



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“Efecto de la restricción de nutrientes y el tratamiento térmico sobre el comportamiento en crema pastelera de cepas enterotoxigénicas de *Staphylococcus aureus* procedentes de diversos orígenes”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:
Fernando Dueñas Medina

Dirigido por:
Dr. Eduardo Fernández Escartín

SINODALES

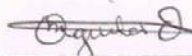
Dr. Eduardo Fernández Escartín
Presidente

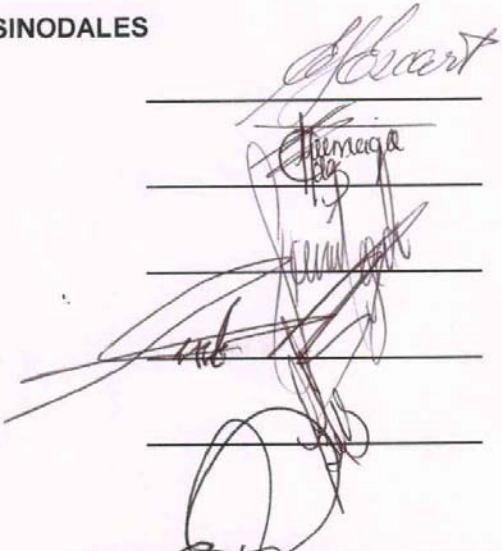
Dra. Montserrat Hernández Iturriaga
Secretaria

Dr. Fausto Tejeda Trujillo
Vocal

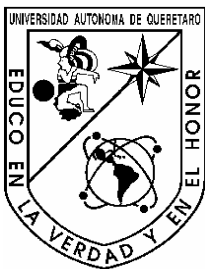
M. en C. Josefina Saldaña Lozano
Suplente

M. en C. Beatriz Liliana Álvarez Mayorga
Suplente


Q. B. Magali Elizabeth Aguilar Ortiz
Director de la Facultad de Química


Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qró.
Abril, 2008
México



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL
CENTRO DE LA REPÚBLICA (PROPAC)

“Efecto de la restricción de nutrientes y el tratamiento térmico sobre el comportamiento en crema pastelera de cepas enterotoxigénicas de *Staphylococcus aureus* procedentes de diversos orígenes”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

Fernando Dueñas Medina

Dirigida por:

Dr. Eduardo Fernández Escartín

Santiago de Querétaro, Qro., Abril de 2008

RESUMEN

Algunos microorganismos patógenos son capaces de sobrevivir y desarrollar en diversos alimentos. En la evaluación de riesgos es fundamental conocer los factores que determinan este comportamiento. Para estudiarlo se recurre a diseños experimentales en donde generalmente se emplean cepas de colección. Se ha demostrado que en ocasiones el comportamiento de tales cepas no sigue el mismo patrón de aquellas recién aisladas de, por ejemplo, individuos portadores, alimentos o bien células que han sido expuestas a tratamientos subletales con agentes físicos y químicos. Esta última situación ocurre comúnmente en condiciones naturales o en sitios donde se elaboran y procesan alimentos. En este trabajo se evaluó el efecto de la restricción de nutrientes y el tratamiento térmico subletales (condiciones de estrés) sobre el comportamiento en crema pastelera de cepas enterotoxigénicas de *Staphylococcus aureus* procedentes de diversos orígenes: cepas de colección (SaC), nativas de portadores (SaP) y aisladas de alimentos (SaA). El software DMFit diseñado para la predicción del comportamiento microbiano se utilizó para calcular las velocidades de desarrollo ($\log \text{UFC h}^{-1}$). En las cepas no expuestas a una condición de estrés se observó un incremento de casi $1 \log \text{UFC g}^{-1}$ en 2 h, sugiriendo una duración de la fase lag cercana a 1 h. Una cepa SaC fue sometida a estrés por restricción de nutrientes en crema pastelera diluida, incubada a $30^\circ\text{C}/9 \text{ h}$ (SaC_{ERN}) e inoculada en crema pastelera íntegra. En las curvas de desarrollo de las cepas SaC y SaC_{ERN} en crema pastelera íntegra, se observó el mismo comportamiento que con las cepas no expuestas a estrés; sin embargo al analizar estadísticamente las velocidades de desarrollo, 0.2481 y $0.2365 \log \text{UFC h}^{-1}$ respectivamente, se encontró que la restricción de nutrientes tenía efecto significativo ($P < 0.05$), aunque no en la biomasa alcanzada a las 10 h ($P > 0.05$). Por otra parte, las cepas SaC, SaP y SaA fueron expuestas por separado a estrés por tratamiento térmico a 55°C por 20 min. (SaC_{ETT}, SaP_{ETT} y SaA_{ETT}) y a continuación inoculadas en crema pastelera íntegra. Las tres cepas sometidas a estrés por tratamiento térmico mostraron un alargamiento de la fase lag a 2 h, así como una reducción significativa de las velocidades de desarrollo (0.3594 , 0.2684 y 0.2612 respectivamente) ($P < 0.05$). Los resultados demuestran que el origen de las cepas de *S. aureus* tiene un efecto significativo en su comportamiento en alimentos.

(Palabras clave: Restricción de nutrientes, Tratamiento térmico, *Staphylococcus aureus*, crema pastelera).

SUMMARY

Some pathogen microorganisms are able to survive and to develop in some kinds of foods. In risks evaluation it is fundamental to know the factors determining this behavior. In order to study it, strains from collections are commonly used in experimental designs. It has been demonstrated that the behavior of those strains doesn't follow the same pattern of the recently isolated, for example, from carriers, food, or strains exposed to sub lethal chemical or physical treatments. The latter occurs commonly in natural conditions or places where foods are prepared or processed. In this study, the effect of starvation and heat treatments both at sub lethal levels (stress condition) on the behavior of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from different origins in filling cream has been assessed. Those strains were obtained from collections (SaC), wild types from carriers (SaP) and some others isolated from foods (SaA). The software DMFit, designed to predict microbial behavior was used to calculate the growth rates ($\log \text{UFC h}^{-1}$). Strains without stress exposition showed an increment of almost $1 \log \text{UFC h}^{-1}$ in 2 h, suggesting a lag phase duration of around 1 h. One SaC strain was subject of stress by starvation in diluted filling cream, incubated at a $30^\circ\text{C}/9 \text{ h}$ (SaC_{ERN}) and then inoculated in whole filling cream. In the dynamics curves of SaC and SaC_{ERN} in whole filling cream, in unstressed strains was observed the same behavior; nevertheless, analyzing statistically the development rates, 0.2481 and 0.2365 respectively, it was found that starvation had a significant effect ($P < 0.05$) on them, but not in the biomass produced within 10 h ($P > 0.05$). On the other hand, SaC, SaP and SaA strains were exposed separately to sub lethal heat treatment at 55°C for 20 min (SaC_{ETT} , SaP_{ETT} and SaA_{ETT}) and then inoculated in whole filling cream. All three strains subject to this treatment showed a longer lag phase of 2 h as well as a significant reduction in the growth rates (0.3594, 0.2684 and 0.2612 respectively) ($P < 0.05$). These results demonstrate that the origin of the *S. aureus* strains have a significant effect on their behavior on foods.

(Key words: Starvation, Heat treatment, *Staphylococcus aureus*, filling cream).

Para:

Yolo, Emilio, Diego y Fernando.

AGRADECIMIENTOS

Deseo resaltar el apoyo de:

- CONACYT
- Universidad Autónoma de Querétaro
- Mis sinodales, y
- El grupo de trabajo del Laboratorio de Inocuidad Microbiana de Agua y Alimentos

ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMEN	i
SUMMARY	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE	v
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE CUADROS	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. El microorganismo	3
2.1.1. Factores ecológicos	4
2.1.1.1. Composición química del sustrato	5
2.1.1.2. pH	6
2.1.1.3. Actividad de agua (A_a)	6
2.1.1.4. Temperatura	7
2.1.1.5. Potencial de oxidoreducción	7
2.1.1.6. Presencia de flora antagónica	7
2.1.1.7. Vitalidad del microorganismo	8
2.1.2. Productos extracelulares	8
2.1.2.1. Enterotoxinas estafilocócicas (EEs)	8
2.1.3. Fuentes y mecanismos de contaminación	10

2.2. Estrés celular.	11
2.2.1. Mecanismos de respuesta de adaptación al estrés	12
2.2.2. Espectro de respuestas de los microorganismos	14
2.2.3. Respuesta al estrés y el impacto en la sobrevivencia de <i>S. aureus</i> .	15
2.3. Epidemiología.	15
2.3.1. Intoxicación estafilococcica	15
2.3.1.1. Variación estacional	17
2.3.1.2. Morbilidad y letalidad	18
2.3.1.3. Alimentos más frecuentemente implicados	18
2.3.1.4. Brotes de intoxicación estafilococcica	19
2.3.1.5. Prevención y control de <i>S. aureus</i>	20
2.4. Microbiología predictiva	20
2.4.1. Antecedentes	20
2.4.2. Modelo de Baranyi	22
2.4.3. Base de datos de crecimiento microbiano en alimentos "ComBase"	23
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. OBJETIVOS	25
4.1. Objetivo general	25
4.2. Objetivos específicos	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS	26
5.1. Materiales	26

5.2 Métodos	28
5.2.1 Cepas de <i>S. aureus</i> .	28
5.2.1.1 Obtención de cultivos puros a partir de alimentos y de portadores humanos.	28
5.2.1.2 Caracterización fenotípica	28
5.2.1.3 Determinación de la enterotoxigenicidad de las cepas	29
5.2.2 Cinéticas de desarrollo en crema pastelera de cepas de <i>S. aureus</i> de colección, de exudado nasal, de cepas recién aisladas de portador humano y de alimentos.	31
5.2.2.1 Elaboración de la crema pastelera	31
5.2.2.2 Cinética de desarrollo en crema pastelera de cepas de <i>S. aureus</i> de colección.	32
5.2.2.3 Cinética de desarrollo en crema pastelera de <i>S. aureus</i> del exudado nasal de portador humano comparada con una mezcla de tres cepas de colección.	32
5.2.2.4 Cinética de desarrollo en crema pastelera de <i>S. aureus</i> recién aislado de portador humano y de alimentos.	33
5.2.3. Restricción de nutrientes	34
5.2.3.1 Determinación de la dilución de crema pastelera que permita el mínimo desarrollo de <i>S. aureus</i> en 8 h.	34
5.2.3.2 Cuantificación de las células de <i>S. aureus</i> dañadas subletalmente.	34
5.2.3.3 Cinética de desarrollo en crema pastelera íntegra recién elaborada de la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 6538 sometida a estrés por restricción de nutrientes.	34
5.2.4 Tratamiento térmico.	35
5.2.4.1 Determinación del tiempo para la inducción de estrés por tratamiento térmico.	35
5.2.4.2 Cinéticas de desarrollo en crema pastelera recién elaborada de cepas de <i>S. aureus</i> de colección, recién aisladas de portador humano y de alimentos, sometidas a estrés por tratamiento térmico.	35

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
6.1. Obtención y caracterización fenotípica de cepas de <i>S. aureus</i> aisladas a partir de alimentos y de portadores humanos.	38
6.2 Cinética de desarrollo en crema pastelera de cepas de <i>S. aureus</i> de colección, de exudado nasal, de cepas recién aisladas de portador humano y de alimentos.	40
6.2.1 Cinética de desarrollo en crema pastelera de cepas de <i>S. aureus</i> de colección	41
6.2.2 Cinética de desarrollo en crema pastelera de <i>S. aureus</i> de exudado nasal	44
6.2.3 Cinética de desarrollo en crema pastelera de cepas de <i>S. aureus</i> recién aisladas de portador humano	53
6.2.4 Cinética de desarrollo en crema pastelera de cepas de <i>S. aureus</i> recién aisladas de alimentos	56
6.3. Comportamiento en crema pastelera de cepas de <i>S. aureus</i> sometidas a estrés por restricción de nutrientes ó mediante tratamiento térmico.	57
6.3.1 Restricción de nutrientes	57
6.3.2 Tratamiento térmico.	63
6.3.2.1 Determinación de la condición de estrés de <i>S. aureus</i> ATCC 6538 no enterotoxigénico	63
6.3.2.2 Determinación de la condición de estrés de <i>S. aureus</i> ATCC 14458 enterotoxigénico	64
6.3.2.3 Determinación de la condición de estrés de <i>S. aureus</i> enterotoxigénico recién aislado de portador humano	66
6.3.2.4 Determinación de la condición de estrés de <i>S. aureus</i> enterotoxigénico recién aislado de queso cotija	67
7. CONCLUSIONES	72
8. BIBLIOGRAFÍA	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Resumen de la técnica ELISA para la detección de enterotoxinas estafilocócicas en alimentos, empleando el Kit comercial TECRA®.	30
2	Cinética de desarrollo en crema pastelera de <i>S. aureus</i> procedente del exudado nasal de portador humano y una mezcla de tres cepas de colección.	33
3	Cinética de desarrollo en crema pastelera de la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 6538 previamente sometida a estrés por restricción de nutrientes.	36
4	Cinéticas de desarrollo en crema pastelera de cepas de <i>S. aureus</i> previamente sometidas a estrés por tratamiento térmico.	37
5	Comportamiento en dos experimentos independientes (A y B) de una mezcla de tres cepas de colección de <i>S. aureus</i> no enterotoxigénicas, en crema pastelera almacenada a 22 y 35°C.	43
6	Comportamiento de <i>S. aureus</i> ATCC enterotoxigénico en crema pastelera, almacenada a 30°C.	44
7	Comportamiento de <i>S. aureus</i> enterotoxigénico procedente del exudado nasal del portador AF y en una mezcla de tres cepas de colección no enterotoxigénicas en crema pastelera, almacenada a: 22 y 35°C.	46
8	Comportamiento de <i>S. aureus</i> enterotoxigénico procedente del exudado nasal del portador MG y en una mezcla de tres cepas de colección de <i>S. aureus</i> no enterotoxigénicas en crema pastelera, almacenada a 22°C.	47
9	Comportamiento de <i>S. aureus</i> enterotoxigénico procedente del exudado nasal del portador MG y en una mezcla de tres cepas de colección no enterotoxigénicas, en crema pastelera almacenada a 35°C.	48
10	Dinámica de una mezcla de tres cepas de colección de <i>S. aureus</i> no enterotoxigénico y una cepa enterotoxigénica aislada del exudado nasal MG, en crema pastelera a 22°C.	49
11	Dinámica de una mezcla de tres cepas de colección de <i>S. aureus</i> no enterotoxigénico y una cepa enterotoxigénica aislada del exudado nasal MG, en crema pastelera a 35°C.	50
12	Comportamiento de BMA y de una mezcla de tres cepas de colección de <i>S. aureus</i> no enterotoxigénicas en crema pastelera, conservada a 22°C.	52

13	Comportamiento de BMA y en una mezcla de tres cepas de colección de <i>S. aureus</i> no enterotoxigénicas en crema pastelera, conservada a 35°C.	52
14	Comportamiento a 30°C de <i>S. aureus</i> enterotoxigénico recién aislado del portador MG, en crema pastelera almacenada a 30°C.	54
15	Dinámica en crema pastelera de <i>S. aureus</i> recién aisladas de queso cotija y panela, almacenada a 30°C.	56
16	Comportamiento de <i>S. aureus</i> ATCC 6538 no enterotoxigénico según concentración de crema pastelera a 30°C.	58
17	Comportamiento de <i>S. aureus</i> ATCC 6538 no enterotoxigénico en crema pastelera diluida al 0.1 y 0.2% empleando como diluyente BFS y DPS, almacenada a 30°C.	59
18	Comportamiento de <i>S. aureus</i> ATCC 6538 no enterotoxigénico en crema pastelera íntegra y diluida en BFS a tres concentraciones, almacenada a 30°C.	60
19	Comportamiento de <i>S. aureus</i> ATCC 6538 no enterotoxigénico no estresado y sometido a estrés por restricción de nutrientes, en crema pastelera, almacenada a 30°C.	62
20	Reducción de la población <i>S. aureus</i> ATCC 6538 no enterotoxigénico recuperado en AST y AST 10% NaCl después de la inducción de estrés por tratamiento térmico a 55°C a diferentes tiempos.	64
21	Reducción de la población de <i>S. aureus</i> ATCC 14458 enterotoxigénico recuperada en ABP y AST 10% NaCl después de la inducción de estrés por tratamiento térmico a 55°C por 20 min.	65
22	Comportamiento de <i>S. aureus</i> ATCC 14458 enterotoxigénico no estresado y sometido a estrés por tratamiento térmico a 55°C por 20 min, e inoculado en crema pastelera almacenada a 30°C.	65
23	Reducción de la población de <i>S. aureus</i> enterotoxigénico recién aislado del portador MG recuperado en ABP y AST 10% NaCl después de la inducción de estrés por tratamiento térmico a 55°C por 20 min.	66
24	Comportamiento de <i>S. aureus</i> enterotoxigénico recién aislado del portador MG no estresado y sometido a estrés por tratamiento térmico a 55°C por 20 min, e inoculado en crema pastelera almacenada a 30°C.	67
25	Reducción de la población de <i>S. aureus</i> enterotoxigénico recién aislado de queso cotija, recuperado en ABP y AST 10% NaCl después de la inducción de estrés por tratamiento térmico a 55°C por 20 min.	68

- 26 Comportamiento de *S. aureus* enterotoxigénico recién aislado de queso cotija no estresado y sometido a estrés por tratamiento térmico a 55°C por 20 min, e inoculado en crema pastelera almacenada a 30°C. 69

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Peso molecular y punto isoeléctrico de las EEs.	9
2	Brotos de intoxicación por <i>S. aureus</i> según mes de presentación. Estados Unidos 1988-1992.	17
3	Positividad y enterotoxigenicidad de cepas de <i>S. aureus</i> en muestras de portadores humanos, quesos y otros alimentos.	39
4	A _a y pH de la crema pastelera preparada en el laboratorio.	41
5	Poblaciones (log UFC g ⁻¹) en dos experimentos independientes (A y B) de una mezcla de tres cepas de colección de <i>S. aureus</i> no enterotoxigénicas en crema pastelera almacenada a 22 y 35°C.	42
6	Poblaciones de <i>S. aureus</i> ATCC enterotoxigénico en crema pastelera, almacenada a 30°C.	44
7	Población inicial de <i>S. aureus</i> suspendida en el exudado de dos portadores humanos y después de 18 h de almacenamiento de la suspensión en refrigeración.	45
8	Población (log UFC g ⁻¹) de <i>S. aureus</i> enterotoxigénico procedente del exudado nasal del portador AF y en una mezcla de tres cepas de colección no enterotoxigénicas en crema pastelera, durante el almacenamiento a 22 y 35°C.	46
9	Población (log UFC g ⁻¹) de <i>S. aureus</i> enterotoxigénico procedente del exudado nasal del portador MG y en una mezcla de tres cepas de colección no enterotoxigénicas, en crema pastelera, almacenada a 22°C.	47
10	Población (log UFC g ⁻¹) de <i>S. aureus</i> enterotoxigénico procedente del exudado nasal del portador MG y en una mezcla de tres cepas de colección no enterotoxigénicas, en crema pastelera, almacenada a 35°C.	48
11	Población (log UFC g ⁻¹) de una mezcla de tres cepas de colección de <i>S. aureus</i> no enterotoxigénico y una cepa enterotoxigénica aislada del exudado nasal MG, en crema pastelera a 22°C.	49
12	Población (log UFC g ⁻¹) de una mezcla de tres cepas de colección de <i>S. aureus</i> no enterotoxigénico y una cepa enterotoxigénica aislada del exudado nasal MG, en crema pastelera a 35°C.	50
13	Poblaciones (log UFC g ⁻¹) de BMA y <i>S. aureus</i> (mezcla de tres cepas no enterotoxigénicas) en crema pastelera, almacenada a 22°C durante 24 h.	51

14	Poblaciones (log UFC g ⁻¹) de BMA y <i>S. aureus</i> (mezcla de tres cepas no enterotoxigénicas) en crema pastelera, conservada a 35°C durante 24 h.	52
15	Población de <i>S. aureus</i> enterotoxigénico recién aislado del portador MG, en crema pastelera, almacenada a 30°C.	54
16	Velocidad de crecimiento y biomasa alcanzada a las 10 h a 30°C de 4 cepas de <i>S. aureus</i> enterotoxigénicas, en crema pastelera según su origen.	54
17	Velocidad de crecimiento y biomasa alcanzada a las 10 h en crema pastelera almacenada a 22°C, de tres cepas de <i>S. aureus</i> según su origen.	55
18	Velocidad de crecimiento y biomasa alcanzada a las 10 h en crema pastelera almacenada a 35°C, de tres cepas de <i>S. aureus</i> según su origen.	55
19	Población (log UFC g ⁻¹) de <i>S. aureus</i> enterotoxigénico recién aislado de queso cotija y panela, en crema pastelera almacenada a 30°C.	56
20	Población (log UFC g ⁻¹) de <i>S. aureus</i> ATCC 6538 no enterotoxigénico en crema pastelera íntegra y diluida en DPS, almacenada a 30°C.	58
21	Población (log UFC g ⁻¹) de <i>S. aureus</i> ATCC 6538 no enterotoxigénico en crema pastelera diluida al 0.1 y 0.2% empleando como diluyente BFS y DPS, almacenada a 30°C.	58
22	Población (log UFC g ⁻¹) de <i>S. aureus</i> ATCC 6538 no enterotoxigénico en crema pastelera íntegra y diluida en BFS a tres concentraciones, almacenada a 30°C.	60
23	Población (log UFC g ⁻¹) de <i>S. aureus</i> ATCC 6538 no enterotoxigénico no estresado y sometido a estrés por restricción de nutrientes, en crema pastelera almacenada a 30°C.	61
24	Velocidad de crecimiento y biomasa alcanzada a las 10 h en crema pastelera de <i>S. aureus</i> ATCC 6538 no enterotoxigénico sin estresar y estresado por restricción de nutrientes, almacenada a 30°C.	62
25	Población (log UFC g ⁻¹) de <i>S. aureus</i> ATCC 6538 no enterotoxigénico recuperada en AST y AST 10% NaCl, después de la inducción de estrés por tratamiento térmico a 55°C a diferentes tiempos.	64
26	Población (log UFC g ⁻¹) de <i>S. aureus</i> ATCC 14458 enterotoxigénico recuperado en ABP y AST 10% NaCl después de la inducción de estrés por tratamiento térmico a 55°C por 20 min.	65

27	Población (log UFC g ⁻¹) de <i>S. aureus</i> ATCC 14458 enterotoxigénico, no estresado y sometido a estrés por tratamiento térmico a 55°C por 20 min, e inoculado en crema pastelera almacenada a 30°C.	65
28	Población (log UFC g ⁻¹) de <i>S. aureus</i> enterotoxigénico recién aislado del portador MG recuperado en ABP y AST 10% NaCl después de la inducción de estrés por tratamiento térmico a 55°C por 20 min.	66
29	Población (log UFC g ⁻¹) de <i>S. aureus</i> enterotoxigénico recién aislado de portador MG no estresado y sometido a estrés por tratamiento térmico a 55°C por 20 min, e inoculado en crema pastelera almacenada a 30°C.	66
30	Población (log UFC g ⁻¹) de <i>S. aureus</i> enterotoxigénico recién aislado de queso cotija recuperado en ABP y AST 10% NaCl después de la inducción de estrés por tratamiento térmico a 55°C por 20 min.	68
31	Población (log UFC g ⁻¹) de <i>S. aureus</i> enterotoxigénico recién aislado de queso cotija no estresado y sometido a estrés por tratamiento térmico a 55°C por 20 min, e inoculado en crema pastelera almacenada a 30°C.	68
32	Velocidad de crecimiento (log UFC h ⁻¹) en cepas de <i>S. aureus</i> enterotoxigénicas procedentes de diferentes orígenes, no estresadas y estresadas por tratamiento térmico a 55°C, en crema pastelera almacenadas a 30°C.	69
33	Biomasa alcanzada (log UFC g ⁻¹) a las 10 h en tres cepas de <i>S. aureus</i> enterotoxigénicas procedentes de diferentes orígenes, no estresadas y estresadas por tratamiento térmico 55°C, en crema pastelera almacenada a 30°C.	70
34	Velocidad de crecimiento y biomasa alcanzada a las 10 h en tres cepas de <i>S. aureus</i> enterotoxigénicas procedentes de diferentes orígenes sin estrés, almacenadas a 30°C.	70
35	Velocidad de crecimiento y biomasa alcanzada a las 10 h en tres cepas de <i>S. aureus</i> enterotoxigénicas procedentes de diferentes orígenes estresadas por tratamiento térmico a 55°C, en crema pastelera, almacenadas a 30°C.	71

1. INTRODUCCIÓN

A diferencia de la mayoría de las bacterias enteropatógenas, *S. aureus* es un microorganismo toxigénico. Se encuentra en la piel y algunas mucosas, destacando la nasal. Dado su carácter antroponótico puede emplearse como indicador de contaminación humana. La toxina se sintetiza durante la multiplicación de la bacteria en el alimento. La ingestión del germen, incluso enterotoxigénico, no es antecedente obligado para que ocurra una intoxicación. La información actualmente disponible para evaluar su comportamiento proviene básicamente de diseños en los cuales se recurre a cepas de colección. Se cuenta con evidencia científica de que el comportamiento de cepas de colección de una bacteria puede ser diferente al de cepas provenientes de sus fuentes naturales que contaminan directamente a los alimentos (Castillo *et al.*, 1999; Scout *et al.*, 2006), o bien, entre las células que han sufrido estrés por tratamientos subletales con agentes físicos o químicos (Buchanan, *et al.*, 1989). Esta última situación ocurre comúnmente en sitios donde se elaboran alimentos. Se sabe que dicho estrés puede modificar la resistencia de los microorganismos a altas temperaturas, la congelación y aún la virulencia (Bryan, 1976; O'Driscoll *et al.*, 1996). En consecuencia la sobrevivencia y el desarrollo del germen en los alimentos también pueden ser afectados.

Típicamente el conocimiento de las potencialidades de los microorganismos para proliferar o sobrevivir en los alimentos proviene de modelos de reto diseñados en el laboratorio. Cepas de colección, certificadas o no, se inoculan en el alimento y se sigue su comportamiento bajo condiciones controladas del o los factores cuyo efecto se pretende evaluar. Los resultados que se obtienen, se asumen representativos de lo que acontecería en condiciones naturales, es decir, cuando la cepa del patógeno ingresa al alimento a partir de una fuente natural de contaminación. Existen, sin embargo, razones para cuestionar la validez de estos enfoques.

Un hecho particularmente significativo que debe considerarse en el diseño de los modelos es la acentuada plasticidad para adaptarse a las condiciones cambiantes de los diversos ambientes que contaminan o infectan; la dinámica que exhiban en los estudios de laboratorio puede mostrar diferencias significativas para una especie microbiana particular. De manera general, las bacterias reaccionan al estrés ambiental a través de cambios

temporales y mutaciones (Archer, 1996). Para sobrevivir y desarrollar deben mantener su integridad y homeostasis. Es posible determinar el comportamiento microbiano en el agua, alimentos, y en general en el medio ambiente y de los factores que los afectan, mediante estudios que valoren los cambios en la población microbiana bajo las condiciones que se presentan o transcurren de manera natural, es decir sin modificar el curso de los acontecimientos. Alternativamente, el investigador recurre a modelos de laboratorio en los que se simulan las condiciones naturales, pero se ajusta el o los factores cuyo efecto sobre los microorganismos se desea valorar.

En este trabajo se evaluó el efecto subletal (condición de estrés) de la restricción de nutrientes y el tratamiento térmico sobre el comportamiento en crema pastelera de cepas enterotoxigénicas de *Staphylococcus aureus* procedentes de diversos orígenes: cepas de colección (SaC), nativas de portadores (SaP) y aisladas de alimentos (SaA). La hipótesis consiste en que el comportamiento difiere de los tradicionalmente reconocidos como característicos del microorganismo. Primero una cepa de colección fue sometida a estrés fisiológico por restricción de nutrientes inoculándola en crema pastelera diluida e incubada a 30°C/9 h. Posteriormente a todas las cepas se indujo una condición de estrés mediante tratamiento térmico (55°C/20 min). Finalmente con las cepas recuperadas (dañadas subletalmente) se determinó su comportamiento en crema pastelera íntegra recién elaborada. El software DMFit diseñado para la predicción del comportamiento microbiano fue empleado para calcular las velocidades de desarrollo ($\log \text{UFC h}^{-1}$).

2. ANTECEDENTES

2.1. El microorganismo

S. aureus es una de las primeras bacterias de interés humano descubierta y descrita. Su potencial patógeno para el hombre y animales se manifiesta en diversas formas. En su ciclo natural puede existir como parásito en el cuerpo humano, o dar lugar a procesos patológicos tales como sinusitis, otitis, septicemia y endocarditis. Generalmente se recupera muy escasamente del contenido intestinal; puede causar enterocolitis, apendicitis e incluso perforación de la pared intestinal (Fernández-Escartín, 2000).

S. aureus es un microorganismo de la familia *Micrococcaceae* que se presenta como coco gram positivo agrupado en racimos. Las colonias son usualmente ≥ 1.5 mm de diámetro, lisas, convexas y con bordes bien definidos. Es un organismo inmóvil, no esporulado, aerobio y facultativamente anaerobio. Algunas cepas producen pigmentos característicos cuya intensidad es más pronunciada cuando crece a temperatura ambiente o refrigeración en medios ordinarios (Baird-Parker, 2000).

En la microbiología sanitaria el *S. aureus* tiene gran interés, tanto por las enterotoxinas que produce, como por el especial significado que se deriva de su presencia y abundancia en algunos alimentos (Fernández-Escartín, 2000). Puede crecer y producir la enterotoxina en una gran variedad de sustratos bajo extensos límites de condiciones ambientales. La producción de enterotoxinas se lleva a cabo en límites más estrechos que los requeridos para el crecimiento del microorganismo. Es un típico indicador de contaminación humana en alimentos que han sido objeto de tratamiento térmico (Fernández-Escartín, 2000).

El hombre y mamíferos constituyen el primer reservorio del microorganismo. Se alberga en el tracto nasofaríngeo de personas con o sin signos y síntomas de la enfermedad, en la piel sana y en las infecciones piógenas de la piel. Los estafilococos utilizan una amplia gama de carbohidratos. En condiciones aerobias el principal producto de la utilización de la glucosa es el ácido acético, con pequeñas cantidades de CO₂. En condiciones anaerobias es ácido láctico (Minor, T. 1976a).

En agar Baird-Parker (ABP) la peptona y el extracto de carne constituyen la fuente de carbono y nitrógeno. El extracto de levadura aporta vitaminas del complejo B y la glicina y el piruvato estimulan su crecimiento. Este medio de cultivo es selectivo por la adición de telurito de potasio y cloruro de litio, que inhiben el desarrollo de la mayoría de la flora acompañante; y diferencial debido a que al medio se le incorpora una emulsión de yema de huevo que permite demostrar la actividad lecitinasa, produciendo alrededor de la colonia una zona opaca que a menudo tiene una zona clara más externa. Se pueden encontrar cepas no lipolíticas, que presentan características similares de colonias, pero sin la zona opaca y clara (Bergdoll, 1989). Adicional al efecto inhibitorio del telurito de potasio los estafilococos coagulasa positiva lo reducen a telurio y originan colonias de color grisáceo-negro.

El estafilococo es un anaerobio facultativo pero su desarrollo es más abundante en condiciones aerobias. La proliferación ocurre, desde 6.5 hasta 46°C, con óptima de 37°C. El pH óptimo es de 7 a 7.5 con desarrollo que varía desde un pH de 4.2 a 9.3 (Bergdoll, 1989). Se desarrolla bien en casi todos los medios de laboratorio de rutina, por ejemplo agar soya tripticasa.

2.1.1. Factores ecológicos

La siguiente recopilación y comentarios ilustran la influencia de los factores ecológicos que afectan la actividad del *S. aureus* en los alimentos; se han seleccionado los más relevantes. Hay que aclarar que en general, toda esta información es aplicable solo a las condiciones particulares en las que cada investigador diseña sus estudios, especialmente las cepas empleadas, la densidad de los inóculos, y el control de los factores asociados a aquel que en particular esté siendo motivo de evaluación. Cuando se estudia por ejemplo, el efecto del pH sobre la sobrevivencia o tasa de desarrollo, generalmente los restantes factores, se ajustan a su nivel óptimo. La influencia de la temperatura sobre *S. aureus* debe estudiarse no sólo como factor condicionante de su multiplicación en los alimentos, sino también por su efecto letal. Este se puede manifestar en las dos situaciones extremas, la congelación y la alta temperatura. En ambos casos la pérdida de la viabilidad es afectada no sólo por el nivel de la temperatura, sino por el efecto asociado de otros factores, sea protector o agravante (Bryan, 1976).

Una diversidad de condiciones opera para que dichos alimentos se vean incriminados en brotes de intoxicación alimentaria; entre otros se incluyen la exposición a la contaminación, el estado fisiológico de las células, la composición del sustrato, A_a , pH, potencial de óxido reducción, humedad relativa, antagonismo microbiano, presencia de conservadores, la temperatura y el carácter termoestable de la enterotoxina. Destacan y se comentan los siguientes:

1. La composición química del sustrato
2. El pH
3. La A_a
4. La temperatura
5. El potencial de oxidorreducción
6. La presencia de flora antagónica
7. La vitalidad del microorganismo

2.1.1.1. Composición química del sustrato

La situación más favorable para el *S. aureus* es la presencia de proteínas de origen animal y adecuada fuente de energía: un carbohidrato fácilmente fermentescible como la glucosa. No es de extrañar por ello, que sean los productos lácteos y cárneos, o que los contienen en su formulación, los que con mayor frecuencia aparecen implicados como vehículo en los brotes. Puede metabolizar la glucosa aeróbica y anaeróticamente hasta piruvato. El ácido se produce en las mismas condiciones a partir de la glucosa, lactosa, maltosa y manitol. Muchas cepas hidrolizan las proteínas animales nativas (hemoglobina, fibrina, clara de huevo y caseína), y polipéptidos como la gelatina. Los lípidos y fosfolipoproteínas son hidrolizadas con liberación de ácidos grasos. No obstante, aunque se llegan a alcanzar niveles de cientos de millones de estafilococo por gramo de alimento, estos no suelen mostrar signos de deterioro, por lo que las personas los consumen sin reticencia (Saldaña, 1991).

2.1.1.2. pH

El pH óptimo para el crecimiento de *S. aureus* y producción de la enterotoxina estafilocócica (EE) es próximo a la neutralidad. Sin embargo, numerosas investigaciones revelan que el tipo de acidulante utilizado para ajustar el pH tiene un marcado efecto en el desarrollo del germen y por ende en la producción de la toxina. Minor y Marth (1970), compararon la efectividad de diversos ácidos orgánicos para inhibir el desarrollo de *S. aureus* en leche. Observaron que la inhibición es más acentuada si se usa ácido acético, siguiéndole en efecto, el cítrico, el láctico, tartárico y clorhídrico. Para conseguir una reducción de 90% en el desarrollo al cabo de 12 h, el pH debió ajustarse a 5.2 con ácido acético, a 4.9 con láctico, a 4.7 con cítrico y a 4.6 con clorhídrico. Una reducción de 1000 veces se alcanzó a pH 4.9 usando ácido acético en tanto que para el mismo efecto con el clorhídrico, fue posible reducirlo hasta 3.3

Los límites de pH para la síntesis de la toxina son más estrechos que los requeridos para el desarrollo del germen. Es decir, dentro de ciertos valores de pH una cepa enterotoxigénica puede entrar en actividad e incrementar su número, sin que se acompañe de la liberación de EEs. Se afirma que las enterotoxinas A (EEA), B (EEB), C (EEC) y D (EED) podrían ser generadas en una variedad de alimentos con valores de pH entre 5.5 y 6.0, pero no por debajo de 5.0 (Scheusner y Harmon, 1973).

2.1.1.3. Actividad de agua (A_a)

La cantidad de agua que es aprovechable por los microorganismos ó A_a tiene un importante efecto en el crecimiento. La A_a es disminuida por sustancias polares que se disuelven en el agua. Por ejemplo, en la crema pastelera que se emplea para relleno de panes, la harina, el huevo y la leche tienen un efecto menor en la A_a ; el azúcar en cambio tiene una considerable influencia. Pero aún así, las cremas pasteleras con baja A_a no deben considerarse seguras ya que el agua puede emigrar y formar cavidades con una mayor A_a que el resto del producto siendo esto particularmente posible en la interfase entre la crema y la costra del pan (Díaz, y Pérez, 1985). Un valor de A_a por debajo de 0.86 puede prevenir el desarrollo de *S. aureus* y por debajo de 0.90 la producción de EEs (Bergdoll, 1989).

2.1.1.4. Temperatura

Como parásito humano, el *S. aureus* es un mesófilo típico con temperatura óptima para crecer de 35 a 37°C. La temperatura tiene una influencia definitiva en el desarrollo del microorganismo y la producción de la EEs. Surkiewicz (1966) reportó un incremento en la población de estafilococos coagulasa positivos en pasteles de crema almacenados a temperatura ambiente durante 24 a 48 h. Numerosos estudios muestran la susceptibilidad al calor de esta bacteria (Baird-Parker, 2000; Bergdoll, 1989; Iandolo y Ordal, 1966). La pasteurización entonces es un medio muy seguro para su destrucción. El inadecuado almacenamiento o la falta de refrigeración de pasteles rellenos, es un factor decisivo en la mayoría de los brotes de intoxicación por *S. aureus* (Bryan, 1976).

2.1.1.5. Potencial de oxidorreducción

El potencial redox es un importante factor selectivo en todos los ambientes, incluidos los alimentos. Los microorganismos aerobios necesitan valores redox positivos para crecer, mientras que los anaerobios, valores negativos. La tasa de desarrollo y la cantidad de toxina producida por *S. aureus* en anaerobiosis es menor a la obtenida en aerobiosis. En caldo infusión cerebro corazón (BHI) aerado se han registrado concentraciones de 65µg ml⁻¹ de EEB en menos de 24 h a 37°C; en cultivo estático, el tiempo requerido es de 10 días para generar solo la mitad de EEB (McLean *et al.*, 1968).

2.1.1.6. Presencia de flora antagónica

El *S. aureus* compite muy mal con otros microorganismos (Iandolo *et al.*, 1965). Los factores que favorecen la actividad de uno y otro son los mismos, pero no de igual valor cuantitativo. La competencia por nutrientes esenciales puede determinar ese efecto, como se ha demostrado con *Serratia marcesens*, *Pseudomonas* y *Streptococcus diacetylactis* (Peterson *et al.*, 1962). Las bacterias lácticas actúan en función de la producción de agua oxigenada o de la acidez que generan (Dahiya y Speck, 1968; Daly *et al.*, 1973). La complejidad de las asociaciones microbianas se ilustra todavía más con el hecho de que el *S. aureus* tiene la capacidad de inhibir a *Brevibacterium megatherium* y *B. linens* (Graves y Frazier, 1963). Las bacterias lácticas son especialmente activas contra *S. aureus* (Kao y

Frazier, 1966). En el requesón y en el pastel de moka se ha observado un intenso efecto antagónico de una flora láctica artificialmente inoculada sobre cepas enterotoxigénicas de *S. aureus* (Saldaña, J., 1991).

2.1.1.7. Vitalidad del microorganismo

El daño que sufren los microorganismos por efecto del calor, refrigeración, desecación, cambios en el ambiente nutricional, sustancias químicas diversas, liofilización y congelación-descongelación, tienen un especial significado en la microbiología de los alimentos (Hurst, 1977). Estos tratamientos pueden afectar la integridad estructural y funcional de las células. El sitio primariamente dañado es la membrana celular (Iandolo y Ordal, 1966; Allwood y Russell, 1969), pero también hay degradación de moléculas y destrucción o inactivación de enzimas (Bluhm y Ordal, 1969; Martin *et al.*, 1976; Miller y Ordal, 1972). Se considera dañado un microorganismo cuando se muestra incapacitado para crecer en un medio o alimento en el que de ordinario lo hace libremente.

2.1.2. Productos extracelulares

S. aureus es capaz de producir una muy amplia gama de compuestos, la mayoría de los cuales están implicados en la génesis de la enfermedad. Toxinas de acción local, enterotoxinas, leucocidinas, exotoxinas y diversas enzimas forman el arsenal de este "bien equipado patógeno". En agar sangre, *S. aureus* produce una lisis de glóbulos rojos. Estas son en realidad potentes toxinas citolíticas, que actúan sobre las membranas de muchas células (no sólo los eritrocitos) y causan gran destrucción tisular (Joklik *et al.*, 1998).

2.1.2.1. Enterotoxinas estafilocócicas (EEs)

El estudio de las EEs empezó en 1930 cuando se aisló una cepa de *S. aureus* a partir de un alimento responsable de un brote de intoxicación haciéndolo crecer en cultivo puro. El filtrado estéril fue ingerido por voluntarios los cuales manifestaron los síntomas de la enfermedad (Minor, T. 1976b). Catorce EEs han sido identificadas y reportadas en la literatura (Cuadro 1). Las más estudiadas son los tipos EEA (Friedman y Howard, 1971), EEB

(Altenbern, 1975), EEC₁ (Genigeorgis, *et al.*, 1971a.), EEC₂, EEC₃, EED (Bautista *et al.*, 1988) y EEE.

Cuadro 1. Peso molecular y punto isoeléctrico de las EEs.

Tipo (EEs)	Peso Molecular (Da)	Punto isoeléctrico
A	27,100	7.3
B	28,336	8.6
C ₁	27,531	8.6
C ₂	27,531	7.8
C ₃	27,563	8.1
D	26,360	7.4
E	26,425	7.0
G	27,043	5.7
H	25,210	No determinada
I	24,928	No determinada
J	28,565	8.65
K	25,539	6.5
L	24,593	8.66
M	24,842	8.24
N	26,067	6.97
O	26,777	6.55

Fuente: European Commission Health & Consumer Protection, 2003.

Las EEs son cadenas polipeptídicas constituidas principalmente por lisina, tirosina, ácido glutámico y ácido aspártico, con un peso molecular de 25,000 a 29,000 Da. Son resistentes a la acción de diversas enzimas proteolíticas y al calor, lo que en el alimento constituye un riesgo, ya que aun después del tratamiento térmico, las toxinas permanecen activas en ausencia total del microorganismo (El-Dairouty, 1988). Se sintetizan durante la fase log en pequeña cantidad; generalmente se observa un incremento al final de esta e inicio de la estacionaria y cuando hay niveles de *S. aureus* mayor de 10^6 g⁻¹ (Fernández-Escartín, 2000). La presencia de quitina (0.1%) no sólo estimula la producción de EEs (hasta 88 %), sino que incrementa la termoestabilidad de la toxina (Anderson *et al.*, 1997).

S. aureus es positivo a la producción de coagulasa. Se ha observado que la mayoría de las cepas enterotoxigénicas son coagulasa positiva; sin embargo, cepas de *S. aureus* coagulasa negativas han sido reportadas en brotes de intoxicación (Breckinridge y Bergdoll, 1971). Pruebas más recientes muestran una buena correlación entre la producción de EEs y

la de termonucleasa, sin ser definitiva por sí sola. Se estima que $<1 \mu\text{g}$ de EEA puede ser suficiente para causar la enfermedad. Esta observación se basa en la estimación del contenido de enterotoxina en queso que fue implicado en un brote y la pequeña cantidad de queso consumido por las personas que enfermaron (Minor, T. 1976c).

2.1.3. Fuentes y mecanismos de contaminación

El mayor reservorio de *S. aureus* son los humanos y animales. El porcentaje de humanos sanos que son portadores varía de 30 al 50%, con 15 a 35% como portadores permanentes (Bergdoll, 1989). Alimentos como el puré de papa y los rellenos de pasteles se han identificado con especial frecuencia como vehículos de EEs en brotes de enfermedad asociados a su consumo, tanto en México como en otros países (Fernández-Escartín, 2000).

El proceso de configuración de peligros en los brotes de intoxicación por EEs se inicia con la contaminación del alimento. A continuación es imperativa la multiplicación de la bacteria de manera que se genere suficiente toxina (alrededor de $1 \mu\text{g}$) en la porción comestible para provocar una respuesta clínica (Wei y Chiou, 2002). Es necesario tomar en cuenta que si bien un alimento como tal no sostiene el desarrollo del estafilococo, por ejemplo el yogurt o el helado de crema, pueden ser, y de hecho se han reportado como causa de brotes. Esto ocurre cuando algún ingrediente o la materia prima ya contenían EEs al tiempo de usarlo en la elaboración del producto. Los tratamientos recibidos (fermentación, congelación, pasteurización) no suelen afectar la integridad de la toxina (Bergdoll, 1989).

Con base en los datos de morbilidad de la Secretaría de Salud (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2005), que se mantienen con variaciones menores en los últimos años, puede estimarse que en el país ocurren más de 300 millones de episodios de enfermedades transmisibles por alimentos (ETA's) anuales en nuestro país (Fernández-Escartín, 2000). Con todo su potencial económico, científico, tecnológico y nivel sanitario, en Estados Unidos la estimación para 1998 fue de 76 millones de eventos anuales, con 350,000 hospitalizaciones y 5,000 muertes (Mead *et al.*, 1998).

El patrón de respuesta del patógeno es crítico para que el alimento pase del estado de inocuidad a la de riesgo plenamente configurado, lo cual está determinado tanto por la composición del alimento como por las condiciones ambientales. Las bacterias patógenas se exponen en su ambiente natural a los efectos de diversos agentes físicos y químicos que merman su capacidad para sobrevivir o desarrollar en un alimento (Samelis y Sofos, 2003). De manera general, las bacterias reaccionan al estrés ambiental a través de cambios temporales o mutaciones (Archer, 1996). Adicionalmente, son factores relevantes el potencial enterotoxigénico de la cepa de *S. aureus* implicada (Baird-Parker, 2000), y como se ha indicado, su condición fisiológica particular en la que se encuentre al tiempo de ingresar al alimento.

2.2. Estrés celular

Para sobrevivir y desarrollar los microorganismos deben mantener su integridad y una condición de homeostasis. Sin embargo, la exposición a factores ambientales pueden afectar estos procesos. En ausencia de mecanismos protectores, la intensidad del efecto suele provocar una condición de estrés, y en caso extremo la muerte celular (Gahan y Hill, 2003). Dentro del huésped, el germen encuentra barreras o mecanismos de defensa que también afectan su capacidad de sobrevivencia y enfrentan condiciones adversas de variada intensidad. El estrés no letal induce la expresión de genes cuya función es conferir protección contra esas condiciones adversas. Los genes de esta categoría incluyen los chaperones moleculares, las proteínas de choque térmico, ATPasas, y otros sistemas responsables de mantener la homeostasis celular. Adicionalmente, el estrés en los microambientes del huésped puede en ocasiones estimular genes de regulación con papel específico en la colonización y patogénesis (Gahan y Hill, 2003).

El estrés suele definirse dependiendo del contexto para su uso. En física, por ejemplo, estrés es la fuerza que se aplica por unidad de área. Cuando se emplea en el campo de la biología, estrés se refiere a la respuesta a la exposición a condiciones nutricionales deficientes, a agentes químicos y condiciones físicas no óptimas (Samelis y Sofos, 2003). En la literatura sobre estrés microbiano, se emplean varias descripciones para referirse a la respuesta al estrés: “adaptación”, “tolerancia”, “habituaación” y otros. Estas son objeto de estudios de laboratorio y reflejan diferentes respuestas fisiológicas. En este trabajo, estrés se

refiere a la respuesta adversa en el crecimiento o la sobrevivencia microbiana tras la exposición a cualquier factor o condición. De acuerdo con esta definición práctica, muchos de los tratamientos durante el proceso de los alimentos se consideran estresantes (Yousef y Courtney, 2003).

Para referir la respuesta de los microorganismos con el estrés se emplea la palabra “*ligero*” para describir el nivel subletal, que no afecta la viabilidad, pero reduce la velocidad de crecimiento, “*moderado*” cuando no solamente afecta el crecimiento microbiano sino además causa algún daño en la viabilidad de la célula, pero es reversible, y “*extremo*” o “*severo*” se refiere a un daño de magnitud que es letal para las células, dando lugar a la muerte de la mayoría de la población (Yousef y Courtney, 2003).

2.2.1. Mecanismos de respuesta de adaptación al estrés

Se ha demostrado que la adaptación incrementa la tolerancia al estrés causado por diversos factores ambientales (Wong y Liu, 2006). El proceso está regulado por cambios en la fisiología de los microorganismos tanto estructurales como metabólicos. Algunas bacterias poseen una notable capacidad para adaptarse a los efectos de factores ecológicos que les provocan un estado de estrés celular de variada intensidad. En los modelos de laboratorio se presentan problemas derivados de la condición particular de las cepas de los microorganismos utilizados. La plasticidad que les es proverbial, da lugar a que ante el efecto de factores ecológicos a los que se exponen en el ambiente (temperatura, humedad, disponibilidad de oxígeno, condiciones de acidez y otros), los microorganismos llevan a cabo procesos adaptativos que movilizan sus recursos metabólicos y modifica su tolerancia a esos factores.

Está ampliamente documentado que la adaptación favorece la tolerancia al estrés físico, químico o biológico y promueve la sobrevivencia o desarrollo en ambientes adversos, incluidos los que se encuentran en donde se producen y procesan alimentos (Ravishankar y Juneja, 2003). La tolerancia en ocasiones no es específica (Mackey *et al.*, 1994); por ejemplo *E. coli* O157:H7 incrementa su tolerancia a temperaturas elevadas después de haber sido expuesta a un estrés ácido (Ryu y Beuchat, 1999). La restricción de nutrientes disponibles y

el estrés ácido extienden la tolerancia a 56°C de *Listeria monocytogenes* (Lou y Yousef, 1997). También se ha observado que una resistencia a la acidez aumenta la virulencia de *L. monocytogenes* en ratones (O'Driscoll *et al.*, 1996). *Salmonella* expuesta a bajos niveles de A_a (0.95) muestra una mayor tolerancia a temperatura elevada (54°C) independientemente de los solutos utilizados para ajustar la A_a (Mattick *et al.*, 2000). La transferencia sucesiva en sustratos con concentraciones crecientes de acidez puede conducir a una acrecentada tolerancia (sobrevivencia o desarrollo) a bajos niveles de pH. Las células de *L. monocytogenes* y *Salmonella* Typhimurium, que sobreviven a tratamientos térmicos subletales, exhiben una tolerancia a temperaturas que no soportan los cultivos originales (Bunning *et al.*, 1990).

Generalmente el proceso adaptativo es reversible, de manera que las poblaciones celulares tratadas dejan de manifestar el cambio inducido cuando cesa la exposición a las condiciones que lo determinaron. Este comportamiento, sin embargo, puede acarrear problemas de sobrevivencia o proliferación en alimentos que reciben tratamientos o se almacenan en condiciones que habitualmente permiten un control efectivo del germen (Yousef y Courtney, 2003).

Los microorganismos en los alimentos o en el medio ambiente con frecuencia están expuestos a estrés, y algunas de las respuestas que manifiestan son susceptibles de ser evaluadas. La respuesta varía principalmente con el tipo y magnitud del estrés. Bajo ciertas condiciones, la respuesta microbiana puede tener un efecto de protección o adaptación. Los microbiólogos y procesadores de alimentos están interesados en la respuesta de adaptación al estrés, que podría modificar la resistencia de los microorganismos a los tratamientos aplicados, incluidos los de preservación. Como se anotó, un pronunciado nivel de estrés puede dañar a las células. El daño de las células se inicia al agotarse las fuentes de energía con un decremento en la capacidad para superar efectos nocivos adicionales. El daño es evidente por la sensibilización de las células a los tratamientos con agentes selectivos, antibióticos y otros factores de deterioro o el efecto en la multiplicación de las células.

Detectar y medir la respuesta al estrés ofrece algunas aplicaciones benéficas. Los procesadores de alimentos deben conocer las consecuencias de los tratamientos

moderados, así como los mecanismos que dan lugar a la resistencia de los patógenos a procesos que presumiblemente son letales para esos microorganismos.

Para determinar las condiciones que conducen a las respuestas de adaptación, es posible variar la intensidad del nivel de estrés aplicado. Basados en la experiencia y la literatura publicada, hay que reconocer que la respuesta microbiana de adaptación es más aparente a niveles subletales de estrés, y cuando el microorganismo se encuentra en un activo estado metabólico. Muchos investigadores, sin embargo, han demostrado que es posible inducir la adaptación microbiana en la fase estacionaria (Buchanan y Edelson, 1999). De igual forma, cuando algún factor es modificado y las células son expuestas a una dosis letal puede ocurrir una adaptación de la fracción de la población que eventualmente sobreviva al tratamiento. Después de la aplicación del estrés bajo investigación, se intenta detectar y cuantificar la respuesta. Aunque la detección de la respuesta al estrés es generalmente laboriosa, la distinción del daño es relativamente simple. Debe destacarse que las células estresadas-sensibilizadas (dañadas) muestran una disminución en la velocidad de crecimiento, y en ocasiones se reduce el tamaño de la colonia en agar, se perjudica el crecimiento en la presencia de agentes selectivos como NaCl y sales biliares, se incrementa la sensibilidad a antibióticos y se presenta una pérdida de la aerotolerancia (Yousef y Courtney, 2003).

2.2.2. Espectro de respuestas de los microorganismos

El fenómeno del estrés en los microorganismos puede catalogarse en distintas clases: a) respuestas a estrés específico y fenómeno de causa (choque térmico, ácidos y acidez, osmolaridad reducida) b) respuestas generales al estrés (esporulación bacteriana y resistencia, respuestas patogénicas) (Johnson, 2003) c) adicionalmente hay que incluir la respuesta de percepción en *quorum* (Whiteley y Greenberg, 2001), muerte celular programada según edad de las células (Beckman y Ames, 1998; Lewis, 2000), y formación de biopelículas multicelulares o multiespecies (Costerton *et al.*, 1999). La respuesta al estrés puede suponer la afectación a la resistencia y sobrevivencia de patógenos y organismos esporulados a lo largo de la cadena de producción de alimentos, desde la precosecha (en el caso de frutas y hortalizas), o en operaciones de procesamiento, y almacenamiento de

alimentos durante su vida de anaquel. Puede variar acorde con la composición del alimento, y respecto a la ecología microbiana y las especies asociadas en los alimentos (Roberts *et al.*, 1998).

2.2.3. Respuesta al estrés y el impacto en la sobrevivencia de *S. aureus*

Numerosas investigaciones demuestran que el medio ambiente y las propiedades de resistencia de *S. aureus* influyen en los parámetros de crecimiento. Shebuski *et al.*, (2000) evidenciaron que el medio de crecimiento tiene un marcado efecto en la resistencia de *S. aureus*. El crecimiento de *S. aureus* con una A_a de 0.94 incrementa la resistencia térmica a 60°C. Ésta resistencia es mediada por la expresión de proteínas de choque térmico y por la acumulación de solutos compatibles que contribuyen al incremento de la resistencia térmica. La formación de biopelículas por *S. aureus* y *S. epidermidis* parece estar influenciada por la exposición a etanol y sales (Knøbloch *et al.*, 2001; Rachid *et al.*, 2000).

2.3. Epidemiología

Por mucho, son los agentes microbianos los que con mayor frecuencia afectan la salud de la población en todo el mundo, tanto en forma de brotes, como de casos individuales (Knøchel y Gould, 1995; Todd y Pivnick 1974). Esta aseveración debe ser subrayada. Sólo con el reconocimiento de su validez podrá plantearse correctamente el problema y la solución de la mala calidad sanitaria de los alimentos en nuestro país. Es lamentable, y eso en parte explica la situación, que algunos altos funcionarios sostengan que son los contaminantes químicos (naturales o introducidos por el hombre), los que más frecuentemente amenazan nuestra salud siguiendo la vía de los alimentos.

2.3.1. Intoxicación estafilocócica

La sintomatología de la intoxicación estafilocócica es muy característica, lo bastante, para disponer de un diagnóstico presuntivo desde el inicio del estudio epidemiológico de un brote. Contribuyen a ello la cortedad del periodo de incubación. Generalmente los síntomas aparecen entre los 30 min y 8 h; excepcionalmente fuera de estos límites después de la ingesta del alimento. Entre 1 y 3 h se concentra la mayor proporción. La extensión está

determinada por la cantidad de toxina ingerida (no necesariamente la cantidad de alimento consumido) y por la susceptibilidad de cada persona. No todas las personas que consumen el alimento sospechoso enferman, ni todos estos responden con la misma sintomatología. Lo más característico es la náusea, el vómito y la diarrea que generalmente se presentan en más del 75% de los casos; el dolor abdominal suele estar presente. Con menos frecuencia se ha reportado cefalea, calosfríos, postración, debilidad, colapso, hipotensión y aún fiebre. Los síntomas se instalan abruptamente, pero la duración del padecimiento no suele ir más allá de un día y eventualmente dos (Fernández-Escartín, 2000).

Algunos investigadores han revisado documentos históricos en los que se consignan las primeras descripciones sobre la intoxicación estafilocócica, cuando aún se desconocía el papel del microorganismo en su etiología. En 1830 se exponía de manera anónima en una publicación científica: “se ha observado con frecuencia en el Continente que ciertos alimentos adquieren propiedades venenosas de un tipo especial y en forma que los químicos y médicos no han podido explicar satisfactoriamente. Los más comunes son una variedad de queso y salchicha en Alemania; pero también el tocino y el jamón en Francia y Alemania se han encontrado varias veces con esa condición. En el caso que dio lugar a su investigación, el jefe de una familia compró un pastel de jamón en Paris. Toda la familia consumió la carne el mismo día. Tres horas después el jefe de familia se vio afectado con ansiedad, seguido de sudores fríos, estremecimiento, dolor violento en el estómago y vómito frecuente; a continuación sed abrasadora, extrema sensibilidad en el vientre de manera que difícilmente podía soportar el peso de las sábanas, diarrea profusa y cólico en extremo violento. Su hija de 27 años y un niño de 9 años fueron atacados de manera similar. El médico que les atendió declaró que tenían una inflamación violenta en el estómago, lo que inclinaba que se le atribuyera a un verdete natural o a un carbonato de cobre impartido por hongos del preparador del pastel. En pocos días los tres individuos se recuperaron con un tratamiento antiflogístico. Alrededor de ese periodo otros clientes sufrieron accidentes similares, y en consecuencia se ordenó una investigación judicial. Después de una investigación adecuada se encontró que cada operación se efectuaba con la debida atención a la limpieza. Las pruebas químicas efectuadas por separado en la carne y en la pasta, así como el vómito y la materia fecal, no revelaron trazas de los venenos químicos comúnmente reconocidos: arsénico, cobre, antimonio y plomo, sugiriendo la relación de la enfermedad con venenos biológicos” (Dack, 1956).

Para que los alimentos se vean involucrados en brotes de intoxicación alimentaria por *S. aureus*, influye la composición del sustrato, la actividad de agua, el pH, el potencial de óxido-reducción, la presencia de conservadores, es estado fisiológico de las células, el antagonismo microbiano y el carácter termoestable de las EEs (Tibana *et al.*, 1987). La ingestión del germen, incluso enterotoxigénico, no es el antecedente o condición obligada para que se presente el daño. Mas aún, la intoxicación puede aparecer tras la ingestión de un alimento libre de estafilococos viables. Siendo por otra parte, una bacteria común en diversos tejidos del hombre y animales, se le conoce como un patógeno oportunista (Fernández-Escartín, 2000).

2.3.1.1. Variación estacional

Es de esperar una mayor incidencia de la intoxicación estafilocócica durante la época calurosa del año, dado que uno de los factores más frecuentemente detectado como propiciador de los brotes, es el abuso de la temperatura en el almacenamiento de los alimentos implicados. Así ocurre en efecto al menos en Estados Unidos, según se advierte en el siguiente Cuadro:

Cuadro 2. Brotes de intoxicación por *S. aureus* según mes de presentación. Estados Unidos 1988-1992.

Año	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
1988	0	1	1	1	0	1	0	1	0	2	1	0
1989	0	3	2	1	2	2	1	0	1	0	0	2
1990	1	1	0	1	3	2	3	1	1	0	0	0
1991	0	0	2	1	0	2	2	0	0	1	1	0
1992	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1
TOTAL	1	5	6	5	6	7	7	2	3	3	2	3

Fuente: CDC, 1996.

Bergdoll (1989) reportó que en un tiempo los rellenos de pastel fueron la principal causa de intoxicación estafilocócica en Estados Unidos; sin embargo, en la actualidad este

tipo de alimento está menos involucrado, probablemente porque se tienen más cuidados en su manejo especialmente en los meses calurosos.

2.3.1.2. Morbilidad y letalidad

La morbilidad y mortalidad originada por enfermedades gastrointestinales fueron sumamente elevadas en todo el mundo hasta finales del siglo XIX. En el transcurso de los primeros años del siglo pasado, el problema se fue resolviendo en los países industrializados gracias a la elevación de los niveles generales de vida de dichas sociedades (Bryan, 1976). Sin embargo, en los países en desarrollo las enfermedades gastrointestinales continúan siendo uno de los principales problemas de salud pública que afectan sobre todo a la población infantil. Con base en datos epidemiológicos del sector salud es fácil apreciar a las intoxicaciones alimentarias como uno de los más frecuentes problemas de salud entre los mexicanos (Fernández-Escartín, 2000).

Se reconoce en general que la letalidad de la intoxicación está próxima a cero. Ocasionalmente se presentan muertes. Se trata de personas de edad avanzada o menores, de los que no se proporciona la información necesaria para establecer un diagnóstico correcto de la causa de la muerte. Entre 1,526 casos Canadá reportó 3 muertes; de 6,903 casos en Estados Unidos no se reportó una sola; y de 714 en Inglaterra, solo una (Tood, 1978).

2.3.1.3. Alimentos más frecuentemente implicados

Muchos alimentos son un excelente medio para el crecimiento de *S. aureus*. Los comúnmente asociados con intoxicación alimentaria son la carne (vaca, cerdo y aves), productos cárnicos salados (jamón, salami, salchichas), productos de panadería (rellenos de crema) y productos lácteos (quesos) (Bergdoll, 1989). La leche raramente participa en brotes en Estados Unidos; sin embargo, un brote ocurrió en una escuela en Kentucky en 1985, después de consumir leche con chocolate. La EEA fue detectada en la leche, aunque no fue posible aislar *S. aureus*. La investigación reveló que por descuido, la leche estuvo a temperatura ambiente por 4-5 h antes de su pasteurización, tiempo durante el cual desarrolló el estafilococo y sintetizó la toxina; desafortunadamente las EEs no se inactivaron con la

pasteurización (Bergdoll, 1989). En Estados Unidos los brotes de intoxicación en los cuales la crema pastelera ha sido identificada como el vehículo de EEs, declinaron del 17.8% en 1939 al 2.3% en 1973 (Bryan, 1976).

2.3.1.4. Brotes de intoxicación estafilocócica

En la ciudad de Guadalajara un brote de gastroenteritis asociado al consumo de pastel de moka causó no menos de 60 casos de intoxicación entre más de cinco familias. La moka se preparó a base de huevo, margarina, azúcar y café en la pastelería. Los ingredientes se mezclaron en una batidora; un empleado que posteriormente se identificó como portador de *S. aureus* en la piel del antebrazo, participaba en el batido introduciendo manos y antebrazo en la crema dentro de la batidora. Los pasteles se prepararon extendiendo la moka entre dos mitades del pan horneado, los cuales se almacenaron entre 28 y 32°C. El estudio del laboratorio mostró una incapacidad del estafilococo para multiplicarse directamente en la crema. Sin embargo, en la pastelería se acostumbraba rociar las partes internas del pan con agua edulcorada previo a la incorporación de la moka. Este tratamiento elevó la actividad de agua lo suficiente para permitir el desarrollo del germen en los pasteles. Los pasteles rellenos de mermelada de fresa preparados simultáneamente en la misma pastelería, mostraron una escasa presencia de *S. aureus* (si bien no dieron lugar a caso de intoxicación) poniendo de manifiesto prácticas de operación que propiciaban una continua contaminación cruzada (Fernández-Escartín *et al.*, 1998).

En Estados Unidos entre 1938 y 1972 de 573 brotes de intoxicación por pasteles rellenos, en 374 (65%) se identificó *S. aureus* como agente etiológico. En uno de dichos brotes se analizaron cultivos de exudados nasofaríngeos de los empleados de la pastelería encontrándose en la mayoría de ellos *S. aureus*, incluso una infección purulenta de uno de ellos (Bryan, 1976)

Dentro de los factores asociados a brotes de intoxicación destacan la participación de un portador del microorganismo entre quienes preparan el alimento, un largo periodo entre la preparación y consumo del alimento y una refrigeración nula o inadecuada. Para que se acumule suficiente EEs en un alimento cuyo consumo ulterior provoque una respuesta clínica, el *S. aureus* enterotoxigénico debe multiplicarse hasta concentraciones casi siempre

mayores a un millón de UFC g⁻¹ ó ml⁻¹. Raj y Bergdoll (1969) estimaron que 20 a 25 µg de EEB es suficiente para causar manifestaciones clínicas en el hombre, que parece ser más sensible que el mono.

2.3.1.5. Prevención y control de *S. aureus*

El estafilococo es un microorganismo de amplia ubicuidad, virtualmente imposible eliminarlo del medio ambiente. Al menos en el 50% de los individuos portadores del microorganismo puede ser aislado de conductos nasales, garganta o de sus manos. En cualquier momento un alimento expuesto a la manipulación humana, se encuentra en riesgo de ser contaminado. No todas las cepas son toxigénicas, pero un elevado porcentaje (50-70%) puede serlo. Calentar los alimentos después de su manipulación y antes de su consumo normalmente es una buena medida de prevención; sin embargo si la toxina ha sido sintetizada en el alimento, el calentamiento no es suficiente para destruir la toxina. En muchos casos, el alimento no es manejado adecuadamente después de su procesamiento; entonces el microorganismo puede desarrollar y producir EEs. Para prevenir la intoxicación estafilocócica, es importante mantener refrigerados los alimentos susceptibles durante todo el tiempo entre su preparación y consumo. La mayoría de las intoxicaciones pudieron ser prevenidas si se toma esta simple medida (Bergdoll, 1989).

2.4. Microbiología predictiva

2.4.1. Antecedentes

Investigadores, profesionales en inocuidad de los alimentos y las agencias reguladoras utilizan cada vez más los modelos matemáticos como herramientas para mejorar la inocuidad y vida de anaquel de los alimentos. La microbiología predictiva requiere un desarrollo sistemático del conocimiento de la cinética microbiana y respuesta a los factores del medio ambiente relevantes en los alimentos, todos incluidos en un modelo matemático. Los modelos pueden ser empleados para interpretar los efectos del procesamiento y prácticas de distribución, sobre el crecimiento microbiano en alimentos, para el desarrollo de nuevos productos o procesamiento de los alimentos, y conocer los niveles de seguridad (Baranyi y Roberts, 1994).

La microbiología predictiva inició como una ciencia puramente empírica, cuyos fundadores son probablemente Esty y Meyer. En 1922 describieron la muerte térmica de *Clostridium botulinum* con un modelo logarítmico lineal, el cual se emplea para calcular el tratamiento que debe aplicarse en el procesamiento de productos cárnicos de baja acidez. Este modelo simplemente indica que a una temperatura determinada la velocidad relativa de muerte de las bacterias es constante con el tiempo (Baranyi y Roberts, 1994).

La microbiología predictiva se basa en la premisa de que el crecimiento, sobrevivencia e inactivación de los microorganismos puede ser cuantificada y expresada con ecuaciones matemáticas, y que bajo un conjunto de condiciones ambientales específicas el comportamiento microbiano es reproducible (Ross y MaMeekin, 1994). A continuación se hace referencia a justificaciones en el uso de la microbiología predictiva en alimentos según Baranyi y Roberts, (1994):

1. El objetivo de los microbiólogos en alimentos es minimizar o prevenir el crecimiento microbiano en lugar de optimizarlo como suele ser la regla en biotecnología. Consecuentemente los efectos de los factores inhibitorios ambientales, como conservadores, se han investigado más intensivamente.

2. La concentración de células de interés es mucho menor que en biotecnología, donde es típicamente mayor que $10^6 - 10^7$ células ml^{-1} o g^{-1} . En consecuencia, algunos métodos validados a altas concentraciones de células, por ejemplo, turbidez, biomasa, o mediciones de conductividad, no deben ser aplicados directamente sin establecer la relación entre el número de células y la medición a bajas concentraciones bacterianas.

3. A diferencia de un biorreactor en la microbiología de alimentos, la cinética de la fase lag es de gran importancia.

4. Generalmente la información disponible acerca del ambiente fisicoquímico de un alimento es mucho menor y a menudo menos precisa que en un bioreactor. Por lo tanto, los métodos matemático-estadísticos aplicados involucran varios elementos simplificadores y empíricos.

2.4.2 Modelo de Baranyi

De acuerdo con la Web of Science citation index (ISI, 2007), el modelo de Baranyi ha sido subsecuentemente citado en más de 300 artículos, y ha llegado a ser el modelo de crecimiento primario más ampliamente utilizado (Baranyi y Roberts, 2004). Aunque es útil para ajustar varias curvas (semi-sigmoideas, fase lineal precedida o seguida por fases estacionarias) el principal paso en el modelo fue su origen dinámico. Principalmente describe las fases de transición, tanto para la situación de crecimiento como para la de muerte (Baranyi y Pin, 2001), de manera que puede ser también utilizado para un ambiente fluctuante. El modelo se expresa de la siguiente manera:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{q(t)}{q(t)+1} \cdot \mu_{\max} \cdot \left[1 - \left(\frac{x(t)}{x_{\max}} \right)^m \right] x(t)$$

Donde: x es el número de células al tiempo t , x_{\max} es la máxima densidad de población, $q(t)$ representa la concentración del substrato limitante, la cual cambia con el tiempo. El valor inicial $q(0)$ es una medida del estado fisiológico inicial de las células. El parámetro m representa la curvatura antes de la fase estacionaria.

El modelo se expresa mediante una función que ajusta el estado fisiológico de las células y la modelación de las fases de crecimiento microbiano de una forma más continúa; además permite predecir el crecimiento bajo fluctuaciones de temperatura (Baranyi y Roberts, 1994). Elfwing *et al.*, (2004) validaron de manera experimental la fase lag descrita matemáticamente en el Modelo de Baranyi, para lo cual emplearon una cámara de flujo y un analizador automático de imágenes para posibilitar la observación de divisiones de miles de células individuales y derivar distribuciones estadísticas de ellas.

2.4.3. Base de datos de crecimiento microbiano en alimentos “ComBase”

ComBase es un programa que se inició en el Instituto de Investigación de Alimentos (IFR) del Reino Unido con el propósito de ser una herramienta para el desarrollo de la microbiología predictiva. Es la base de datos más grande en Internet que contiene información sobre el comportamiento de bacterias patógenas en alimentos y caldos de cultivo. La disponibilidad de esta información ofrece grandes beneficios para el aseguramiento de la inocuidad de los alimentos. Es una herramienta importante para estimar los riesgos dentro del Sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico. De igual forma contribuye a la optimización de los recursos destinados a la investigación ya que evita la repetición innecesaria de experimentos. El acceso a esta base de datos es gratuito a través de Internet: www.combase.cc (ComBase, 2007a)

3. JUSTIFICACIÓN

Las siguientes consideraciones justifican el desarrollo de un trabajo de investigación original sobre el comportamiento en alimentos de alto riesgo de una bacteria implicada en un problema de salud pública relevante para nuestro país:

- El conocimiento del comportamiento de los microorganismos en los alimentos proviene de modelos de reto diseñados con cepas de colección. Las descargas de material clínico por un portador humano puede ser instrumentable en el laboratorio y conduce a un mejoramiento en el modelo empleado para evaluar dicho comportamiento.
- En cualquier caso es conveniente llevar a cabo estudios comparativos de los comportamientos con cepas de diferentes orígenes, e incluso que han sido expuestas a diferentes tratamientos estresantes como los que pueden ocurrir durante el manejo, preparación y procesamiento de los alimentos.
- El desarrollo o la sobrevivencia de los microorganismos patógenos en los alimentos resulta determinante en la configuración de peligros que finalmente definen su nivel de inocuidad. Este conocimiento constituye el soporte científico para diseñar acciones de prevención consistentes.
- La información generada de estos estudios constituye una base de datos o de referencia consistentes para la planeación de programas de prevención de riesgos por parte de las empresas que procesan alimentos, y aún de la propia regulación sanitaria.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general:

Evaluar el efecto de la restricción de nutrientes y de tratamiento térmico subletales, sobre el comportamiento en crema pastelera de cepas enterotoxigénicas de *S. aureus* procedentes de diversos orígenes.

4.2 Objetivos específicos

1. Disponer de cepas de *S. aureus* aisladas a partir de alimentos y de portadores humanos, y caracterizarlas fenotípicamente.
2. Determinar la cinética de desarrollo en crema pastelera, de cepas de *S. aureus* de colección, de descargas nasales, recién aislada de portador humano y de diversos alimentos.
3. Evaluar el comportamiento en crema pastelera de cepas de *S. aureus* sometidas a estrés por restricción de nutrientes ó tratamiento térmico.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

Equipo

AquaLab Model CX2. Decagan Devices, Inc.

Autoclave eléctrica de mesa, Market-Forge, Sterilimatic.

Balanza analítica, sensibilidad 0.0001g, Ainswoth, Modelo 100 A

Balanza granataria, OHAUS. Modelo. CT 200-S

Baño María. Precision Scientific. Model 181

Bolsas de polietileno, presentación en rollo, sin marca comercial.

Bolsas estériles *Whirl-pack*, Nasco.4oz./118ml. B00679

Campana de flujo laminar, Alder y Veco

Centrífuga de mesa, Hermle

Cuenta colonias, Québec Reichert-Jung

Homogenizador Stomacher®, Seward 400

Horno para esterilización en seco, Shel-lab

Incubadoras, Precision Scientific, Modelo 815

Microscopio. ZEISS. Axiostar plus.

Micropipetas de 5 a 1000 µl.

Potenciómetro. Orion. Modelo 410 A.

Refrigerador. OJEDA

Termopares Microtherma 2. ThermoWorks

Unidades de filtración Millipore, Sartorius

Vortex, Fisher Scientific Ind.

Material estéril

Abatelenguas.

Cajas petri de vidrio 100 x 10 mm.

Hisopos

Probeta de 100 ml.

Varillas de vidrio en “L”

Membrana de celulosa de 12,000 Da. SIGMA.

Medios de cultivo

Agar azul de toluidina con ADN.

Agar Baird-Parker (ABP) MERK.

Agar base sangre (ABS) MERK.

Agar infusión cerebro corazón (Agar BHI) BECTON DICKINSON.

Agar soya tripticasa (AST) BIOXON.

Caldo soya tripticasa (CST) MERK.

Infusión cerebro corazón (BHI) BIOXON.

Reactivos

Agua destilada

Buffer de fosfatos salino (BFS)

Diluyente de peptona salino al 0.1% (DPS), BIOXON.

Kit comercial TECRA® Staphylococcal enterotoxin visual immunoassay, para la detección de toxinas estafilocócicas A, B, C₁, C₂, C₃, D y E.

Solución de LiCl 13.3 Molar en agua. Control A_a = 0.250. HIGH-PURITY STANDARS.

Solución de LiCl 8.5 Molar en agua. Control A_a = 0.500. HIGH-PURITY STANDARS.

Solución de NaCl 6.0 Molar en agua. Control A_a = 0.760. HIGH-PURITY STANDARS.

Telurito de potasio. SIGMA

Solución buffer, pH 4 y 7. J. T. BAKER.

Solución salina isotónica (SSI), KEM DE MÉXICO.

Material biológico

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Staphylococcus aureus ATCC 14458

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Staphylococcus aureus ATCC 29213

Staphylococcus epidermidis ATCC 12228

5.2 Métodos

5.2.1 Cepas de *S. aureus*

5.2.1.1 Obtención de cultivos puros a partir de alimentos y de portadores humanos

Los alimentos fueron obtenidos en supermercados y mercados públicos; incluyeron: quesos, pastel de tres leches, pollo, jamón de cerdo, jamón de pavo y tocino, que eran expendidos a granel.

Para los portadores humanos se seleccionaron personas jóvenes, aparentemente sanas y sin tratamiento con antibióticos. El procedimiento consistió en humedecer un hisopo estéril en DPS e introducir 1 cm en los conductos nasales, girándolo cinco veces y suspendiendo el exudado en DPS (Henning, *et al.*, 1979).

Para ambos tipos de muestra se inoculó por extensión en superficie 100 µl en placas de ABP y se incubaron a 35°C/48 h. Se efectuó el recuento de colonias sospechosas (Baird-Parker, 2000), y se seleccionaron y purificaron 3–5 colonias para su caracterización fenotípica (BAM, 1995; Fernández-Escartín, 1998; NOM-115, 1994).

5.2.1.2 Caracterización fenotípica

Las cepas recién aisladas de alimentos y de portadores humanos, se caracterizaron fenotípicamente mediante las siguientes pruebas:

- Catalasa: De un cultivo joven de *S. aureus* en BHI tomar 10 µl, colocar en porta objetos y agregar un volumen equivalente de peróxido de hidrógeno. La aparición en los primeros 10 s y producción sostenida de burbujas de gas o efervescencia indica una reacción positiva. Dado que algunas bacterias pueden poseer enzimas distintas de la catalasa, capaces de descomponer el peróxido de hidrógeno, unas pocas burbujas diminutas formadas a los 20 a 30 s no se consideran una prueba positiva (Koneman, 1983).

- Coagulasa: En un tubo estéril mezclar 0.5 ml de un cultivo joven en BHI de *S. aureus* con 0.5 ml de plasma humano con EDTA (Morton y Cohn, 1972). Incubar en baño María a 37°C. Algunas cepas de *S. aureus* coagulasa positivas pueden producir un coágulo en 1 a 4 h. Otras cepas producen sólo suficiente coagulasa para dar una reacción positiva tardía, luego de 18 a 24 h de incubación. Por lo tanto, todas las pruebas que son negativas a las 4 horas, se confirman a las 24 h (Koneman, 1983).
- Termonucleasa. Calentar en baño María a ebullición por 15 min un tubo con 0.5 ml de un cultivo joven de *S. aureus* en BHI. Enfriar y homogenizar con vortex por 8 s. Inocular 5 µl del caldo inactivado en cada uno de los pozos del portaobjetos con agar azul de toluidina con ADN e incubar a 35°C/24 h en cámara húmeda. La presencia de halo rosado indica una reacción positiva (Lachica *et al.*, 1971; Lachica *et al.*, 1972).

5.2.1.3 Determinación de la enterotoxigenicidad de las cepas (Figura 1)

Se empleó el método de celofán sobre agar de Hallander (Hallander *et al.*, 1969). De un cultivo joven de *S. aureus* en BHI se inocularon 100 µl en una placa de Agar BHI (pH 6.0) cubierta con membrana de celulosa (12,000 Da). Se incubaron las cajas en posición normal a 35°C/24 h. El crecimiento fue recuperado con 2.5 ml de Na₂HPO₄ 0.1 M empleando una micropipeta. Se centrifugó a 6,000 rpm/30 min. En 1 ml del sobrenadante se determinó la toxina por la técnica de ELISA, empleando el kit comercial TECRA® Staphylococcal enterotoxin visual immunoassay, para la detección de EEA, EEB, EEC₁, EEC₂, EEC₃, EED y EEE (Brett, 1998; Freed *et al.*, 1982; Miller *et al.*, 1978; Thompson *et al.*, 1986).

Las cepas de *S. aureus* aisladas y caracterizadas fenotípicamente se conservaron en refrigeración en ABS con transferencias cada 30 días.

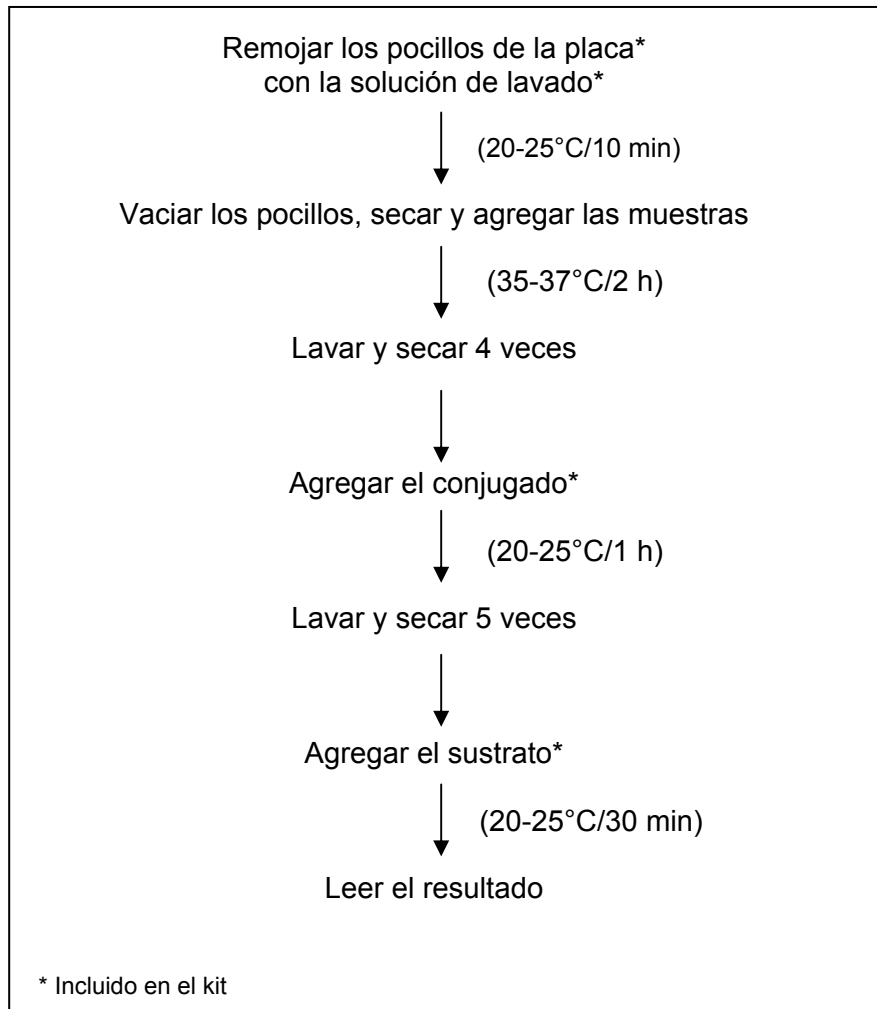


Figura 1. Resumen de la técnica de ELISA para la detección de enterotoxinas estafilocócicas en alimentos, empleando el Kit comercial TECRA ®.

5.2.2 Cinéticas de desarrollo en crema pastelera de cepas de *S. aureus* de colección, de exudado nasal, de cepas recién aisladas de portador humano y de alimentos

5.2.2.1 Elaboración de la crema pastelera

Se siguió el procedimiento que es común en las pastelerías de acuerdo con la siguiente formulación:

Leche	1 L
Azúcar	100 g
Canela	1.5 g
Fécula de maíz	70 g
Yemas de huevo	2 piezas
Vainilla	10 ml

Se mezclaron 850 ml de leche con el azúcar y la canela. Se calentó con agitación continua hasta ebullición. La fécula de maíz prehidratada en 100 ml de leche se incorporó lentamente y se llevó a ebullición; se agregaron las dos yemas de huevo mezcladas con 50 ml de leche, se adicionó la vainilla y se hirvió por 3 min. Se enfrió con agitación suave para evitar la formación de grumos.

Se determinó la actividad de agua (A_a) de la crema pastelera siguiendo las instrucciones del equipo AquaLab® empleado para este fin, ajustado con soluciones saturadas de referencia (Scott *et al.*, 2001).

Para determinar el pH del alimento se preparó una solución 1:1 (10 g de crema pastelera con 10 ml de agua destilada recién hervida y enfriada sin agitación) y se midió en el potenciómetro.

5.2.2.2. Cinética de desarrollo en crema pastelera de cepas de *S. aureus* de colección

Se inocularon en CST por separado tres cepas de *S. aureus* de colección (ATCC: 6538, 25923 y 29213) y se incubaron a 35°C/24 h. Fue formada una mezcla con 1 ml de cada una y homogenización en vortex por 8 s. Se prepararon diluciones decimales de la mezcla para inocular finalmente una concentración de 10^3 UFC g⁻¹, que se incorporó a la crema pastelera auxiliándose de un cuchillo estéril. La crema pastelera se almacenó en baño María a 22° y 35°C. Se inoculó por extensión en superficie en ABP a las 0, 2, 4, 7, 10 y 24 h, y se incubó a 35°C/48 h.

Para determinar la velocidad de desarrollo se recurrió al software DMFit disponible de manera gratuita en www.combase.cc.

5.2.2.3. Cinética de desarrollo en crema pastelera de *S. aureus* del exudado nasal de portador humano comparada con una mezcla de tres cepas de colección (Figura 2)

Se procedió como se indicó en 5.2.1.1. Simultáneamente se refrigeró la suspensión del exudado nasal de 4 a 7°C por 18 h. A partir de la suspensión refrigerada se repitieron los recuentos en placas de ABP y se incubaron a 35°C/48 h. Posteriormente se activaron a 35°C/24 h en CST por separado tres cepas de *S. aureus* de colección (ATCC: 6538, 25923 y 29213). Se conformó una mezcla de las tres cepas de colección y se homogenizó en vortex por 8 s. Se prepararon diluciones decimales de la mezcla para inocular una concentración similar a la encontrada a las 18 h de *S. aureus* en la suspensión del exudado nasal del portador en estudio y se incorporaron por separado a la crema pastelera auxiliándose de un cuchillo estéril. La crema pastelera inoculada fue almacenada en baño María a 30°C. Se inoculó por extensión en superficie en ABP a las 0, 2, 4, 7, 10 y 24 h y se incubó a 35°C/48 h. Se llevaron a cabo simultáneamente los recuentos de BMA por vaciado en placa en AST y se incubaron a 35°C/48 h.

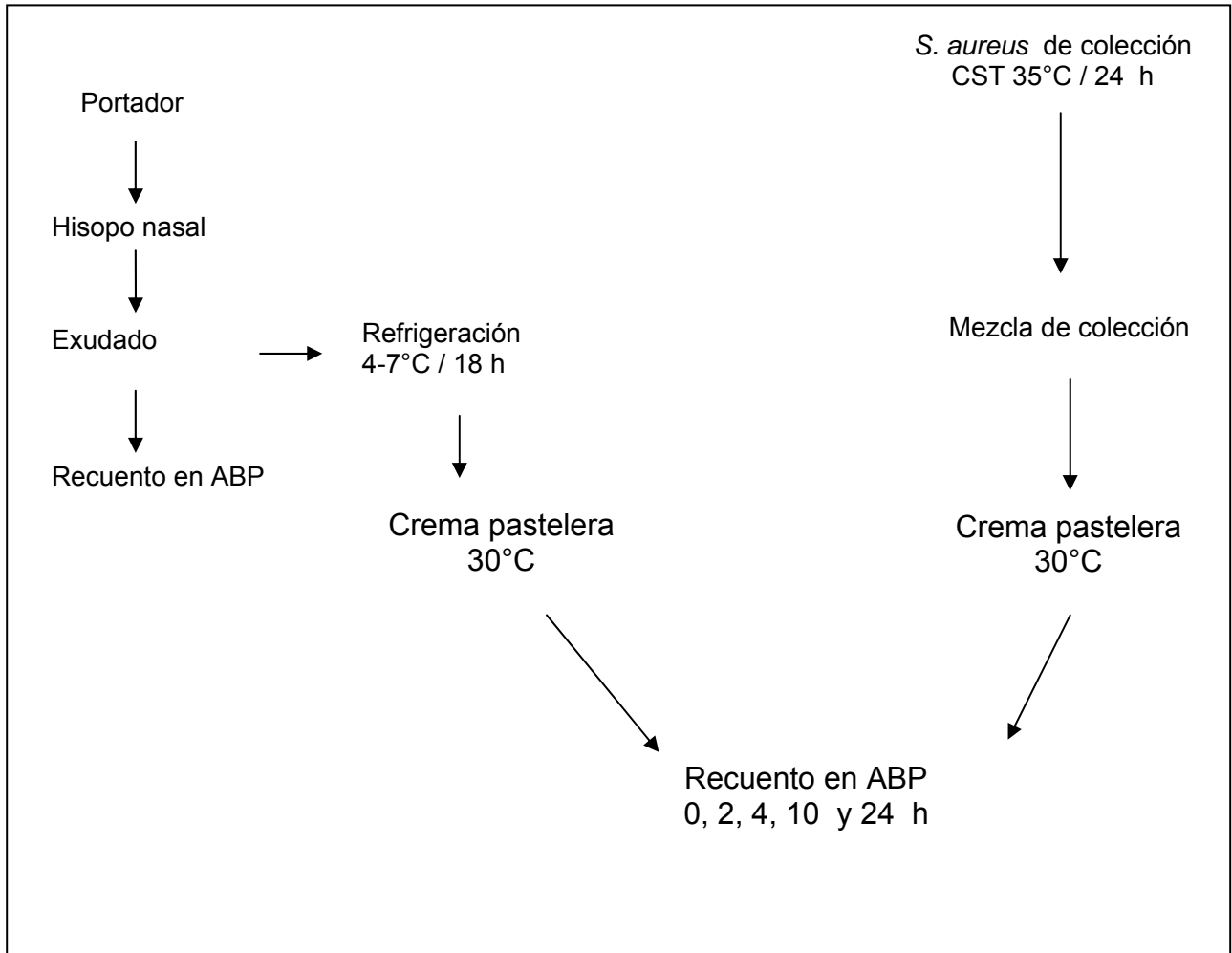


Figura 2. Cinética de desarrollo en crema pastelera de *S. aureus* procedente del exudado nasal de portador humano y una mezcla de tres cepas de colección.

5.2.2.4 Cinética de desarrollo en crema pastelera de *S. aureus* recién aislado de portador humano y de alimentos

La cepa recién aislada de portador humano o de alimentos se activó en CST a 35°C/24 h. Diluciones decimales fueron preparadas para inocular finalmente una concentración estimada de 10^3 UFC g^{-1} . Se incorporó y homogenizó en la crema pastelera auxiliándose de un cuchillo estéril. La crema pastelera se almacenó en baño María a 30°C (punto medio entre 22° y 35°C). Se inoculó por extensión en superficie en ABP a las 0, 2, 4, 7, 10, 15, 20 y 24 h y se incubó a 35°C/48 h.

5.2.3 Restricción de nutrientes

5.2.3.1 Determinación de la dilución de crema pastelera que permita el mínimo desarrollo de *S. aureus* en 8 h

S. aureus ATCC 6538 se activó en CST a 35°C/24 h. Las células se lavaron centrifugando por tres ciclos a 3500 rpm/10 min. Se separó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en BFS. En el último lavado y previo a la resuspensión en BFS se secó con papel filtro estéril el borde del tubo para eliminar la mayor parte posible de residuos de nutrientes propios del CST. Se prepararon diluciones decimales para inocular una concentración de 10^3 UFC g^{-1} la cuál se incorporó a la crema pastelera tanto íntegra como diluida auxiliándose de un cuchillo estéril. La crema pastelera se almacenó en baño María a 30°C. Se inoculó por extensión en superficie en ABP y se incubó a 35°C/48 h.

5.2.3.2 Cuantificación de las células de *S. aureus* dañadas subletalmente

Se activaron en CST tres cepas de *S. aureus* de colección (ATCC: 6538, 25923 y 29213), a 35°C/24 h. Se conformó una mezcla de las tres cepas tomando 1 ml de cada una y se homogenizó en vortex por 8 s. Las células se lavaron como se describe en 5.2.3.1. Se prepararon diluciones decimales de la mezcla para inocular una concentración de 10^4 UFC g^{-1} y se incorporaron a la crema pastelera auxiliándose de un cuchillo estéril. La crema pastelera inoculada se almacenó en baño María a 30°C. Se inoculó por extensión en superficie tanto en ABP como en AST adicionado de diferentes concentraciones de NaCl (10, 14 y 17%). El recuento se efectuó a las 0, 3, 6, 9 y 12 h en placas incubadas a 35°C/48 h.

La población dañada subletalmente es la diferencia entre la población que crece en un medio general y la que se recupera en un medio con inhibidores (NaCl) (Sandel *et al.*, 2003).

5.2.3.3 Cinética de desarrollo en crema pastelera íntegra recién elaborada de la cepa de *S. aureus* ATCC 6538 sometida a estrés por restricción de nutrientes (Figura 3)

Se procedió como se describe en 5.2.3.1. A partir de la cepa lavada se prepararon diluciones decimales y se inoculó una concentración de 10^5 UFC ml^{-1} en tubos que contenían crema pastelera diluida al 0.4%. Los tubos se almacenaron en baño María a 30°C/ 9 h. Por

otra parte se inocularon 300 μ l (10^3 UFC g^{-1}) en recipientes estériles con 30 g de crema pastelera íntegra recién elaborada. Estos recipientes se almacenaron en baño María a 30°C y paralelamente los recipientes inoculados con la misma cepa no expuesta a estrés. Se inocularon por extensión en superficie en ABP. Se efectuaron recuentos a las 0, 2, 4, 7, 10, 15, 20 y 24 h, y se incubó a 35°C/48 h.

5.2.4 Tratamiento térmico

5.2.4.1 Determinación del tiempo para la inducción de estrés por tratamiento térmico

Se activó la cepa de *S. aureus* ATCC 6538 en CST a 35°C/24 h. Se centrifugó por tres ciclos a 3500 rpm/10 min. Fue separado el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en BFS. De la cepa lavada se colocaron 3 ml en una bolsa estéril, se extendió en el fondo del baño María y se aplicó el tratamiento térmico a $55 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Inmediatamente al concluir los diferentes periodos (0, 15, 20, 25 y 30 min) de tratamiento térmico se introdujo la bolsa en una cama de hielo por 10 s (en este punto la cepa se encuentra dañada subletalmente). Se llevó a cabo el recuento en AST y AST adiconado con 10% NaCl por la técnica de vaciado en placa, incubando las cajas a 35°C/48 h.

5.2.4.2 Cinéticas de desarrollo en crema pastelera recién elaborada de cepas de *S. aureus* de colección, recién aislada de portador humano y de alimentos, sometidas a estrés por tratamiento térmico (Figura 4)

Se procedió para cada cepa por separado de acuerdo a lo descrito en la sección 5.2.4.1. Se determinó el estrés por tratamiento térmico a los 20 min. Se prepararon diluciones decimales para inocular una concentración de 10^3 UFC g^{-1} y se incorporaron a la crema pastelera auxiliándose de un cuchillo estéril. Paralelamente se almacenaron recipientes inoculados con la misma cepa no expuesta a estrés. La crema pastelera inoculada se almacenó en baño María a 30°C. Se inoculó por extensión en superficie en ABP a las 0, 2, 4, 7, 10, 15, 20 y 24 h, y se incubó a 35°C/48 h.

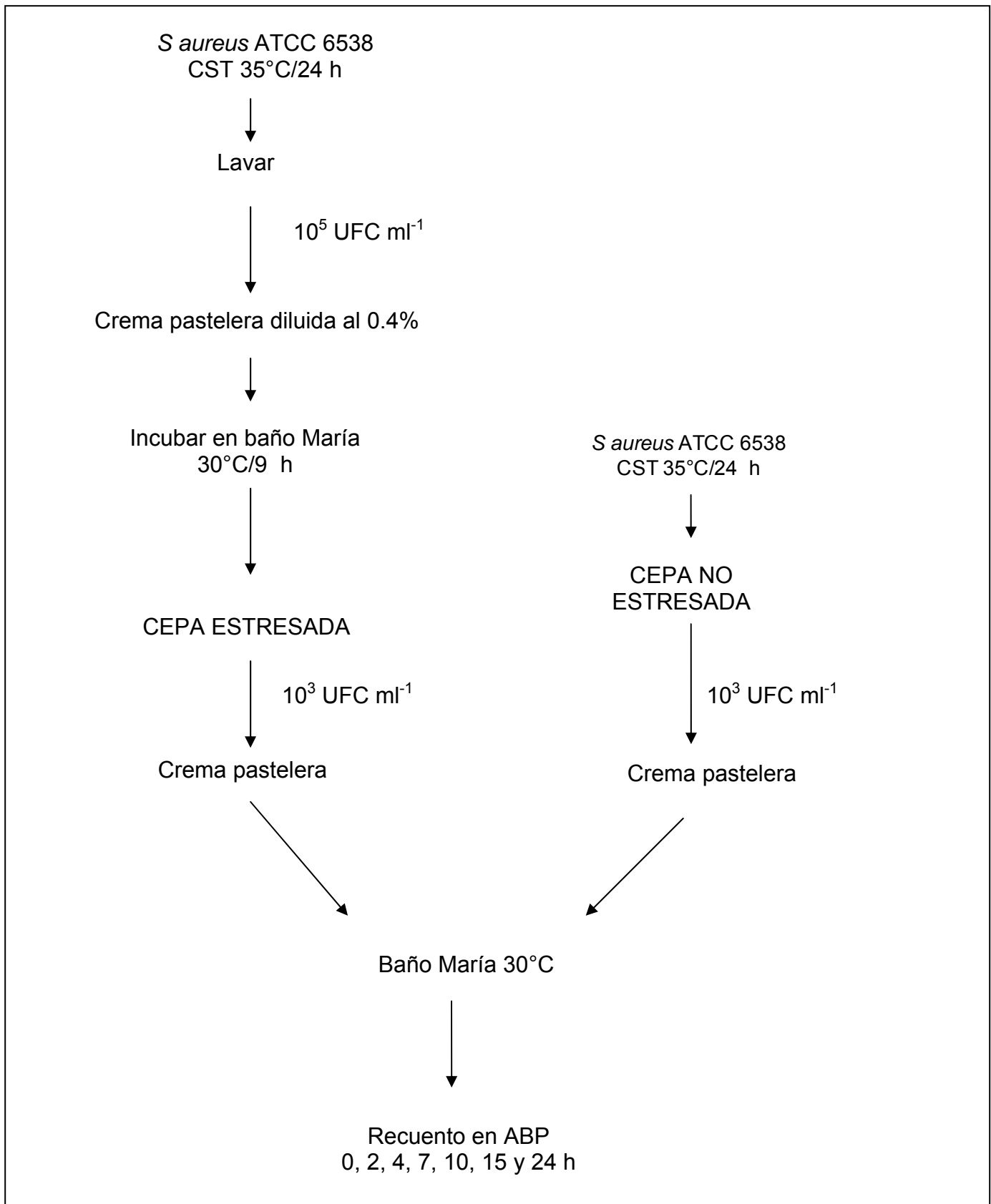


Figura 3. Cinética de desarrollo en crema pastelera de la cepa de *S. aureus* ATCC 6538 previamente sometida a estrés por restricción de nutrientes.

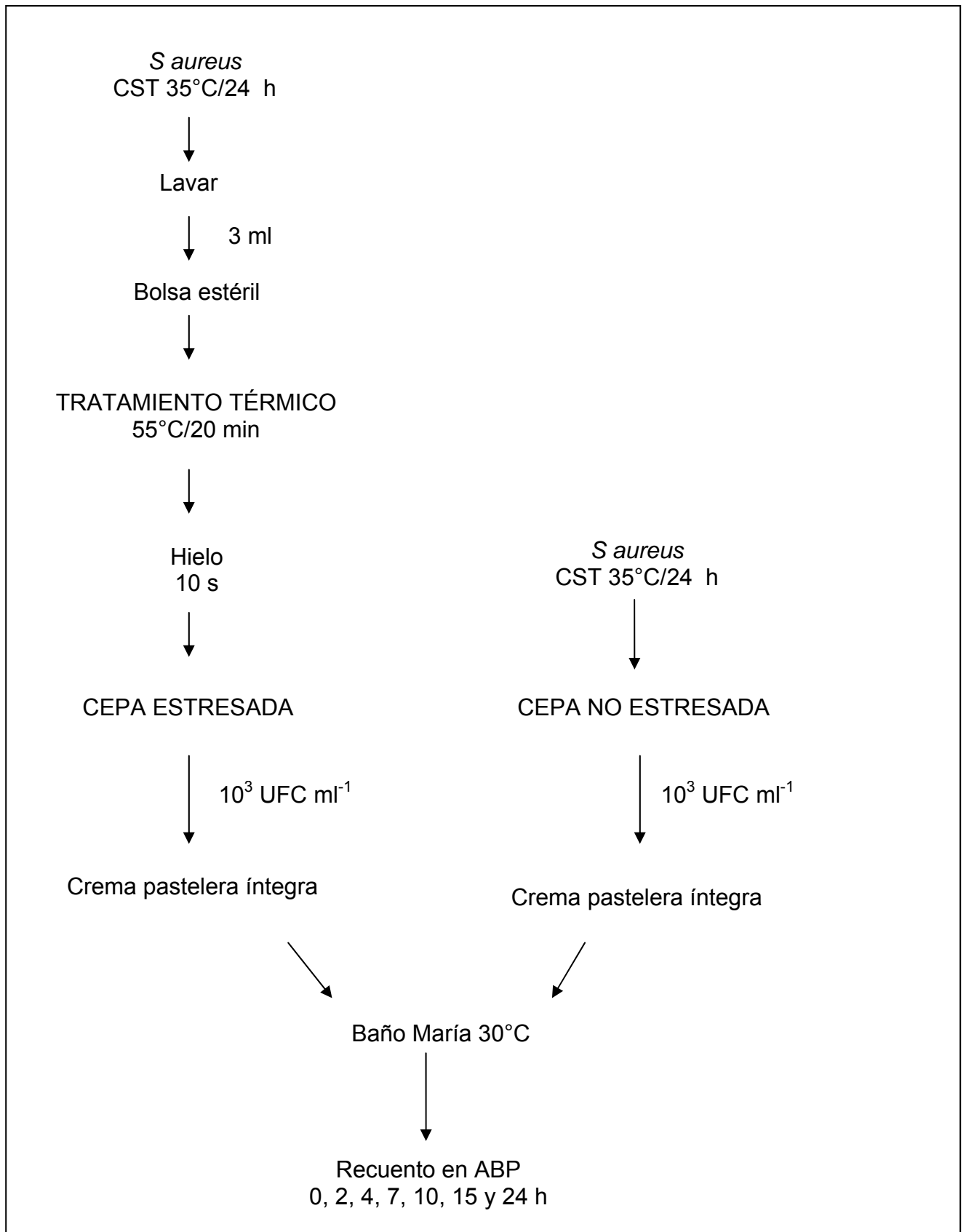


Figura 4. Cinéticas de desarrollo en crema pastelera de cepas de *S. aureus* previamente sometidas a estrés por tratamiento térmico.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Obtención y caracterización fenotípica de cepas de *S. aureus* aisladas a partir de alimentos y de portadores humanos

Habitualmente el comportamiento de los microorganismos en los alimentos se planea a base de modelos en los cuales se utilizan cepas certificadas (o de una fuente muy segura), que se inoculan y se sigue su comportamiento bajo condiciones ambientales definidas (Bolton, *et al.*, 1988; Fujikawa e Igarashi, 1988). Las cepas certificadas suelen ser cepas de colección de empresas reconocidas, tales como la American Type Culture Collection (ATCC). De acuerdo con este esquema, se tiene la ventaja de que es posible controlar la cantidad de inóculo en el alimento al iniciar el estudio. Es posible también, marcar la cepa para facilitar su recuento en los medios de cultivo, y finalmente, se cuenta con una garantía de la idoneidad de la cepa (Burnett, *et al.*, 2004). Sin embargo, las cepas de colección, aunque de origen definido y conocido, tienen la limitante de que se han adaptado a las condiciones de cultivo del laboratorio. No es de esperar por tanto, que su comportamiento siga idéntico patrón al de las cepas que contaminan el alimento directamente de fuentes naturales (Castillo, *et al.*, 1999; Scott, *et al.*, 2006). De esta manera, utilizar cepas aisladas de su fuente original el modelo del laboratorio resulta menos artificioso y simula de manera más genuina los acontecimientos que en condiciones naturales de contaminación ocurren en los alimentos. Lo limitado de este enfoque radica principalmente en la imposibilidad de conocer desde el inicio, la población de la bacteria patógena de interés.

En este trabajo, hemos recurrido tanto a cepas provenientes de colección, como de cepas recién aisladas de alimentos, ó de la cepa nativa de la fuente humana de contaminación. Para este propósito, empezamos por identificar individuos sanos adultos portadores de *S. aureus* (Kloos y Musselwhite, 1975). El exudado colectado se suspendió en DPS, incluida por supuesto su flora acompañante, para ser utilizado como inóculo a la crema pastelera. En total se dispuso de 20 cepas, trece de fuente humana y siete de quesos obtenidos del comercio (Cuadro 3). El intento por aislar al germen de otros once alimentos (cárnicos y pasteles) resultó infructuoso. Todas estas cepas disponibles fueron identificadas mediante pruebas de catalasa, tinción de Gram, coagulasa, termonucleasa, y fermentación de sacarosa y manitol (Baird-Parker, 2000). Dos pruebas nos parecieron de especial

significado: la coagulasa y la termoucleasa. Ambas, se observan típicamente entre las cepas enterotoxigénicas (Bergdoll, 1989; Minor, T. 1976d), pero hay que consignar que eventualmente se aíslan cepas enterotoxigénicas coagulasa negativas (Breckinridge y Bergdoll, 1971; Jay, 1978).

Cuadro 3. Positividad y enterotoxigenicidad de cepas de *S. aureus* en muestras de portadores humanos, quesos y otros alimentos.

Origen de la muestra	N	Positivas (%) ¹	Enterotoxigénicas ² (%)
Humanos	130	13 (10)	11 (85)
Quesos	27	7 (26)	4 (57)
Otros alimentos ³	11	0 (0)	-

¹ Prueba de catalasa, coagulasa y termoucleasa.

² EEA, EEB, EEC₁, EEC₂, EEC₃, EED y EEE.

³ Pastel de tres leches, pollo (pierna y muslo), jamón de cerdo, jamón de pavo y tocino.

De acuerdo con la escala de intensidad de la reacción de coagulasa generalmente reconocida (Baird-Parker, 2000), las 20 cepas aisladas provocaron coagulación del plasma con intensidad de +++ ó ++++ después de 6 h de incubación (Rayman *et al.*, 1975; Sperber y Tatini, 1975; García *et al.*, 1980). La reacción de termoucleasa no representó problema para su lectura, que mostró una intensa reacción a las 24 h (Lachica *et al.*, 1971). Adicionalmente se determinó la enterotoxigenicidad, con el kit comercial TECRA® que es una prueba inmunológica basada en la modalidad de ELISA. Tiene una elevada sensibilidad (1 ng ml⁻¹), proporciona resultados en sólo 4 h, y su ejecución es sencilla. El método generalmente tiene una buena confiabilidad, aunque algunos resultados falsos-positivos pueden presentarse, debido a la presencia de peróxidos y metabolitos no enterotoxigénicos presentes en los alimentos (Park *et al.*, 1992, 1994). Consiste en un inmunoensayo de respuesta visual que permite detectar los tipos EEA, EEB, EEC₁, EEC₂, EEC₃, EED ó EEE. El 85% resultó positiva para las cepas humanas y 57% entre las procedentes de alimentos (Cuadro 3.). Reyes, *et al.* (1984), reportaron una positividad de 41% entre 400 cepas aisladas de quesos. Está claro que existen cepas coagulasa y termoucleasa positivas que en las condiciones del estudio no sintetizaron enterotoxina. Gomez-Lucía *et al.*, (1989) expresan que la síntesis de EEs depende del sustrato y pueden obtenerse diferentes resultados cuando las cepas crecen en

celofán sobre el agar. Las cepas de colección y las aisladas de portadores humanos y quesos se conservaron en el laboratorio en ABS con resiembras cada 30 días, y mantenimiento en refrigeración.

6.2 Cinética de desarrollo en crema pastelera de cepas de *S. aureus* de colección, de exudado nasal, de cepas recién aisladas de portador humano y de alimentos

S. aureus es una bacteria enterotoxigénica. La enterotoxina es una exotoxina que sintetiza el germen cuando encuentra en sustratos y condiciones ambientales propicias para su desarrollo (Crisley, *et al.*, 1964; Markus y Silverman, 1969, 1970; Miller y Fung, 1973; Morse y Baldwin, 1971). Alimentos como yogurt, mantequilla y crema agria no son favorables (Minor, T. 1976e). Como se ha indicado, no todas las cepas disponen de los determinantes genéticos de esta facultad (Jablonski y Bohach, 2001), de manera que existen cepas que pueden multiplicarse en el alimento sin dañar su inocuidad. Adicionalmente cepas toxigénicas pueden no sintetizar la toxina si los factores ecológicos del entorno no se lo permiten. Por ejemplo, la mínima A_a requerida para el desarrollo del germen (bacteria halotolerante) es de 0.83, pero la mínima para sintetizar la toxina es de 0.87 (Troller, 1972; Lee *et al.*, 1981; ICMSF, 1996).

En consecuencia, para valorar la peligrosidad de la crema pastelera como vehículo del *S. aureus*, resulta indispensable determinar su potencial para proliferar en el alimento, aunque los rellenos de pastel en general son vehículos del microorganismo como agente etiológico. Por ejemplo, *S. aureus* estuvo involucrado en 374 de 573 (65.3%) brotes de intoxicación alimentaria asociados al consumo de pasteles rellenos en Estados Unidos de 1938 a 1972 (Bryan, 1976). Situación similar se presenta con la carne que favorece más el crecimiento de *S. aureus* comparada con caldo BHI (Genigeorgis, *et al.*, 1971b). Considerando la importancia que tiene no solamente la temperatura como factor ecológico, sino la cantidad de agua disponible y el pH en el comportamiento de los microorganismos en los alimentos (Plitman *et al.*, 1973). En este trabajo determinamos el nivel de A_a y del pH en todos los experimentos (Cuadro 4).

Cuadro 4. A_a y pH de la crema pastelera preparada en el laboratorio.

	A_a	pH
Media	0.998	6.71
Límite inferior	0.996	6.68
Límite superior	0.999	6.72

Como se indicó, la cantidad de agua disponible para el microorganismo tiene un efecto acentuado sobre el crecimiento. La A_a en el alimento disminuye debido a compuestos sobre todo polares, que se encuentran disueltos. En la crema pastelera la harina, el huevo y la leche tienen un efecto menor en la A_a ; el azúcar en cambio tiene una considerable influencia. Los rellenos de pastel con una A_a baja, no pueden por ese sólo hecho considerarse seguros. Es posible en algunos casos la migración de agua desde porciones con mayor humedad dentro del mismo pastel. Precisamente esto ocurrió en la ciudad de Guadalajara en un brote de gastroenteritis por consumo de pastel de moka. En la pastelería se acostumbraba rociar las partes internas del pan previo a la incorporación de la moka, con agua edulcorada. Este tratamiento elevó la actividad de agua lo suficiente para permitir el desarrollo del germen en los pasteles (Fernández-Escartín *et al.*, 1998). Así, la presencia del germen constituye sólo un riesgo potencial. Aunque existen numerosos estudios sobre la capacidad de síntesis de la enterotoxina estafilocócica en los alimentos, esta experiencia se ha derivado de investigaciones en las que se recurre al empleo de cepas de colección, aisladas de alimentos, o bien de alimentos implicados en brotes de intoxicación (Knøbloch, *et al.*, 2001). No encontramos un registro de estudios en los cuales se siga el comportamiento de la bacteria incorporada directamente al alimento, y acompañada de la flora nativa de la fuente de aislamiento. Esta observación es de importancia ante la posibilidad de que tal flora acompañante pudiera interferir con el desarrollo y producción de la enterotoxina.

6.2.1 Cinética de desarrollo en crema pastelera de cepas de *S. aureus* de colección

Nuestro diseño fue creciente en complejidad, de manera que primero se estudió el comportamiento de cepas de colección en cultivo puro inoculadas en la crema pastelera seguido de almacenamiento a 22 y 35°C. Se incluyeron en cada estudio tres cepas de colección no enterotoxigénicas mezcladas como inóculo. Este enfoque, comúnmente

utilizado en estudios similares con una diversidad de patógenos y de alimentos, pretende disminuir la influencia de la distinta capacidad que muestran diferentes cepas de ésta bacteria.

El germen mostró capacidad para desarrollar en la crema pastelera a 22°C, y más intensamente a 35°C (Cuadro 5 y Figura 5). En estos estudios el estafilococo procedía de un cultivo en ABS, que difiere ostensiblemente en composición respecto a la crema pastelera.

La consistencia del trabajo se puede apreciar en el bajo valor de la dispersión de los valores de los recuentos que se han incluido en los cuadros y figuras. No obstante, de acuerdo con la Figura 5, el tiempo requerido para adaptarse al nuevo sustrato fue pequeño, más notable, en el estudio realizado a 35°C. Las figuras muestran el comportamiento de dos experimentos para cada temperatura, y puede advertirse (como era de esperar) que en 24 h se alcanza una población de *Staphylococcus* más elevada a 35 que a 22°C. Ya desde las 10 h la población alcanzó casi 3 log UFC g⁻¹ a 22°C y de 5 log UFC g⁻¹ a 35°C. Resulta evidente que almacenada la crema a 35°C, adquiere peligrosidad entre las 7 y 10 h cuando se alcanzan más de 6 log UFC g⁻¹, siendo francamente riesgoso a partir de las 24 h en las dos temperaturas. En leche, EEA y EED fueron detectadas con recuentos de 10⁷, pero no por debajo de esta población (Noletto y Bergdoll, 1980, 1982). Como se ha indicado, se reconoce que cuando la población de *Staphylococcus* en el alimento rebasa el millón de UFC g⁻¹, el peligro para la salud es manifiesto porque la cantidad de enterotoxina que se ha acumulado en tales condiciones alcanza la dosis tóxica, es decir, suficiente toxina para provocar una respuesta clínica entre los consumidores (Bergdoll, 1989).

Cuadro 5. Poblaciones (log UFC g⁻¹) en dos experimentos independientes (A y B) de una mezcla de tres cepas de colección de *S. aureus* no enterotoxigénicas en crema pastelera almacenada a 22 y 35°C.

Experimento	Temperatura de almacenamiento (°C)	Tiempo (h)					
		0	2	4	7	10	24
A	22	¹ 1.7 (0.09)	1.8 (0.07)	2.5 (0.04)	3.2 (0.03)	4.3 (0.02)	6.2 (0.03)
B	22	2.3 (0.02)	2.5 (0.03)	2.6 (0.09)	2.9 (0.09)	2.9 (0.03)	5.5 (0.01)
A	35	1.7 (0.03)	3.0 (0.02)	3.6 (0.03)	5.3 (0.05)	7.1 (0.02)	9.1 (0.02)
B	35	2.4 (0.03)	2.9 (0.08)	3.9 (0.05)	5.4 (0.08)	6.7 (0.03)	9.0 (0.01)

¹ Media de resultados (desviación estándar).

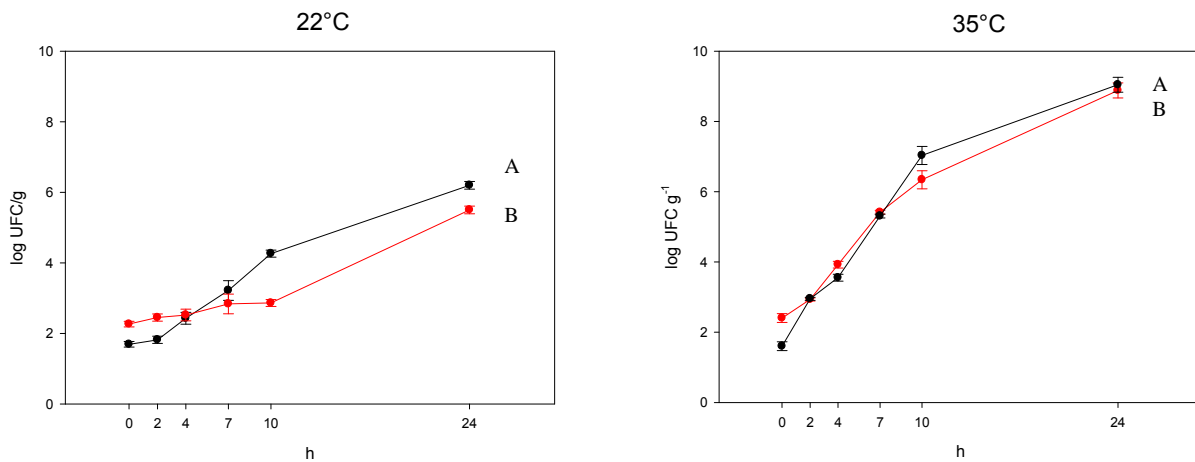


Figura 5. Comportamiento en dos experimentos independientes (A y B) de una mezcla de tres cepas de colección de *S. aureus* no enterotoxigénicas, en crema pastelera almacenada a 22 y 35°C.

Recordemos que el estudio anterior se realizó inoculando mezclas de cepas del germen en el alimento; parecería de interés, por tanto, conocer el comportamiento de una cepa individual dentro del mismo modelo descrito. Para tal propósito, se recurrió a la cepa ATCC 14458 (enterotoxigénica). La Figura 6 muestra la actividad del germen en la crema almacenada a 30°C. Claramente se aprecia su notable facultad para proliferar en ese sustrato. Hacia las 10 h, en un primer experimento la población alcanzada fue de 7.6 log UFC g⁻¹ con una fase lag menor a 2 h (Cuadro 6), partiendo de poco más de 1000 UFC g⁻¹. En un experimento posterior se incluye la cinética del germen dentro de intervalos de tiempo de media hora, a fin de determinar la duración de la fase lag. Este parámetro es importante porque pone de manifiesto el límite de tiempo en el que se puede almacenar la crema pastelera fuera de refrigeración sin consecuencias para el riesgo de multiplicación, y por tanto de síntesis de la enterotoxina.

Cuadro 6. Poblaciones de *S. aureus* ATCC enterotoxigénico en crema pastelera, almacenada a 30°C.

Tiempo (h)	log UFC g ⁻¹
0	¹ 3.1 (0.06)
2	3.8 (0.01)
4	4.6 (0.06)
7	5.9 (0.06)
10	7.6 (0.01)
15	8.6 (0.06)
20	9.2 (0.06)
24	9.3 (0.01)

¹ Media de resultados (desviación estándar).

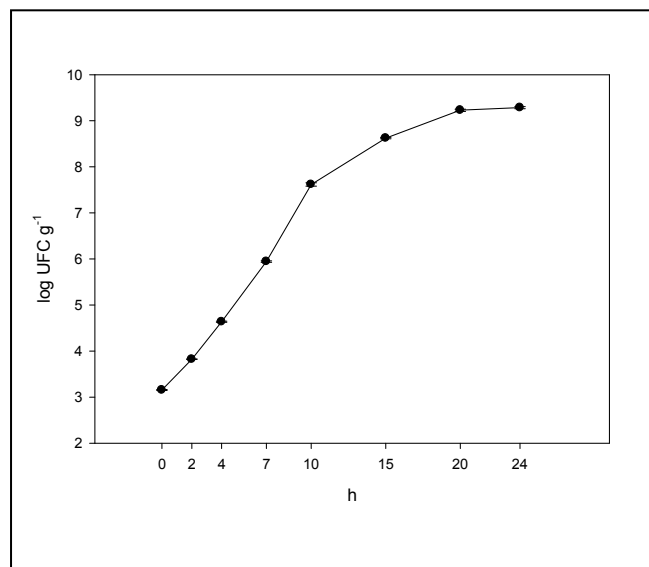


Figura 6. Comportamiento de *S. aureus* ATCC enterotoxigénico en crema pastelera, almacenada a 30°C.

6.2.2 Cinéticas de desarrollo en crema pastelera de cepas de *S. aureus* de exudado nasal

Se espera que este diseño constituya un modelo más genuino para monitorear el comportamiento del *S. aureus* en la crema pastelera, como ocurriría en condiciones naturales en una pastelería. Aunque es más manejable y sencillo recurrir a los cultivos puros del germen, los resultados pasan por alto la interacción que pueda tener este germen con la flora acompañante que típicamente acontece cuando un individuo portador contamina el alimento. Aun la composición del vehículo del germen difiere muy significativamente. En el caso de los cultivos puros el vehículo es DPS, muy distinto al material que se recoge con el hisopo cuando se obtiene el exudado nasal. Tales factores podrían ser decisivos en el comportamiento del microorganismo en la crema pastelera.

Este tipo de modelo no nos permite conocer y controlar el nivel de inóculo inicial, como fue realizado en el caso de las cepas en cultivo puro. Con el objeto de conocer mejor la población de *Staphylococcus* en el exudado, se efectuó de inmediato el recuento del germen en este material; se conservó una porción en refrigeración a 4-7°C y se repitió el recuento al

cabo de 18 h. Los resultados evidencian que no existe diferencia estadística significativa entre la población del germen con el inóculo del exudado, fresco y después del periodo de refrigeración (Cuadro 7). En consecuencia, fue posible comparar su comportamiento en ambos casos, partiendo del mismo nivel de inóculo inicial: 1.7 log UFC g⁻¹ a 22°C y 2.3 - 2.5 log UFC g⁻¹ a 35°C (Cuadro 8).

Cuadro 7. Población inicial de *S. aureus* suspendida en el exudado de dos portadores humanos y después de 18 h de almacenamiento de la suspensión en refrigeración.

Portador	Inicial (log UFC g ⁻¹)	Suspensión refrigerada por 18 h (log UFC g ⁻¹)
MG	¹ 3.67 (0.01) _{A*}	3.66 (0.01) _A
AF	3.72 (0.01) _A	3.71 (0.01) _A

¹ Media de resultados (desviación estándar).

* Valores en la misma fila no seguidos de la misma letra indican diferencia estadística significativa con P<0.05 (Tukey-Kramer).

Como no se esperaban diferencias acentuadas en los parámetros de desarrollo del germen en la crema pastelera inoculada con mezcla de cepas de colección no enterotoxigénicas respecto al germen en el exudado nasal, se llevó a cabo el estudio de la cinética bacteriana simultáneamente con cepas de ambas fuentes del microorganismo. El experimento se realizó conservando la crema pastelera tanto a 22 como a 35°C; en ningún caso se observó una fase lag evidente a juzgar por las líneas mostradas en la Figura 7. El desarrollo es muy activo a las dos temperaturas, mayor en el caso de la cepa aislada del portador **AF** que la mezcla de colección no enterotoxigénica. Es notable que a diferencia de los estudios previos, en este caso el comportamiento a 22 y 35°C, tanto con la cepa de colección con la suspendida en el exudado, fueran afectados mínimamente por la temperatura de la crema. Es destacable también la acentuada diferencia en la población alcanzada a las 10 h a las dos temperaturas entre ambos tipos de cepas. A las 10 h y a 22°C, la diferencia en la crema fue de 3.8 log UFC g⁻¹, a favor de la cepa del portador y a 35°C de manera similar 3.7 log UFC g⁻¹ (Cuadro 8). La consecuencia directa de estos comportamientos en términos de riesgo a la salud consecutivos a la contaminación de la crema por un portador, está expresada por tales diferencias. Es decir, si el estudio se hubiera efectuado con cepas de colección, se habría subestimado el nivel de tal riesgo.

Cuadro 8. Población (log UFC g⁻¹) de *S. aureus* enterotoxigénico procedente del exudado nasal del portador AF y en una mezcla de tres cepas de colección no enterotoxigénicas en crema pastelera, durante el almacenamiento a 22 y 35°C.

Cepa	Temperatura (°C)	Tiempo (h)					
		0	2	4	7	10	24
Portador AF	22	¹ 1.7 (0.01)	3.0 (0.07)	3.6 (0.03)	5.3 (0.01)	7.1 (0.03)	9.1 (0.01)
Mezcla de colección no enterotoxigénica	22	1.7 (0.09)	1.8 (0.07)	2.5 (0.04)	2.6 (0.03)	3.3 (0.02)	6.7 (0.03)
Portador AF	35	2.5 (0.03)	3.5 (0.01)	4.7 (0.03)	5.5 (0.05)	7.9 (0.03)	9.2 (0.02)
Mezcla de colección no enterotoxigénica	35	2.3 (0.03)	2.6 (0.02)	3.2 (0.03)	3.7 (0.05)	4.2 (0.02)	7.2 (0.02)

¹ Media de resultados (desviación estándar).

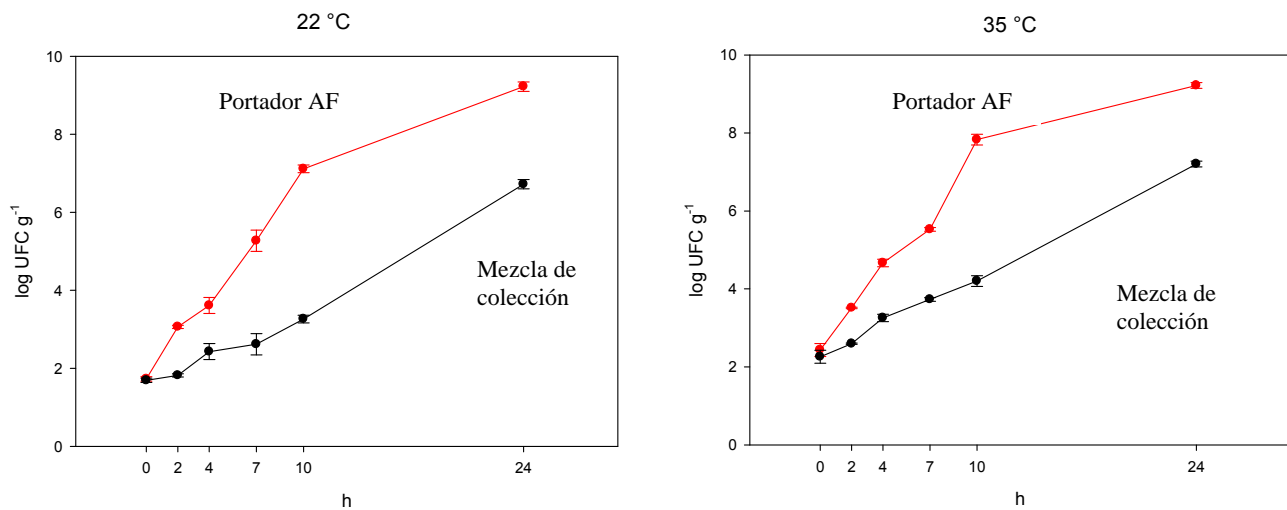


Figura 7. Comportamiento de *S. aureus* enterotoxigénico procedente del exudado nasal del portador AF y en una mezcla de tres cepas de colección no enterotoxigénicas en crema pastelera, almacenada a: 22 y 35°C.

El estudio referido para comparar la cepa presente en el exudado del portador contra la mezcla de cepas de colección no enterotoxigénicas, se repitió en el portador **MG** (Figura 8 y 9). A fin de dilucidar la duración de la fase lag de estas cepas cuando se inoculan en la crema pastelera, se diseñó un experimento similar. La variante introducida consistió en llevar a cabo recuentos del *Staphylococcus* en periodos de media hora para la crema almacenada a 22°C y cada 20 min para 35°C. Como se observa, en esta ocasión el comportamiento de ambas cepas fue muy similar a las dos temperaturas de almacenamiento (Figura 10 y 11); sin embargo es evidente la mayor actividad del germen a 35°C. Tales resultados no deben

ser sorprendentes. Como se ha señalado, existen diferencias individuales entre las cepas que conducen a comportamientos un tanto contrastados. La experiencia muestra, y existe abundante literatura al respecto, que el origen y condiciones en las que se mantiene una bacteria en su hábitat natural o en condiciones artificiales, da lugar a cambios adaptativos, o bien ponen en operación mecanismos genéticos que se traducen en esas diferencias (Archer, 1996). Pueden encontrarse, por ejemplo, situaciones en las que la virulencia de una bacteria se exagera, o adquiere la capacidad para fermentar un azúcar que sus ancestros no hacían, pierden la movilidad, modifican su termoresistencia o tolerancia a los ácidos, y muchas otras alteraciones que como queda dicho, suelen manifestar los microorganismos (Flowers y Martin, 1980; Rosenthal e landolo, 1970; Witter, 1981).

Cuadro 9. Población ($\log \text{ UFC g}^{-1}$) de *S. aureus* enterotoxigénico procedente del exudado nasal del portador MG y en una mezcla de tres cepas de colección no enterotoxigénicas, en crema pastelera, almacenada a 22°C.

Cepa	Tiempo (h)					
	0	2	4	7	10	24
Portador MG	¹ 1.9 (0.02)	2.1 (0.01)	2.3 (0.01)	2.9 (0.03)	3.0 (0.04)	5.9 (0.01)
Mezcla de colección no enterotoxigénica	2.3 (0.02)	2.5 (0.03)	2.6 (0.09)	2.9 (0.09)	2.9 (0.03)	5.5 (0.01)

¹ Media de resultados (desviación estándar).

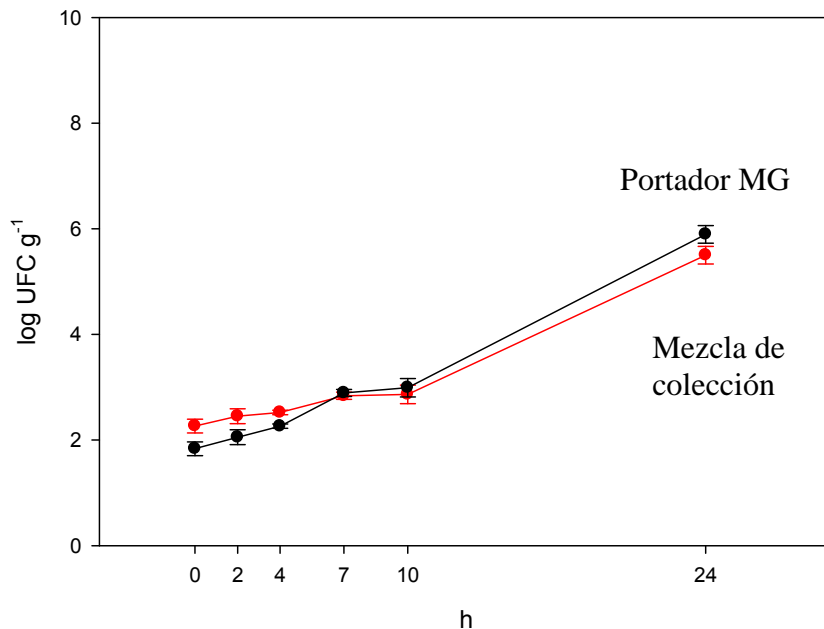


Figura 8. Comportamiento de *S. aureus* enterotoxigénico procedente del exudado nasal del portador MG y en una mezcla de tres cepas de colección de *S. aureus* no enterotoxigénicas en crema pastelera, almacenada a 22°C.

Cuadro 10. Población (log UFC g⁻¹) de *S. aureus* enterotoxigénico procedente del exudado nasal del portador MG y en una mezcla de tres cepas de colección no enterotoxigénicas, en crema pastelera, almacenada a 35°C.

Cepa	Tiempo (h)					
	0	2	4	7	10	24
Portador MG	¹ 2.0 (0.10)	2.7 (0.05)	3.9 (0.06)	5.6 (0.10)	7.2 (0.10)	8.6 (0.04)
Mezcla de colección no enterotoxigénica	2.4 (0.03)	2.9 (0.08)	3.9 (0.05)	5.4 (0.08)	6.3 (0.03)	8.9 (0.01)

¹ Media de resultados (desviación estándar).

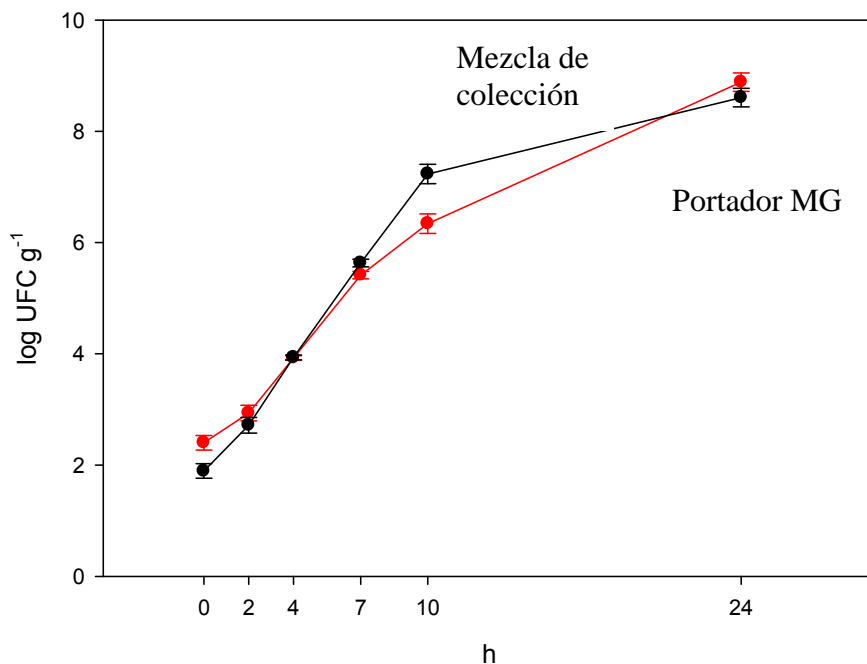


Figura 9. Comportamiento de *S. aureus* enterotoxigénico procedente del exudado nasal del portador MG y en una mezcla de tres cepas de colección no enterotoxigénicas, en crema pastelera almacenada a 35°C.

En el estudio para determinar la fase lag la cepa de colección no mostró evidencias significativas de multiplicación a 22°C en 120 min; puede observarse para el caso de la cepa del exudado una duración de la fase lag de 1.5 h a partir de la cual se inicia un activo desarrollo (Cuadro 11 y Figura 10). Cuando la crema se mantiene a 35°C las condiciones se tornan más favorables para el desarrollo bacteriano, de tal suerte que se presenta un ligero incremento de la cepa de colección a partir de la media hora de incubación (Cuadro 12 y Figura 11). A 35°C la cepa del exudado muestra una reducción significativa de 0.4 log a los 20 min, pero es evidente que a partir de los 40 min se inicia el crecimiento franco del microorganismo. Es posible subrayar que la crema pastelera utilizada en este estudio

constituye un sustrato muy propicio para el desarrollo de este patógeno. Para evitar riesgos a la salud resulta evidente la necesidad de proceder a la mayor brevedad a utilizar la crema pastelera en cuanto es preparada y aplicada como relleno de pasteles. Por supuesto la protección primaria de este alimento radica en prevenir la contaminación, pero está fuera de toda duda que cualquier retraso en el enfriamiento del producto acarrea consecuencias muy peligrosas para el consumidor.

Cuadro 11. Población (log UFC g⁻¹) de una mezcla de tres cepas de colección de *S. aureus* no enterotoxigénico y una cepa enterotoxigénica aislada del exudado nasal MG, en crema pastelera a 22°C.

Cepa	Tiempo (min)				
	0	30	60	90	120
Mezcla de colección no enterotoxigénica	¹ 2.3 (0.16)	2.5 (0.15)	2.5 (0.05)	2.5 (0.11)	2.5 (0.23)
Cepa enterotoxigenica del exudado MG	1.9 (0.15)	1.7 (0.14)	1.6 (0.05)	1.6 (0.15)	2.1 (0.23)

¹ Media de resultados (desviación estándar).

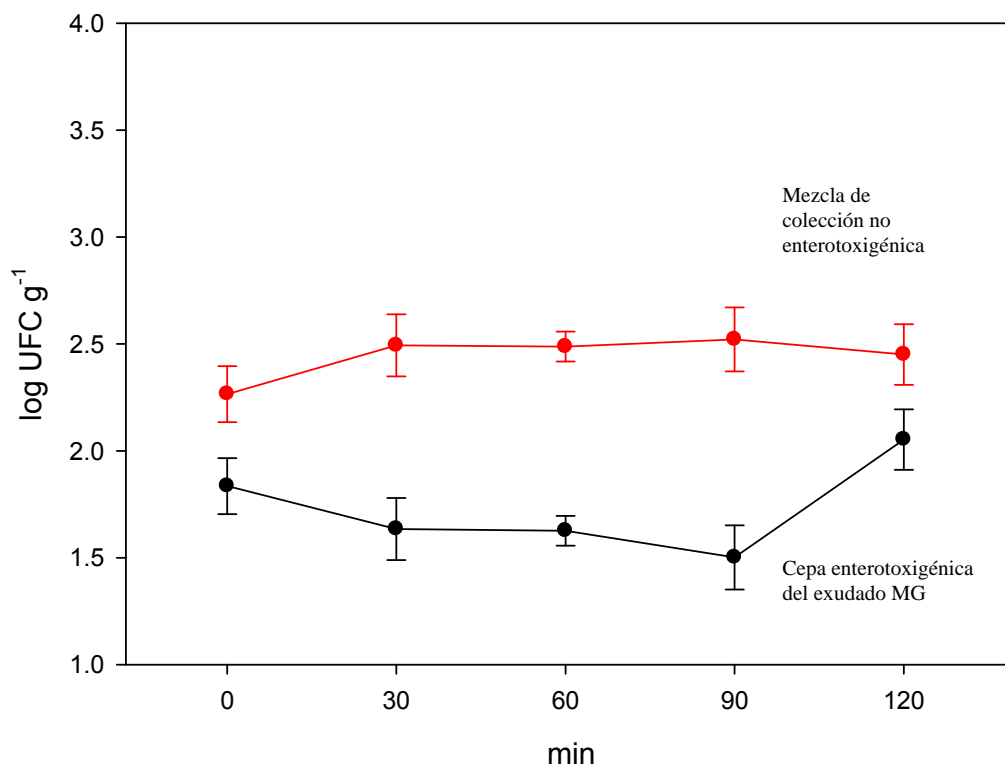


Figura 10. Dinámica de una mezcla de tres cepas de colección de *S. aureus* no enterotoxigénico y una cepa enterotoxigénica aislada del exudado nasal MG, en crema pastelera a 22°C.

Cuadro 12. Población (log UFC g⁻¹) de una mezcla de tres cepas de colección de *S. aureus* no enterotoxigénico y una cepa enterotoxigénica aislada del exudado nasal MG, en crema pastelera a 35°C.

Cepa	Tiempo (min)						
	0	20	40	60	80	100	120
Mezcla de colección no enterotoxigénica	¹ 2.4 (0.04)	2.6 (0.15)	2.5 (0.17)	2.7 (0.08)	2.6 (0.09)	2.8 (0.04)	2.9 (0.09)
Cepa enterotoxigenica del exudado MG	2.0 (0.04)	1.6 (0.14)	2.0 (0.19)	2.3 (0.06)	2.4 (0.09)	2.6 (0.04)	2.7 (0.10)

¹ Media de resultados (desviación estándar).

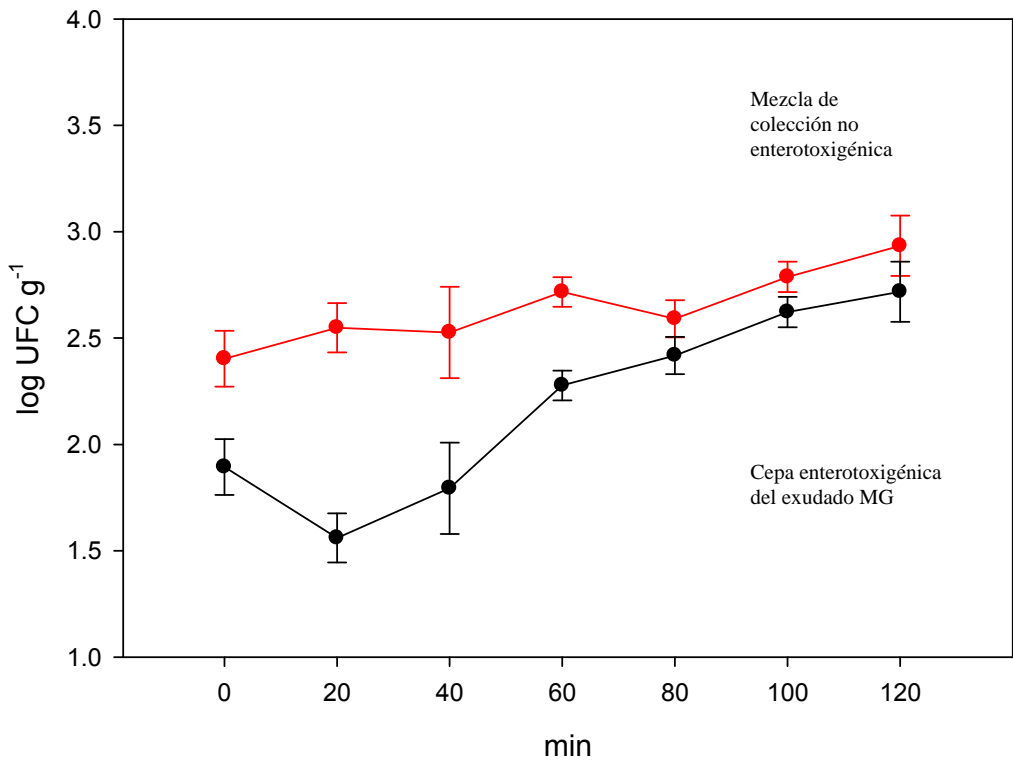


Figura 11. Dinámica de una mezcla de tres cepas de colección de *S. aureus* no enterotoxigénico y una cepa enterotoxigénica aislada del exudado nasal MG, en crema pastelera a 35°C.

Es pertinente señalar que en el estudio realizado con el exudado del portador **MG**, simultáneamente se determinó el contenido de BMA. Es bien sabido que el *S. aureus* es una bacteria que manifiesta amplia susceptibilidad al efecto antagónico de una diversidad de bacterias que son comunes en los alimentos y en el medio ambiente (Haines y Harmon, 1973; Peterson *et al.*, 1964). Los resultados de este estudio muestran que en la crema pastelera, el *S. aureus* inoculado se comporta de una manera similar a las BMA's. Hay que

anotar que el propio *S. aureus* forma parte de las BMA's. Así que las líneas de las BMA's de las Figuras 12 y 13 están incluyendo a la población de *S. aureus*. En otras palabras, para 22°C de los 7.6 log UFC g⁻¹ de BMA contadas a las 24 h, 5.5 log UFC g⁻¹ corresponden a *S. aureus*. Por la forma particular en que se preparó la crema pastelera para este experimento, no se generan muchos espacios para observar un posible efecto antagónico de las BMA's sobre el *S. aureus*. La crema pastelera estaba recién preparada, y como se indicó, se obtiene mediante cocción a 90°C, lo que permite una sobrevivencia muy restringida de microorganismos presentes en los ingredientes (Martin y Myers, 1994). Incluso, puede apreciarse que esas bacterias sobrevivientes se encontraban en una condición de estrés que como se muestra en la propia Figura 12, requirió hasta cerca de 5 h de fase lag, es decir de recuperación, antes de iniciar el desarrollo exponencial. En otros estudios, por ejemplo requesón inoculado con *S. aureus* y almacenado a 22°C, *S. aureus* incrementó su número en 3 log UFC g⁻¹ en 24h (Meza, 1999).

En este último estudio también es destacable la semejanza en el comportamiento del *S. aureus* (ambos enterotoxigénicos) del portador **AF** con respecto al portador **MG**: las tendencias de las líneas del comportamiento del germen son similares en lo general, tanto a 22°C (Figuras 3 y 4), como a 35°C (Figuras 3 y 5).

Cuadro 13. Poblaciones (log UFC g⁻¹) de BMA y *S. aureus* (mezcla de tres cepas no enterotoxigénicas) en crema pastelera, almacenada a 22°C durante 24 h.

Cepa	Tiempo (h)					
	0	2	4	7	10	24
BMA	¹ 3.3 (0.03)	3.2 (0.11)	3.3 (0.02)	3.7 (0.09)	4.4 (0.03)	7.6 (0.03)
<i>S. aureus</i>	2.3 (0.02)	2.5 (0.03)	2.6 (0.09)	2.9 (0.09)	2.9 (0.03)	5.5 (0.01)

¹ Media de resultados (desviación estándar).

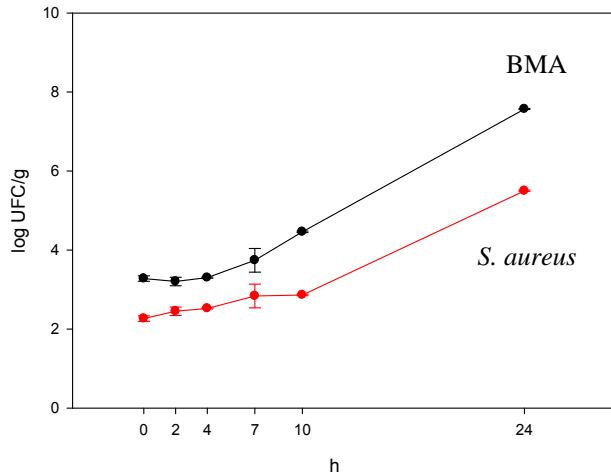


Figura 12. Comportamiento de BMA y de una mezcla de tres cepas de colección de *S. aureus* no enterotoxigénicas en crema pastelera, conservada a 22°C.

Cuadro 14. Poblaciones (log UFC g⁻¹) de BMA y *S. aureus* (mezcla de tres cepas no enterotoxigénicas) en crema pastelera, conservada a 35°C durante 24 h.

Cepa	Tiempo (h)					
	0	2	4	7	10	24
BMA	¹ 3.3 (0.04)	5.1 (0.04)	6.0 (0.05)	7.1 (0.03)	8.2 (0.07)	9.3 (0.04)
<i>S. aureus</i>	2.4 (0.03)	2.9 (0.08)	3.9 (0.05)	5.4 (0.03)	6.3 (0.08)	8.9 (0.01)

¹ Media de resultados (desviación estándar).

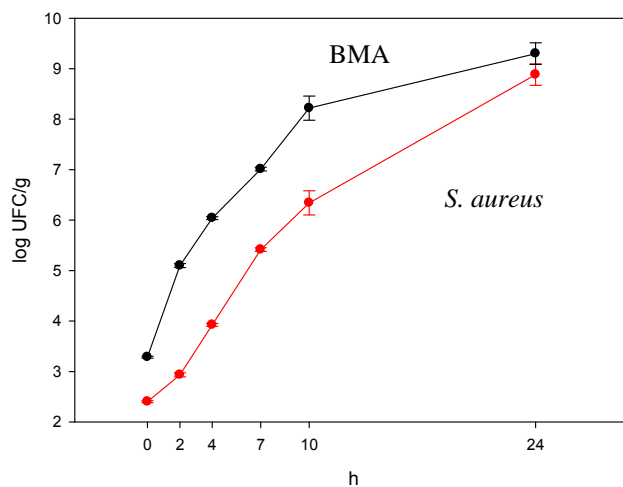


Figura 13. Comportamiento de BMA y en una mezcla de tres cepas de colección de *S. aureus* no enterotoxigénicas en crema pastelera, conservada a 35°C.

6.2.3 Cinética de desarrollo en crema pastelera de cepas de *S. aureus* recién aisladas de portador humano

Más adelante dentro de éste capítulo, una cepa recién aislada del exudado nasal de portador humano **MG**, se incluyó en el estudio. Su cinética se valoró a 30°C en la crema pastelera a partir de niveles de inóculo semejantes a los empleados en los estudios previos. Debe resaltarse la tendencia de la curva de respuesta con esta cepa de portador **MG** con respecto a la observada con la cepa de colección. Y por otra parte, sin embargo, el máximo de población alcanzada a partir de las 4 h es mayor con esta última cepa, y segundo, el acercamiento y trazo de la línea que conduce a la fase estacionaria es también muy manifiesto con esta cepa. Este hallazgo contrasta con el mostrado por la cepa del portador **MG** en la cual, a las 20 h, aun no se observaba la fase estacionaria (Cuadro 15 y Figura 14).

Generalmente los investigadores emplean la ecuación de Gompertz para estimar la velocidad de desarrollo microbiano (Buchanan, *et al.*, 1989). En este trabajo, los resultados de las cinéticas se capturaron en el software DMFit. Como se describe en los antecedentes, representa un mejor modelo matemático ya que tiene como ventajas que la fase lag se expresa mediante una función que ajusta el estado fisiológico de las células y la modelación de las fases de crecimiento microbiano de una forma más continua; además, permite predecir el crecimiento bajo fluctuaciones de temperatura (Baranyi y Roberts, 1994). Las poblaciones consideradas para el análisis son las que se obtuvieron a las 10 h directamente de los recuentos en las placas de ABP. Las velocidades de crecimiento ($\log \text{UFC h}^{-1}$) de las cuatro cepas enterotoxigénicas en crema pastelera almacenada a 30°C no muestran diferencias estadísticas significativas al ser comparadas entre sí $P > 0.05$ (Cuadro 16). Es ilustrativo que lo reportado por otros autores para cepas de *S. aureus* incubadas a 30°C en caldos de cultivo, la velocidad se encuentre 0.4783 y 0.4128 $\log \text{UFC h}^{-1}$ (ComBase, 2007b), lo que confirma lo favorable que es la crema pastelera para el desarrollo del microorganismo comparada con los medios de cultivo. Después de 10 h todas las cepas mostraron poblaciones mayores a 6 $\log \text{UFC g}^{-1}$, lo que hace suponer que en este periodo es posible que las cepas hayan sintetizado suficiente cantidad de toxina para provocar una respuesta clínica en el consumidor (Lancette y Bennett, 2001). Esto podría tener relación con los datos reportados en referencia al incremento en la frecuencia de brotes de intoxicación estafilocócica en los meses de verano, cuando la temperatura suele superar 30°C (Fernández, *et al.*, 1998).

Cuadro 15. Población de *S. aureus* enterotoxigénico recién aislado del portador MG, en crema pastelera, almacenada a 30°C.

Tiempo (h)	log UFC g ⁻¹
0	¹ 3.1 (0.04)
2	3.5 (0.03)
4	4.2 (0.04)
7	5.5 (0.02)
10	6.6 (0.02)
15	7.5 (0.02)
20	8.3 (0.04)
24	9.1(0.02)

¹ Media de resultados (desviación estándar).

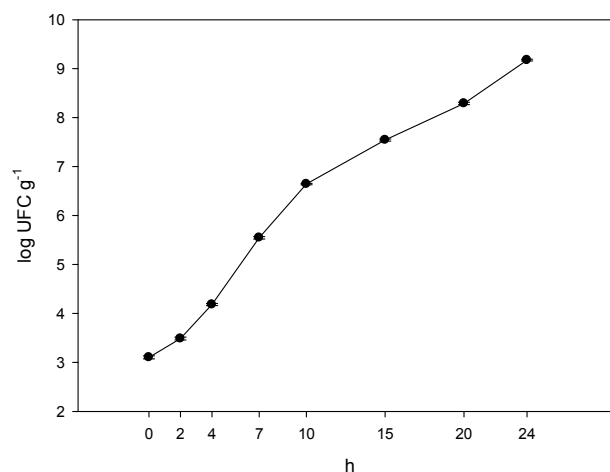


Figura 14. Comportamiento a 30°C de *S. aureus* enterotoxigénico recién aislado del portador MG, en crema pastelera almacenada a 30°C.

Cuadro 16. Velocidad de crecimiento y biomasa alcanzada a las 10 h a 30°C de 4 cepas de *S. aureus* enterotoxigénicas, en crema pastelera según su origen.

Origen	Velocidad (log UFC h ⁻¹)	Biomasa a las 10 h (log UFC g ⁻¹)
ATCC 14458	¹ 0.4312 (0.003) A*	7.6 (0.01) A
Portador MG	0.3991 (0.013) A	7.1 (0.03) C
Queso cotija	0.4408 (0.053) A	7.2 (0.03) B
Queso panela	0.4273 (0.004) A	6.2 (0.03) D

¹ Media de resultados (desviación estándar).

* Valores en la misma columna no seguidos de la misma letra indican diferencia estadística significativa con P<0.05 (Tukey-Kramer).

A 22°C (Cuadro 18) la cepa del portador AF alcanzó a las 10 h una mayor biomasa que la del portador MG (P>0.05), esto es, comportamientos distintos entre cepas de un origen muy similar.

Cuadro 17. Velocidad de crecimiento y biomasa alcanzada a las 10 h en crema pastelera almacenada a 22°C, de tres cepas de *S. aureus* según su origen.

Origen	Velocidad (log UFC h ⁻¹)	Biomasa a las 10 h (log UFC g ⁻¹)
Mezcla de colección no enterotoxigénica	[†] 0.1916 (0.006) _{AB*}	2.4 (0.288) _B
Portador AF (enterotoxigénica)	0.2037 (0.006) _A	4.2 (0.057) _A
Portador MG (enterotoxigénica)	0.1743 (0.006) _B	2.6 (0.152) _B

[†] Media de resultados (desviación estándar).

* Valores en la misma columna no seguidos de la misma letra indican diferencia estadística significativa con P<0.05 (Tukey-Kramer).

La velocidad de desarrollo de *S. aureus* enterotoxigénico recuperado de los exudados nasales es más elevada (Cuadro 19). Siendo este (que se extiende a las manos) el vehículo más común de contaminación humana en alimentos con este microorganismo, se debería insistir en la exigencia de las autoridades y productores de alimentos en el uso de cubreboca como medida económica y eficaz de prevención de este tipo de contaminación. Esta medida es un complemento obligado a la conservación de estos alimentos en refrigeración (Bergdoll, 1989). Cerca de la temperatura óptima del microorganismo (37°C) las cepas, independientemente del origen, desarrollan a una velocidad elevada en la crema pastelera, observación comparable a lo publicado por otros autores en caldos de cultivo a 37°C (ComBase, 2007).

Cuadro 18. Velocidad de crecimiento y biomasa alcanzada a las 10 h en crema pastelera almacenada a 35°C, de tres cepas de *S. aureus* según su origen.

Origen	Velocidad (log UFC h ⁻¹)	Biomasa a las 10 h (log UFC g ⁻¹)
Mezcla de colección no enterotoxigénica	[†] 0.4372 (0.068) _{B*}	6.9 (0.09) _C
Portador AF (enterotoxigénica)	0.5164 (0.044) _{AB}	7.8 (0.13) _A
Portador MG (enterotoxigénica)	0.5744 (0.011) _A	7.2 (0.13) _B

[†] Media de resultados (desviación estándar).

* Valores en la misma columna no seguidos de la misma letra indican diferencia estadística significativa con P<0.05 (Tukey-Kramer).

6.2.4 Cinéticas de desarrollo en crema pastelera de cepas de *S. aureus* recién aisladas de alimentos

Finalmente se estudiaron dos cepas del patógeno recién aisladas de queso cotija y panela. Ambas muestran en la Figura 15 modificaciones en la población del germen virtualmente idénticas para fines prácticos, tomando en cuenta que no se partió del mismo nivel de inóculo en los dos casos. Sin embargo, se alcanza a notar una vez más que la dispersión de los valores (desviación estándar) en los tres replicados para cada punto de las curvas es mínima (Cuadro 17). Esta observación merece destacarse debido a que la inoculación de las placas para los recuentos se realizó por extensión en superficie, una técnica que generalmente es menos reproducible que la de vaciado en placa.

Cuadro 19. Población (log UFC g⁻¹) de *S. aureus* enterotoxigénico recién aislado de queso cotija y panela, en crema pastelera almacenada a 30°C.

Cepa	Tiempo (h)							
	0	2	4	7	10	15	20	24
Cotija	¹ 3.6 (0.07)	3.8 (0.03)	4.1 (0.05)	5.6 (0.02)	7.2 (0.07)	8.6 (0.04)	9.2 (0.03)	9.2 (0.02)
Panela	3.3 (0.06)	3.5 (0.04)	3.8 (0.09)	5.2 (0.06)	6.3 (0.02)	8.3 (0.03)	9.2 (0.04)	9.3 (0.03)

¹ Media de resultados (desviación estándar).

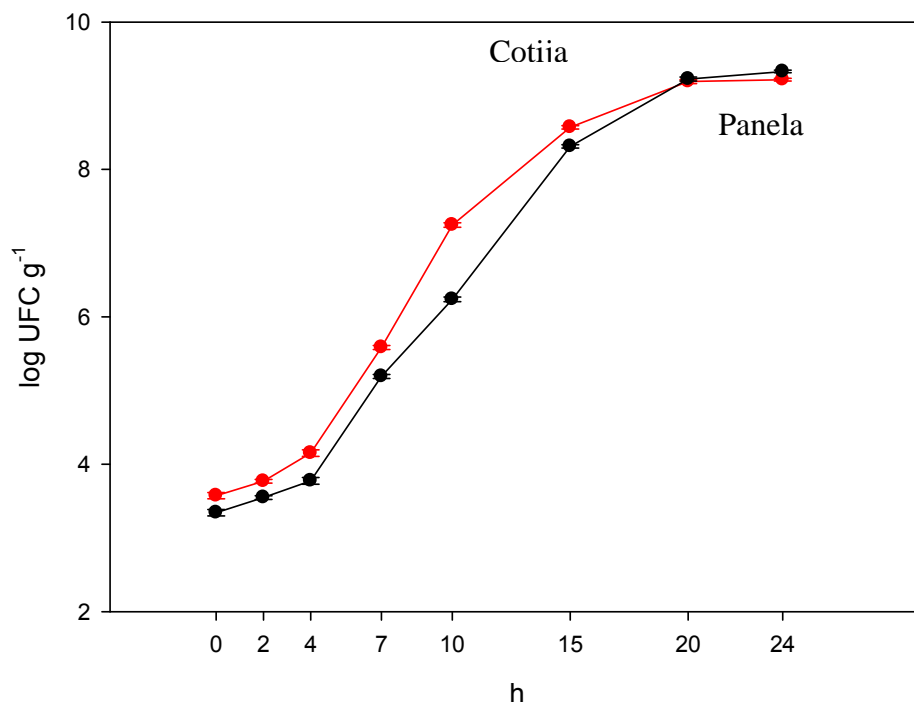


Figura 15. Dinámica en crema pastelera de *S. aureus* recién aisladas de queso cotija y panela, almacenada a 30°C.

6.3 Comportamiento en crema pastelera de cepas de *S. aureus* sometidas a estrés por restricción de nutrientes ó mediante tratamiento térmico

Una vez atendidos los estudios que pueden considerarse preliminares en el trabajo, se procedió a valorar la influencia de condiciones estresantes para el *S. aureus* en su capacidad para proliferar en la crema pastelera. Las condiciones de estrés a las que puede exponerse el germen en una pastelería son muy diversas (Yousef y Courtney, 2003), y el propósito central del trabajo consiste en determinar en que términos podría modificarse el intenso desarrollo del germen en el alimento.

Se llevaron a cabo dos estudios, uno para observar el comportamiento del germen sujeto a un estrés más complejo y menos controlable consistente en inducir el estrés mediante la restricción de nutrientes, y otro cuya intensidad puede ser controlada y estimada con relativa facilidad (tratamiento térmico subletal).

6.3.1 Restricción de nutrientes

Para valorar el factor de restricción de nutrientes disponibles para el germen, el primer problema consiste en determinar el nivel de nutrientes, es decir de dilución de residuos del producto en los utensilios, que pudiera inducir una condición de estrés. Definir este parámetro presenta dificultades que no se observan ante factores más cuantificables y controlables como puede ser la exposición a un tratamiento subletal térmico.

Se prepararon diluciones de crema pastelera en las que se inoculó el microorganismo, y en función de la respuesta en la curva de crecimiento se seleccionó aquella que mostrara un alargamiento de la fase lag y un desarrollo inicial más pobre respecto a el que se observa cuando el germen prospera en la crema pastelera sin diluir. Es decir, la dilución en la cual el germen se encontraría en condición de estrés. Un estudio preliminar sin replicados (Cuadro 20 y Figura 16) muestra claramente como se daña el desarrollo del *S. aureus* conforme la disponibilidad de nutrientes se restringe (Peterson, *et al.*, 2005). Como el DPS aporta nutrientes, nos parece pertinente sustituirlo como diluyente por una solución BFS. En efecto, cuando se comparan las respuestas del germen en ambos tipos de diluyentes es fácil demostrar la incapacidad del germen (las células utilizadas en todos estos ensayos consisten

en suspensiones lavadas en tres ocasiones para remover todo residuo de materia orgánica en la suspensión final usada como inóculo) para proliferar en la crema pastelera diluida al 0.2 y 0.1% (Cuadro 21 y Figura 17).

Cuadro 20. Población (log UFC g⁻¹) de *S. aureus* ATCC 6538 no enterotoxigénico en crema pastelera íntegra y diluida en DPS, almacenada a 30°C.

Concentración (%) de crema pastelera	h de almacenamiento			
	0	3	6	8
Íntegra	3.2	3.7	4.6	5.6
1.0	3.2	3.5	4.4	4.6
0.1	3.2	3.4	3.6	3.8

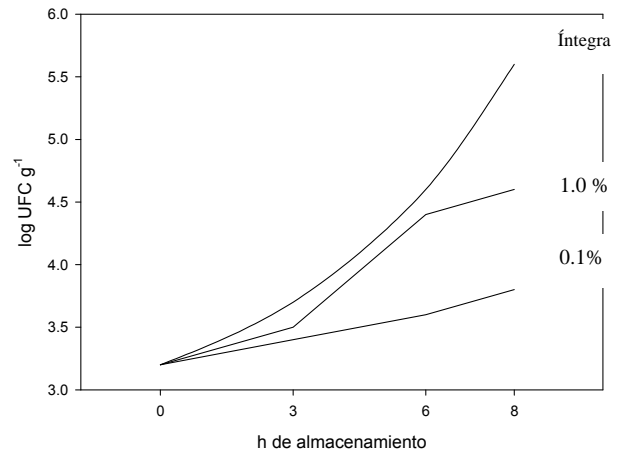


Figura 16. Comportamiento de *S. aureus* ATCC 6538 no enterotoxigénico según concentración de crema pastelera a 30°C.

Cuadro 21. Población (log UFC g⁻¹) de *S. aureus* ATCC 6538 no enterotoxigénico en crema pastelera diluida al 0.1 y 0.2% empleando como diluyente BFS y DPS, almacenada a 30°C.

Concentración (%)	Diluyente empleado para los recuentos	Tiempo (h)					
		0	3	6	9	12	20
0.1	BFS	¹ 3.3 (0.05)	3.3 (0.01)	3.2 (0.02)	3.2 (0.09)	3.3 (0.02)	3.3 (0.02)
0.2	BFS	3.1 (0.05)	3.3 (0.01)	3.2 (0.01)	3.2 (0.08)	3.5 (0.02)	3.8 (0.02)
0.1	DPS	3.2 (0.08)	4.2 (0.02)	5.1 (0.02)	6.0 (0.02)	7.1 (0.01)	8.2 (0.04)
0.2	DPS	3.2 (0.07)	4.4 (0.02)	5.2 (0.02)	6.0 (0.02)	7.2 (0.01)	8.2 (0.02)

¹ Media de resultados (desviación estándar).

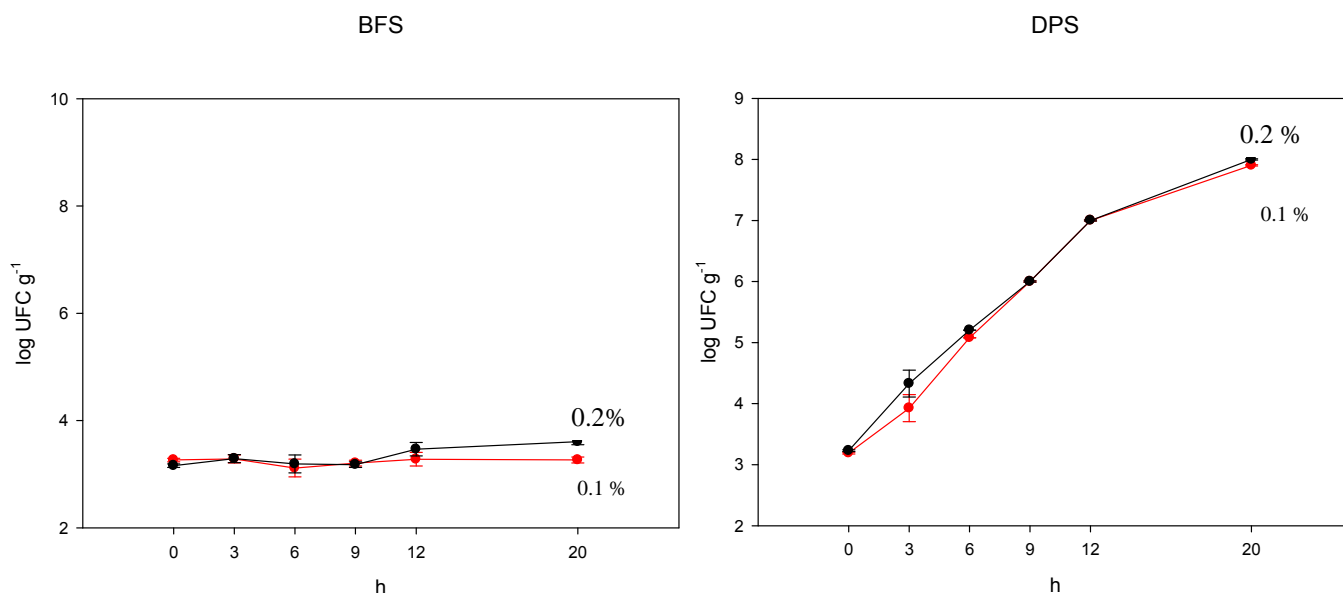


Figura 17. Comportamiento de *S. aureus* ATCC 6538 no enterotoxigénico en crema pastelera diluida al 0.1 y 0.2% empleando como diluyente BFS y DPS, almacenada a 30°C.

Se inoculó *S. aureus* no enterotoxigénico en crema pastelera diluida a 0.4, 0.7 y 1.0% de sólidos, y se determinó la población bacteriana después de incubar a 30°C, observamos que desde las 12 h el comportamiento guarda una proporción directa con el grado de dilución utilizado de la crema (Cuadro 22 y Figura 18).

La condición de estrés se entiende como aquel estado en el que la bacteria ha sufrido un daño estructural y funcional que no le permite desplegar un desarrollo pleno como ocurre cuando la célula se encuentra libre de daño (Samelis y Sofos, 2003).

El problema consiste en determinar una condición de restricción de nutrientes entre células que se emplearán en algún experimento y que obstaculicen su crecimiento y ulterior desarrollo. Para el efecto, cuando comparamos las poblaciones que se obtienen cuando se utiliza crema pastelera integra y crema pastelera diluida al 0.4% constatamos que a las 9 h en el primer caso, la bacteria se encuentra ya en pleno desarrollo, alcanzando una población de 4.5 log UFC g⁻¹; en ese mismo periodo a la concentración de 0.4% el recuento del germen no se ha modificado con respecto al original, es decir, las células permanecen viables pero resultan limitadas en su capacidad para proliferar ante la escasez de nutrientes. Puede, en consecuencia, considerarse que estas células se encuentran en condición de estrés, y por

tanto, constituyen una suspensión de gérmenes que puede ser utilizada para valorar los efectos de tal condición de escasez de nutrientes, sobre el desarrollo en crema pastelera íntegra. En otras palabras, estamos simulando una situación en la cual, por ejemplo, células residuales en utensilios mal saneados han sobrevivido, pero difieren en la integridad estructural y fisiológica que exhiben las células robustas libres de daño.

Cuadro 22. Población (log UFC g⁻¹) de *S. aureus* ATCC 6538 no enterotoxigénico en crema pastelera íntegra y diluida en BFS a tres concentraciones, almacenada a 30°C.

Concentración	Tiempo (h)					
	0	3	6	9	12	15
Íntegra	¹ 3.1 (0.08)	2.8 (0.03)	3.7 (0.06)	4.5 (0.06)	5.0 (0.02)	5.6 (0.01)
1.0	3.0 (0.07)	2.9 (0.02)	3.1 (0.08)	3.5 (0.06)	4.2 (0.03)	4.6 (0.01)
0.7	2.9 (0.08)	2.9 (0.01)	3.1 (0.07)	3.2 (0.02)	3.6 (0.02)	4.1 (0.01)
0.4	2.9 (0.04)	2.9 (0.01)	2.8 (0.02)	2.8 (0.08)	2.8 (0.03)	3.0 (0.01)

¹ Media de resultados (desviación estándar).

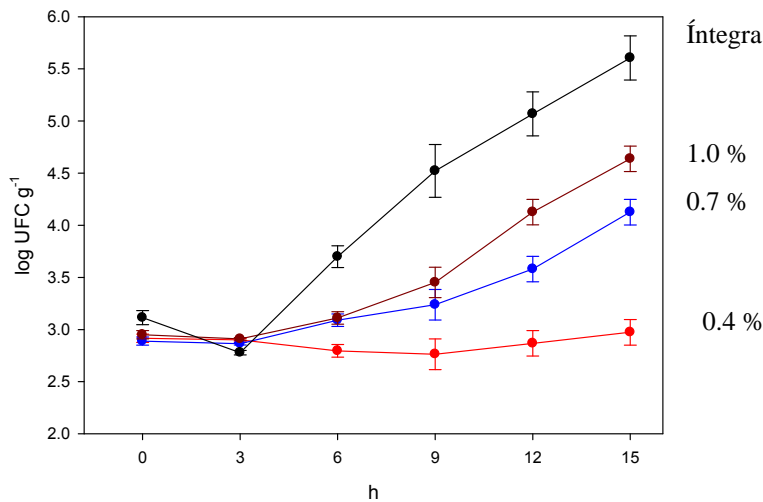


Figura 18. Comportamiento de *S. aureus* ATCC 6538 no enterotoxigénico en crema pastelera íntegra y diluida en BFS a tres concentraciones, almacenada a 30°C.

El experimento final consistió en inocular al microorganismo suspendido en crema pastelera diluida al 0.4% y almacenada durante 9 h, en crema pastelera íntegra. El objetivo consiste en detectar cualquier diferencia en el comportamiento de estas células con respecto al mismo producto inoculado con células provenientes de un cultivo fresco y lavado, de células no dañadas. Los resultados muestran (Cuadro 23 y Figura 19) que no existe una diferencia significativa en la dinámica de las dos cepas. Prácticamente las dos líneas de la figura pueden sobreponerse, aunque es interesante destacar una discreta fase lag en el experimento con células no estresadas que no se observa en el otro caso. Es necesario recordar al respecto, que aunque la curva se trazó a lo largo de 24 h, en realidad los efectos del estrés celular se limitan al periodo transcurrido entre la inoculación y el inicio del desarrollo franco del germen (fase lag), ya que una vez recuperada la célula e iniciado el desarrollo no existe diferencia en el comportamiento de las células siempre íntegras con respecto a aquellas que se han recuperado del estrés (Baird-Parker, 2000). La fase lag mencionada en el cultivo no estresado puede explicarse por el hecho de que se han inoculado células que provienen de un medio de cultivo de laboratorio cuya formulación difiere de la crema pastelera; la célula requiere un periodo de adaptación a la composición del nuevo sustrato que es la crema pastelera. En las células estresadas, este problema no existe o mínimamente, debido a que las células inoculadas habían permanecido en un sustrato compuesto por los mismos nutrientes de la crema pastelera usada como sustrato final para el experimento. En realidad, este estudio no ha permitido poner de manifiesto una diferencia en el comportamiento de células no estresadas con respecto a las estresadas por efecto de la restricción de nutrientes como factor en la inducción del estrés (Cuadro 24). Es evidente que el control de la condición de estrés por escasez de nutrientes no es tan cuantificable ni controlable como la del inducido por tratamiento térmico como se detalla más adelante.

Cuadro 23. Población (log UFC g⁻¹) de *S. aureus* ATCC 6538 no enterotoxigénico no estresado y sometido a estrés por restricción de nutrientes, en crema pastelera almacenada a 30°C.

Cepa	Tiempo (h)							
	0	2	4	7	10	15	20	24
Estresada	¹ 3.6 (0.09)	4.1 (0.06)	4.7 (0.06)	5.7 (0.06)	6.6 (0.06)	7.6 (0.06)	8.3 (0.06)	9.3 (0.06)
NO estresada	3.1 (0.06)	3.3 (0.06)	4.2 (0.06)	5.2 (0.06)	6.3 (0.06)	7.1 (0.06)	8.0 (0.09)	9.0 (0.06)

¹ Media de resultados (desviación estándar).

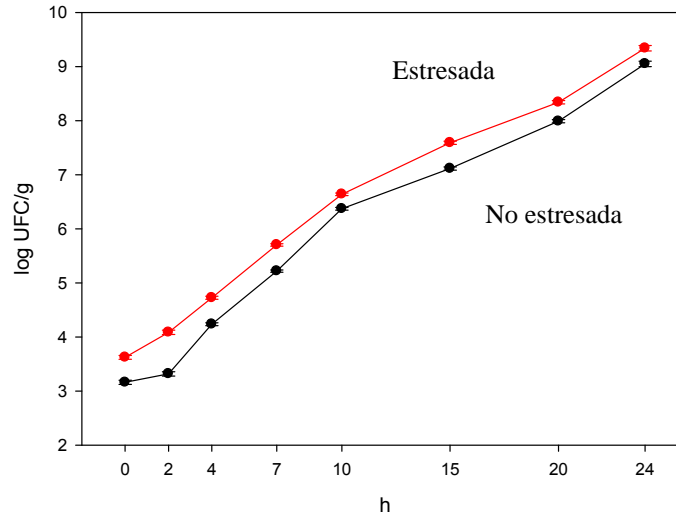


Figura 19. Comportamiento de *S. aureus* ATCC 6538 no enterotoxigénico no estresado y sometido a estrés por restricción de nutrientes, en crema pastelera, almacenada a 30°C.

Aunque existió una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) en las velocidades de desarrollo (Cuadro 24) no son (numéricamente *per se*), motivo de alarma en la configuración del riesgo, ya que la diferencia es mínima y la biomasa alcanzada a las 10 h es prácticamente la misma.

Cuadro 24. Velocidad de crecimiento y biomasa alcanzada a las 10 h en crema pastelera de *S. aureus* ATCC 6538 no enterotoxigénico sin estresar y estresado por restricción de nutrientes, almacenada a 30°C.

Condición	Velocidad (log UFC h ⁻¹)	Biomasa a las 10h (log UFC g ⁻¹)
No estresada	¹ 0.2481 (0.0036) A*	6.3 (0.057) A
Estresada	0.2365 (0.0053) B	6.6 (0.608) A

¹ Media de resultados (desviación estándar).

* Valores en la misma columna no seguidos de la misma letra indican diferencia estadística significativa con $P < 0.05$ (Tukey-Kramer).

6.3.2 Tratamiento térmico

El calor es quizá el agente estresante mas ampliamente estudiado entre los microorganismos (Allwood y Russell, 1967). Como se ha expuesto, al *S. aureus* hay que aplicarle un tratamiento subletal, es decir, suficiente para inactivar a las células más termosensibles e inducir el estado de estrés en la mayor parte de la población restante (Pariza e Iandolo, 1969). En esta bacteria la temperatura subletal se inicia hacia los 53°C, de manera que coincidente con Iandolo y Ordal (1966), 55°C se puede considerar una temperatura apropiada para nuestro propósito. Temperaturas mayores (60°C) como lo reportan Angelotti *et al.* (1961), inactivan totalmente a *S. aureus* en crema pastelera.

6.3.2.1 Determinación de la condición de estrés de *S. aureus* ATCC 6538 no enterotoxigénico

En el primer experimento el germen se suspendió en BFS y, en baño maría, se sometió a temperatura de $55 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Periódicamente se efectuó el recuento del microorganismo tanto en agar AST como en AST adicionado de 10% de NaCl (Lachica, 1984). Típicamente la diferencia en los recuentos a cada periodo de tratamiento se interpreta como la población que se encuentra en condición de estrés (Cuadro 25). Por ejemplo, a los 15 min la población del germen ha disminuido de 9.3 a $7.0 = 2.3 \log \text{UFC g}^{-1}$. Pero a la vez, $7.0 - 5.0 = 2 \log \text{UFC g}^{-1}$ de la población se encuentran en condición de estrés. Y $5.0 \log \text{UFC g}^{-1}$ es la población de células que no ha sido afectada por el calor y mantiene su viabilidad. Ésta diferencia, cercana a los $2 \log \text{UFC g}^{-1}$ se mantiene a lo largo del experimento, según se ilustra en la Figura 20. Consideramos de interés comparar el comportamiento en la crema pastelera consecutivo al tratamiento estresante del calor de cepas de *S. aureus* de diferentes orígenes. Por supuesto, queda excluido el ensayo del *S. aureus* contenido en el exudado nasal.

Este estudio fue realizado con la cepa ATCC 6538, una bacteria de colección de remoto origen, que aún conserva completa sensibilidad a la penicilina, situación prácticamente desterrada en la naturaleza (ATCC, 1989); adicionalmente, según confirmamos en el laboratorio, esta cepa no es enterotoxigénica.

Cuadro 25. Población (log UFC g⁻¹) de *S. aureus* ATCC 6538 no enterotoxigénico recuperada en AST y AST 10% NaCl, después de la inducción de estrés por tratamiento térmico a 55°C a diferentes tiempos.

Medio de cultivo	Tiempo (min)				
	0	15	20	25	30
AST	[†] 9.3 (0.06) A *	7.0 (0.01) A	5.4 (0.06) A	4.5 (0.06) A	4.0 (0.06) A
AST 10% NaCl	9.3 (0.09) A	5.0 (0.05) B	4.2 (0.02) B	3.2 (0.06) B	2.8 (0.06) B

[†] Media de resultados (desviación estándar).

* Valores en la misma columna no seguidos de la misma letra indican diferencia estadística significativa con P<0.05 (Tukey-Kramer).

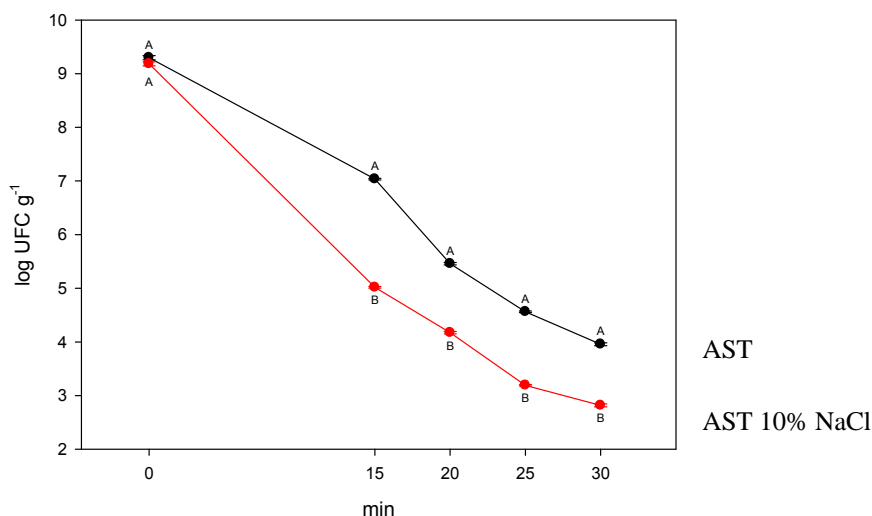


Figura 20. Reducción de la población *S. aureus* ATCC 6538 no enterotoxigénico recuperado en AST y AST 10% NaCl después de la inducción de estrés por tratamiento térmico a 55°C a diferentes tiempos.

6.3.2.2 Determinación de la condición de estrés de *S. aureus* ATCC 14458 enterotoxigénico

En consecuencia, se recurrió a otra cepa de colección en la que habíamos demostrado capacidad enterotoxigénica. Así, con la cepa ATCC 14458 enterotoxigénica, fue posible alcanzar un 23% de células dañadas con un tratamiento por 20 min a 55°C (Cuadro 26 y Figura 21). Cuando se efectuó el ensayo en crema recién elaborada de manera concurrente con la cepa sin estresar, ambas cepas mostraron una capacidad similar de desarrollo en crema pastelera a 30°C (Cuadro 27 y Figura 22). Se alcanza a observar en la cepa estresada, sin embargo, un ligero retraso en el inicio del desarrollo, que evidenciaría la fase de recuperación de esta cepa tratada.

Cuadro 26. Población (log UFC g⁻¹) de *S. aureus* ATCC 14458 enterotoxigénico recuperado en ABP y AST 10% NaCl después de la inducción de estrés por tratamiento térmico a 55°C por 20 min.

Medio de cultivo	Tiempo (min)	
	0	20
ABP	¹ 9.2 (0.03) A*	5.2 (0.03) A
AST 10% NaCl	9.2 (0.03) A	4.0 (0.03) B

¹ Media de resultados (desviación estándar).

* Valores en la misma columna no seguidos de la misma letra indican diferencia estadística significativa con P<0.05 (Tukey-Kramer).

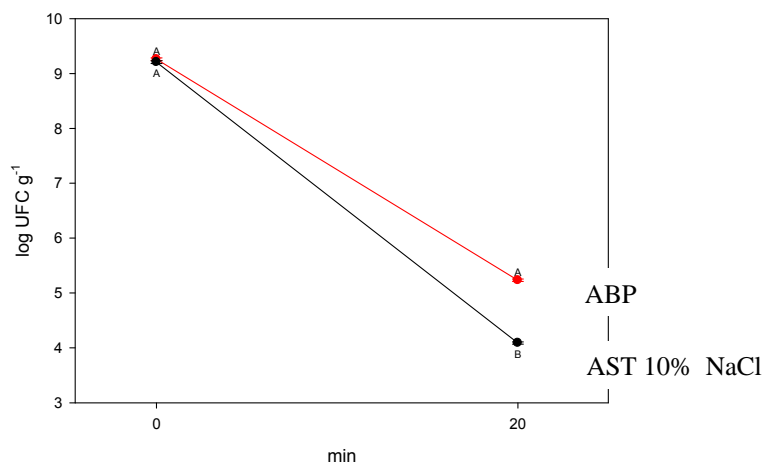


Figura 21. Reducción de la población de *S. aureus* ATCC 14458 enterotoxigénico recuperada en ABP y AST 10% NaCl después de la inducción de estrés por tratamiento térmico a 55°C por 20 min.

Cuadro 27. Población (log UFC g⁻¹) de *S. aureus* ATCC 14458 enterotoxigénico, no estresado y sometido a estrés por tratamiento térmico a 55°C por 20 min, e inoculado en crema pastelera almacenada a 30°C.

Cepa	Tiempo (h)							
	0	2	4	7	10	15	20	24
NO estresada	¹ 3.2 (0.06)	3.8 (0.01)	4.6 (0.06)	5.9 (0.06)	7.6 (0.06)	8.6 (0.06)	9.2 (0.02)	9.3 (0.01)
Estresada	3.2 (0.06)	3.2 (0.02)	4.3 (0.06)	5.7 (0.06)	6.9 (0.06)	7.7 (0.06)	8.4 (0.04)	9.0 (0.01)

¹ Media de resultados (desviación estándar).

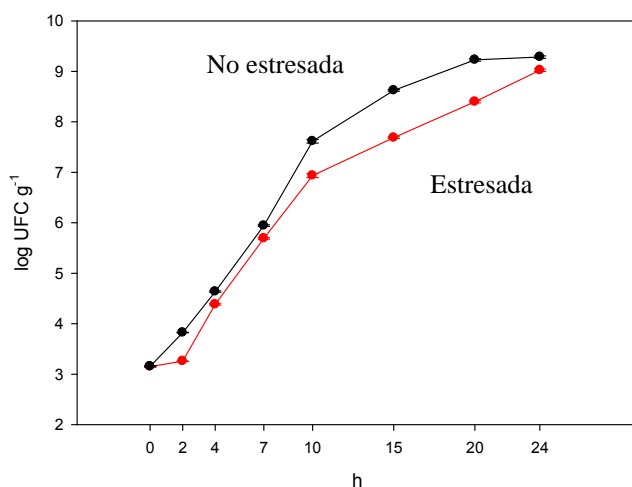


Figura 22. Comportamiento de *S. aureus* ATCC 14458 enterotoxigénico no estresado y sometido a estrés por tratamiento térmico a 55°C por 20 min, e inoculado en crema pastelera almacenada a 30°C.

6.3.2.3 Determinación de la condición de estrés de *S. aureus* enterotoxigénico recién aislado de portador humano

En este estudio la población de células estresadas en la suspensión fue de 20% (Cuadro 28 y Figura 23). Observamos de manera muy destacada el proceso de adaptación requerido con las células estresadas para recuperarse e iniciar su desarrollo, hecho que se expresa en una fase lag cercana a 2 h, que contrasta con la ausencia (o muy breve duración de la fase lag) por parte de la cepa no estresada (Cuadro 29 y Figura 24).

Cuadro 28. Población (log UFC g⁻¹) de *S. aureus* enterotoxigénico recién aislado del portador MG recuperado en ABP y AST 10% NaCl después de la inducción de estrés por tratamiento térmico a 55°C por 20 min.

Medio de cultivo	Tiempo (min)	
	0	20
ABP	¹ 9.3 (0.03) A*	6.0 (0.03) A
AST 10% NaCl	9.3 (0.03) A	4.8 (0.03) B

¹ Media de resultados (desviación estándar).

* Valores en la misma columna no seguidos de la misma letra indican diferencia estadística significativa con P<0.05 (Tukey-Kramer).

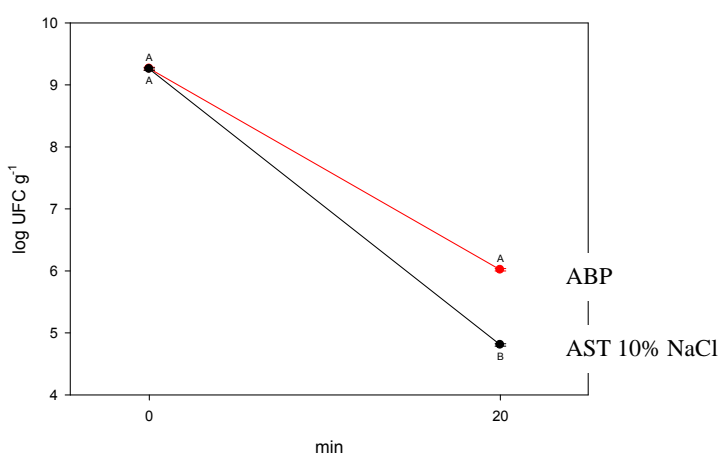


Figura 23. Reducción de la población de *S. aureus* enterotoxigénico recién aislado del portador MG recuperado en ABP y AST 10% NaCl después de la inducción de estrés por tratamiento térmico a 55°C por 20 min.

Cuadro 29. Población (log UFC g⁻¹) de *S. aureus* enterotoxigénico recién aislado de portador MG no estresado y sometido a estrés por tratamiento térmico a 55°C por 20 min, e inoculado en crema pastelera almacenada a 30°C.

Cepa	Tiempo (h)							
	0	2	4	7	10	15	20	24
NO estresada	¹ 3.1 (0.04)	3.5 (0.03)	4.2 (0.04)	5.5 (0.02)	6.6 (0.02)	7.5 (0.02)	8.3 (0.04)	9.1 (0.02)
Estresada	3.0 (0.06)	3.0 (0.06)	3.5 (0.06)	4.7 (0.06)	5.9 (0.06)	7.0 (0.06)	8.1 (0.06)	9.1 (0.01)

¹ Media de resultados (desviación estándar).

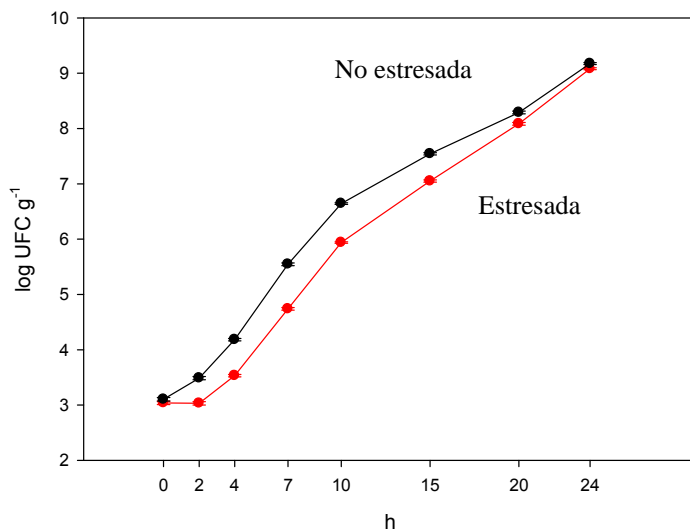


Figura 24. Comportamiento de *S. aureus* enterotoxigénico recién aislado del portador MG no estresado y sometido a estrés por tratamiento térmico a 55°C por 20 min, e inoculado en crema pastelera almacenada a 30°C.

6.3.2.4 Determinación de la condición de estrés de *S. aureus* enterotoxigénico recién aislado de queso cotija

Por su parte, la cepa recuperada del queso cotija mostró una sensibilidad similar a la cepa anterior, con 25% de células dañadas después del mismo periodo de tratamiento (Cuadro 30 y Figura 25). En la crema pastelera la inoculación de células dañadas de ésta cepa continúa mostrando una fase lag de 2 h en la curva de desarrollo; la cepa no estresada muestra una fase lag similar, pero la diferencia es estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Un dato interesante que hay que subrayar, es que inmediatamente después de iniciada la fase exponencial, la cepa estresada alcanza niveles de población menores a los que muestra la cepa no estresada (Cuadro 31 y Figura 26). Por lo demás, el comportamiento de las dos cepas se encuentra muy próximo al de la cepa aislada de portador humano.

Cuadro 30. Población (log UFC g⁻¹) de *S. aureus* enterotoxigénico recién aislado de queso cotija recuperado en ABP y AST 10% NaCl después de la inducción de estrés por tratamiento térmico a 55°C por 20 min.

Medio de cultivo	Tiempo (min)	
	0	20
ABP	¹ 9.4 (0.03) A*	7.3 (0.03) A
AST 10% NaCl	9.4 (0.03) A	5.5 (0.03) B

¹ Media de resultados (desviación estándar).

* Valores en la misma columna no seguidos de la misma letra indican diferencia estadística significativa con P<0.05 (Tukey-Kramer).

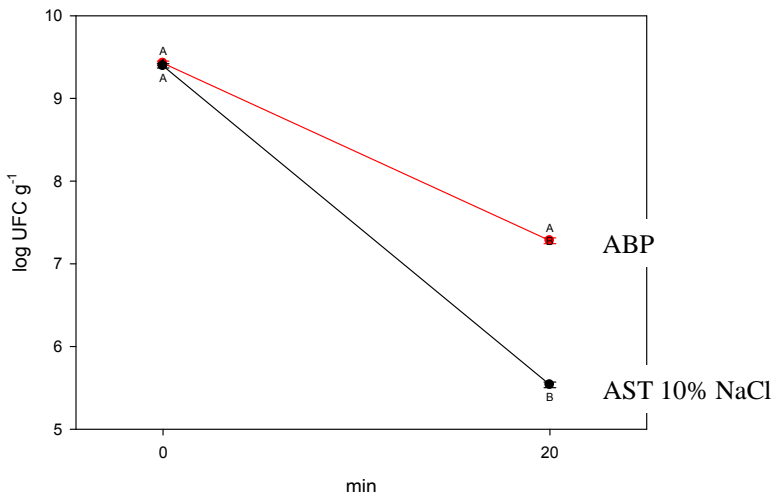


Figura 25. Reducción de la población de *S. aureus* enterotoxigénico recién aislado de queso cotija, recuperado en ABP y AST 10% NaCl después de la inducción de estrés por tratamiento térmico a 55°C por 20 min.

Cuadro 31. Población (log UFC g⁻¹) de *S. aureus* enterotoxigénico recién aislado de queso cotija no estresado y sometido a estrés por tratamiento térmico a 55°C por 20 min, e inoculado en crema pastelera almacenada a 30°C.

Cepa	Tiempo (h)							
	0	2	4	7	10	15	20	24
NO estresada	¹ 3.1 (0.03)	3.3 (0.02) A*	4.4 (0.03)	5.7 (0.03)	6.9 (0.03)	7.7 (0.03)	8.4 (0.02)	9.1 (0.01)
Estresada	3.1 (0.03)	3.1 (0.02) B	3.9 (0.03)	5.0 (0.03)	6.4 (0.03)	7.1 (0.03)	8.2 (0.03)	9.1 (0.01)

¹ Media de resultados (desviación estándar)

* Valores en la misma columna no seguidos de la misma letra indican diferencia estadística significativa con P<0.05 (Tukey-Kramer).

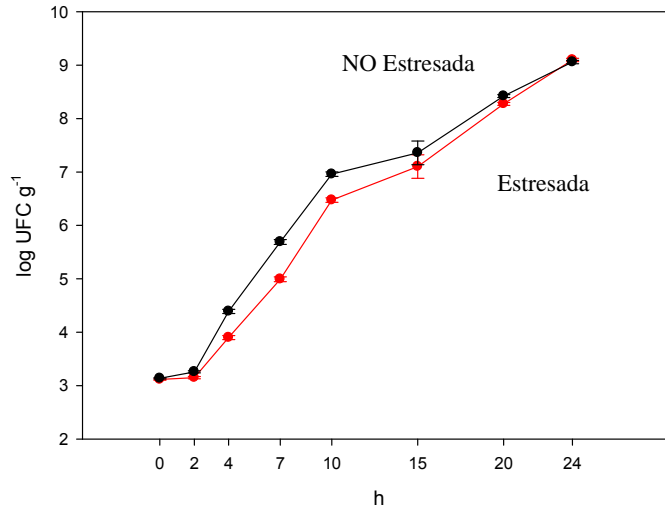


Figura 26. Comportamiento de *S. aureus* enterotoxigénico recién aislado de queso cotija no estresado y sometido a estrés por tratamiento térmico a 55°C por 20 min, e inoculado en crema pastelera almacenada a 30°C.

Para las velocidades de crecimiento y biomásas alcanzadas a las 10 h (Cuadros 32 y 33), se observa una diferencia significativa ($P < 0.05$) antes y después del tratamiento térmico. Aunque hay una disminución en las velocidades de las cepas estresadas con respecto a las no estresadas, a las 10 h todas las cepas llegan de hecho al mismo nivel de población, alrededor de 6 log UFC g⁻¹; cuando se inicia el desarrollo, la historia previa de la célula no afecta la velocidad de crecimiento o la cantidad o tasa de producción de enterotoxina (Baird-Parker, 2000).

Cuadro 32. Velocidad de crecimiento (log UFC h⁻¹) en cepas de *S. aureus* enterotoxigénicas procedentes de diferentes orígenes, no estresadas y estresadas por tratamiento térmico a 55°C, en crema pastelera almacenadas a 30°C.

Cepa	NO estresada	Estresada
ATCC 14458	[†] 0.4312 (0.0032) _A *	0.3594 (0.007) _B
Portador MG	0.3991 (0.0131) _A	0.2684 (0.007) _B
Cotija	0.3605 (0.0099) _A	0.2612 (0.003) _B

[†] Media de resultados (desviación estándar)

* Valores en la misma fila no seguidos de la misma letra indican diferencia estadística significativa con $P < 0.05$ (Tukey-Kramer).

Para las tres cepas estudiadas se aprecia una disminución significativa en la biomasa alcanzada a las 10 h entre las cepas estresadas con respecto a las no estresadas (Cuadro 33), pero todas alcanzan alrededor de 6 log UFC g⁻¹. No es de extrañar que entre las cepas no estresadas las de colección alcancen una mayor biomasa a las 10 h; la reducción en la biomasa alcanzada osciló entre 0.5 – 0.8 log UFC g⁻¹, siendo la cepa aislada de queso cotija estresada la que mostró la menor reducción.

Cuadro 33. Biomasa alcanzada (log UFC g⁻¹) a las 10 h en tres cepas de *S. aureus* enterotoxigénicas procedentes de diferentes orígenes, no estresadas y estresadas por tratamiento térmico 55°C, en crema pastelera almacenada a 30°C.

Cepa	NO estresada	Estresada
ATCC 14458	¹ 7.6 (0.057) _{A*}	6.9 (0.001) _B
Portador MG	6.6 (0.057) _A	5.9 (0.057) _B
Cotija	6.9 (0.057) _A	6.4 (0.011) _B

¹ Media de resultados (desviación estándar).

* Valores en la misma fila no seguidos de la misma letra indican diferencia estadística significativa con P<0.05 (Tukey-Kramer).

En el caso de la cepa ATCC 14458 enterotoxigénica, se detectó una mayor velocidad y biomasa a las 10 h entre cepas sin estresar (Cuadro 34), seguida por la cepa aislada de portador MG y la cepa aislada de queso cotija. Esta es una evidencia más de comportamientos distintos entre cepas con diferente origen con implicaciones directas en la inocuidad de los alimentos.

Cuadro 34. Velocidad de crecimiento y biomasa alcanzada a las 10 h en tres cepas de *S. aureus* enterotoxigénicas procedentes de diferentes orígenes sin estrés, almacenadas a 30°C.

Cepa	Velocidad (log UFC h ⁻¹)	Biomasa a las 10h (log UFC g ⁻¹)
ATCC 14458	¹ 0.4312 (0.0032) _{A*}	7.6 (0.001) _A
Portador MG	0.3991 (0.0013) _B	7.1 (0.057) _B
Cotija	0.3605 (0.0099) _C	6.9 (0.115) _B

¹ Media de resultados (desviación estándar).

* Valores en la misma columna no seguidos de la misma letra indican diferencia estadística significativa con P<0.05 (Tukey-Kramer).

Entre las cepas recién aisladas, de portador humano y de alimento, no encontramos diferencias significativas ($P > 0.05$) en las velocidad de desarrollo (Cuadro 35), lo que es congruente con la condición de daño que presentaban esas cepas en su fuente natural (Mead, *et al.*, 1989).

Cuadro 35. Velocidad de crecimiento y biomasa alcanzada a las 10 h en tres cepas de *S. aureus* enterotoxigénicas procedentes de diferentes orígenes estresadas por tratamiento térmico a 55°C, en crema pastelera, almacenadas a 30°C.

Cepa	Velocidad (log UFC h ⁻¹)	Biomasa a las 10h (log UFC g ⁻¹)
ATCC 14458	¹ 0.3594 (0.007) _{A*}	6.9 (0.057) _A
Portador MG	0.2684 (0.003) _B	5.9 (0.057) _C
Cotija	0.2612 (0.003) _B	6.4 (0.057) _B

¹ Media de resultados (desviación estándar).

* Valores en la misma columna no seguidos de la misma letra indican diferencia estadística significativa con $P < 0.05$ (Tukey-Kramer).

Está ampliamente demostrado que cuando la ciencia se aplica adecuadamente en los enfoques y programas de vigilancia y control sanitario de los alimentos, se obtienen logros tangibles en la protección de su inocuidad. La situación contraria es absolutamente válida, si no se procura esa aplicación. Así mismo, si no se genera el conocimiento científico, la inocuidad de los alimentos queda fuera de control y determinada por el azar. A la postre, la consecuencia es un incremento en la incidencia de enfermedades asociadas al consumo de los alimentos (Fernández-Escartín, 2000).

7. CONCLUSIONES

- * La incidencia de cepas de *S. aureus* en el exudado nasal de individuos asintomáticos fue de 10%, entre los cuáles el 85% resultaron enterotoxigénicas. Entre las procedentes de alimentos la cifra fue de 57%
- * La crema pastelera constituye un excelente medio para el crecimiento del *S. aureus*; su comportamiento está influenciado considerablemente por la temperatura.
- * En la crema pastelera recién preparada (pH 6.71, A_a 0.998) *S. aureus* desarrolla activamente, con mayor intensidad a 35 que a 22°C.
- * Para la mezcla de tres cepas de colección de *S. aureus* no enterotoxigénicas el periodo de adaptación fue más corto a 35 que a 22°C. A partir de inóculos de 1.7 y 2.3 log UFC g⁻¹ se alcanzan poblaciones de 3.0 y 5.3 log a las 7 h y de 5.5 - 6.2 y 9 - 9.1 log a las 24 h.
- * No existe diferencia estadística significativa entre la población del germen con el inóculo en forma de exudado nasal, fresco o después de almacenarlo 18 h en refrigeración.
- * El desarrollo es mayor en el caso de la cepa procedente del exudado de un portador (AF) respecto a la mezcla de colección no enterotoxigénica. La consecuencia directa de estos comportamientos en términos de riesgo a la salud consecutivos a la contaminación de la crema por un portador, está expresada por tales diferencias: si el estudio se hubiera efectuado con cepas de colección, se habría subestimado el nivel de tal riesgo.
- * En el estudio para determinar la fase lag, la mezcla de colección no enterotoxigénica, no mostró evidencias significativas de multiplicación a 22°C en 120 min mientras que la cepa del exudado de portador MG mostró una fase lag de 1.5 h. A 35°C con la cepa del exudado de este portador se observa una reducción significativa de 0.4 log a los 20 min, pero a partir de los 40 min se inicia el crecimiento franco del microorganismo.

* Por la forma particular en que se utilizó la crema pastelera para este experimento, no se generan muchos espacios para observar un posible efecto antagónico de la flora asociada sobre el *S. aureus*. Incluso, puede apreciarse que esas bacterias sobrevivientes se encontraban en una condición de estrés que requirieron hasta cerca de 5 h para entrar a la fase exponencial.

* Las velocidades de crecimiento ($\log \text{UFC h}^{-1}$) de las cepas enterotoxigénicas (ATCC 14458, y recuperadas del portador MG, queso cotija y queso panela) en crema pastelera almacenada a 30°C, no muestran entre sí diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$). Después de 10 h todas mostraron poblaciones mayores a $6 \log \text{UFC g}^{-1}$, lo que destaca que en este periodo sería posible la síntesis de suficiente enterotoxina para provocar una respuesta clínica en el consumidor.

* El empleo de DPS para preparar el inóculo del microorganismo en la crema pastelera no es recomendable debido a su utilización como nutriente, provocando un sesgo en la interpretación de la respuesta.

* En crema pastelera diluida al 0.4% el germen mantiene su viabilidad, pero no se observa desarrollo. El empleo de esta concentración para inducir la condición de estrés por efecto de la restricción de nutrientes no es tan cuantificable ni controlable como la inducida por tratamiento térmico.

* En los términos en que ha sido diseñado este estudio no se observa alguna diferencia en el comportamiento de células no estresadas con respecto a las estresadas por efecto de la restricción de nutrientes como factor en la inducción del estrés.

* Independientemente del origen de la cepa, entre 20 y 25% de células resultó dañada subletalmente con un tratamiento térmico de $55 \pm 0.5^\circ\text{C}$ por 20 min.

* La sensibilidad al estrés por tratamiento térmico fue similar entre las cepas independientemente de su origen, siendo común un alargamiento de la fase lag de hasta 2 h.

* En la dinámica de desarrollo en crema pastelera de la cepa ATCC 14458 enterotoxigénica, se observa un ligero retraso inicial en la cepa estresada que corresponde a la fase de recuperación.

* En todas las cepas las velocidades de crecimiento y biomasa alcanzadas a las 10 h, se observa una diferencia significativa ($P < 0.05$) antes y después del tratamiento térmico.

* En el caso de la cepa ATCC 14458 enterotoxigénica, se detectó una mayor velocidad y biomasa a las 10 h entre cepas sin estresar, seguida por la cepa aislada de portador MG y la cepa aislada de queso cotija. Esta es una evidencia más de comportamientos distintos entre cepas con diferente origen con implicaciones directas en la inocuidad de los alimentos.

* La velocidad de desarrollo de la cepa de colección estresada por tratamiento térmico resultó mayor que la de las cepas aisladas tanto de alimentos como de portadores humanos, lo que subraya la pertinencia de llevar a cabo investigaciones con éstas últimas

* La acción prioritaria de prevención radica en evitar la contaminación de los alimentos; al respecto la fuente humana del germen tiene un significado crucial. Una buena educación y entrenamiento de los manejadores de alimentos resulta imperativa.

* A pesar de los avances en el conocimiento del comportamiento de *S. aureus* y sus enterotoxinas en los alimentos, y de la instrumentación de prácticas sanitarias de operación, la intoxicación estafilocócica continúa teniendo un impacto significativo en la salud pública de muchos países.

* La evaluación del comportamiento de *S. aureus* en los alimentos puede ser más objetiva si se recurre a cepas obtenidas de la fuente de contaminación original, en sustitución de cepas de colección.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Angelotti, R., Foter, M.J. and Lewis, K.H. 1961. Time-temperature effects on salmonellae and staphylococci in foods. III. Thermal death time studies. *Appl. Microbiol.* 9: 308-315.
- Allwood, M.C. and Russell, A.D. 1967. Mechanism of thermal injury in *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* 15: 1266-1269.
- Allwood, M.C. and Russell, A.D. 1969. Thermal induced changes in the physical properties of *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Bacteriol.* 32: 68-78.
- Altenbern, R.A. 1975. Derivation of high enterotoxin B producing mutants of *Staphylococcus aureus* from the parent strains. *Appl. Microbiol.* 30: 271-275.
- Anderson, J.E., Beelman, R.B. and Doores, S. 1997. Enhanced production of thermal stability of staphylococcal enterotoxin A in the presence of chitin. *J. Food Prot.* 60: 1351-1357.
- Archer, D.L. 1996. Preservation microbiology and safety: evidence that stress enhances virulence and triggers adaptive mutations. *Trends Food Sci. Technol.* 7: 91-95.
- ATCC. 1989. American Type Culture Collection. Catalogue of bacteria & bacteriophages. 202-205. 17th edition. Rockville, Maryland. USA.
- BAM. 1995. Bacteriological Analytical Manual. 8th ed. Division Microbiology, Center for food Safety and Applied Nutrition, U.S. Food and Drug Administration, Assoc. Off. Anal Chem., Arlington, V.A.
- Baird-Parker, T.C. 2000. *Staphylococcus aureus*. In: "The Microbiological safety and quality of food". 1317-1335. Lund, B.M., Baird Parker, T.C. and Gould, G.W. (Eds). Aspen Publ. Inc. Maryland, USA.
- Baranyi, J. and Pin, C. 2001. A parallel study on modelling bacterial growth and survival curves. *J. Theor. Biol.* 210: 327-336.
- Baranyi, J. and Roberts, T.A. 1994. A dynamic approach to predicting growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* 23: 277-294.
- Baranyi, J. and Roberts, T.A. 2004. Predictive microbiology –Quantitative Microbial Ecology Culture-. March 2004: 1-5.
- Bautista, L., Gaya, P., Medina, M. and Nuñez, M. 1988. A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk staphylococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 566-569.
- Beckman, K.B. and Ames, B.N. 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 78: 547-581.
- Bergdoll, M.S. 1989. *Staphylococcus aureus*. In: Foodborne Bacterial Pathogens. 463-523. Marcel Dekker, Inc. USA.

- Bluhm, L. and Ordal, Z.J. 1969. Effect of sublethal heat on the metabolic activity of *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 97: 140-150.
- Bolton, K.J., Dodd, C.E.R., Mead, C.G. and Waites, W.M. 1988. Chlorine resistance of strains of *Staphylococcus aureus* isolated from poultry-processing plants. Appl. Microbiol. 6: 31-34.
- Breckinridge, J.C. and Bergdoll, M.S. 1971. Outbreak of foodborne gastroenteritis due to coagulase-negative enterotoxin producing *Staphylococcus*. New Engl. J. Med. 284: 541-543.
- Brett, M.M. 1998. Kits for detection of some bacterial food poisoning toxins: problems, pitfalls and benefits. J. Appl. Microbiol. Sym. Suppl. 84: 110S-118S.
- Bryan, F.L. 1976. *Staphylococcus aureus*: In: "Food Microbiology: Public Health and Spoilage Aspects". 12-128. DeFiguereido, M.P. y Splittstoesser, D.D. Ed. AVI Publ. Co. USA.
- Buchanan, R.L. and Edelson, S.G. 1999. pH-Dependent stationary-phase acid resistance response of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence of various acidulants. J. Food Prot. 62: 211-218.
- Buchanan, R.L., Stahl, H.G. and Whiting, R.C. 1989. Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride, and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 52: 844-851.
- Bunning, B.K., Crawford, R.G., Tierney, J.T. and Peeler, J.T. 1990. Tolerance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium after sublethal heat shock. Appl. Environ. Microbiol. 56: 3216-3219.
- Burnett, A.B., Iturriaga, M.H., Escartín, E.F., Pettigrew, C.A. and Beuchat, L.R. 2004. Influence of variations in methodology of populations of *Listeria monocytogenes* recovered from lettuce treated with sanitizers. J. Food Prot. 67: 742-750.
- Castillo, A., Lucia, L.M., Kemp, G.K. and Acuff, G.R. 1999. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium on beef carcasses surfaces using acidified sodium chlorite. J. Food Prot. 62: 580-584
- CDC. 1996. Center for Disease Control. Surveillance for foodborne disease outbreaks. United States, 1988-1992. Morb. Mortal. Weekly Rep. Pub. Health Serv., Atlanta. GA. 45/No SS5.
- ComBase. 2007a. A combined database for predictive microbiology. Disponible en: <http://www.combase.cc>
- ComBase. 2007b. A combined database for predictive microbiology. Disponible en: <http://combase.arserrc.gov/ResultDetails.aspx?Q=9412> Accesado: 28 de Noviembre de 2007.

- Costerton, J.W., Stewart, P.S. and Greenberg, E.P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of bacterial infections. *Science*. 284: 1318-1322.
- Crisley, F.D., Angelotti, R. and Forter, M.J. 1964. Multiplication of *Staphylococcus aureus* in syntetic cream fillings and pies. *Pub. Health Rep.* 79: 369-376.
- Dack, G.M. 1956. Food poisoning. 3th ed. Univ. Chicago Press. USA.
- Dahiya, R.S. and Speck, M.L. 1968. Hydrogen peroxide formation by Lactobacilli and its effect on *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.* 53: 1568-1572.
- Daly, C., LaChance, M., Sandine, W.E. and Elliker, R.P. 1973. Control of *Staphylococcus aureus* in sausage by starter cultures and chemical acidulation. *J. Food Sci.* 38: 426-430.
- Díaz, C.A. y Pérez, J.A., 1985. Tesis de Licenciatura. "Dinámica de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico en relleno de pastel". Universidad de Guadalajara. México.
- El-Dairouty, K.R. 1988. Staphylococcal intoxication traced to non-fat dried milk. *J. Food Protect.* 52: 901-902.
- Elfwing, A., Le Marck, Y., Baranyi, J. and Ballagi, A. 2004. Observing the growth and division of large number of individual bacteria using image análisis. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 675-678.
- European Comission Health & Consumer protection. 2003. Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on Staphylococcal enterotoxins in milk products, particulary cheeses. Management of scientific committees; scientific cooperation and networks.
- Fernández-Escartín, E. 1998. Microbiología Sanitaria Agua y Alimentos Vol. I. 147-156. Ed. Universidad de Guadalajara.
- Fernández-Escartín, E. 2000. Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. Ed. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Fernández-Escartín, E., Saldaña-Lozano, J. y Montiel-Falcón, A. 1998. Intoxicación por enterotoxina de *Staphylococcus aureus* asociado al consumo de pastel de moka. *Microbiología y epidemiología. Rev. Lat-Amer. Microbiol.* 40: 25-31.
- Flowers, R.S. and Martin, S.E. 1980. Ribosome assembly during recovery of heat-injured *Staphylococcus aureus* cells. *J. Bacteriol.* 141: 645-651.
- Freed, R.C., Everson, M.L., Reiser, R.F. and Bergdoll, M.S. 1982. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 1349-1355.
- Friedman, M.E. and Howard, M. 1971. Induction of mutants of *Staphylococcus aureus* 100 with increased ability to produce enterotoxin A. *J. Bacteriol.* 106: 289-291.

- Fujikawa, H. and Igarashi, H. 1988. Rapid latex agglutination test for detection of staphylococcal enterotoxins A to E that uses high-density latex particles. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2345-2348.
- Gahan, C.G.M. and Hill, C. 2003. Relationship between stress adaptation and virulence in foodborne pathogenic bacteria. In: *Microbial Stress Adaptation and Food Safety*. 213-245. Yousef, A.E. and Kuneja, V.K. (Eds.). CRC Press, USA.
- Garcia, M.L., Moreno, B. and Bergdoll, M.S. 1980. Characterization of staphylococci isolated from mastitic cows in Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 548-553.
- Genigeorgis, C., Foda, M.S. Mantis, A. and Sadler, W.W. 1971a. Effect of sodium chloride and pH on enterotoxin C production. *Appl. Microbiol.* 21: 862-866.
- Genigeorgis, C., Savoukidis, M. and Martin, S. 1971b. Initiation of staphylococcal growth in processed meat environments. *Appl. Microbiol.* 21: 940-942.
- Gomez-Lucía, E., Goyache, J., Orden, J.A., Blanco, J.L., Ruiz-santa-Quiteria, J.A., Domínguez, L. and Suárez, G. 1989. Production of enterotoxin A by supposedly nonenterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1447-1451.
- Graves, R.R. and Frazier, W.C. 1963. Food microorganism influencing the growth of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* 11: 513-516.
- Haines, W.C. and Harmon, L.G. 1973. Effect of selected lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus* and production of enterotoxin. *Appl. Microbiol.* 25: 436-441.
- Hallander, H.O., Laurell, G. and Dornbusch, K. 1969. Determination of methicilin-resistance of *Staphylococcus aureus*. Heterogeneity and its influence on the disc diffusion method. *Scand. J. Infec. Dis.* 1: 169 - 174.
- Henning, C., Hillborgh, U., Lindvall, K., Marqvardsen, O., Sellers, J. and Wahlin, S. 1979. Comparison of *Staphylococcus aureus* carriage and skin infection rates in hospital and office employees. *J. Hyg. Camb.* 83: 437-444.
- Hurst, A. 1977. Bacterial injury: a review. *Can. J. Microb.* 23: 935-944.
- Iandolo, J.J., and Ordal, J. 1966. Repair of thermal injury of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 91: 134-142.
- Iandolo, J.J., Clark, C.W., Bluhm, L. and Ordal, J. 1965. Repression of *Staphylococcus aureus* in associative culture. *Appl. Microbiol.* 13: 646-649.
- ICMSF. 1996. International Commission on Microbiological Specifications for Food. *Microorganisms in Foods. 5. Microbiological Specifications of Food Pathogens*. Blackie Academic & Professional. UK.
- ISI, 2007. Web of Science. Disponible en: http://www.uv.es/infobib/guias/guia_wos-sci.html

- Jablonski, L.M. and Bohach, G.A. 2001. *Staphylococcus aureus*. In: Food Microbiology. 411- 434. Fundamentals and frontiers. 2a ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Jay, J.M. 1978. Staphylococcal gastroenteritis. In: Modern Food Microbiology. 441-459. 2th ed. Van Nostrand Reinhold Company, New York, N.Y.
- Johnson, E.A. 2003. Microbial adaptation and survival in foods: In : Microbial Stress Adaptation and Food Safety. 75-103. Yousef, A.E. and Kuneja, V.K. (Eds.). CRC Press, USA.
- Joklik, W.K., Willett, H.R., Amos, D.B. and Wilfert, C.M. 1998. *Staphylococcus*. En: Zinzer Microbiología. 554-575. 20^a ed. Ed. Médica Panamericana.
- Kao, C.T. and Frazier, W.C. 1966. Effect of lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus*. Appl. Microbiol. 14: 251-255.
- Kloos, W.E. and Musselwhite, M.S. 1975. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria an human skin. Appl. Micobiol. 30: 381-395.
- Knøbloch, J.K.M., Bartscht, K., Sabottke, H., Rohde, H.H. and Mack, D. 2001. Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, and activator of the sigB operon: differential activation mechanism due to ethanol and salt stress. J. Bacteriol. 183: 2624-2633.
- Knøchel, S. and Gould, G. 1995. Preservation microbiology and safety: quo vadis? Trends Food Sci. Technol. 6: 127-131.
- Koneman, E.W. 1983. Cocos gram positivos. En: Diagnóstico microbiológico. 291–314. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Lachica, R.V.F. 1984. Egg yolk-free Baird-Parker medium for the accelerated enumeration of foodborne *Staphylococcus aureus*. Appl. Environ. Microbiol. 48: 870-871.
- Lachica, R.V.F., Genigeorgis, C. and Hoerprich, P.D. 1971. Metachromatic agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. Appl. Microbiol. 21: 585-587.
- Lachica, R.V.F., Hoerprich, P.D. and Franti, C.E. 1972. Convenient assay for staphylococcal nuclease by the metachromatic well-agar-diffusion technique. Appl. Microbiol. 24: 920-923.
- Lancette, G.A. and Bennett, R.W. 2001. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal enterotoxins. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 387-403. Fourth Edition. USA.
- Lee, R.Y., Silverman, G.J. and Munsey, D.T. 1981. Growth and enterotoxin A production by *Staphylococcus aureus* in precooked bacon in the intermediate moisture range. J. Food Sci. 46: 1687-1692.

- Lewis, K. 2000. Programmed cell death in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64: 503-514.
- Lou, Y. and Yousef, A.E. 1997. Resistance of *Listeria monocytogenes* to heat after adaptation to environment stress. *J. Food Prot.* 59: 465-471
- Mackey, B.M., Boogard, E., Hayes, C.M. and Baranyi, J. 1994. Recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes*. *Internat. J. Food Microbiol.* 22: 227-237.
- Markus, Z.H. and Silverman, G.J. 1969. Enterotoxin B synthesis by replicating and nonreplicating cells of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 97: 506-512.
- Markus, Z.H. and Silverman, G.J. 1970. Factors affecting the secretion of staphylococcal enterotoxin A. *J. Appl. Microbiol.* 20: 492-496.
- Martin, S.E. and Myers, E.R. 1994. *Staphylococcus aureus*. In: *Foodborne disease handbook. Diseases caused by bacteria.* 345-394. Hui, Y.H., Gorham, J.R., Murrell, K.D. and Cliver, D.O. Marcel Dekker, Inc. USA.
- Martin, S.E., Flowers, R.S. and Ordal, Z.J. 1976. Catalase: Its effect on microbial enumeration. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 731-734.
- Mattick, K.L., Jørgensen F., Legan, J.D., Lappin-Scott, H.M. and Humphrey, T.J. 2000. Habituation of *Salmonella* spp. at reduced water activity and its effect on heat tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4921-4925.
- McLean, R.A., Lily, H.D. and Alford, J.A. 1968. Effects of meat curing salts and temperature on production of staphylococcal enterotoxin B. *J. Bacteriol.* 95: 1207-1211.
- Mead, G.C., Norris, A.P. and Bratchell, N. 1989. Differentiation of *Staphylococcus aureus* from freshly slaughtered poultry and strains endemic to processing plants by biochemical and physiological test. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 153-159.
- Mead, P.S., Slutsker, L. and Vietz, V. 1998. Food related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 607-625.
- Meza, J.C. 1999. Preservación de la inocuidad microbiana del requesón mediante la incorporación de bacterias lácticas seleccionadas. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. México.
- Miller, B.A., Reiser, R.F. and Bergdoll, M.S. 1978. Detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, D, and E in foods by radioimmunoassay, using staphylococcal cells containing protein A as immunoadsorbent. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 421-426
- Miller, L.L. and Ordal, Z.J. 1972. Thermal injury and recovery of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol.* 24: 878-884.

- Miller, R.D. and Fung, D.Y.C. 1973. Amino acid requirements for the production of enterotoxin B by *Staphylococcus aureus* S-6 in a chemically defined medium. *Appl. Microbiol.* 25: 800-806.
- Minor, T. 1976a. Taxonomy and general description of the staphylococci. In *Staphylococci and their Significance in Foods*. 13-26. Elsevier Scientific Publishing Company. USA.
- Minor, T. 1976b. Some historical aspects of Staphylococcal infections, intoxications, and classification. In: *Staphylococci and their Significance in Foods*. 1-12. Elsevier Scientific Publishing Company. USA.
- Minor, T. 1976c. Pathogenesis and mode of action of the staphylococcal enterotoxins. In: *Staphylococci and their Significance in Foods*. 159-174. Elsevier Scientific Publishing Company. USA.
- Minor, T. 1976d. Physiological characteristics suggested as indices of staphylococcal enterotoxigenicity. In: *Staphylococci and their Significance in Foods*. 53-77. Elsevier Scientific Publishing Company. USA.
- Minor, T. 1976e. Behavior of Staphylococci in dairy foods. In: *Staphylococci and their Significance in Foods*. 195-217. Elsevier Scientific Publishing Company. USA.
- Minor, T. and Marth, E.H. 1970. Growth of *Staphylococcus aureus* in acidified pasteurized milk. *J. Milk Food Technol.* 33: 516-520.
- Morse, S.A. and Baldwin, J.N. 1971. Regulation of staphylococcal enterotoxin B: effect of thiamine starvation. *Appl. Microbiol.* 22: 242-249.
- Morton, H. E. and Cohn, J. 1972. Coagulase and deoxyribonuclease activities of Staphylococci isolated from clinical sources. *Appl. Microbiol.* 23: 725-733.
- Noletto, A.L. and Bergdoll, M.S. 1980. Staphylococcal enterotoxin production in the presence of non-enterotoxigenic staphylococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 1167-1171.
- Noletto, A.L. and Bergdoll, M.S. 1982. Production of enterotoxin by *Staphylococcus aureus* strain that produces three identifiable enterotoxins. *J. Food Protect.* 45: 1096-1097.
- NOM-115-SSA-1994. Bienes y servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos.
- O'Driscoll, B., Gahan, C.G.M. and Hill, C. 1996. Adaptive acid tolerance in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid tolerance mutant which displays increased virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1693-1698.
- Pariza, M.W. and Iandolo, J.J. 1969. Coagulase production by injured *Staphylococcus aureus* MF-31 during recovery. *Appl. Microbiol.* 17: 836-838.

- Park, C.E., Akhtar, M. and Rayman, M.K. 1992. Non-specific reactions of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit (TECRA) for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2509-2512.
- Park, C.E., Akhtar, M. and Rayman, M.K. 1994. Evaluation of a commercial enzyme immunoassay kit (RIDASCREEN) for detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, D, and E in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 677-681.
- Peterson, A.C., Black, J.J. and Gunderson, M.F. 1962. Staphylococci in competition. I. Growth of naturally occurring mixed populations in precooked frozen foods during defrosting. *Appl. Microb.* 10: 16-22.
- Peterson, A.C., Black, J.J. and Gunderson, M.F. 1964. Staphylococci in competition. III. Influence of pH and salt on staphylococcal growth in mixed populations. *Appl. Microbiol.*, 12: 70-76.
- Peterson, C.N., Mandel, M.J. and Silhavy, T.J. 2005. *Escherichia coli* starvation diets: essential nutrients weigh and distinctly. *J. Bacteriol.* 187: 7549-7553.
- Plitman, M., Park, Y., Gomez, R. and Sinskey, A.J. 1973. Viability of *Staphylococcus aureus* in intermediate moisture meats. *J. Food Science.* 38: 1004-1008.
- Rachid, S., Ohlsen, K., Wallner, J., Hacker, M. and Ziebuhr, W. 2000. Alternative transcription factor σ^B is involved in regulation of biofilm expression in a *Staphylococcus aureus* mucosal isolate. *J. Bacteriol.* 182: 6824-6826.
- Raj, H.D. and Bergdoll, M.S. 1969. Effect of enterotoxin B on human volunteers. *J. Bacteriol.* 98: 833-834.
- Ravishankar, S. and Juneja, V.K. 2003. Adaptation or resistance response of microorganisms to stresses in the food processing environment. In: *Microbial Stress Adaptation and Food Safety*. 105-158. Yousef, A.E. and Kuneja, V.K. (Eds.). CRC Press, USA.
- Rayman, M.K., Park, C.E., Philpott, J. and Dood, E.C.D. 1975. Reassessment of the coagulase and thermostable nuclease tests as means of identifying *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* 29: 451-454.
- Reyes, L., Mota, L., Costarrica, L. y Parrilla C. 1984. Determinación de la enterotoxigenicidad de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de quesos. *Lat. Amer. Microbiol.* 26: 277-283.
- Roberts, T.A., Pitt, J.I., Farkas, J. and Grau, F.H. Eds. 1998. *Microorganism in Foods*. 6: *Microbial Ecology of Food Commodities*. International Commission on the Microbiological specifications of foods. Blakie Academic & Professional, London.
- Rosenthal, L.J. and landolo, J.T. 1970. Thermally induced intracellular alteration of ribosomal ribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 103: 833-835.

- Ross, T. and McMeekin, T.A. 1994. Predictive microbiology. *Int. J. Food Microbiol.* 23: 241-264.
- Ryu, J.H. and Beuchat, L.R. 1999. Changes in heat tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 after exposure to acidic environments. *Food Microbiol.* 16: 317-324.
- Saldaña, J. 1991. Microbiología y epidemiología de la intoxicación alimentaria por *Staphylococcus aureus*. Tesis de Maestría. Universidad de Guadalajara. México.
- Samelis, J. and Sofos, J.N. 2003. Strategies to control stress-adapted pathogens. In: *Microbial stress adaptation and food safety*. 303-351. Yousef, A.E. and Kuneja, V.K. (Eds.). CRC Press, USA.
- Sandel, M.K., Wu, Y.-F.G. and McKillip, J.L. 2003. Detection and recovery of sublethally-injured enterotoxigenic *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.* 94: 90-94.
- Scheusner, D.L. and L.G. Harmon, 1973. Growth and enterotoxin production by various strains of *Staphylococcus aureus* in selected foods. *J. Food Sci.* 38: 474 – 476.
- Scott, L., McGee, P., Sheridan, J.J., Earley, B. and Leonard, N. 2006. A comparison of the survival in feces and water of *Escherichia coli* O157:H7 growth under laboratory conditions or obtained from cattle feces. *J. Food Protect.* 69: 6-11.
- Scott, V.N., Clavero, R.S. and Troller, J.A. 2001. Measurement of water activity (a_w), acidity and Brix. In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 649-657. 4th ed. Pouch Dowes, F. and Ito K. (Eds.). American Public Health Association, Washington, DC.
- Shebuski, J.R. Vilhelmsson, O. and Miller, K.J. 2000. Effects of grow at low water activity on the thermal tolerance of *Staphylococcus aureus*. *J. Food Protect.* 63: 1277-1289.
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2005. Epidemiología. Sistema Único de Información. 22(52):4. Secretaría de Salud. México.
- Sperber, W.H. and Tatini, S.R. 1975. Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* 29: 502-505.
- Surkiewicz, B.F. 1966. Bacteriological survey of the frozen prepared foods industry. *Appl. Microbiol.* 14: 21-26.
- Thompson, N.E., Razdan, M., Kuntsmann, G., Aschenbach, J.M., Evenson, M.L. and Bergdoll, M.S. 1986. Detection of staphylococcal enterotoxins by enzyme-linked immunosorbent assays and radioimmunoassays: Comparison of monoclonal and polyclonal antibody systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 885-890.
- Tibana, A., Rayman, K.M., Akhtar, M. and Szabo, R. 1987. Thermal stability of staphylococcal enterotoxin A, B, and C in a buffered system. *J. Food Protect.* 50: 239-242.

- Todd, E.C. and Pivnick, H. 1974. The significance of food poisoning in Canada. *Can. J. Pub. Health.* 65: 89-91.
- Tood, E.C. 1978. Foodborne diseases in six countries a comparison. *J. Food Protect.* 41: 559-565.
- Troller, J.A. 1972. Effect of water activity on enterotoxin A production and growth of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* 24: 440-443.
- Wei, H.-L. and Chiou, C.-S. 2002. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* from an outbreak associated with a food handler. *Epidemiol. Infect.* 128: 15-20.
- Whiteley, M. and Greenberg, E.P. 2001. Promoter specificity elements in *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing controlled genes. *J. of Bacteriol.* 183: 5529–5534.
- Witter, L.D. 1981. Thermal injury and recovery of selected microorganisms. *J. Dairy Sci.* 64: 174-177.
- Wong, H-C. and Liu S-H. 2006. Susceptibility of the heat-, acid-, and bile-adapted *Vibrio vulnificus* to lethal low-salinity stress. *J. Food Protect.* 69: 2924-2928.
- Yousef, A.E. and Courtney, P.D. 2003. Basics of stress adaptation and implications in new-generation foods. In : *Microbial Stress Adaptation and Food Safety*. 1-30. Yousef, A.E. and Kuneja, V.K. (Eds.). CRC Press, USA.