal en putrefacción, aguas residuales, comida animal, pollo fresco y congelado, alimentos frescos y procesados, queso, leche no procesada, desechos de los mataderos, así como en el tracto digestivo de humanos y animales asintomáticos, *L. monocytogenes* se ha aislado de variadas especies de mamíferos, aves, peces, crustáceos e insectos (Fernández, 2000). No obstante su principal hábitat es el suelo y la materia vegetal en descomposición, en la cual sobrevive y crece como saprofito (Ryser y Marth, 1991).

Debido a su amplia distribución, este microorganismo tiene muchas oportunidades de contaminar los alimentos en distintas etapas del proceso de empaclado.

Una vez realizados los seis muestreos longitudinales se identificó *L. monocytogenes*, la incidencia global del patógeno es de 24% (Cuadro 10). Es una positividad alta del patógeno, este valor nos sigue la presencia e instalación de *L.*

monocytogenes dentro de la planta. La incidencia del patógeno en las zanahorias es de 4.6%, en superficies del área de proceso de la empacadora 19.5%.

Heisink y col. reportan que de mil muestras de verduras crudas examinadas 50 mostraron *L. monocytogenes*. Para papas eran positivas 21.2%, en rábanos 14.4%, en pepinos 2.2%, y en col 1.2% (Heisink y col., 1989). Estudios realizados por otros investigadores reportan cifras para *L. monocytogenes* de 11% en equipo y área de proceso de salmón ahumado (Rorvik y col., 1995) y 14% en el equipo utilizado para la elaboración de queso (Silva y col., 2003)

En Francia, una planta procesadora de carne *L. monocytogenes* fue aislado en 68% de muestras de materia prima (Salvat y col., 1995). En contraste, al muestrear equipo y medio ambiente de una planta procesadora de pescado en EE.UU, *L. monocytogenes* se encontró únicamente en 1.2% de las muestras (Hoffman y col., 2003).

En la Figura 13, se observa el incremento de la incidencia de *L. monocytogenes* conforme se realizaron los muestreos. De acuerdo con el National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF, 1991) asegura que respecto a *L. monocytogenes* el problema es mayor en las áreas de producción en donde existen temperaturas de: 10-15°C. Se propician condiciones ambientales que favorecen la sobrevivencia y desarrollo del patógeno con respecto a otros microorganismos asociados. *L. monocytogenes* es un microorganismo ambiental. De acuerdo a los registros para el clima en San José Iturbide en el estado de Guanajuato se presenta una temperatura media mensual de 12.5°C en Enero y de 16.4°C en Febrero (CCAUG 2009) de manera que este factor ambiental favorece la presencia de *L. monocytogenes* en la empacadora. .

Antes del acondicionamiento, al descargar la zanahoria del camión se encontró una incidencia de *L. monocytogenes* en un 17% (Figura 17). Una vez concluida la desinfección la presencia de *L. monocytogenes* en zanahoria se reduce considerablemente, mostrando un 0% de positividad. El desinfectante Acido

tricloroisocianurico a 200 ppm es un germicida en la eliminación de *L. monocytogenes*. Sin embargo con forme evoluciona la zanahoria durante el proceso se vuelve a detectar *L. monocytogenes* en etapas posteriores a la desinfección. Una vez trascurrido todas las etapas del proceso de producción la zanahoria es almacenada en las cámaras de refrigeración a 0°C. A temperaturas bajas *L. monocytogenes* compite favorablemente con la flora asociada, lo que le permite desarrollar hasta niveles elevados, debido a su carácter psicótrofo.

Una de cada cuatro zanahorias ya empacadas y refrigeradas presenta incidencia de *L. monocytogenes*. Es importante analizar este resultado, porque se encontró la presencia del patógeno en producto terminado, ósea, listo para su consumo. Este valor nos sugiere que existen fuentes de contaminación dentro de la empacadora.

Se ha encontrado una alta incidencia (25%) en muestras obtenidas dentro de la cámara de frío. En múltiples ocasiones la zanahoria no se somete a una correcta manipulación y se destina a un periodo de refrigeración. El riesgo potencial aumenta, dado el carácter psicótrofo que permite a *L. monocytogenes* desarrollar. Adicionalmente, existe una mayor probabilidad de contaminación a los productos ya procesados.

Debido al carácter ubicuo de la *L. monocytogenes*, las muestras pueden haber interactuado en múltiples factores provocando una contaminación, por el agua de riego, en la cosecha o por los trabajadores, por equipo o por el ambiente. La alta incidencia del patógeno en la muestras de producto terminado, implica un alto riesgo para la población sensible, es decir, personas cuya inmunidad se encuentra inmadura o deprimida. Este grupo incluye principalmente a: recién nacidos, ancianos, personas inmunocomprometidas y mujeres embarazadas

En la Figura 17 se observa que *Listeria* spp diferente a *L. monocytogenes*, es un indicador apropiado de la presencia de *L. monocytogenes* en producto. Las agencias gubernamentales de Australia, Nueva Zelanda y Estados Unidos, en lo

que concierne a la inocuidad de los alimentos no distinguen entre las especies de *Listeria*, pues la presencia de cualquier de ellas puede indicar potencial contaminación con *L. monocytogenes* (Esquivel, 2008).

En lo que respecta a las superficies de muestras ambientales (Figura 18), presentan una elevada positividad y corresponden a la manija de la entrada de cámara de frío (80%), sus paredes (40%) así como la puerta de entrada de la empacadora (60%). Las superficies analizadas no tienen contacto directo con las zanahorias y superficies de equipo, pero existe una alta probabilidad de contaminar debido a que las manos de los trabajadores pueden actuar como vehículo hacia el producto. Existe la posibilidad que no necesariamente lleve a cabo la contaminación dentro de la empacadora, pero el peligro está latente y puede actuar como fuente potencial de contaminación.

Las superficies juegan un papel muy importante en la contaminación de *L. monocytogenes* en zanahorias. El patógeno puede permanecer adherido a la superficie del equipo el tiempo suficiente para desarrollarse y eventualmente se desprenda y contamine el producto.

Entre las superficies que se destacan por presentar una alta positividad a *L. monocytogenes* se encuentran los rodillos del hidrogenador (47%), rodillos del seleccionador de tamaño (60%), partes ocultas del seleccionador de tamaño (27%), alfombra de volantes (28%). Los resultados nos sugieren que *L. monocytogenes* se encuentra establecida e instalada dentro del área de producción posterior al proceso de desinfección donde ya no existe alguna etapa de eliminación del patógeno.

La maquinaria de trabajo (rodillos, bandas) junto con el equipo de producción se lavan y desinfectan una vez terminada la jornada laboral. En la práctica no sucede así, las bandas retienen residuos orgánicos como raíces o materia orgánica. Debido a la falta de limpieza los residuos no son eliminados y participan en la contaminación.

Es importante precisar que aunque el estudio abarcó seis muestreos longitudinales, se tomaron pocas muestras para puntos específicos durante el proceso, los resultados dan una idea del nivel de higiene, así como la incidencia de *L. monocytogenes* en cada uno de los puntos muestreados, además sugieren la posibilidad de la presencia del patógeno que se encontró en cada punto de muestreo se mantenga en otros sitios al interior de la planta empacadora.

Los datos arrojados por *L. monocytogenes* en la planta empacadora manifiesta la relación existente entre la complejidad y un diseño ineficiente de la línea de proceso, así como el pobre nivel sanitario de la planta y equipo. Además los resultados muestran que una alta incidencia en la zanahoria almacenada puede deberse a la combinación de contaminación cruzada entre el crecimiento bacteriano y la mala higiene de las maquinarias en el proceso.

No es posible la eliminación total de *L. monocytogenes* de las frutas y hortalizas, debido a su carácter heterogéneo. El ejercicio mental y punto crítico no está en cómo prevenir la presencia de *L. monocytogenes* sino como poder reducir a su mínima expresión los niveles de tal patógeno.

Adicionalmente, es necesario promover una cultura de prevención de listeriosis mediante educación tanto a los trabajadores como a las personas que consumen este tipo de productos y hacer énfasis en la correcta manipulación de los alimentos evitando contaminaciones cruzadas.

VII.6.1 Recomendaciones.

Se enlistan a continuación las medidas más sobresalientes para el control de *L. monocytogenes* en una planta procesadora de alimentos (Silva y col., 2003)

a) Diseñar y establecer un programa de limpieza y saneamiento de drenajes y áreas encharcadas. El monitoreo de *Listeria* spp debe aplicarse de forma periódica como indicador del patógeno.

b) Reforzar las barreras sanitarias alrededor de todas las instalaciones para impedir su entrada por medio del personal (lavabos con jabones desinfectantes, tapetes sanitarios equipados con sanitizantes de actividad reconocida vs. *Listeria* como sales de amonio cuaternarias ó ácidos orgánicos como el peracético y en menor grado, cloro y yodo).

c) Llevar a cabo un programa agresivo de monitoreo de *Listeria* y/o microorganismos relacionados en bandas, equipos y áreas de contacto directo con el producto terminado, después de la fase de desinfección. Estos son sitios en donde *L. monocytogenes* se puede establecer, incluyendo las áreas en donde resulta difícil la limpieza como lo son las bandas transportadoras

d) La capacitación del personal en los Procedimientos de Operación Estándar de Saneamiento (POES), enfocados al control de *Listeria*.

e) Debe ser prioridad especial la limpieza entre cada turno o bien al final de la jornada de trabajo en aquellas áreas en donde el producto es manejado antes de ser empacado. No existe sustituto para la limpieza a conciencia de la planta y del equipo, lo que reducirá enormemente la presencia de todas las bacterias en la planta.

VII.7 Capacidad de la PCR y la técnica tradicional para identificar cepas *L. monocytogenes* a partir de zanahorias y superficies-

El avance de la biotecnología ha permitido el desarrollo de nuevos métodos para la detección de este microorganismo en alimentos, los cuales proporcionan ventajas en cuanto a la eficiencia, sensibilidad y disminución del tiempo de detección. Estos métodos rápidos, por estar basados en la determinación de ácidos nucleicos, tienen la potencialidad de ser altamente específicos, y discriminar entre organismos muy cercanamente relacionados genéticamente. Tal es el caso de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), una tecnología molecular de amplificación *in vitro* del ADN (Bartlett y Stirling, 2003), que se utiliza ampliamente hoy en día como un método rápido de diagnóstico, e identificación de características genotípicas, para género y especie.

El método de cultivo tradicional requiere un mínimo de 5 días para determinar si el alimento está libre de *Listeria* y de 10 días para reconocer si es *Listeria spp.* o *L. monocytogenes*. La técnica de PCR desarrollada en esta investigación, puede utilizarse como una herramienta diagnóstica para monitorear la seguridad de hortalizas como la zanahoria y las superficies asociadas a su empaque en sólo 30 hrs, acortando con ello el diagnóstico de este microorganismo en 9 días además, permite incrementar el número de muestras examinadas en la industria para optimizar el proceso de inspección y seguridad alimentaria.

La combinación de tales técnicas constituye una herramienta muy valiosa para la identificación rápida de *L. monocytogenes* y permite confirmar los resultados obtenidos por la técnica convencional del medio de cultivo.

La técnica tradicional por medio de cultivo difícilmente será sustituida en su totalidad, ya que es fundamental para complementar la técnica del PCR en muestras de alimentos.

VIII. CONCLUSIONES

Los productos del estudio observacional y la valoración de los resultados de los análisis microbiológico de la zanahoria y superficies constituyen una base sólida para establecer medidas efectivas de prevención.

Las BMA permiten apreciar la eficiencia de los tratamientos aplicados, de lavado y desinfección.

De 60 muestras de zanahoria adquiridas en la empacadora la incidencia de *E. coli* fue 67%. La mediana para *E. coli* en las muestras positivas fue de 5 NMP/3 zanahorias.

La incidencia de *E. coli* demuestra la existencia de problemas por contaminación o sobrevivencia microbiana dentro de la planta empacadora.

La técnica de la USDA resultó más eficiente que la técnica de la FDA para la recuperación de *L. monocytogenes* en zanahorias y superficies.

La técnica de PCR (utilizando como iniciador el gen *HlyA*) permitió detectar de forma específica para *L. monocytogenes*. La mínima concentración del patógeno fue 5 y 1 UFC *L. monocytogenes* por unidad experimental de zanahoria.

La positividad general de *L. monocytogenes* en las 282 muestras colectadas durante una temporada de producción de zanahoria fue del 24% (4.6% zanahoria, 19.5 % superficies)

La relación en el hallazgo de *Listeria spp* y *L. monocytogenes* en zanahoria señala a *Listeria spp* como un indicador apropiado de la presencia de *L. monocytogenes*.

La combinación de técnicas (PCR y tradicional por medio de cultivo) construye una herramienta muy valiosa para la identificación confiable de *Listeria monocytogenes*.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Aarnisalo K, Tallavaara K, Wirtanen G, Maijala R y Raaska L. 2006.** The hygienic working practices of maintenance personnel and equipment hygiene in the Finnish food industry. *Food Control* 17(12), 1001–1011.
- Acevedo, L.; Mendoza, C. y Oyon, R. 2001.** Coliformes totales, fecales y algunas enterobacterias, *Staphylococcus* sp. y hongos en ensaladas para perros calientes expendidas en la ciudad de Maracay, Venezuela. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. Vol:51: 4-15.
- Aznar R. and Alarcon B. 2002.** On the Specificity of PCR Detection of *Listeria monocytogenes* in Food: a Comparison of Published Primers. *System. Appl. Microbiol.* Vol 25: 109–119
- Astudillo M y Payán A. 1994.** Listeriosis neonatal: ¿enfermedad poco frecuente o no diagnosticada? Enfoque microbiológico. *Colombia Médica*. Vol. 25(2):69 - 72.
- Bartlett, J. y Stirling, D. 2003** *Methods in Molecular Biology. PCR Protocols*. Vol 226. 2nd Ed. Humana Press. New Jersey. 545
- Bell C, y Kyriakydes A. 2000.** *Listeria. Una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos*. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza
- Beuchat, L. R. 1996.** Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *J. Food Prot.* Vol. 59: 204-216
- Beuchat, L y Ryu, JH. 1997.** Produce handling and processing practices. *Emerging Infectious Diseases* Vol: 3 . Disponible en: www.cdc.gov/ncidod/eid/vol3no4/beuchat.htm
- Bihn, E.; Gravani, R.; Hawkes, J. y col. 1999.** Reduzca la contaminación microbiana con buenas prácticas agrícolas. Publicación del Programa “Good Agricultural Practices Program” de la Universidad de Cornell, EE.UU.
- CAC/ RCP (Codex Alimentarius Commission). 1997** Rev. 3. Volumen 1B. Código Internacional Recomendado de Prácticas. Principios Generales de higiene de los alimentos.
- Capita R, Alonso C, García MT, Moreno B y García Fernandez C. 1999.** El pollo como alimento. *ALIMENTACIÓN. Equipos y Tecnología*. Año XVIII. Nº7: 101 - 108.

- Capita R, Alonso-Calleja C, García-Linares M, Moreno B, García-Fernandez C. 2000.** *Listeria monocytogenes* y carne de pollo. ALIMENTACIÓN. Equipos y Tecnología. Año XIX. N°3: 73 – 80
- Castro de Esparza, MI. 1991.** Programa de muestreo y medición de *Salmonella* y *E. coli* en verduras mediante enjuague de su superficie. Publicación del Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (CEPIS). Lima:4-7.
- CCAUG (Centro de Ciencias Atmosféricas Universidad de Guanajuato), 2009.** Disponible en: http://www.ccaug.ugto.mx/Reports/Pron Mete_20090924.pdf
- Choi. y Hong. 2003.** Rapid Enumeration of *Listeria monocytogenes* in milk using competitive PCR. Int. J. Food Microbiol.Vol 84 (1): 79-85.
- Crespo MP, Vélez JD. 1999.** Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en un hospital de tercer nivel. Colombia Médica. Vol. 30(2): 89-98.
- Curiale M, Lewus C. 1994.** Detection of *Listeria monocytogenes* in Samples Containing *Listeria innocua* . Journal of Food Protection. Vol. 57:1048 - 1051.
- Curtis GDW, Lee WH. 1995.** Culture media and methods for the isolation of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology. Vol. 26:1-13.
- De Curtis ML, Franceschi O, De Castro N. 2002.** *Listeria monocytogenes* en vegetales mínimamente procesados. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Vol.52(3):2-8.
- Diane, R. 1995.** Microbiología práctica de alimentos. 2a ed. Acribia. Zaragoza. Mexico.43-49.
- Doyle ME. 2001.** Virulence characteristics of *Listeria monocytogenes*. Food Research Institute Briefings.<http://www.wisc.edu/fri/briefs/virulencelmono.pdf>
- Echandi, MI. y Antillon F. 2000.** Contaminación microbiológica de los alimentos en Costa Rica: Revista Biomédica 11(2): 113- 122.
- Esquivel, J.J.H. 2008** Incidencia, distribución y control de *Listeria monocytogenes* durante el procesamiento de espinaca precocida y congelada. Tesis para obtener el título de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- FAO/OMS. 2000.** Consulta Mixta FAO/OMS de Expertos sobre la Evaluación de Riesgos Asociados a los Peligros Microbiológicos en los Alimentos. Sede de la FAO, Roma. 27-55.

Fasciolo, G.; Gabriel, E.; Meca, Ml. y col. 1998. Riego con efluentes tratados: Aceptabilidad sanitaria para un cultivo de ajo. Memorias del XXVII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Brasil.

FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION U. S.). 1998. Guía para reducir al mínimo el riesgo microbiano en los alimentos, en el caso de frutas y vegetales frescos. Publicación del Dpto. de Agricultura de los Estados Unidos. 74 p. Disponible en: <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/sprodgui.html>

FDA-CFSAN. 2002. *Listeria monocytogenes*. En: Bacteriological Analytical Manual. Novena edición. Capítulo 10.

FINTRAC CDA Centro de Desarrollo de Agronegocios (CDA). 2003. Equipo Básico para Empacadoras de Frutas y Vegetales Frescos. Boletín de Poscosecha num 4. Disponible en: http://www.fintrac.com/docs/honduras/bt_04_empacadoras_equipo_basico_05_03_esp.pdf

Feng, P., S. D. Weagant, and M. A. Grant. 1998. Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. In: Food and Drugs Administration (FDA). Bacteriological Analytical Manual. 8th Ed. AOAC, Arlington, VA. USA. 7-12.

Feng, P., y Weagant, S. 2002. Diarrheogenic *Escherichia coli*. 8a Ed., Bacteriological Analytical Manual. Capitulo 4. Disponible en: www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html

Fenlow, D. R. 1985. Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agriculture environment. J. Appl. Bacteriol. 59:537-544.

Fernández EE., Castillo AA. y Torres VR. 1982. Destino de Salmonella artificialmente inoculada en la leche durante la elaboración y almacenamiento de quesos frescos no pasteurizados. I. Cambios en el pH, acidez y flora microbiana. Rev. Lat-amer. Microb. 24: 235-240.

Fernández EE., Alvarez M.B. y Pérez B.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 plantas del Bajío. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México: 1- 33.

Fernández E.E. 2008 Microbiología e Inocuidad de los alimentos. ED. Universidad Autónoma de Querétaro. México. 2a Edición.

Garcia, R.; Chavez, J.; Mejia, A. 2002. Microbiological determinations of some vegetables from the Xochimilco zone in Mexico City. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Vol. 44 (1): 24-30.

Harris, L. y Cullor, J. 2002. Recomendaciones para mantener los alimentos en buen estado durante el verano. Publicación de la División de Agricultura y Recursos Naturales (ANR) de la Universidad de California, EE.UU. Disponible en: www.ucanr.org/spanish/spstories/alimentos.shtml

Hernández I.M. 1999. Perfil de contaminación de guacamole congelado durante su procesamiento y factores que influyen en la sobrevivencia y desarrollo de *Listeria monocytogenes*. Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. 69 – 80.

Heisink, J.E. Wagner, D.E., Nierman, M.L., y Peeler, J.T. 1989. *Listeria* spp found on fresh market produce. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1925-1927.

Hobbs, B. y Roberts, D. 1997. Higiene y toxicología de los alimentos. 3a Ed. Acribia. Zaragoza.

Hoffman, A. D., D. M. Norton y M. Wiedmann. 2003. *Listeria monocytogenes* contamination patters for the smoked fish processing environment and for raw fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 52-60.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). 1981. Microorganismos de los alimentos II: Métodos de muestreo para análisis microbiológicos. 1ª Ed. Acribia. Zaragoza. 215.

ICMSF 1996. Microorganisms in Foods 5: Characteristics of microbial pathogens. T.A. Roberts (ed.). Blackie Academic & Professional, London.

ICMSF 1999. Microorganismos de los alimentos I: Su significado y métodos de enumeración. 2a Ed. Acribia. Zaragoza. 439-440.

ICMSF, 2001 Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of food commodities. T.A. Roberts (ed.). Blackie Academic & Professional, London

IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura) 2007. Guía practica de Exportación de Zanahoria a los Estados Unidos. 1 – 11.

IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute) 1998. Descriptores de la zanahoria silvestre y cultivada (*Daucus carota* L.) 1ª Ed. Acribia. Zaragoza. 1-3.

- Jaradat ZW, Bhunia A. 2003.** Adhesion, Invasion, and Translocation Characteristics of *Listeria monocytogenes* Serotypes in Caco-2 Cell and mouse Models. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 69(6): 3640-3645.
- Jay, J. 2000.** Microbiología moderna de los alimentos. 4a ed. Acribia. Zaragoza. 457-480.
- Jones, F. P. Smith, and D. C. Watson. 1978.** Pollution of water supply catchments by breeding gulls and the potential environmental health implications. *J. Inst. Water Eng. Sci.* 32:469-482.
- Kuhn, M.y W. Goebel. 1989.** Identification of an Extracellular Protein of *Listeria monocytogenes* Possibly Involved in Intracellular Uptake by Mamarian Cells. *Infect. Immun.* Vol. 57 (1): 55-61.
- Laciar AL, Vaca L, De Centorbi ONP. 1999.** *Listeria* spp., en alimentos de origen animal. *Revista Argentina de Microbiología.* Vol. 31: 25-30.
- Lawrence LM, Gilmour A. 1994.** Incidence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in a Poultry Processing Environment and in Poultry Products and Their Rapid Confirmation by Multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 60(12):4600-4604.
- Lee, J., D. Basford, T. Donovan, A. Furniss, y D. West. 1982.** The incidence of *Vibrio cholerae* in water, animals, and birds in Kent, England. *J. Appl. Bacteriol.* 52:281-291.
- Limongelli, Jc.; Rondinone, Mc.; Fernadez J. 1991.** Impacto de la contaminación en la calidad de los productos vegetales. Publicación del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Buenos Aires. 183-206.
- López C. L. Dávila, M. R., Martínez B. M 2005.** Evaluación antimicrobiana de la zanahoria (*Daucus carota*). *Revista de Salud Publica y Nutricion.* 4, 23-28.
- Luechfeld, N., M. Blaser, L. Reller, y W. Wang. 1980.** Isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* from migratory wildfowl. *J. Clin. Microbiol.* 12:406-408.
- Maroto, J. 1989.** Horticultura Herbácea. 3^{ra} Ed. Ediciones Mundiprensa. Madrid – España. 45 – 53.

- Monge, R.; Chinchilla, M.; Reyes, L. 1996.** Presencia de parásitos y bacterias intestinales en hortalizas que se consumen crudas en Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*. Vol. 44 (2): 369-375.
- Monge R, Arias-Echandi ML. 1999.** Presence of *Listeria monocytogenes* in fresh salad vegetables. *Revista Biomédica*. Vol.10: 29-31.
- National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. 1991.** *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Foods. Microbiol.* 14: 185 - 246.
- NOM-093-SSA1-1994** Norma Oficial Mexicana. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/093ssa14.html>
- Odumeru JA, Mitchell SJ, Alves DM, Lynch JA, Yee AJ, Wang SL. y col. 1997.** Assessment of the microbiological quality of ready-to-use vegetables for health-care food services. *J Food Prot.* 60: 954-960.
- OPS/OMS 1998.** Contaminación microbiana de los alimentos vendidos en la vía pública, en ciudades de América Latina y características socio-económicas de sus vendedores y consumidores.
- Pedersen, J.C. y Jacobsen, C.S. 1993.** Fate of *Enterobacter cloacae* JP120 and *Alcaligenes eutrophus* AEO106 in soil during water stress: effects on culturability and viability. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol.59: 1560-1564.
- Peeler, J. T., y Maturin L. J. 1992.** Aerobic plate count. In: Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 7th Ed. AOAC International. USA. 17-26.
- Quessy, S., y S. Messier. 1992.** *Campylobacter* spp. and *Listeria* spp in ring-billed gulls (*Larus delawarensis*). *J.Wildl. Dis.* 28:525-531.
- Remacha MA, Herrera JA, Esteban A, Roiz V, Quiroga L, Parra I. 2002.** Bacteriemia por *Listeria monocytogenes*. *Revista de Diagnóstico Biológico*. Vol.51(3). 32-41.
- Reynolds K. 2002.** Salmonella: Un patógeno común y mortal. *Agua Latinoamérica* Vol. 2 (1). 41-42.
- Rocourt J y Cossart P.. 2001.** *Microbiología de los Alimentos, Fundamentos y fronteras*. 1ª ed Acribia, S. A. Zaragoza. 355-369.

Rorvik L.M., Caugant, D. A. y Yndesrtand, M. 1995. Contamination pattern of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp in a salmon slaughterhouse and smoked salmon processing plant. *Int. J. Food Microbiol.*25:19-27.

Rosas Patricia y Reyes Genara. 2008. Evaluacion de los programas pre-requisitos del plan HACCP en una planta de sardinas congeladas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición* Vol 58: 171-181.

Ruiz M.A. 2007. Fuentes y mecanismos de contaminación de *Salmonella* hacia frutas y hortalizas durante su cultivo y cosecha. Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. 52 – 110.

Ryser, E.T. y Marth, E.H. 1991. *Listeria, Listeriosis and Food Safety.* Marcel Dekker, Inc. N.Y.

Salvat, G., M. T. Toquin, Y. Michel and P. Colin. 1995. Control of *Listeria monocytogenes* in the delicatessen industries: lessons of a listeriosis outbreak in France. *Int. J. Food Microbiol.* 25,75-81.

SENASICA, SAGARPA, CMCC 2002. Manual de buenas prácticas agrícolas, guía para el agricultor. Centro de investigación en alimentos y desarrollo Fisiología y Tecnología Poscosecha de Frutas y Hortalizas. Unidad Culiacán Disponible: http://www.fao.org/ag/agn/fv/files/1048_MANUALBPA2005_COMPLETO.PDF

Sheu , P.M., Berghof, K. y Stahl, U.,1998. Detection of pathogenic and spoilage microorganisms in food with the polymerase chain reaction. *Food Microbiol.* Vol.15: 13-31.

SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera), con información de las Delegaciones de la SAGARPA 2007 Disponible http://reportes.siap.gob.mx/aagricola_siap/icultivo/index.jsp

Siller, J.; Báez, M.; Sañudo, A. 2002. Manual de buenas prácticas agrícolas para frutas y hortalizas frescas. 1a Ed Publicación del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo Mexicano (CIAD). México: 64.

- Silva, I. M., R. C. Almeida, M. A. Alves and P. F. Almeida. 2003.** Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. *Int. J. Food Microbiol.* 81, 241-248.
- Swanson, K. M. J., R. L. Petran, and J. H. Hanlin. 2001.** Most probable number technique Cap. 6 Culture methods for enumeration of microorganisms.. In Pouch, F. ND Ito, K. 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th Ed. American Public Health Association.59 – 61.
- Trevor V. Suslow, Jeffrey Mitchell and Marita Cantwell 2009.** Carrot Recommendations for Maintaining Postharvest Quality. Postharvest Tecnology UC DAVIS. . Disponible: <http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts>
- Vaz Da Costa-Vargas, S.; Mara, D.; Vargas, C. 1991.** Residual faecal contamination on effluent-irrigated lettuces. *Water Science Technology.* Vol 24 (9): 89-94.
- Wallace, J. S., T. Cheasty, y K. Jones. 1997.** Isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from wild bird. *J. Appl. Microbiol.* 82:399-404.
- Williams, R., D. Golden. 2001.** Influence of modified atmospheric storage, lactic acid, and NaCl on survival of sublethally heat-injured *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* Vol. 64 (3): 379-386.