

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“COMPORTAMIENTO *Enterobacteriaceae* Y *Salmonella* EN
JUGO DE APIO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

JAZEL MOISÉS VELASCO ROJAS

DIRIGIDA POR

DR. EDUARDO FERNÁNDEZ ESCARTÍN

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2012



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“COMPORTAMIENTO *Enterobacteriaceae* Y *Salmonella* EN
JUGO DE APIO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

JAZEL MOISES VELASCO ROJAS

DIRIGIDA POR

DR. EDUARDO FERNÁNDEZ ESCARTÍN

SINODALES

Dr. EDUARDO FERNÁNDEZ ESCARTÍN

DIRECTOR

**Dra. SOFÍA MARÍA ARVIZU MEDRANO
SINODAL**

Dra. Ma. ESTELA VÁZQUEZ BARRIOS

SINODAL

**M.C. JOSEFINA SALDAÑA LOZANO
SINODAL**

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
II. 1 Importancia de la inocuidad microbiana de los alimentos.	2
II.1.1 El alimento inocuo.	2
II.1.2 La necesidad de alimentos inocuos.	2
II. 2 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's)	3
II.2.1 Magnitud del problema.	4
II.2.2 Frutas y hortalizas mínimamente procesadas	5
II.2.2.1 El apio	6
II.2.2.2 Jugo de apio	6
II.2.3 Brotes asociados al consumo de hortalizas	6
II. 3 Enfoques de prevención y sus limitaciones.	9
II.3.1 Enfoques de prevención	9
II.3.2 Evaluación de los riesgos microbianos	11
II.3.3 Prevalencia de los microorganismos patógenos.	12
II. 4 Agentes patógenos e indicadores comunes en frutas y hortalizas	13
II.4.1 Concepto y utilidad de los microorganismos indicadores	13
II.4.2 <i>Enterobacteriaceae</i>	14
II.4.3 <i>Salmonella</i> spp.	14
II.4.3.1 Salmonelosis	15
III. HIPÓTESIS	17
IV. OBJETIVOS	18
IV.1 General	18

IV.2 Específicos	18
V. MATERIALES Y MÉTODOS	19
V.1 Materiales	19
V.1.1 Equipo	19
V.1.2 Medios de cultivo	19
V.1.3 Reactivos y soluciones	20
V.1.4 Material biológico	20
V.2 Métodos	20
V.2.1 Obtención y preparación de las muestras	20
V.2.1.1 Jugo de apio obtenido del mercado local	20
V.2.1.2 Preparación del jugo de apio en el laboratorio.	20
V.2.2 Análisis microbiológicos.	22
V.2.2.1 Bacterias indicadoras	22
V.2.2.1.1 <i>Enterobacteriaceae</i>	22
V.2.2.1.2 Detección, aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i> .	23
V.2.3 Comportamiento de <i>Enterobacteriaceae</i> y <i>S. Typhimurium</i> en jugo de apio crudo preparado en mercado público y en laboratorio	23
V.2.3.1 Obtención y selección de cepa de <i>Salmonella</i> resistente a rifampicina.	23
V.2.3.2 Comportamiento a 22°C de <i>Enterobacteriaceae</i> nativa y <i>Salmonella</i> en jugo de apio preparado en un mercado público y en el laboratorio.	25
V.2.3.3 Comportamiento de <i>Salmonella</i> en jugo de apio preparado en el laboratorio con tres niveles de inóculo de <i>Enterobacteriaceae</i> , incubado a 22° C por 24 h.	26
V.2.3.4 Comportamiento de <i>Enterobacteriaceae</i> y <i>Salmonella</i> en sobrenadante estéril de jugo de apio.	28
VI. RESULTADOS	31
VI.1 Incidencia de <i>Enterobacteriaceae</i> en jugo de apio fresco obtenido en	

mercado local de la ciudad de Querétaro	31
VI.2 Comportamiento de <i>Enterobacteriaceae</i> nativa y <i>Salmonella</i> en jugo de apio preparado en un mercado público y en el laboratorio a 22° C.	31
VI.3 Efecto del contenido de <i>Enterobacteriaceae</i> en el comportamiento de <i>Salmonella</i> en jugo de apio preparado en el laboratorio y almacenado a 22°C	36
VI.4 Valoración del comportamiento de <i>Enterobacteriaceae</i> y <i>Salmonella</i> en el sobrenadante de jugo de apio previamente incubado a 22°C por 24 horas con tres niveles de <i>Enterobacteriaceae</i> .	40
VII. DISCUSIÓN	47
VIII. CONCLUSIONES	50
IX. BIBLIOGRAFÍA	51

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Contenido nutricional de apio por cada 100g	7
2	Etiología de brotes de enfermedad asociados a frutas y hortalizas crudas.	9
3	Comportamiento de <i>Salmonella</i> en jugo de apio fresco con tres niveles <i>Enterobacteriaceae</i> e incubado a 22°C	32
4	Comportamiento de <i>Enterobacteriaceae</i> (ENT) en jugo de apio fresco a 22°C	32
5	Comportamiento a 22°C de <i>Enterobacteriaceae</i> (niveles bajo, medio y alto) en jugo de apio preparado en el laboratorio.	37
6	Comportamiento a 22°C de <i>Salmonella</i> (concentración alta y baja) en jugo de apio preparado en el laboratorio con tres niveles de <i>Enterobacteriaceae</i> (bajo, medio y alto).	37
7	Comportamiento de <i>Enterobacteriaceae</i> inoculado con tres niveles en jugo de apio fresco y en CST, almacenado a 22°C	40
8	Comportamiento de <i>Enterobacteriaceae</i> y <i>Salmonella</i> a 22°C por 24 h, inoculado en el sobrenadante del jugo de apio y del CST previamente inoculados e incubados	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Distribución de agentes patógenos en brotes por frutas y hortalizas. Estados Unidos. 1990 - 2005.	9
2	Obtención de jugo de apio en el laboratorio en condiciones asépticas	21 21
3	Recuento de <i>Enterobacteriaceae</i> por vaciado en placa	22
4	Detección de <i>Salmonella</i> por cultivo tradicional	24
5	Comportamiento a 22°C de <i>Salmonella</i> inoculada y <i>Enterobacteriaceae</i>	26
6	Comportamiento de <i>Enterobacteriaceae</i> y <i>Salmonella</i> inoculadas en jugos de apio preparado en el laboratorio e incubado a 22°C por 24h	27
7	Comportamiento de <i>Enterobacteriaceae</i> y obtención de sobrenadante estéril de jugo de apio y CST	29
8	Comportamiento de <i>Salmonella</i> y <i>Enterobacteriaceae</i> en el sobrenadante estéril a 22°C por 24h.	30
9	Comportamiento de <i>Salmonella</i> en jugos de apio procedentes de mercado público (concentración media y alta de <i>Enterobacteriaceae</i>) y preparados en el laboratorio (concentración baja de <i>Enterobacteriaceae</i>) a 22°C.	33
10	Comportamiento de <i>Enterobacteriaceae</i> en jugos de apio procedentes del mercado público (concentración media y alta de <i>Enterobacteriaceae</i>) y preparadas en el laboratorio (concentración baja de <i>Enterobacteriaceae</i>) a 22°C.	34
11	Comportamiento de <i>Enterobacteriaceae</i> (tres niveles) y <i>Salmonella</i> (4 log UFC/mL) en jugo de apio	35
12	Comportamiento de <i>Enterobacteriaceae</i> artificialmente inoculada a tres concentraciones en jugos de apio fresco e incubado a 22°C	38
13	Efecto de tres concentraciones de <i>Enterobacteriaceae</i> en el comportamiento de <i>S. Typhimurium</i> en jugo de apio preparado en el laboratorio y almacenado a 22°C	39

- 14 Comportamiento a 22°C de *Enterobacteriaceae* según nivel inicial
inoculado con tres niveles en jugo de apio fresco y en CST. 42
- 15 Comportamiento de *Enterobacteriaceae* y *Salmonella* a 22°C por 24 h,
inoculado en el sobrenadante del jugo de apio y del CST previamente
inoculados e incubados 44

RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA's) son un problema mundial de salud pública. Un alimento se considera contaminado cuando contiene agentes microbianos patógenos, sustancias físicas, tóxicas, orgánicas o inorgánicas extrañas a su composición natural, o en concentraciones mayores a las permitidas. La confianza en la inocuidad e integridad de los alimentos es un requisito importante que demanda la población, lo cual aumenta la preocupación por los modernos sistemas de elaboración y comercialización de los alimentos a fin de brindar garantías de protección de la salud pública. El objetivo de este trabajo fue identificar el comportamiento de *Enterobacteriaceae* y *Salmonella* en jugo fresco de apio que se prepara y se sirve en un mercado local de la ciudad de Querétaro, así como jugo preparado bajo condiciones de laboratorio por medio de técnicas de identificación y recuentos microbianos tradicionales. En el caso de *Enterobacteriaceae* se obtuvo una población máxima de hasta 8 log UFC/mL de jugo de apio, una mínima de 3 log UFC/mL y una media de 5 log UFC/mL, siendo estas un indicativo de que no se están siguiendo las adecuadas prácticas de higiene al elaborar y servir el jugo; mientras que en el caso de *Salmonella* no se detectó por medio de las técnicas presentadas. Al monitorear la cinética de crecimiento de *Salmonella* en jugo de apio se observa una total inhibición en su desarrollo cuando la población de *Enterobacteriaceae* en el medio es de 7 log UFC/mL, mientras que cuando la población de *Enterobacteriaceae* es de 3 log UFC/mL *Salmonella* puede incluso incrementar su concentración 3 log UFC/mL. Este trabajo sirve de referencia a futuras investigaciones para la evaluación del comportamiento de otros patógenos de interés en jugos de apio o diferentes frutas y hortalizas.

I. INTRODUCCIÓN

Globalmente se ha incrementado el consumo de frutas y hortalizas, debido en parte a una mayor conciencia de los beneficios que aportan a la salud y a que están disponibles todo el año. De esta manera, se incrementa el número de casos de enfermedades asociados a su consumo. El apio, como ocurre con otras hortalizas, se comercializa y suele consumirse crudo. Aunque aparentemente no se han reportado brotes por el consumo de este alimento, se encuentra expuesto como el resto de las hortalizas a contaminación, sobrevivencia y desarrollo de microorganismos patógenos. Se carece de información acerca de su calidad microbiológica. Esta información es fundamental para estructurar e implementar programas de prevención de las enfermedades microbianas asociadas a su consumo. En este trabajo se monitoreó el comportamiento microbiológico de *Salmonella* y *Enterobacteriaceae* en jugo de apio preparado bajo condiciones de laboratorio así como en jugo de apio preparado en condiciones como se comercializa y consume en forma de jugo fresco en un sitio venta de un mercado público de la ciudad de Querétaro.

II. ANTECEDENTES

II. 1 Importancia de la inocuidad microbiana de los alimentos.

II.1.1 El alimento inocuo.

En general, cuando se aborda el problema de la inocuidad de los alimentos se implican riesgos de enfermedad, sean crónicos o agudos, consecutivos a su consumo. La integridad y la inocuidad de un alimento generan confianza en la población, de ahí la preocupación por los sistemas modernos de producción agrícola, elaboración y comercialización a fin de brindar garantías de protección a la salud. Un alimento se considera contaminado cuando contiene agentes microbianos patógenos, y/o sustancias tóxicas u orgánicas extrañas a su composición natural en concentraciones mayores a las permitidas. (OPS/OMS, 2002). La mayoría de estos peligros (fundamentalmente microbianos) se pueden presentar en el alimento, por lo que es necesaria la protección de su inocuidad. A lo largo de la cadena alimentaria (del campo a la mesa) su contaminación se suele identificar como punto crítico. En el caso de las frutas y hortalizas cobra especial significado la desatención a las prácticas agrícolas sanitarias, el uso de agua de dudosa calidad microbiológica y las condiciones de almacenamiento que propician nuevas contaminaciones o favorecen la actividad de microorganismos indeseables. Las consecuencias de ignorar estas observaciones conducen a la gestación de riesgos en los alimentos, antesala de los incidentes de enfermedad.

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA's) constituyen un problema de salud pública cuya magnitud puede expresarse en términos de la incidencia y del costo económico implicado. Lamentablemente, esta información actualmente es casi privativa de países industrializados, denominados desarrollados. En países como el nuestro el problema se maneja entonces, en términos de especulaciones.

II.1.2 La necesidad de alimentos inocuos.

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA's) son un problema mundial de salud pública. Patógenos nuevos y emergentes suelen aparecer utilizando

diversos alimentos como vehículos. Este evento se ha asociado a los cambios en su ecología resultante de la industrialización y procesamiento (Tauxe y col. 1997). La incidencia de brotes asociados al consumo de frutas y hortalizas muestra un evidente incremento. Por ejemplo, en Estados Unidos se ha duplicado su frecuencia entre los periodos 1973 - 1987 y 1988 - 1991 (CDC, 1996). De manera concurrente se advierte una creciente predisposición de la población hacia una dieta más sana. La demanda por alimentos inocuos es directamente proporcional al incremento en su consumo, hecho del cual se derivan dos condiciones que deben subrayarse. Por un lado, se acompaña de ingreso de divisas para los países que las exportan, o la pérdida del mismo ante rechazos del producto por la presencia de microorganismos patógenos. Segundo, se fortalece el comercio internacional, que insiste en seguir las directrices del Codex Alimentarius en lo concerniente a la formulación y ajuste de políticas y programas de protección de la inocuidad de los alimentos dentro del marco de los sistemas nacionales de cada país. Esto propicia un manejo sanitario más comprometido ante los productos de exportación, que en teoría deberían ofrecer la misma calidad a la de aquellos que fundamentalmente se destinan al consumo nacional. La realidad es que los países exportadores, generalmente denominados países en sub y/o en desarrollo, implementan lineamientos de prácticas sanitarias que responden a las exigencias del comprador. Esto se ha hecho evidente en el decomiso hasta el cierre del mercado de productos provenientes de México hacia los Estados Unidos de Norte América (CDC, 2000).

II. 2 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's)

En el caso específico de las frutas y hortalizas se estima que entre las ETA's se incluyen 14 millones de eventos con 60,000 hospitalizaciones y 1,800 muertes asociados al consumo de alimentos. Destacan los patógenos, *Salmonella* y *Listeria* a los cuales se les responsabiliza de 1,500 muertes por año. Se estima que las ETA's aparentemente causan más casos aunque menos muertes de lo que se pensaba (WHO, 2010). Lo que resulta pertinente y necesario considerar es el efecto de las ETA's en un país como México, representativo en muchos aspectos

de países en sub desarrollo en Latino América. Es de suma importancia mencionar que, en muchas ocasiones, la información epidemiológica es escasa o nula, a pesar de que existen universidades y centros de investigación que están en condiciones de aportar conocimientos, apoyo y asesoría al gobierno y sectores productivos. Las exportaciones de frutas y hortalizas realizadas por diversos países hacia los Estados Unidos, representan un mercado muy importante, con fuerte impacto en la economía. El efecto es evidente ante el incremento global del turismo que se restringe a los países tropicales y sub tropicales ante el riesgo de enfermar en virtud de su pobre nivel en salud pública (Cartwright, 2003). Situación similar ocurre ante la considerable incidencia de gastroenteritis entre viajeros hacia países como México.

II.2.1 Magnitud del problema.

Ésta se puede apreciar desde dos perspectivas: en términos de incidencia y severidad, y el costo económico implicado. El costo económico es tangible y medible, lo que no ocurre con el sufrimiento y eventual pérdida de la vida.

Dentro del costo social existen diferentes repercusiones en el individuo, tales como:

- Costos familiares individuales: gastos médicos y pérdida de ingresos.
- Ausentismo.
- Pérdida del productor, distribuidor o comerciante del producto causante del brote.
- Costo en el sector público
- Investigación de los casos y brotes
- Tratamiento médico (Sockett, 1991).

En los Estados Unidos las cifras de los sistemas de vigilancia epidemiológica indican que el costo de las ETA's es alarmante. Según Buzby y Roberts (1997) en este país fue de \$6.5 - 34.9 billones de dólares en 1995.

Los individuos afectados que se consideran dentro del padrón estadístico no solamente son quienes solicitan ayuda médica, sino también aquellos que solicitan examen de laboratorio para análisis que, eventualmente tiene un costo (Kuchenmüller y col. 2009). Por tanto, para estimar el costo real de las ETA's y acceder a información relevante para la implementación de políticas de inocuidad,

se necesita información más allá de la morbilidad y mortalidad. Debe ser exhaustivo e incluir reportes de la severidad, duración, e incluso las secuelas (Mead y col., 1999).

II.2.2 Frutas y hortalizas mínimamente procesadas

En las últimas décadas, el consumo de vegetales mínimamente procesados y sus derivados se ha incrementado significativamente a nivel mundial (IFPA., 2004). Esta tendencia responde a la idea generalizada de que los vegetales son alimentos saludables, y a que cuanto más fresco se encuentren, mejores condiciones de calidad y seguridad pueden obtenerse de ellos. Si a todo lo anterior se le suma que el precio es accesible a un amplio sector de la población, se entiende que el consumo sea cada vez mayor. El proceso en la obtención de alimentos incluye la selección, lavado, cortado y algún tratamiento térmico si es necesario. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que se trata de alimentos crudos, lo que obliga a extremar las buenas condiciones de manipulación y de aplicar otras técnicas que permitan cierta inactivación microbiana, como la aplicación de productos químicos compatibles con el producto y con la salud, como el hipoclorito de sodio o la aplicación de ácidos orgánicos (Kniel y col., 2003). En México esta industria apenas está surgiendo y es seguro que el porcentaje tan bajo que representa hoy (0.6%) del mercado total de frutas y hortalizas, se incremente notablemente en los próximos años. El éxito radicará en el buen uso de las tecnologías que se han desarrollado para lograr presentaciones más atractivas en el mercado nacional y que a la vez garanticen la inocuidad de los productos (González y col., 2004).

Los alimentos mínimamente procesados son frescos y, por tanto, crudos. Esto implica que los riesgos para la salud pueden ser superiores a los de los alimentos que han sido tratados con cualquier proceso tecnológico. Por ello, se pueden transmitir microorganismos patógenos, entre ellos, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7 y *Salmonella*.

II.2.2.1 El apio

El apio, *Apium graveolens* L. var. *dulce*, se cree que es originario del mediterráneo. La literatura antigua le atribuye propiedades medicinales desde el año 850 a. C. Se utilizaba para tratar catarros, tos, artritis, entre otros males (Ehler, 2011). El apio contiene sustancias muy olorosas y es utilizado como depurador de la sangre y como diurético (Wilén, 2008), debido a la presencia de un glucósido llamado apiina y un aceite esencial compuesto principalmente por apiol, el cual se emplea en farmacia (Rodríguez 1995). Lo peculiar de esta hortaliza es el hecho de que una porción de 100 gramos contenga solamente 16 kcal (Cuadro 1), requiriendo mayor energía para masticarlo en comparación a la que aporta al consumidor (CCRAB, 2004).

II.2.2.2 Jugo de apio

En los últimos años se han reportado brotes por jugos de frutas y hortalizas (Vojdani y col., 2007). Entre los productos identificados como vehículo del patógeno implicado, destacan el jugo de naranja y el de manzana en Estados Unidos (Fernández E., 2008). En nuestro país, el riesgo de enfermar se incrementa si se consideran las deficientes prácticas sanitarias de operación en las que se incurre durante la preparación del jugo y el hecho de consumirse crudos. No es rara una elevada población de *E. coli* en estos productos, y, finalmente se pueden ver implicados entre los consumidores, poblaciones hipersensibles. Estas últimas son quienes más frecuentemente recurren al consumo de jugos atribuyéndoles propiedades curativas que pudieran sanar sus males (Murray, 2000). En el caso especial del jugo de apio se le atribuyen diversas bondades, tales como diurético, ayuda a eliminar ácido úrico, antihipertensivo y ayuda a prevenir ataques cardiacos. (Wilén, 2008)

II.2.3 Brotes asociados al consumo de hortalizas

Es evidente que la probabilidad de enfermar por frutas y hortalizas pueden debilitar la confianza de la población respecto a su inocuidad y beneficios a la salud (USDHHS, 1998).

Cuadro 1. Contenido nutricional de apio por cada 100g

Nutriente	Unidades	Valor por 100 g
Agua	g	95.43
Energía	kcal	16
Energía	kJ	67
Proteína	g	0.69
Lípidos totales	g	0.17
Cenizas	g	0.75
Carbohidratos	g	2.97
Fibra total dietaria	g	1.6
Azúcares	g	1.83
Minerales		
Ca	mg	40
Mg	mg	11
P	mg	24
K	mg	260
Na	mg	80
F	µg	4
Se	µg	0.4
Vitaminas		
Vitamina C	mg	3.1
Tiamina	mg	0.021
Riboflavina	mg	0.057
Niacina	mg	0.32
Ácido Pantoténico	mg	0.246
Vitamina B-6	mg	0.074
Folato	µg	36
Beta Caroteno	µg	270
Vitamina K	µg	29.3

USDA, 2011

La investigación de los brotes asociados a las frutas y hortalizas es sin duda una tarea difícil. Estos brotes suelen estar dispersos geográficamente y con una tasa de ataque o afectación baja. Su presencia en un platillo puede ser escasa y muchas veces difícil de recordar por el consumidor, por ende, la trazabilidad de dichos productos al estudiar un brote se complica por la compleja red de productores, y puntos de distribución y comercialización. La media de los brotes registrados asociados a las frutas y hortalizas se duplicó durante el periodo 1973-1987 en relación a 1988–1991. Tauxe y col; (1997) lo atribuyen a métodos más eficientes de detección e incremento en la vigilancia. Este incremento es más evidente para las cifras de los años 1990-2005, cuando ocurrieron 639 brotes relacionados con frutas y hortalizas frescas. Así mismo, en el año 2004 se duplicó el número de brotes (85 brotes) en comparación con 1998 (44 brotes). Lo anterior puede deberse al aumento en su consumo, la globalización del mercado internacional, una intensificación de la vigilancia epidemiológica y una mayor población hipersensible (FDA/CFSAN, 2001).

Existe una diversidad de patógenos asociados a brotes por consumo de frutas y hortalizas (Cuadro 2). Se advierte que en el período 1973-1997 los brotes registrados sumaron 145, la mayoría (21%) causados por *Salmonella* (Sivapalasingam y col., 2004; CDC 2000). Los productos-vehículos de patógenos que se registran con mayor frecuencia en Estados Unidos son lechuga, melón, germinados de semillas y jitomates (Beuchat, 1996); y entre los serovares de *Salmonella* detectados en melones, germinados y jugos de frutas se encuentran *S. Oranienburg*, *S. Chester*, *S. Saphra*, *S. Javiana*, *S. Typhimurium*, *S. Anatum*, *S. Stanley*, *S. Montevideo* y *S. Infantis*.

Dos grandes brotes se observaron en varias entidades de Estados Unidos por consumo de jitomate crudo, uno por *S. Javiana* (Wood y col., 1991) y otro por *S. Montevideo* (Hedberg y col., 1994). En el periodo 1990 a 2005 a *Salmonella* se la atribuyó el 18 % de los brotes por frutas y hortalizas, sólo superado por Norovirus con 40% (Figura 1)

Cuadro 2. Etiología de brotes de enfermedad asociados a frutas y hortalizas crudas.

Microorganismo	Periodo			Total
	1973-1987	1988-1992	1993-1997	
<i>Salmonella</i>	9	9	13	31
<i>Shigella</i>	3	0	2	5
<i>S. aureus</i>	4	1	1	6
<i>E. coli</i>	0	0	7	7
<i>Giardia</i>	1	2	0	3
Hepatitis A	1	4	2	7
Norovirus	3	0	2	5
Desconocido	35 (62%)	21 (56%)	25 (48%)	81 (55%)
Total	56	37	52	145

Sivapalasingam y col., 2004

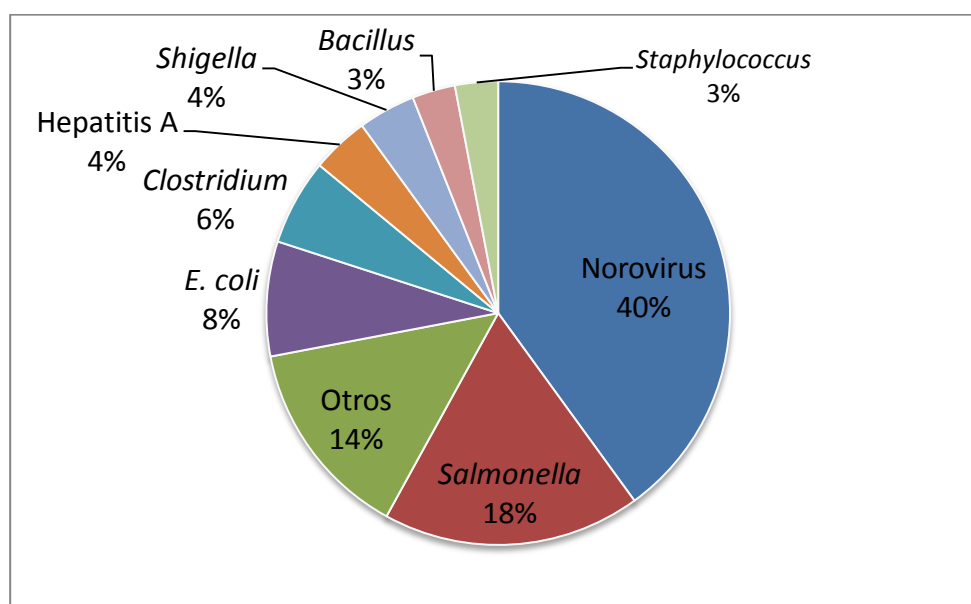


Figura 1. Distribución de agentes patógenos en brotes por frutas y hortalizas. Estados Unidos. 1990 - 2005.

II. 3 Enfoques de prevención y sus limitaciones.

II.3.1 Enfoques de prevención

Un producto con aceptable inocuidad microbiana se consigue mediante la ejecución de una serie ordenada de etapas a lo largo de su producción, distribución y

comercialización hasta el consumo. El problema es que a lo largo de la cadena pueden irse sumando acciones o situaciones que conduzcan finalmente a un producto de cuestionable inocuidad debido principalmente a la contaminación por microorganismos patógenos. Es posible cancelar o mitigar este problema si se implementan acciones preventivas contra la contaminación, sobrevivencia y/o desarrollo de microorganismos patógenos. Al respecto, conviene distinguir entre los sistemas de control tradicionales y el concepto de prevención de riesgos para los productos horto-frutícolas. El control tradicional se basa en la inspección final de frutas y hortalizas en función de la normativa legal vigente y los requisitos comerciales. En contraste, el concepto preventivo incluye medidas y acciones para asegurar y mantener criterios de inocuidad adoptados para la obtención de frutas y hortalizas inocuos. En los enfoques modernos de prevención se realizan diversas acciones a lo largo de la cadena productiva con el fin de no incurrir en prácticas de trabajo peligrosas, o detectarlas tempranamente antes de que expresen riesgos mayores con repercusión negativa en la salud y la economía (Díaz y Vernon, 1999). Las Buenas Prácticas de Higiene (BPH) son fundamentales para proporcionar certeza de que los controles y estándares favorables se mantienen vigentes. Las BPH son de especial utilidad cuando se sustentan y documentan en procedimientos de operación estandarizados, que se monitorean y se verifican con rigor (Kvenberg y Scwald, 2000). Las BPH deben aplicarse durante la producción, transporte y procesamiento del alimento.

La fuente primaria de patógenos entéricos en productos frescos es la materia fecal humana y de animales. Por esta razón, el uso de abonos orgánicos requiere que el proceso de composteo sea completo antes de su aplicación en el campo y se abone con anticipación a la cosecha. Los excrementos de animales sean domésticos, salvajes o de explotación pueden aportar microorganismos patógenos, por lo que se debe cancelar definitivamente su acceso al campo, cosecha y estaciones de empaque. Los lineamientos no se limitan a la materia fecal; se extiende a todo elemento con el que el alimento tenga o pueda llegar a tener contacto directo o indirecto durante el proceso. Destaca el agua, cuya calidad microbiana puede ser decisiva al elaborar un alimento. Las manos de los

trabajadores influyen en cada aspecto de la manipulación del alimento. Las áreas para la higiene personal y la educación de los trabajadores en estos aspectos son de vital importancia para proteger la inocuidad de un producto que se consume crudo o mínimamente procesado. Por ende, la calidad de agua, el saneamiento, el trabajador y su nivel de información sobre la higiene personal son críticos para minimizar los riesgos microbianos. Entre quienes comercializan y preparan hortalizas para consumo inmediato, la Secretaría de Salud establece los siguientes lineamientos para la higiene personal de los trabajadores:

- Usar ropa limpia y apropiada al tipo de trabajo que desarrolla, incluyendo el calzado. Se recomienda el uso de mandiles para trabajos que fácilmente ensucien la ropa.
- Lavar las manos y desinfectarlas antes de iniciar el trabajo, después de cada receso o ausencia del mismo y en cualquier momento durante la jornada cuando puedan estar sucias o contaminadas.
- Mantener las uñas cortas, limpias y libres de esmalte. Si se utilizan guantes que estén en contacto con el producto, que sean impermeables y deberán mantenerse limpios y desinfectados, con la misma rigurosidad que se sigue en el caso de las manos.
- Fumar, masticar, comer o beber sólo podrá hacerse en áreas preestablecidas, en donde el riesgo de contaminación sea mínimo.
- Esmerarse en la limpieza personal. Portar el cabello convenientemente recortado y protegido; los hombres deberán mantenerse bien afeitados.
- Evitar que personas con enfermedades contagiosas, erupciones, heridas infectadas o mal protegidas, laboren o tengan contacto directo o cercano con los alimentos (SSA., 2004).

II.3.2 Evaluación de los riesgos microbianos

Los miembros de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS) han expresado su preocupación por el nivel de inocuidad de los alimentos a escala

nacional e internacional (FAO/OMS, 2003). El incremento de la incidencia de las ETA's en los últimos decenios parece guardar relación, en muchos países, con el hallazgo de microorganismos patógenos en los alimentos. El Análisis de Riesgos consiste en componentes fundamentales identificados como la gestión de riesgos, la comunicación en torno a los riesgos, y la evaluación de riesgos; ha surgido como un modelo estructurado orientado al mejoramiento de nuestros sistemas de control de los alimentos. Tiene como objetivo central producir alimentos inocuos, reducir la incidencia de las enfermedades transmitidas por los alimentos y facilitar su comercio nacional e internacional (FAO/OMS, 2005).

II.3.3 Prevalencia de los microorganismos patógenos.

De manera general, la inocuidad del alimento guarda proporción con la exposición, la capacidad del patógeno para sobrevivir y las condiciones de preparación o procesamiento que afecten su desarrollo. En el caso particular de la frutas y hortalizas se requiere de un modelaje de la evaluación de la exposición que provea información acerca de la concentración inicial del microorganismo implicado, las condiciones de almacenamiento, transporte, distribución y potencial de desarrollo (desde la contaminación hasta el consumo del alimento), la prevalencia del microorganismo en los puntos críticos del proceso, así como los hábitos de consumo. Los riesgos de contaminación pueden abatirse a través de una educación entre los trabajadores, en los sectores de ventas a granel y del público en general. La difusión del conocimiento propicia un manejo adecuado de los productos hortofrutícolas, limita las oportunidades de contaminación cruzada, y la aplicación oportuna y correcta de la temperatura durante el almacenamiento del alimento listo para consumir. Por ejemplo, Sewell y Farber (2001), destacan que la contaminación cruzada en las barras de ensaladas llega a ocurrir a través de eventos u operaciones relacionadas tanto en las empresas como por los propios consumidores. Condición similar es aplicable para cada tipo de alimento, caso particular, el jugo de apio, objeto de estudio en este trabajo. Especialmente problemático es el caso de las frutas y hortalizas, que comúnmente se consumen crudas. No existe una etapa que permita asegurar la eliminación o inactivación de

algún patógeno, o un nivel que podría considerarse admisible, previo al consumo. La ausencia de tratamientos letales para los microorganismos patógenos durante la producción, procesamiento o preparación, no elimina la eventualidad del riesgo de enfermar asociado a su consumo.

II. 4 Agentes patógenos e indicadores comunes en frutas y hortalizas

II.4.1 Concepto y utilidad de los microorganismos indicadores

En los alimentos existe una gran diversidad de microorganismos. Algunos sobreviven, otros se multiplican y otros más se inactivan. Además, existe una estrecha interrelación entre los distintos tipos microbianos. La diversidad permite agruparlos en función de la actividad o potencialidad que exhiban en los alimentos (Fernández, 2008).

El alimento contaminado directa o indirectamente con materia fecal animal o humana puede teóricamente contener microorganismos patógenos y en consecuencia resultan potencialmente peligrosos. El patógeno en los productos generalmente se encuentra en baja concentración y tiende a inactivarse; así, la probabilidad de detectarlo es mínima. Adicionalmente, los procedimientos usados para el aislamiento y confirmación son lentos y costosos (Blackburn y Unilver., 2003). Por lo tanto, se recurre a determinar grupos o especies de bacterias (no patógenas) de origen fecal, usualmente presentes a altas concentraciones. Estos grupos o especies son designados como “indicadores” (Ray, 1996).

Los microorganismos indicadores y/o productos de su metabolismo se usan para una variedad de propósitos que incluyen la evaluación de la inocuidad y la valoración de las medidas de control sanitarias. El uso de microorganismos indicadores depende de los criterios microbiológicos de cada producto en particular. Estos criterios pueden ser normas (límites) de calidad microbiana impuestos por agencias gubernamentales o bien son estipuladas en contratos de compra-venta. La FDA/CFSAN, (2001) considera que generalmente la ausencia o bajas concentraciones de microorganismos indicadores en los alimentos sugieren que los

alimentos no han sido expuestos a condiciones que permitan la contaminación por patógenos o la oportunidad para que estos desarrollen.

En general el contenido microbiano de las frutas y hortalizas refleja la condición de su entorno durante el cultivo (Nguyen y Carlin, 1994). Así, la calidad sanitaria de un alimento está muy determinada por los cuidados en materia de higiene que se apliquen durante la producción. Las malas prácticas sanitarias pueden resultar en pérdida de calidad, daño al producto y, en algunos casos, un peligro a la salud. El recuento de estos indicadores nos proporciona una idea sobre la calidad y posible mal uso de procedimientos orientados a la protección de la inocuidad, pero es de escaso valor para predecir la presencia de patógenos (Thunberg y col. 2002).

II.4.2 *Enterobacteriaceae*

En Europa, esta familia de bacterias se emplea frecuentemente como indicador. Se le asigna un significado similar a la de los coliformes, pero con una mayor cobertura cuando se aplica a los alimentos (Fernández, 2008). Mossel y col. (1963), recomendaron el examen de alimentos para *Enterobacteriaceae* como alternativa para los coliformes. Se trata de bacterias definidas en términos taxonómicos (en contraste con los coliformes), como lo es también *Salmonella* en la microflora del alimento.

II.4.3 *Salmonella* spp.

Salmonella es el microorganismo más ampliamente estudiado entre los patógenos que pueden ser aislados de los alimentos. Su hábitat natural es el contenido intestinal de los animales, incluido el hombre. Se libera al medio ambiente expulsada por las heces. Muestra capacidad para sobrevivir a diversas condiciones ambientales, cualidad que favorece su aislamiento de diversos materiales. Se le ha aislado del medio ambiente, hortalizas en cultivo, animales silvestres, domésticos, de explotación, de humanos enfermos, asintomáticos o convalecientes, y de utensilios y fómites (Fernández, 2008). De manera natural los vegetales se contaminan con *Salmonella* por contacto directo o indirecto con materia fecal animal o humana. Los agentes etiológicos asociados a casos y brotes por frutas y

hortalizas son vastos pero predominan aquellos con *Salmonella* y *Shigella* spp. (Beuchat, 2002, Sewell y Farber, 2001, Sivapalasingam y col. 2004). Es posible detectarles en cereales, frutas y verduras en la pre cosecha. Si se riega un cultivo como las cebollas con agua contaminada, se detecta el patógeno en ellas un día después (Fernández, 2008). La fauna nociva (roedores, insectos) juega un papel prominente como reservorio y vehículo de diseminación. S. Hartford se asoció a un brote por jugo de naranja no pasteurizado en 1995 (Tauxe y col. 1997). Finalmente, *Salmonella* se ha asociado en brotes por jitomate, sandía, melón, naranja, sidra y germinados, entre muchos más. Garcia-Villanova (2002) en un estudio en España observaron una incidencia de 7.7 % en verduras como col, lechuga, apio entre otros, destacándose *Salmonella* Typhimurium como el más frecuente. Cabe destacar que la notable capacidad de adherencia de *Salmonella* y las características propias de la hortaliza dificultan seriamente los procedimientos destinados a su remoción (Ukuku y Feet., 2002). Resulta evidente que, no obstante la abundante literatura acumulada sobre la ecología de la *Salmonella* y la epidemiología de la salmonelosis, aún existen vacíos de información en relación con algunos alimentos y situaciones específicas (por ejemplo, el consumo de jugo de apio) que tienen que ver con la evaluación de riesgos.

II.4.3.1 Salmonelosis

La etiología del cuadro diarréico es variada. Lo pueden ocasionar virus como los norovirus, parásitos como *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium* y bacterias entre las que se encuentran *E. coli*, *Campylobacter*, *Shigella* y *Salmonella*. La infección se puede adquirir por consumo de agua o alimentos contaminados. Merecen destacarse los alimentos cocinados que no reciben un adecuado manejo post cocción, o cualquier alimento que se consuma crudo. Por lo general, los productos de origen animal encabezan los incidentes de salmonelosis; las frutas y hortalizas participan con menor frecuencia (FDA/CFSAN, 2001). Algunos brotes de salmonelosis se atribuyen a productos agrícolas que se consumen crudos. Entre estos se conocen tres brotes multiestatales en Estados Unidos por consumo de jitomates crudos; uno fue causado por *S. Javiana* en 1992, otro por *S. Montevideo*

en 1993, y el tercero en 2000 por *S. Bailon* (CDC, 2000). En otra investigación (CDC, 1991) en 23 entidades de EUA se reportaron casos de salmonelosis (serovar Poona), todos por consumo de melones. No se obtuvo la información del origen de los melones, pero se logró establecer que habían sido distribuidos de dos condados de Texas. La incidencia actual del padecimiento se desconoce en virtualmente todos los países. Para el período 1973-1987 en EUA se registraron en el CDC, 790 brotes de salmonelosis con 55,864 casos y 88 muertes (Bean y Griffin, 1990). En EUA se calculan 2-4 millones de casos de salmonelosis por año, con aproximadamente 500 muertes y se estima que el número de casos de salmonelosis que se reportan al CDC representa solamente 1-5% de los que realmente ocurren (Tauxe, 1997)

La frecuencia de brotes de salmonelosis reportados mensualmente permite observar una clara distribución estacional, observándose mayor incidencia en los meses calurosos con máximo en julio y mínimo en enero (Bean y col., 1997).

III. HIPÓTESIS

Salmonella tiene la capacidad para multiplicarse activamente en jugo de apio.

IV. OBJETIVOS

IV.1 General

Determinar el comportamiento de *Enterobacteriaceae* y *Salmonella* en jugo de apio

IV.2 Específicos

- Cuantificar el contenido de *Enterobacteriaceae* nativa en jugo fresco de apio
- Evaluar el comportamiento de *Salmonella* en jugo fresco de apio
- Valorar la influencia de la flora asociada en la dinámica de crecimiento de *S. Typhimurium* en jugo de apio.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 Materiales

V.1.1 Equipo

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

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

Balanza granataria, sensibilidad 0.1 g, Modelo No. CT200-S (OHAUS)

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

Bolsas de polietileno en rollo sin marca comercial diferentes tamaños

Bolsas de polietileno capacidad 500 mL (Whirl - Pak)

Campana de flujo laminar (Alder y Veco)

Cuenta colonias (Québec Reichert-Jung)

Homogenizador (Stomacher, Seward 400)

Horno para esterilización (Shel-lab)

Incubadora de 35° (Precision Scientific, Seward 400)

Incubadora de 22° (Precision Scientific, Seward 400)

Potenciómetro (Jenway), modelo 3510

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 Base Sangre (ABS), (BD Bioxon)

Agar cuenta estándar (ACE), (BD Bioxon)

Agar rojo violeta bilis suplementado al 1% de glucosa (ARVBG), (BD Bioxon)

Agar sulfito bismuto (ASB), (BD Bioxon)

Agar xilosa lisina desoxicolato de sodio (XLD), (BD Bioxon)

Agar soya tripticasa (AST), (BD Bioxon)

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

Agar hierro lisina (LIA), (BD Bioxon)

Caldo tetracionato (CTT), (BD Bioxon)
Caldo Rappaport Vassiliadis (CRV), (BD Bioxon)
Caldo Soya tripticasa (CST), (BD Bioxon)
Caldo urea, (BD Bioxon)

V.1.3 Reactivos y soluciones

Diluyente de peptona 0.1% (Peptona de caseína, BD Bioxon) (DP)
Solución salina isotónica (SSI) 0.85% (Cloruro de sodio, Productos Químicos Monterrey)
Coloración de Gram (cristal violeta, safranina, lugol, alcohol etílico 95%), (Sigma Chemical Co.)
Rojo de metilo, (Sigma Chemical Co.)
Antisuero polivalente A-I & Vi para *Salmonella* (DIFCO)

V.1.4 Material biológico

Cepa de *S. Typhimurium* ATCC 14028.

V.2 Métodos

V.2.1 Obtención y preparación de las muestras

V.2.1.1 Jugo de apio obtenido del mercado local

En los mercados públicos algunos puestos preparan y expenden jugos y licuados a base de frutas y hortalizas. Se recolectaron 70 muestras de jugos de apio recién preparados y se realizó un estudio observacional sobre la infraestructura del local que expende dicho alimento. Las muestras de jugo de apio fresco se transportaron en hielera al laboratorio para su procesamiento en un tiempo no mayor a dos horas.

V.2.1.2 Preparación del jugo de apio en el laboratorio.

El jugo de apio se preparó a partir de tallos de la planta previamente lavados con agua potable. Una vez escurridos se frotaron con torunda humedecida en peróxido de hidrógeno comercial (3.18 %) diluido al 50% con agua destilada (Kniel y col.,

2003). Después de secarse bajo flujo laminar por 15 min los tallos se introdujeron en vaso de licuadora estéril para extraer el jugo y posteriormente filtrarse a través de gasa estéril, el cual se conservó a 4-7°C hasta su análisis (Figura 2).

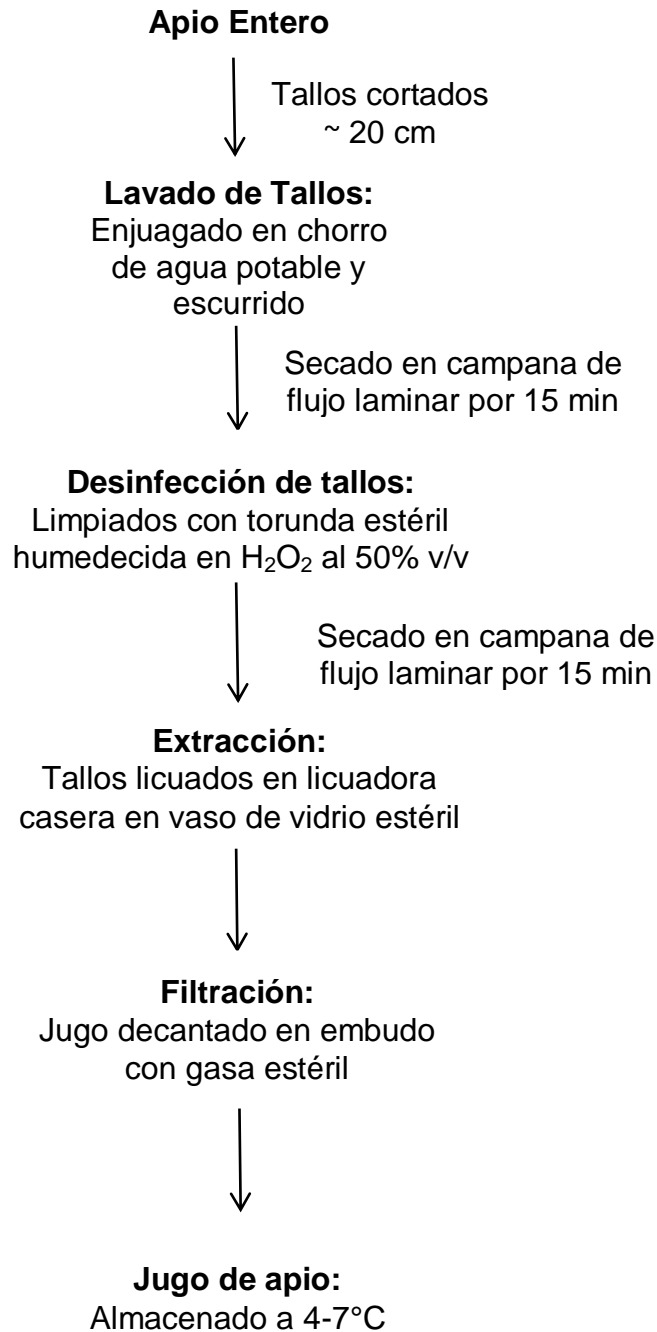


Figura 2. Obtención de jugo de apio en el laboratorio en condiciones asépticas.

V.2.2 Análisis microbiológicos.

V.2.2.1 Bacterias indicadoras

V.2.2.1.1 *Enterobacteriaceae*

El recuento se realizó por la técnica de vaciado en placa con agar bilis rojo violeta suplementado con 1% de glucosa (ABRV+G), y colocando una bicapa en la parte superior de la placa incubando a 35°C/ 24h (Figura 3) (Kornacki y Johnson, 2001). Posterior al tiempo de incubación se realizó un conteo de las colonias en un cuenta colonias.

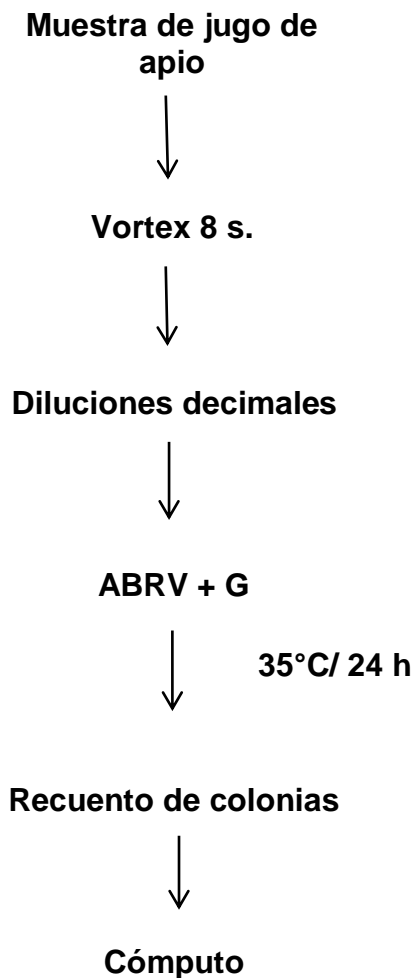


Figura 3. Recuento de *Enterobacteriaceae* por vaciado en placa.

V.2.2.1.2 Detección, aislamiento e identificación de *Salmonella*.

La detección de *Salmonella* se realizó siguiendo el cultivo tradicional según se describe en el esquema general de detección y aislamiento (Figura 4). El procedimiento consistió en una etapa de preenriquecimiento en CST a 35°C por 24 horas. Una segunda etapa de enriquecimiento selectivo en caldos CTT y CRV a 43°C/24h. El aislamiento se consiguió en agar XLD y agar sulfito-bismuto. Se seleccionaron colonias con morfología típica (agar XLD: colonias pequeñas, color rosa con o sin centro negro; agar sulfito-bismuto: colonias con centro negro, precipitado negro con brillo metálico alrededor), o en su caso 5-7 colonias sospechosas, para realizar pruebas bioquímicas (Edwards y Ewing, 1972; Koneman y col. 1983).

- Fermentación de lactosa, sacarosa y glucosa (TSI)
- Descarboxilación de lisina y arginina (LIA)
- Metabolismo de la urea (caldo urea)

Las cepas con patrón típico de *Salmonella* se confirmaron mediante aglutinación con antisuero poly A-I & Vi (Difco™).

V.2.3 Comportamiento de *Enterobacteriaceae* y *S. Typhimurium* en jugo de apio preparado en mercado público y en laboratorio

V.2.3.1 Obtención y selección de cepa de *Salmonella* resistente a rifampicina.

Preparación del inóculo: se utilizó la cepa ATCC 14028 de *S. Typhimurium* resistente a rifampicina. Las cepas se prepararon siguiendo la técnica de Kaspar y Tamplin (1993). Un cultivo de 18 h desarrollado a 35°C en CST. Mediante extensión por superficie se inoculó 100 µL de la suspensión sobre AST suplementado con rifampicina (AST+R, 100 ppm) e incubó a 35°C /48-72 h. Las colonias desarrolladas se estriaron en cajas con AST+R y se conservaron en refrigeración (4-7°C) en tubos de AST+R.

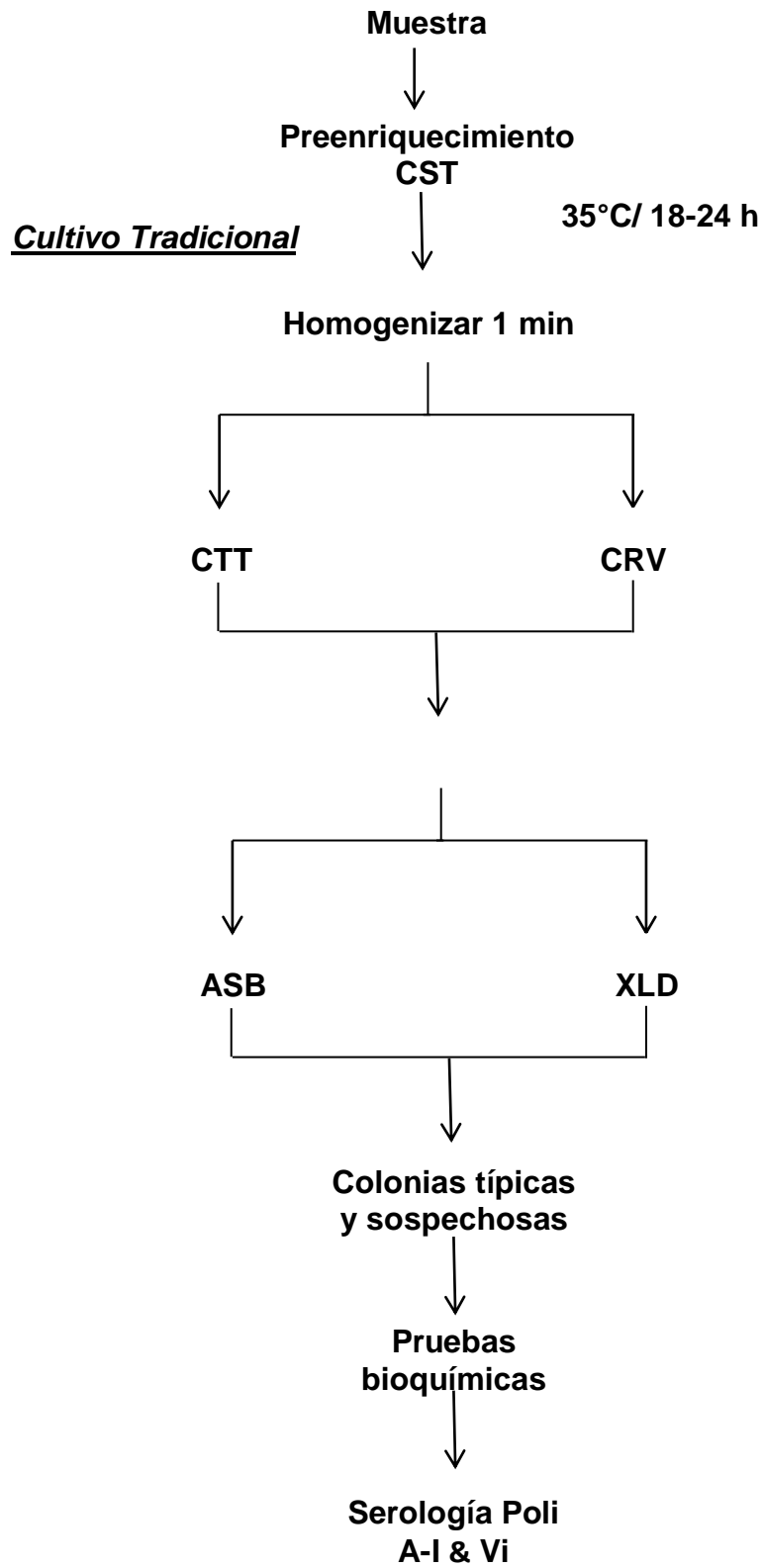


Figura 4. Detección de *Salmonella* por cultivo tradicional.

V.2.3.2 Comportamiento a 22°C de *Enterobacteriaceae* nativa y *Salmonella* en jugo de apio preparado en un mercado público y en el laboratorio.

La microbiología de los alimentos, especialmente los que no han recibido algún tratamiento antimicrobiano, es en general muy compleja. El problema se acentúa en aquellos que sostienen bien el desarrollo bacteriano. Cualquier patógeno que ingresa al alimento enfrenta entonces una competencia de grado variable que puede afectar intensamente su tasa de desarrollo o de sobrevivencia. En las hortalizas crudas, específicamente en el apio, entre la flora nativa o la asociada al tiempo de la contaminación por el patógeno, se pudiera esperar que bacterias del tipo de las *Enterobacteriaceae* (como grupo indicador), tengan un efecto sobre *Salmonella*, si consideramos el hecho de que comparten características ecológicas similares. El efecto suele ser de naturaleza antagónica. Por ello, se seleccionó al grupo *Enterobacteriaceae* como el mejor representante en el apio de la flora asociada a dicho patógeno. Esta interferencia se expresa por medio de diversos mecanismos que incluyen la producción de sustancias antagonistas, cambios en el microambiente bacteriano y reducción de los nutrientes (Brook, 2003). Para seguir el comportamiento de la *Salmonella* y la influencia por el grado de frescura del jugo en términos del nivel de población bacteriana acompañante (*Enterobacteriaceae*), se utilizó como referencia los resultados del contenido de éstas en el puesto de elaboración del jugo. En algunas muestras existía una clara tendencia a detectar concentraciones muy elevadas de *Enterobacteriaceae* (8 log UFC/mL); en otros, los niveles oscilaban alrededor de 4 log UFC/mL. Las muestras preparadas en el laboratorio (aplicando lavado y desinfección) contenían un mínimo de 3 log UFC/mL. Dispusimos así de muestras de jugo de apio con contenido de *Enterobacteriaceae* bajo (3 log UFC/mL), medio (5 log UFC/m) y alto (7 log UFC/mL). Los jugos procedentes del mercado se inocularon con 4 log UFC/mL de *Salmonella* al igual que el jugo elaborado en el laboratorio. La figura 5 muestra el comportamiento de *Salmonella* en jugos con contenido alto, medio y bajo de *Enterobacteriaceae* nativas de los propios jugos (Figura 5).

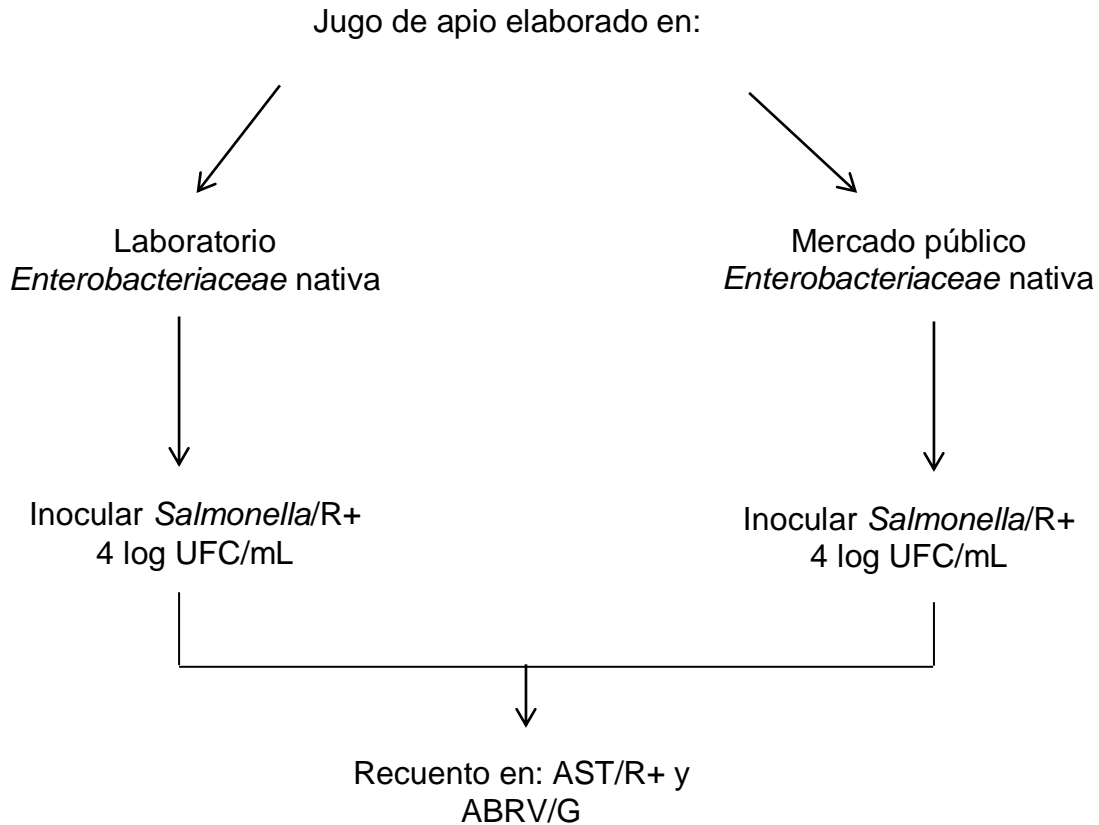


Figura 5. Evaluación a 22°C de *Salmonella* inoculada y *Enterobacteriaceae*

V.2.3.3 Comportamiento de *Salmonella* en jugo de apio preparado en el laboratorio con tres niveles de inóculo de *Enterobacteriaceae*, incubado a 22°C por 24 h.

Se efectuó un estudio sobre la dinámica de crecimiento de *Salmonella* y *Enterobacteriaceae* en jugo de apio en los que se ajustó el contenido inicial con niveles bajo, medio y alto de *Enterobacteriaceae*. Este ajuste se efectuó inoculando jugo preparado en el laboratorio con jugo del comercio preincubado 6 h a 35°C (de manera que se obtuviera una máxima población de *Enterobacteriaceae*). Fueron suficientes 400µL y 1.5 mL de este jugo preincubado para que al adicionarse al jugo de laboratorio se obtuvieran respectivamente niveles medio y alto de *Enterobacteriaceae*. Se inoculó 4 log UFC de *Salmonella*/R+ a las tres variantes de jugo (bajo, medio y alto). Periódicamente se efectuó el recuento de *Salmonella* en AST+R y *Enterobacteriaceae* en ABRV+G (Figura 6).

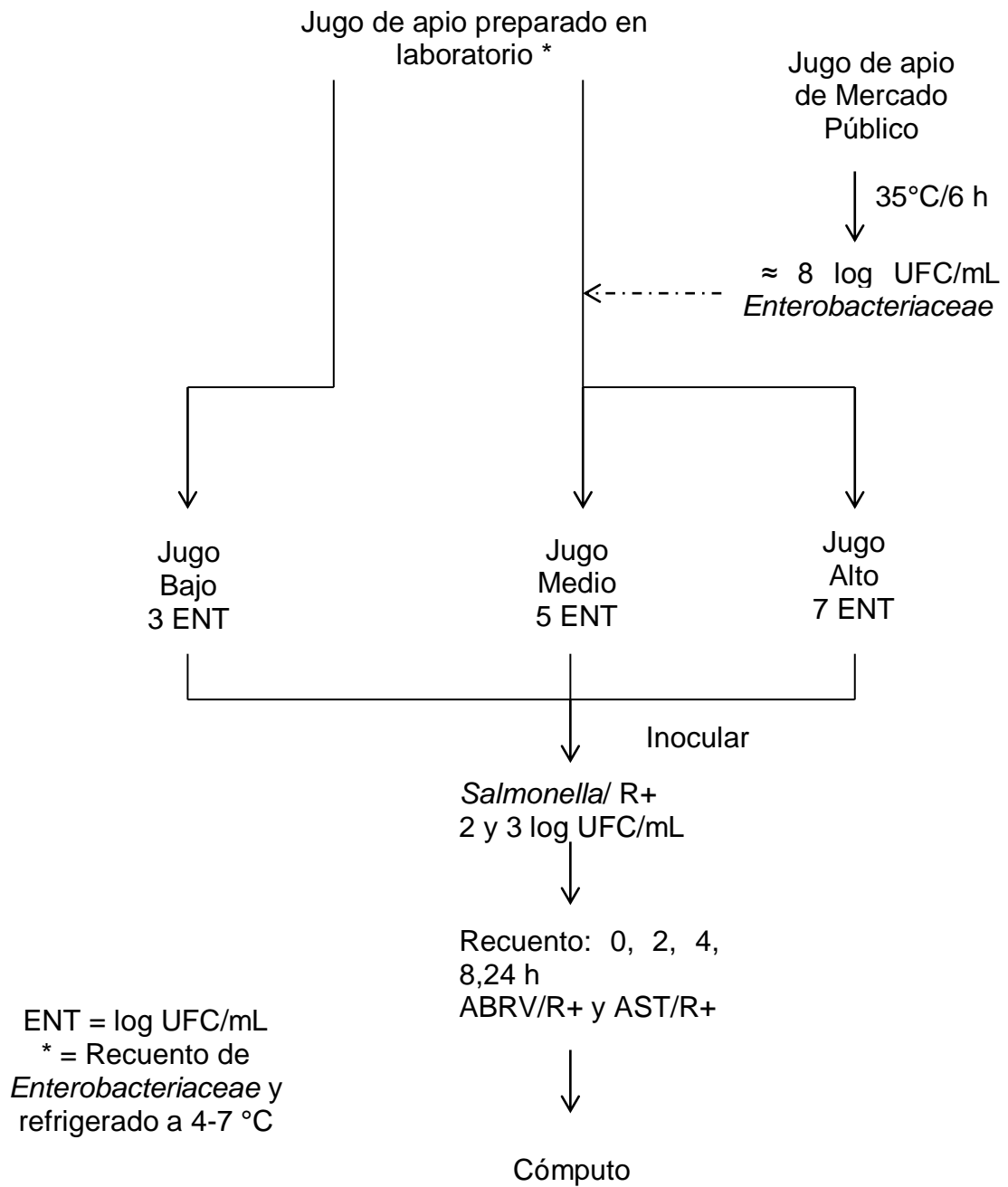


Figura 6. Comportamiento de *Enterobacteriaceae* y *Salmonella* inoculadas en jugos de apio preparado en el laboratorio e incubado a 22°C por 24h

V.2.3.4 Comportamiento de *Enterobacteriaceae* y *Salmonella* en sobrenadante estéril de jugo de apio.

Se evaluó el comportamiento de *Enterobacteriaceae* y *Salmonella* en sobrenadante estéril de jugo de apio incubado. El jugo fresco de apio se inoculó con tres niveles distintos de *Enterobacteriaceae*: bajo (3 log UFC/mL), medio (5 log UFC/mL) y alto (7 log UFC/mL); similar a lo realizado en la Figura 6. Se incubaron por 24h a 22°C, permitiendo el metabolismo de nutrientes o la generación de metabolitos antagónicos al crecimiento de *Salmonella*. Los sobrenadantes estériles se obtuvieron por centrifugación, seguido de filtración bacteriológica de los jugos antes mencionados (Figura 7). De manera concurrente, siguiendo el mismo esquema, en el estudio se incluyó caldo soya tripticasa como control. Se incluyó un control de jugo fresco filtrado sin inoculación previa de *Enterobacteriaceae*. En este material estéril se realizó una prueba re inoculando todos los sobrenadantes con 5 log UFC/mL de *Enterobacteriaceae* e incubando a 22°C por 24 h. Adicionalmente, a los filtrados de jugo de apio que habían sido preparados y que procedían con nivel medio de *Enterobacteriaceae* se les adicionó *Salmonella* con una concentración de 2 log UFC/mL. Los recuentos se llevaron a cabo a las 0, 2, 4, 8, 12 y 24 h de incubación a 22°C (Figura 8).

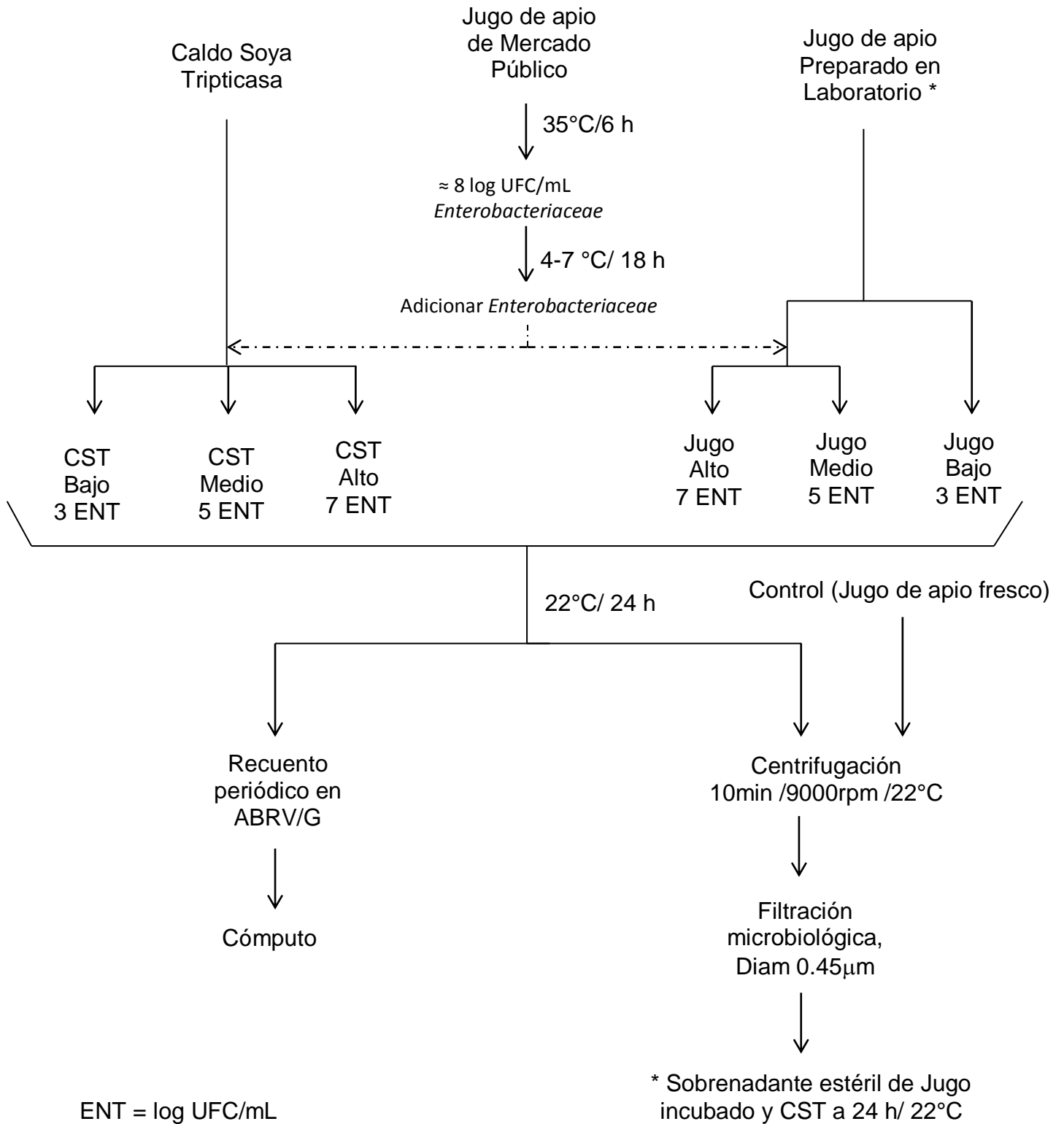


Figura 7. Comportamiento de *Enterobacteriaceae* y obtención de sobrenadante estéril de jugo de apio y CST

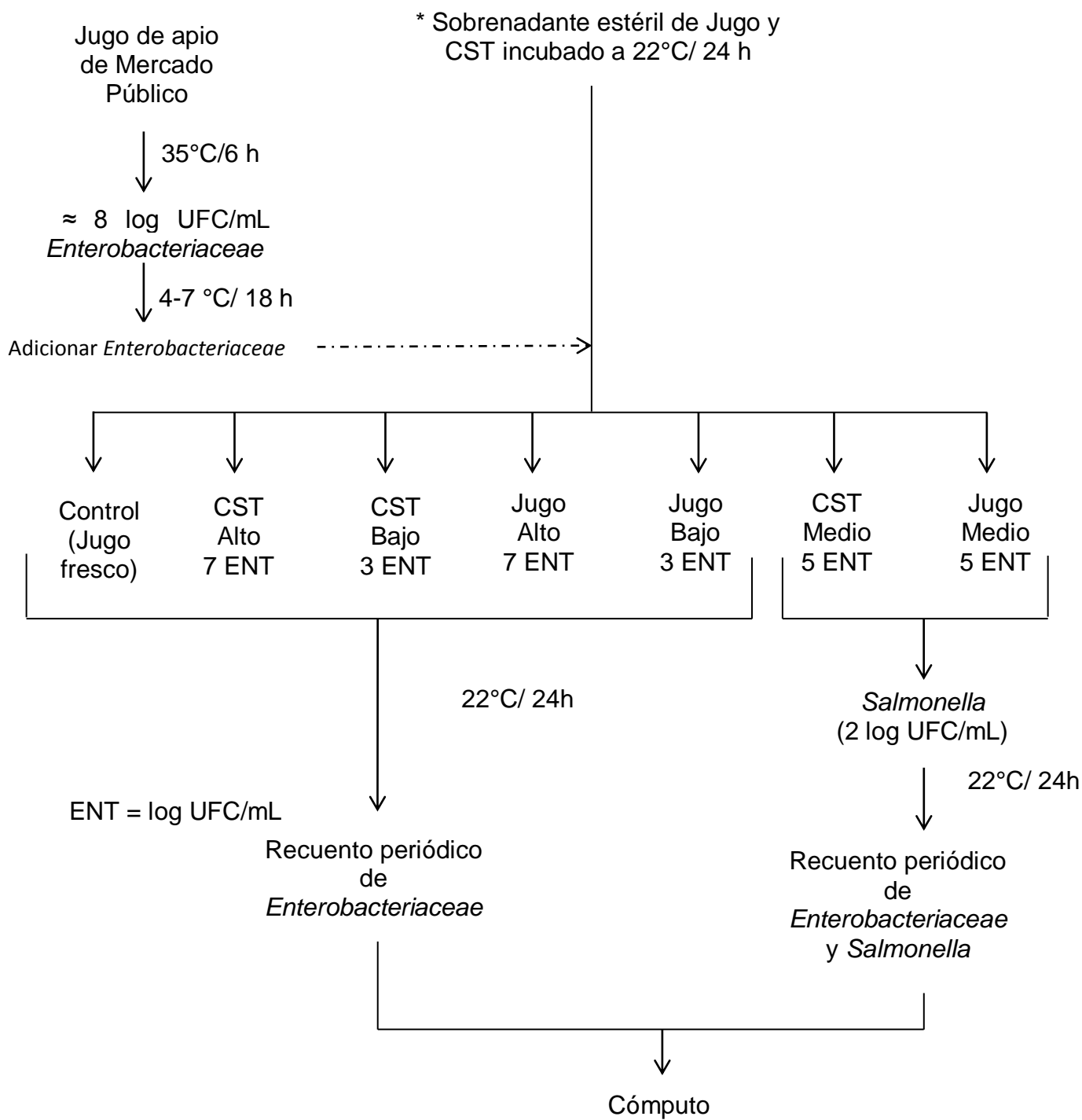


Figura 8. Comportamiento de *Salmonella* y *Enterobacteriaceae* en el sobrenadante estéril a 22°C por 24h.

VI. RESULTADOS

VI.1 Incidencia de *Enterobacteriaceae* en jugo de apio fresco obtenido en mercado local de la ciudad de Querétaro

Se realizó un estudio observacional en el puesto en que se prepara y sirve el jugo de apio. Se apreció una infraestructura inadecuada para el expendio del jugo, deficiencias en las prácticas sanitarias de preparación del jugo incluida una pobre higiene personal por parte del vendedor, un saneamiento deficiente y en ocasiones nulo de superficies de trabajo y de utensilios utilizados en la preparación, así como incierta eficiencia del lavado de la hortaliza y ausencia de desinfección de los tallos del apio.

Al analizar en contenido de *Enterobacteriaceae* de un total de 70 jugos de apio se encontró una población mínima de 3 log UFC/mL, una máxima de 8 log UFC/mL y una media de 5 log UFC/mL. Estos datos muestran congruencia con el estudio observacional

VI.2 Comportamiento de *Enterobacteriaceae* nativa y *Salmonella* en jugo de apio preparado en un mercado público y en el laboratorio a 22° C.

Se inoculó *Salmonella* (4 log UFC/mL) en jugos colectados en el mercado público y su comportamiento se contrastó con el observado en jugo preparado en el laboratorio bajo condiciones asépticas (tallos lavados y desinfectados con peróxido de hidrógeno) (Figura 2). Kniel y col., (2003) habían recurrido a este tratamiento para eliminar patógenos intestinales en jugo de frutas. Nuestro estudio permite evaluar por tanto, el comportamiento de las *Enterobacteriaceae* (como representante de la flora propia del apio) y del patógeno cuando se almacena el alimento a 22°C. El monitoreo se extendió por 8 h considerando que este tiempo es el que corresponde a una jornada laboral donde al inicio se prepara el jugo y aun al final aún queda sobrenadante de jugo preparado.

Cuadro 3. Comportamiento de *Salmonella* en jugo de apio fresco con tres niveles *Enterobacteriaceae* e incubado a 22 ° C

Salmonella
(log UFC/mL)

Horas	Laboratorio	Mercado Público		
	Jugo bajo 3 ENT	Jugo bajo 3 ENT	Jugo medio 5 ENT	Jugo alto 7 ENT
0	4	4	4	4
2	3.3	4.3	4.3	4.3
4	3.7	4.5	4.4	4.5
6	4.2	5	4.6	4.4
8	5.3	5.3	5	4.9

ENT = log UFC/mL *Enterobacteriaceae*

Los resultados muestran un incremento de 1.3 log en la población de *Salmonella* en el Jugo bajo (Cuadro 3), 1 log en el Jugo medio y ninguno en el Jugo alto al cabo de las 8 h de almacenamiento (Cuadro 3). Por su parte, el grupo *Enterobacteriaceae* se multiplica de tal manera que al cabo de 8 h la población se eleva 2.6 log en el jugo bajo elaborado en el laboratorio y 1.7 log el procedente del mercado (Cuadro 4).

Cuadro 4. Comportamiento de *Enterobacteriaceae* (ENT) en jugo de apio fresco a 22°C

Enterobacteriaceae
(log UFC/mL)

Horas	Laboratorio	Mercado Público		
	Jugo bajo 3 ENT	Jugo bajo 3 ENT	Jugo medio 5 ENT	Jugo alto 7 ENT
0	3	3	4.9	7.3
2	4.1	4.2	5.2	7.4
4	4.5	4.5	5.6	7.5
6	5.1	5.0	6.2	8
8	5.6	5.4	6.6	7.6

ENT = log UFC/mL *Enterobacteriaceae*

Por su parte en el jugo medio el incremento fue de 1.7 log y en el recuento en las placas de ABRV-G en el jugo que presentaba 7.3 log UFC/mL, no sólo se mantiene, sino que muestra una caída de 0.4 log UFC/mL al final del periodo (Cuadro 4); el nivel prácticamente se mantiene dentro de las primeras 4 horas, aumentando ligeramente en la hora sexta. (Figura 9).

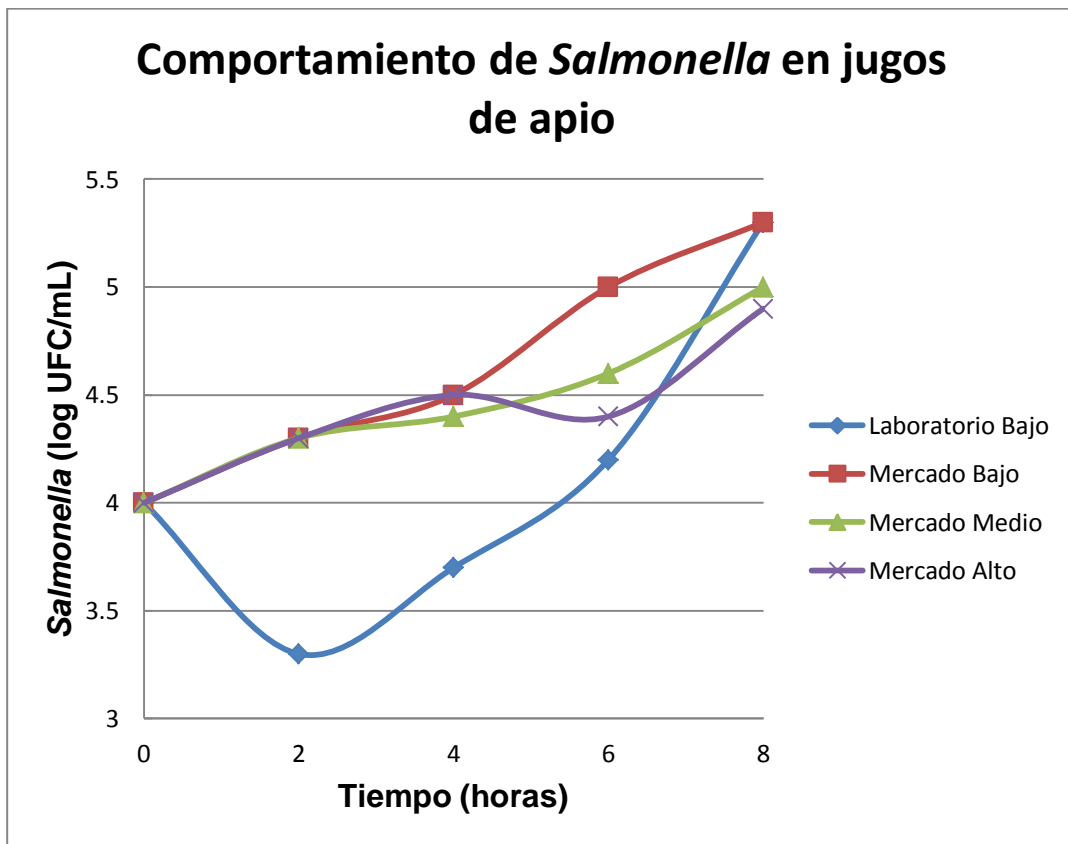


Figura 9. Comportamiento de *Salmonella* en jugos de apio procedentes de mercado público (concentración media y alta de *Enterobacteriaceae*) y preparados en el laboratorio (concentración baja de *Enterobacteriaceae*) a 22°C.

El comportamiento de *Enterobacteriaceae* es distinto en jugo de apio según la población inicial: bajo, 3; medio, 4.9 y alto, 8.3 log UFC/mL respectivamente (Figura 10, Cuadro 4). En el jugo bajo (laboratorio y mercado) hay un marcado desarrollo en 8 h. En el jugo medio, el desarrollo a las 8 h es similar con 1.7 log UFC/mL, y en el jugo alto, se observa una tendencia opuesta, con un descenso al final de la curva.

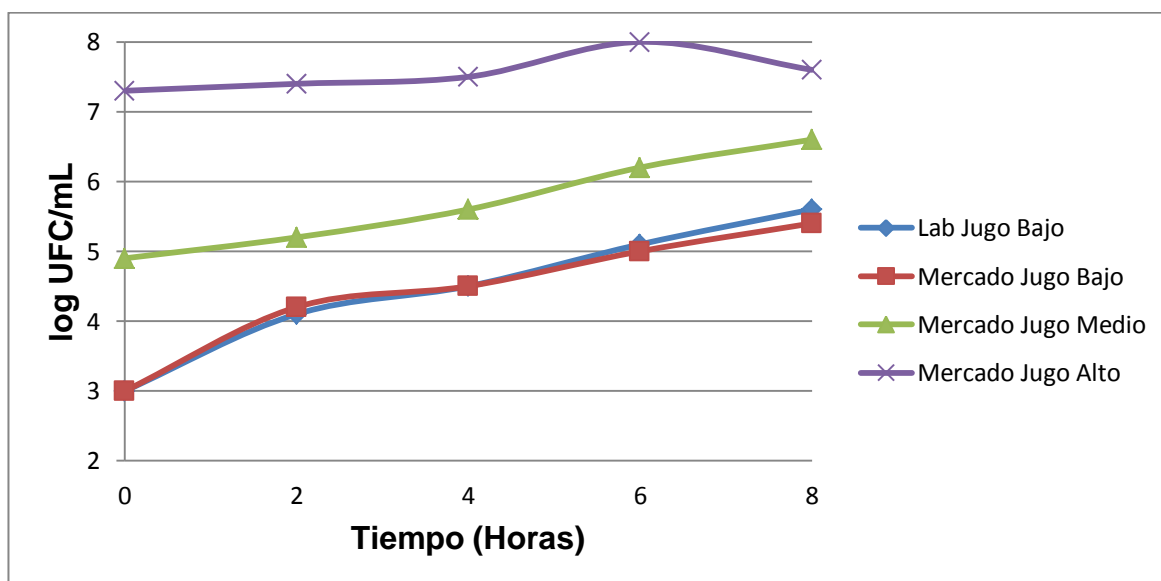
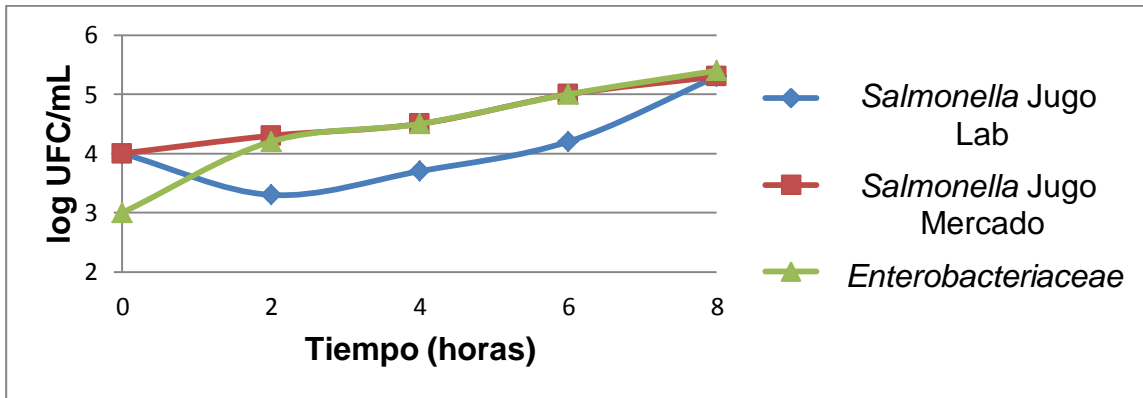
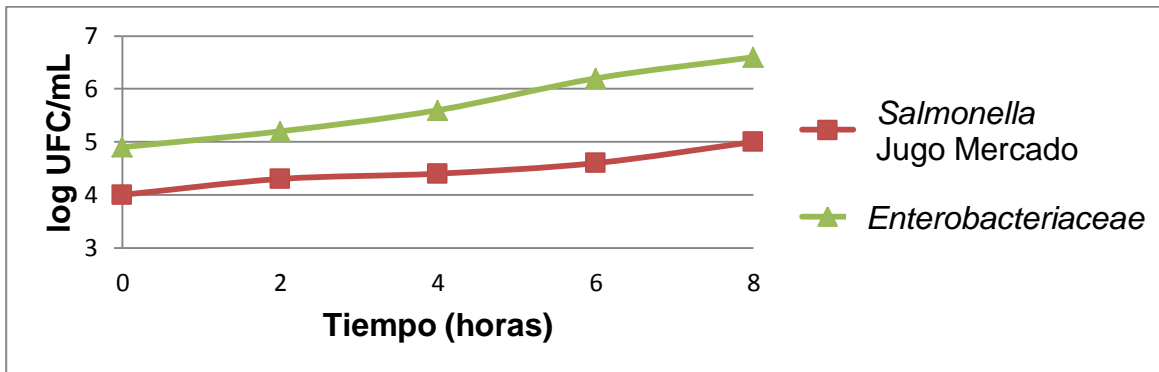


Figura 10. Comportamiento de *Enterobacteriaceae* en jugos de apio procedentes del mercado público (concentración media y alta de *Enterobacteriaceae*) y preparadas en el laboratorio (concentración baja de *Enterobacteriaceae*) a 22°C.

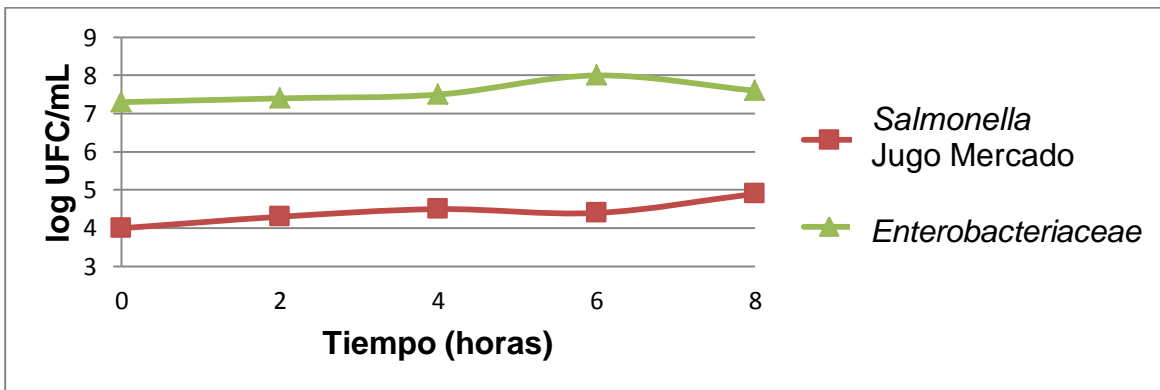
Estos señalamientos son más evidentes cuando se compara gráficamente el crecimiento de *Enterobacteriaceae* y *Salmonella* (Figura 11). En el jugo bajo, con la mejor calidad microbiológica, hay un franco crecimiento tanto de *Enterobacteriaceae* como de *Salmonella* (Figura 11A). Cuando se asocian estos resultados con las maniobras que propician una contaminación cruzada, se destaca su influencia en la elevada población microbiana que se encuentra en el jugo. Si se sigue el procedimiento descrito para la muestra preparada en el laboratorio (Figura 2) o un equivalente, entonces se obtendrían jugos de mejor calidad microbiana.



A. Nivel bajo de *Enterobacteriaceae*



B: Nivel medio de *Enterobacteriaceae*



C: Nivel alto de *Enterobacteriaceae*

Figura 11. Comportamiento de *Enterobacteriaceae* (tres niveles) y *Salmonella* (4 log UFC/mL) en jugo de apio

En el Jugo alto, procedente del mercado público hay una visible afectación del desarrollo de la flora nativa en el jugo, que se continúa con un descenso ligero a las 8 horas.

VI.3 Efecto del contenido de *Enterobacteriaceae* en el comportamiento de *Salmonella* en jugo de apio preparado en el laboratorio y almacenado a 22°C

El comportamiento de *Salmonella* en el jugo no puede genéricamente establecerse en función únicamente de la concentración inicial de flora asociada, representado por el grupo *Enterobacteriaceae*. Este grupo es muy heterogéneo, está constituido por diferentes géneros y especies, de manera que dependiendo de su composición bacteriana cualitativa y cuantitativa, es posible en cada caso un efecto distinto sobre el patógeno. Sugerido también está que la deficiencia en las condiciones higiénicas de su elaboración afecta directamente la probabilidad de obtener un producto de pobre calidad sanitaria. Por ende, en el siguiente estudio se ajusta la concentración de *Enterobacteriaceae* en el jugo a tres niveles, y se evalúa así el comportamiento de *S. Typhimurium* (a niveles de 2 y 3 log UFC/mL) resistente a 100 ppm de rifampicina. Se añade a este estudio un periodo mayor de tiempo del monitoreo para simular la duración de una jornada de trabajo (8 horas) hasta las 24 h, cuando se haga uso de sobrantes al siguiente día. Los resultados de la incubación del jugo procedente del mercado público cuyos recuentos siempre se mostraron elevados hasta de 8 log UFC/mL de flora nativa (*Enterobacteriaceae*) en el jugo de apio. Fue entonces necesario disponer de muestras con tres niveles de *Enterobacteriaceae*: Jugo bajo (3 log UFC/mL), Jugo medio (5 log UFC/mL) y jugo alto (7 log UFC/mL). El crecimiento de *Enterobacteriaceae* fue de: 1.8, 1.5 y 1.0 log UFC/mL para los tres jugos en el orden mencionado a las primeras 8 h (Cuadro 5 y Figura 13). Este comportamiento fue muy similar al observado en el primer estudio (Figura 10) a las 8 h. Los resultados muestran un crecimiento de 5.4, 1.7 y un descenso de 8 log UFC/mL para los jugos bajo, medio y alto respectivamente a las 24 h (Figura 13 y Cuadro 5). Una implicación significativa de estos perfiles de comportamiento es una aparente paradoja: el jugo “sucio” se protege mejor contra

la proliferación de un enteropatógeno contaminante como la *Salmonella*. En el jugo “limpio”, la situación es más peligrosa: ésta desarrolla libremente.

Cuadro 5. Comportamiento a 22°C de *Enterobacteriaceae* (niveles bajo, medio y alto) en jugo de apio preparado en el laboratorio.

Enterobacteriaceae
(log UFC/mL)

Horas	Jugo bajo 3 ENT	Jugo medio 5 ENT	Jugo alto 7 ENT
0	3	4.9	6.9
4	3.8	5.2	7.2
8	4.8	6.4	8
24	8.4	8.1	0

ENT = log UFC/mL *Enterobacteriaceae*

Cuadro 6. Comportamiento a 22°C de *Salmonella* (concentración alta y baja) en jugo de apio preparado en el laboratorio con tres niveles de *Enterobacteriaceae* (bajo, medio y alto).

Salmonella
(log UFC/mL)

Horas	Jugo bajo 3 ENT		Jugo medio 5 ENT		Jugo alto 7 ENT	
0	2	3	2	3	2	3
2	1.5	2.6	1.6	2.6	1.3	2.5
4	1.7	2.5	1.7	2.6	1.8	2.4
8	2.2	3.3	2.4	3.5	1.2	2.2
24	4.4	5.7	0	1	0	1

ENT = log UFC/mL *Enterobacteriaceae*

En lo que corresponde a *Salmonella* inoculada en estos jugos con 2 y 3 log UFC/mL de *Salmonella*, su crecimiento es notablemente similar al de *Enterobacteriaceae* y también a la de *Salmonella* inoculada en jugos del mercado público en el estudio de la Figura 9. *Salmonella* creció en el jugo bajo 2.4 y 2.7 log

UFC/mL con el inóculo inicial de 2 y 3 log UFC/mL respectivamente (Figura 13; 1A y 1B y Cuadro 6). Tanto *Enterobacteriaceae* como *Salmonella* aparentemente no muestran una fase lag bien definida; el crecimiento es exponencial a partir de las 5 h, por lo cual, se aprecia que *Salmonella*, como *Enterobacteriaceae*, encuentra en el jugo fresco un sustrato adecuado para desarrollar. Más adelante se presenta un estudio que específicamente se diseñó para evaluar la dinámica de crecimiento del patógeno en jugo pre incubado, es decir, falto de frescura y abundante en flora asociada. *Salmonella* decreció en el jugo medio: 2 log UFC/mL para un inóculo inicial de 2 y 3 log UFC/mL respectivamente en la gráfica 2A y 2B (Cuadro 6 y Figura 13). Las cifras reflejan la marcada influencia de la flora asociada en el jugo de apio, en especial cuando el inóculo inicial del patógeno es bajo. Por tal razón, en estos productos el cultivo tradicional no fue capaz de detectar *Salmonella* en estos productos. Es importante señalar que la tendencia en las primeras ocho horas es análoga a la primera dinámica con jugos del mercado. Se advierte así, una fase lag de aproximadamente 4 h con fase log hasta las 8 h, y una aparente fase estacionaria que se extiende hasta las 24 horas (Figura 12). Por otra parte, *Salmonella* disminuyó en el jugo alto: 2 log UFC/mL para el inóculo inicial de 2 y 3 log UFC/mL respectivamente en las líneas 3A y 3B (Cuadro 6 y Figura 13). En estas condiciones (7 o más log UFC/mL de *Enterobacteriaceae*), *Salmonella* no muestra indicios de desarrollo y su sobrevivencia se ve disminuida progresivamente hasta las 24 horas.

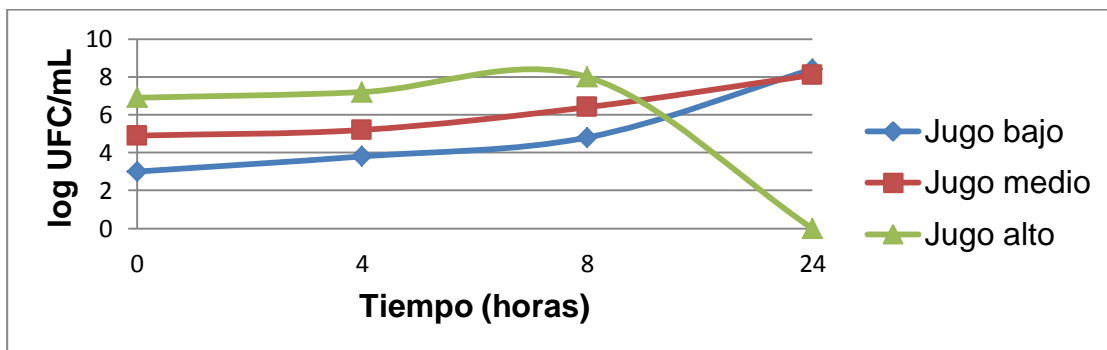


Figura 12. Comportamiento de *Enterobacteriaceae* artificialmente inoculada a tres concentraciones en jugos de apio fresco e incubado a 22°C

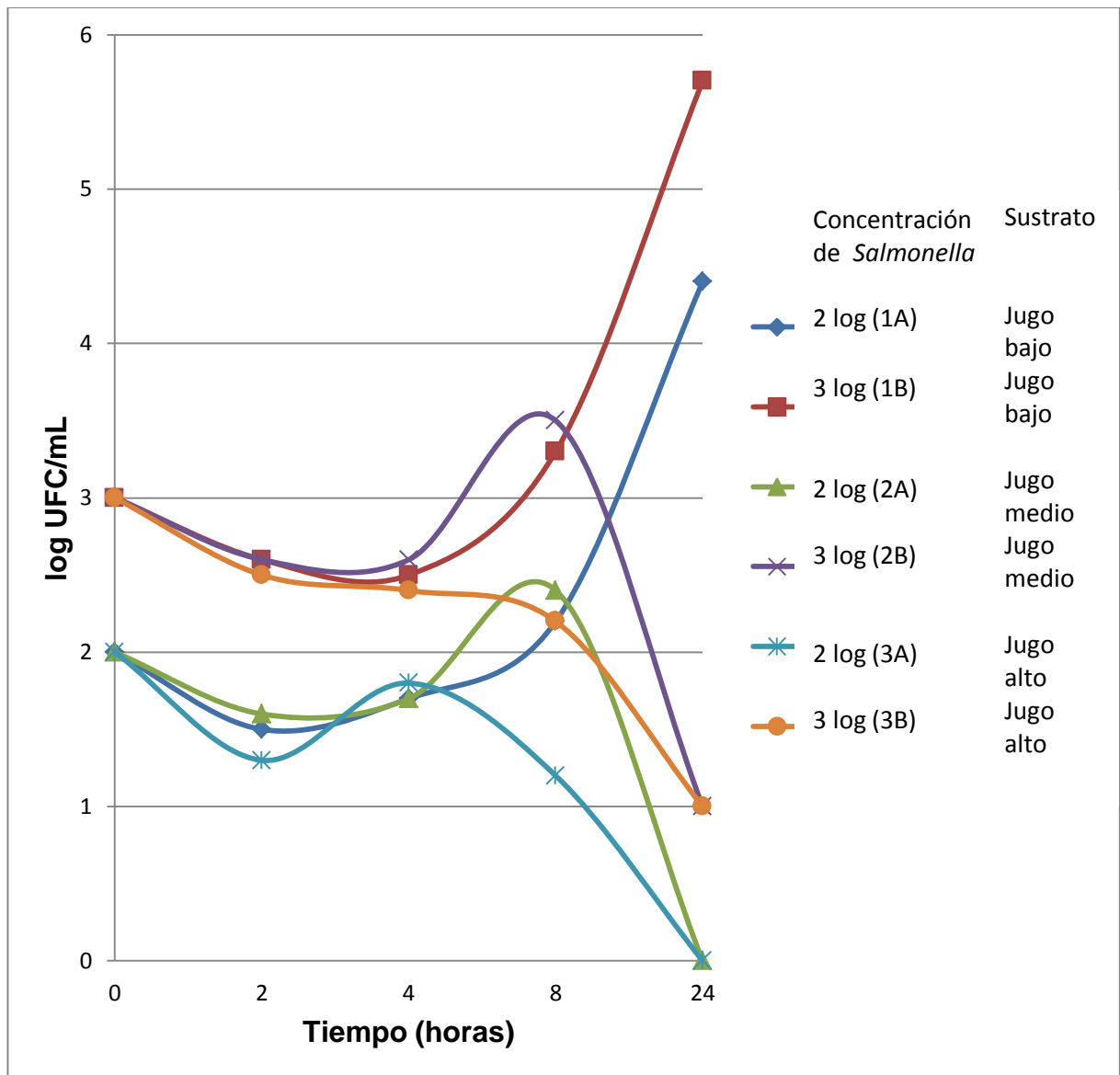


Figura 13. Efecto de tres concentraciones de *Enterobacteriaceae* en el comportamiento de *S. Typhimurium* en jugo de apio preparado en el laboratorio y almacenado a 22°C

VI.4 Valoración del comportamiento de *Enterobacteriaceae* y *Salmonella* en el sobrenadante de jugo de apio previamente incubado a 22°C por 24 horas con tres niveles de *Enterobacteriaceae*.

La dinámica de *Enterobacteriaceae* y *S. Typhimurium* en jugo de apio se encontró afectada por la concentración inicial de la flora asociada (*Enterobacteriaceae*). Parecería pertinente comparar el comportamiento de *Enterobacteriaceae* en el jugo de apio respecto al caldo soya tripticasa. Los resultados se muestran en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Comportamiento de *Enterobacteriaceae* inoculado con tres niveles en jugo de apio fresco y en CST, almacenado a 22°C (Parte I)

Enterobacteriaceae
(log UFC/mL)

Horas	3 ENT		5 ENT		7 ENT	
	Jugo de apio	CST	Jugo de apio	CST	Jugo de apio	CST
0	1.7	3	5.1	4.7	7.1	7
4	1.7	3.2	6	5.5	7.1	7
5	2.6	4.3	6	5.5	8	8.3
9	2.5	4.3	7.1	7.4	8.3	8.4
10	2.6	4.5	7.2	7.4	7.9	8.5
12	2.7	4.4	8	8.1	7.9	8.5
15	5	7.4	8.2	8.2	7.8	8.6
21	6.7	8.4	7.7	8.5	7.8	8.6
24	7.7	8.7	6.4	8.6	4.6	8.1

ENT = log UFC/mL *Enterobacteriaceae*

En general, el CST resultó más propicio para el desarrollo bacteriano que el jugo de apio. Sistemáticamente la población máxima final de *Enterobacteriaceae* fue 1-3.5 log UFC/mL superior en el CST (Cuadro 7 y Figura 14). Finalmente se llevó a cabo un estudio para conocer la dinámica de *S. Typhimurium* y de *Enterobacteriaceae* en el sobrenadante de jugos previamente inoculados con *Enterobacteriaceae*, incubados por 24 h y esterilizados por filtración. De manera concurrente en los

mismos términos descritos, se aplicó un estudio en CST. El objetivo implicado consiste en determinar el efecto de la acumulación de productos del metabolismo de *Enterobacteriaceae* durante su incubación en el jugo (y de manera comparativa en CST), la influencia de la densidad de la flora asociada, o algún otro factor en el comportamiento de ambos microorganismos a partir del término del experimento de la Figura 14.

Las líneas 1, 2 y 3 (de la Figura 14) hacen referencia al jugo de apio previamente incubado, y las líneas 1', 2' y 3' (Figura 15) corresponden a los recuentos realizados en los sobrenadantes (centrifugados y filtrados) obtenidos de las líneas 1, 2 y 3. La misma relación es válida para las líneas I, II, y III con las líneas I', II', y III' aplicables al CST (Figuras 14 y 15).

Las líneas con el mismo número (sea arábigo o romano), representan la dinámica de *Enterobacteriaceae* en jugos o CST que han sido preparadas con el mismo nivel de inóculo: I y 1 con nivel bajo (3 log UFC/mL *Enterobacteriaceae*), II y 2 con nivel medio (5 log UFC/mL *Enterobacteriaceae*) y III y 3 con nivel alto (7 log UFC/mL *Enterobacteriaceae*) como se muestra en el Cuadro 7 para el tiempo 0.

En la Figura 15 se muestran los conteos de *Enterobacteriaceae* y *S. Typhimurium* cuando se inocularon en los sobrenadantes referidos. En el primer caso las bacterias, después de una breve fase lag, se multiplican sin interrupción, en el CST (I') hasta las 48 h, en armonía con la ausencia de factores inhibitorios significativos. En cambio, en el jugo de apio (1'), a las 36 h se inicia una caída en la población de *Enterobacteriaceae*. Es evidente la existencia de factores o sustancias presentes en el jugo que provocan que las bacterias no puedan crecer.

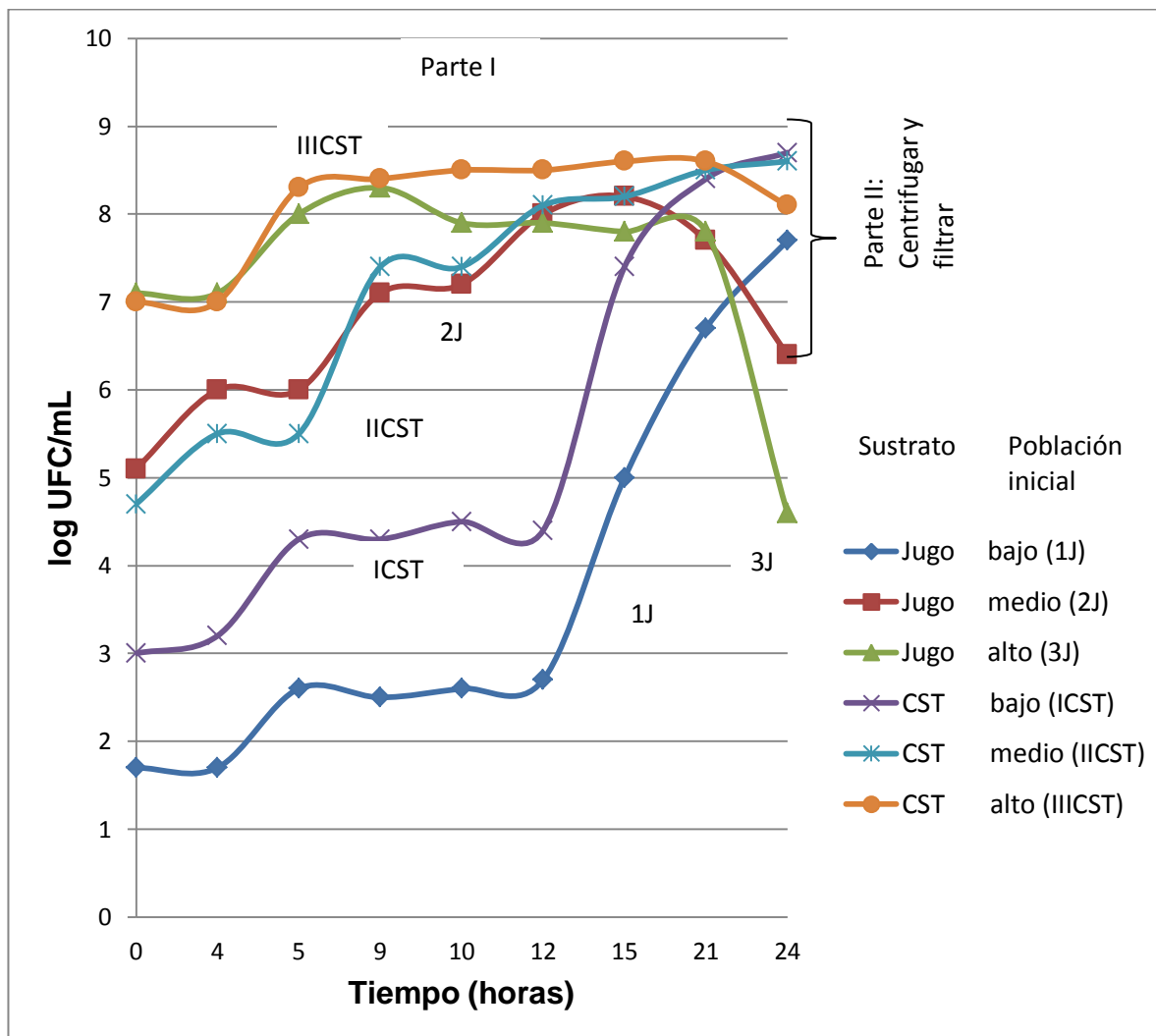


Figura 14. Comportamiento a 22°C de *Enterobacteriaceae* según nivel inicial inoculado con tres niveles en jugo de apio fresco y en CST.

La línea designada Control en la Figura 15, consiste en jugo de apio fresco también esterilizado por filtración, que no ha sido incubado. Se encontró una semejanza notable con el comportamiento de *Enterobacteriaceae* en estudios previos que se ilustraron en la Figura 9 y Figura 12. Esta ausencia de fase estacionaria se encuentra más drásticamente expresada cuando se ha partido de un nivel de *Enterobacteriaceae* en el jugo cercano a 7 log /mL hasta las 48 h, (si se considera el tiempo transcurrido desde la incubación inicial en el jugo fresco). El periodo de

24 – 48 horas corresponde a la incubación del sobrenadante previamente esterilizado. Es el caso de la Figura 14 donde de manera coincidente con los otros ensayos semejantes, cuando la concentración de estas bacterias se aproxima a los 8 log UFC/mL, se inicia la caída referida en la densidad bacteriana de manera más pronunciada. Con el inóculo medio, en CST el comportamiento de *Enterobacteriaceae* es similar al del inóculo bajo (II', Figura 15); en el jugo, en cambio (2', Figura 15), la población de estas bacterias muestra un caída progresiva hasta la casi extinción a las 24 h. Por su parte, ante el inóculo alto, en CST la población de *Enterobacteriaceae* se mantiene prácticamente sin cambio hasta el final del experimento.

En el jugo la tendencia a la inactivación es muy similar a la que se observa en el jugo de concentración media (2', Figura 15). La población final de *Enterobacteriaceae* es semejante cuando se parte de inóculo bajo (I') y medio (II') en el CST. Sin embargo, en el caso del inóculo alto (III'), la población de estas bacterias ya no se incrementa, tan solo se mantiene. Una explicación plausible al respecto es que los nutrientes disponibles en el CST se han agotado más rápidamente ante concentraciones elevadas del inóculo inicial. Adicionalmente no es muy factible que al contrario de lo que podría acontecer en el jugo de apio, en el CST difícilmente se sintetizan y concentran compuestos con alto poder antimicrobiano.

El comportamiento de la *Salmonella* en el sobrenadante estéril se estudió únicamente en el jugo de concentración media de *Enterobacteriaceae* y en CST. En el CST el patógeno se multiplica progresivamente con breve fase lag seguida de un incremento muy discreto hasta las 24 h. En el jugo, desde el tiempo 0 en el sobrenadante (Figura 15), el germen pierde viabilidad, como en el caso anterior hasta la virtual extinción a las 24 h. Ambos microorganismos (*S. Typhimurium* y *Enterobacteriaceae*) se comportan de manera muy similar en CST y en el jugo sobrenadante esterilizado ante un inóculo medio de *Enterobacteriaceae*. En el jugo medio se observa una disminución progresiva en la parte dos hasta las 24 horas de 4.9 log UFC/mL (100%) (Cuadro 8 y Figura 15).

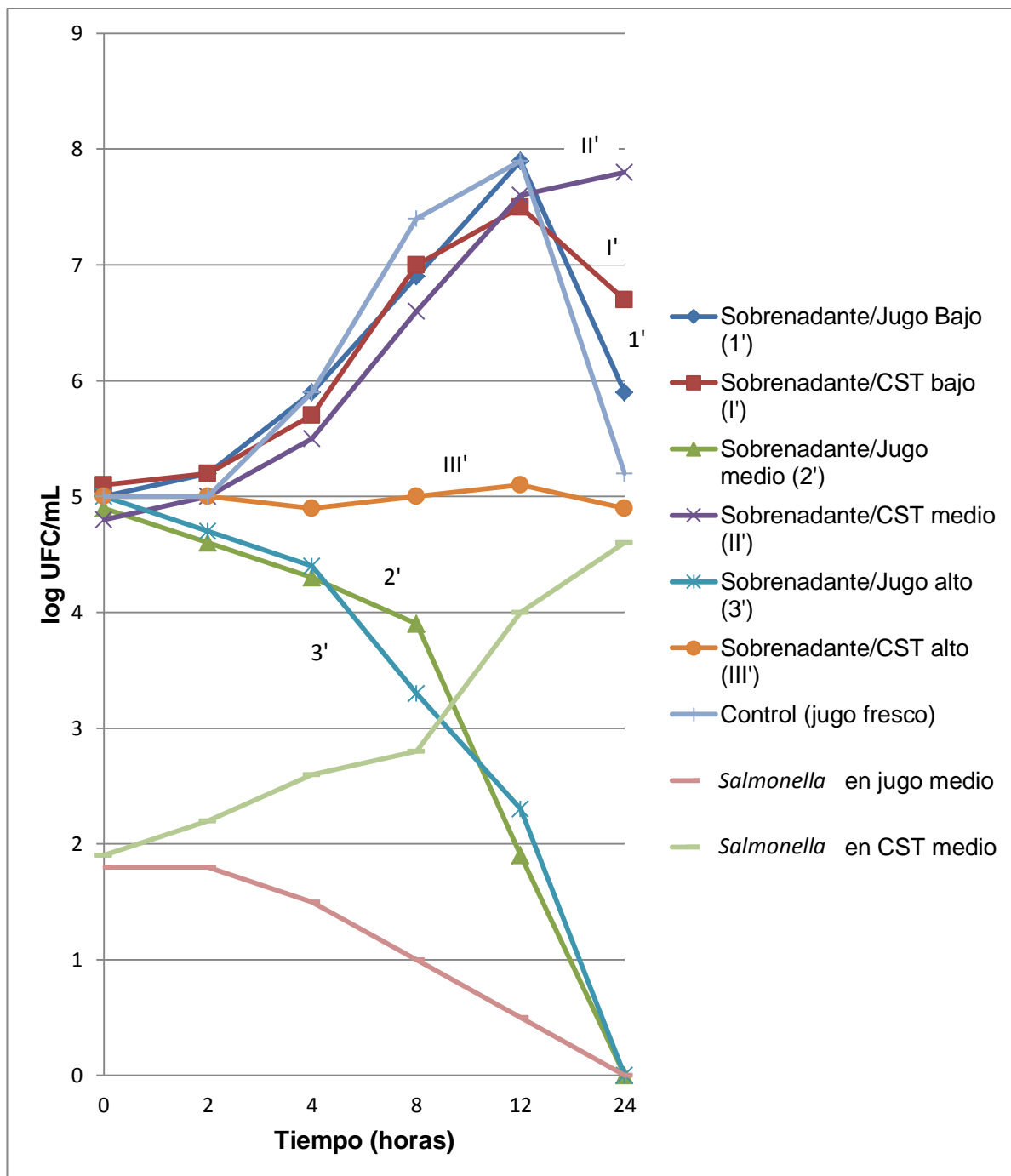


Figura 15. Comportamiento de *Enterobacteriaceae* y *Salmonella* a 22°C por 24 h, inoculado en el sobrenadante del jugo de apio y del CST previamente inoculados e incubados²

² Parte I, Cuadro 7

La *Salmonella* inoculada en este jugo demostró comportamiento similar a la de *Enterobacteriaceae* con un descenso total al tiempo de 24 horas. Esto es más evidente ya que en la Figura 14 se ve que el crecimiento alcanzó más de 7 log UFC/mL de desarrollo, perdiendo su capacidad de sustentar mayor crecimiento en un tiempo más prologado (6 horas en promedio). Una vez más, se refuerza la observación de que el jugo tiene la capacidad de mantener el crecimiento de bacterias por un tiempo significativo hasta alcanzar números excedentes de 7 log UFC/mL. Se convierte de esta manera en un substrato ideal y de alto riesgo por bacterias patógenas al hombre.

En el jugo alto hay un descenso total de la población inicial de *Enterobacteriaceae* en el filtrado hacia las 24 horas. La disminución de 5 log UFC/mL (Cuadro 8) es la indicación más evidente de que una vez establecida la población de máxima, tienden a acabarse los nutrientes que les propicia el jugo de apio por lo cual es marcada la diferencia de disminución en comparación con los controles tanto del jugo de apio fresco, como del control con CST. En la Figura 14, es clara y lógica la tendencia de que hay una progresiva disminución hacia su eliminación.

Cuadro 8. Comportamiento de *Enterobacteriaceae* y *Salmonella* a 22°C por 24 h, inoculado en el sobrenadante del jugo de apio y del CST previamente inoculados e incubados¹ (Parte II)

Tiempo (horas)	3 ENT		5 ENT				7 ENT		Control
	<i>Enterobacteriaceae</i> log UFC/mL		<i>Enterobacteriaceae</i> log UFC/mL		<i>Salmonella</i> log UFC/mL		<i>Enterobacteriaceae</i> log UFC/mL		<i>Enterobacteriaceae</i> log UFC/mL
	Jugo de apio	CST	Jugo de apio	CST	Jugo de apio	CST	Jugo de apio	CST	Jugo de apio sin incubar
0	5	5.1	4.9	4.8	1.8	1.9	5	5	5
2	5.2	5.2	4.6	5	1.8	2.2	4.7	5	5.2
4	5.9	5.7	4.3	5.5	1.5	2.6	4.4	4.9	5.9
8	6.9	7	3.9	6.6	1	2.8	3.3	5	6.9
12	7.9	7.5	1.9	7.6	0.5	4	2.3	5.1	7.9
24	5.9	6.7	0	7.8	0	4.6	0	4.9	5.9

ENT = log UFC/mL *Enterobacteriaceae*

¹ Parte I, Cuadro 7

VII. DISCUSIÓN

Hasta hace poco tiempo, los jugos de frutas no eran reconocidos como vehículo de enfermedades transmitidas por alimentos debido a su bajo pH y sus altos niveles de ácidos orgánicos (Nogueira y col., 2003). En los últimos años se ha reportado una serie de brotes por jugos de frutas y hortalizas (Vojdani, 2007). Entre los productos identificados como vehículo del patógeno implicado, destacan el jugo de naranja y el de manzana en Estados Unidos (Fernández, 2008). En los brotes por jugos de frutas en Estados Unidos, entre 1995 a 2005 con agentes etiológicos identificados, la *Salmonella* fue el más común con 52% de los casos y 710 hospitalizaciones (Vojdani y col., 2007).

El origen y calidad de la materia prima es un factor importante que no se debe dejar de lado, ya que puede representar una fuente de contaminación durante la preparación de los jugos frescos y productos similares para consumo inmediato (FAO/OMS 2003). Es de subrayar enfáticamente que la contaminación ocurre más frecuentemente en los últimas etapas del proceso de elaboración (Vojdani y col., 2007). Si la situación es similar en nuestro país bien valdría generar y disponer de mayor información para darle sustento.

En nuestro país, el riesgo de enfermar se incrementa si se consideran las deficientes prácticas sanitarias de operación en las que se incurre durante la preparación del jugo y el hecho de consumirse crudos. Para muchas personas el consumo de jugos, en especial la de los cítricos, es relativamente seguro en función del bajo pH que no permite la libre sobrevivencia de patógenos. Pero, ciertamente suceden brotes de ETA's causados por *E. coli* O157:H7, *Salmonella* y parásitos (Parish, 1997).

Sharma y col, (2000), refieren que los jugos no pasteurizados son un riesgo a la salud pública mayor (respecto de aquellos que se pasteurizan), dado que no existe un tratamiento químico o térmico terminal para eliminar los microorganismos

patógenos. Es evidente que las prácticas sanitarias de operación e higiene (incluida una adecuada refrigeración) son fundamentales para prevenir las ETA's.

La falta de higiene personal por parte de las personas encargadas de elaborar un alimento es algo que tiene que ser combatido. En un estudio realizado en un establecimiento de preparación de jugos solo el 52% de los trabajadores saben cómo lavar correctamente sus manos, y el 57% de los mismos no están familiarizados con la importancia de mantener condiciones higiénicas en los equipos y utensilios de trabajo (García y col., 2006). De ahí que ya desde 2002 en Estados Unidos se impuso la obligatoriedad de implementar el sistema de Análisis de peligros y puntos críticos de control (APPCC). En dicha regulación se establece que en el proceso de elaboración de un jugo se incluya una etapa en que se garantice la reducción de microorganismos patógenos en 5 log justo antes de ser envasado (FDA, 2001).

El grupo *Enterobacteriaceae* está compuesto por bacterias Gram-negativas, anaerobias facultativas y son asociadas con huéspedes animales o humanos. Esta familia incluye patógenos como *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*. Se utiliza para evaluar la higiene y calidad sanitaria de alimentos crudos o determinar las condiciones higiénicas durante el procesamiento de los alimentos (Musgrove y col., 2004). La elevada incidencia de *Enterobacteriaceae* en las muestras de jugo de apio que se colectaron en un mercado público sugiere un alto riesgo de enfermarse asociado a su consumo. El producto lo consumen muchas personas de manera reiterada sin consecuencia evidente en forma de daño a su salud. Por lo demás, el mero cuestionamiento que se haga al respecto a las personas proclives a su consumo, enfrenta la posibilidad de sesgo ante la convicción de sus efectos benéficos, y las dificultades que confrontan al asociar correctamente la presentación de cuadros diarreicos con el consumo de cualquiera del resto de los alimentos que han consumido en las 48 h anteriores al inicio de los síntomas.

Bajo un saneamiento deficiente de las superficies de trabajo y de los utensilios, resulta muy desconcertante que en dichas condiciones *Salmonella* no se haya detectado en las muestras examinadas. En otro trabajo en el que se analizaron jugos de caña de azúcar que se venden en la calle, se encontraron concentraciones de hasta 6 log UFC/mL de bacterias entéricas; no se detectó *Salmonella* en el producto (García y col., 2006).

El señalamiento anterior se corrobora con la dinámica de crecimiento realizada en el sobrenadante obtenido de jugo de apio previamente incubado con *Enterobacteriaceae* con diferentes poblaciones iniciales de las mismas, ya que al inocular *Enterobacteriaceae* y *Salmonella* en dichos jugos previamente incubados se observa un declive en su crecimiento muy marcado, llegando incluso a niveles no detectables al final de las 24 horas de monitoreo. Algunas hipótesis podrían proponerse para explicar este evento; por ejemplo, la influencia de una excesiva población que se acumula con el tiempo en el sustrato, el agotamiento de nutrientes esenciales, la formación de metabolitos secundarios tóxicos y la reducción del espacio biológico disponible (Fernández, 2008).

VIII. CONCLUSIONES

En el puesto de jugos del mercado público las condiciones sanitarias de preparación y servicio son muy pobres, reflejando un alto contenido de *Enterobacteriaceae* en jugo de apio fresco (8 log UFC/mL).

El comportamiento de *Salmonella* en el jugo de apio difiere según la población inicial de *Enterobacteriaceae*, lo que guarda relación con su nivel de frescura.

Ante una baja población de *Enterobacteriaceae* se observa un incremento en el desarrollo del patógeno; ante cifras elevadas de *Enterobacteriaceae* (> 7 log UFC/mL) el desarrollo de *Salmonella* Typhymurium se inhibe totalmente.

Un filtrado estéril de jugo de apio previamente inoculado con *Enterobacteriaceae* e incubado durante 24 h resulta impropio para el desarrollo e incluso sobrevivencia de *Salmonella*.

La imposibilidad para detectar *Salmonella* en los jugos mediante cultivo, podría asociarse con un efecto antagónico propiciado por la abundante flora asociada presente en los jugos.

Si en lugar de jugo de apio se utiliza CST, *Salmonella* inicia un desarrollo que alcanza 4.6 log UFC/ml a las 24 h. Una hipótesis razonable es que en el jugo de apio se agotan los nutrientes durante las primeras 24 h y se genera una condición adversa para el desarrollo de *Salmonella* que podría asociarse a la acumulación de productos del metabolismo de la flora asociada.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Bean, N. H. and P. M. Griffin. 1990. Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987 pathogens, vehicles, and trends. *J. of Food Protect.* 53: 804-817.

Bean, N. H., J. S. Goulding, M. T. Daniels, and F. J. Angulo. 1997. Surveillance for Foodborne Outbreaks Unites States, 1988-1992. *J. of Food Protect.* 60:1265-1286.

Beuchat, L. R. 1996. Pathogenic microorganism associated with fresh produce. *J. of Food Protect.* 59:204-216.

Beuchat, L. R. 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection.* 4:413 - 423.

Beuchat, L. R. and J. H. Ryu. 1997. Produce handling and processing practices. *Emerg Infect Dis.* 3:459-465

Blackburn, C.W., Unilver R.D. UK. 2003, Microbiological analysis and food safety management: GMP and HACCP systems: 3-17.

Brook, I. 2003. Efectos de la Terapia Antibacteriana sobre la Flora Microbiana de las Adenoides. *J. of Antimicrob. Chemother.* 51:1331-1337.

Buzby, J.C. and Roberts, T. 1997. Economic costs and trade impacts of microbial foodborne illness. *World Health Statics Quarterly.* 50: 57-66.

Cartwright, R.Y. 2003. Food and waterborne infections associated with package holiday. *J. Appl. Microbiol.* 94, pp. 12S-24S.

CCRAB. 2004. California Celery Research Advisory Board. Descargado en marzo 2011 de <http://www.celeryresearch.com/>

CDC. 1991. Centers for Disease Control and Prevention. Epidemiologic Notes and Reports Multistate Outbreak of *Salmonella* Poona Infections – United States and Canada. *MMWR* 40:549-552.

CDC. 1996. Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for foodborne disease outbreaks United States, 1973-1991. Morb. Mortal. Weekly Rep. Pub. Health Serv., A. MMWR. Atlanta, Ga, 45/No SS-5.

CDC. 2000. Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for foodborne disease outbreaks United States, 1993-1997. CDC surveillance summaries. MMWR. 49: 1-7.

Díaz, S. R. and Vernon, C. J. 1999. Inocuidad microbiológica de frutas frescas y mínimamente procesadas. Ciencia y Tecnología Alimentaria. 2:133-136.

Edwards, P. R. and W. H. Ewing. 1972. Identification of *Enterobacteriaceae*. 3 Edition. Burgess Publishing Company. Georgia, USA. pp. 21-47.

Ehler J. T., 2011. Celery history. Descargado en Abril 2011 <http://www.foodreference.com/html/celery-history.html>

FDA/CFSAN. 2001. Analysis and evaluation of preventive control measure for the control and reduction / elimination of microbial hazards on fresh and freshcut produce. U.S. Department for Health and Human Services. Food and Drug Administration Center and Applied Nutrition. Descargado en Abril 2011 de: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/SafePracticesforFoodProcesses/ucm091050.htm>

FDA. 2001. Hazard analysis and critical control point (HAACP); Procedures for the safe and sanitary processing and importing of juice; final rule. Federal Register 66:6137– 6202.

FAO/OMS. 2003. Garantía de la Inocuidad y Calidad de los Alimentos: Directrices para el Fortalecimiento de los Sistemas Nacionales de Control de los Alimentos. Descargado en Abril 2011 de <http://www.fao.org/docrep/006/y8705s/y8705s00.htm>

FAO/OMS. 2005. Evaluaciones de riesgos de *Salmonella* en huevos y pollos para asar. Serie de evaluación de riesgos microbiológicos.

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

Garcia Villanova, R. B. 2002. Contamination on fresh vegetables during cultivation and marketing. Int. J. or Food Microbiol. 4:285-291

Garcia O., A.C., Spano S., A.S., Paiva S., C., Oliveira S., C. W. 2006. Microbiological evaluation of sugarcane juice sold at street stands and juice handling. Cad. Saúde Pública, Río de Janeiro 22: 1111-1114

Gonzalez, R.J., Luo, Y., Ruiz-Cruz, S., Mc Evoy, J.L. 2004. The efficacy of sanitizers to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 on shredded carrots under simulated fresh-cut process water conditions. Journal of Food Protection 67: 2375-2380.

Hedberg, C.W., K.L. MacDonald, and M.T. Osterholm. 1994. Changing epidemiology of food-borne disease: a Minnesota perspective. Clinical Infectious Diseases 18:671-682.

IFPA International Fresh-cut Produce Association. **2004.** Fresh-cut facts. Descargado de: <http://www.fresh-cuts.org/Default.aspx?tabid=103>

Kasrazadeh, M. and Genigeorgis, C. 1994. Potential growth and control of *Salmonella* in Hispanic type soft cheese. Int. J. or Food Microbiol. 22: 127- 140.

Kaspar, C. W. and M. L. Tamplin. 1993. Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. Applied and Environmental Microbiology 59 8: 2425-2429.

Kniel, K. E., S. S. Sumner, D. S. Lindsay, C. R. Hackney, M. D. Pierson, A. M. Zajac, D. A. Golden, and R. Fayer. 2003. Effect of organic acids and hydrogen peroxide on *Cryptosporidium parvum* viability in fruit juices. J. of Food Protect. 66:1650–1657.

Kornacki, J. L., and J. L. Johnson. 2001. *Enterobacteriaceae*, Coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association, Washington, DC, EUA. pp. 69-82.

Koneman, E. W., S. D. Allen, R. Dowell, and H. M. Sommers. 1983. Diagnóstico microbiológico. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.

Kuchenmüller, T., Hird S., Stein C., Kramarz P., Nanda A., Havelaar H. 2009 Estimating the global burden of food born disease – a collaborative effort. *Eurosurveillance.*, 14: 1 - 4

Kvenberg J.E., Schwald D.J.2000, Use of microbial data for hazard analysis and critical control points verification. FDA perspective, *J. of Food Protect.* 63:810-814

Mead, S. P., L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin, and R. V. Tauxe. 1999. Food - related illness and death in the United States. Center for Disease control and prevention, Atlanta Georgia USA. *Emerging Infectious Diseases* 5:607-625. Microbial evaluation of selected fresh produce obtained at retail markets. *J. of Food Protect.* 65:677-682.

Mossel D.A.A., Visser M., Cornellissen A.M.R.1963. The examination of foods for *Enterobacteriaceae* using a test of the type generally adapted for the detection of *Salmonellae*. *J. of Appl. Microbiol.* 26:444–452

Murray, G. 2000. El poder curativo de los jugos. *Selector.* 121-124

Musgrove, M. T., Jones, D. R., Northcutt, J. K., Cox, N. A., Harrison, M. A. 2004. Identification of *Enterobacteriaceae* from washed and unwashed comercial Shell eggs. *J. of Food Protect.* 67: 2613-2616.

Nguyen, C., and F. Carlin. 1994. The microbiology of minimally processed fresh fruit and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 34: 371 -401.

Nogueira, M. C., Oyarzabal, O. A., Gombas, D. E. 2003, Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in Cranberry, Lemon and Lime Juice Concentrates. *J. of Food Protect.* 66:1637-1641

OPS/OMS. 2002. Organización panamericana de la salud. Descargado en Enero 2011 de <http://www.panalimentos.org/comunidad/educacional1.asp=137&id=65>.

Parish, M. E. 1997. Public health and nonpasteurized fruit juices. *Critical Reviews in Microbiology.* 23:109–119.

Ray, B. 1996. *Fundamental Food Microbiology.* Boca Raton, FL: CRC Press.

Rodríguez, F. 1995. Cultivo de apio. *Horticultura global: Revista de Industria, distribución y socioeconomía hortícola.* ISSN 1132-2950 No. 19: 43-52

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

Sivapalasingam, S., C. R.Friedman, L. Cohen, and R. V. Tauxe. 2004. Fresh produce: A growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. *J. of Food Protect.* 67: 2342-2353.

Sharma, M., Beuchat, L. R., Doyle, P. D. and Chen J. 2000. Survival of *Salmonellae* in Pasteurized, Refrigerated Calcium Fortified Orange Juice. *J. of Food Protect.* 64:1299-1304.

Socket P.N. 1991. A review: The economic implications of human *Salmonella* infection. *J. of Appl. Bacteriol.* 71: 289-295

SSA. 2004. Secretaria de Salud de México, Manual de buenas prácticas de higiene y salud, Cap 1. Descargado marzo 2011 <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/capitulo1.html>

Tauxe, R., H. Kruse, C. Hedberg, M. Potter, J. Madden, and K. Wachsmuth.1997. Microbial hazards and emerging issues associated with produce: a preliminary

criteria for foods. Report to the national advisory committee on microbiologic. J. of Food Protect. 60:1400–1408.

Thunberg, R. L., Tran, R. W. Bennett, R. N. Matthews, and N. Belay. **2002**. Microbial evaluation of selected fresh produce obtained at retail markets. J. of Food Protect. 65:677-682.

Ukuku D. and Fett W. F. **2002**. Relationship of Cell Surface Charge and Hydrophobicity to Strength of Attachment of Bacteria to Cantaloupe Rind. J. of Food Protect. 65: 1093–1099

USDA. **2010**. National organic program. Regulations. Descargado Abril 2011 de <http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/nop>.

USDA. **2011**. Data Base Celery: http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl

USDHHS. **1998**. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition.

Vojdani, J.D., Beuchat, L.R., Tauxe, R.V. **2007**. Juice-associated Outbreaks of Human Illness, 1995 through 2005. J. of Food Protect. 71:356-364.

WHO. **2008**. Foodborne disease outbreaks: Guidelines for investigation and control. Descargado Abril 2011 http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fdbmanual/en/

WHO, **2010**. Initiative to estimate the Global Burden of Foodborne Diseases. Descargado Febrero del 2011 http://www.who.int/foodsafety/foodborne_disease/ferg/en

Willen, J. **2008**. Remedios caseros curativos. Ed. Bottom Line. 1ª edición p. 205

Wood, R. C., C. Hedberg, and K. White. **1991**. Amultistate outbreak of *Salmonella javiana* infections associated with raw tomatoes, p. 69. (Abstracts) *In* CDC Epidemic

Intelligence Service, 40th Ann. Conf., Atlanta. U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service.