



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

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

MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

"INCIDENCIA Y FUENTES DE CONTAMINACIÓN DE *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* Y BACTERIAS INDICADORAS EN ZANAHORIA A LO LARGO DEL CULTIVO, ACONDICIONAMIENTO Y EMPACADO EN DOS EMPRESAS PRODUCTORAS"

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

I.A.I. DULCE MARÍA RANGEL FAJARDO

DIRECTOR:

DR. EDUARDO FERNÁNDEZ ESCARTÍN

SINODALES

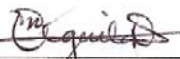
Dr. Eduardo Fernández Escartín
Presidente



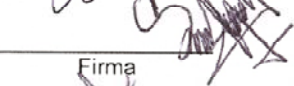


Dr. Martínez Peniche Ramón Alvar
Secretario

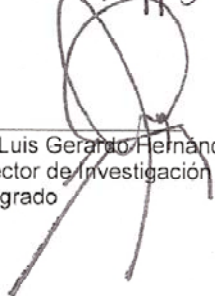
Dra. Sofía Arvizu Medrano
Vocal

Dr. Javier Castro Rosas
Suplente

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga
Suplente


Q.B. Magali E. Aguilar Ortiz
Director de la Facultad


Firma

Firma

Firma

Firma

Firma


Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y
Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre, 2009
México

RESUMEN

El control de la inocuidad de los productos agrícolas durante su cultivo, acondicionamiento y empaqueo se apoya primariamente en las prácticas sanitarias aplicadas en cada etapa. Comúnmente la comprobación del cumplimiento de estas prácticas se realiza por medio de la observación y se verifica mediante estudios de laboratorio. El objetivo central de este trabajo fue detectar peligros microbianos durante el cultivo, acondicionamiento y empaque de zanahoria en dos empresas y evaluar la eficacia de tratamientos químicos para la inactivación de *Salmonella* en zanahoria. Durante 12 meses se colectaron 1427 muestras de zanahoria, agua, tierra y superficies de 2 empresas (“A” y “B”). Se registró la frecuencia de las violaciones a los lineamientos de sanidad. Se cuantificaron bacterias mesófilas aerobias (BMA), *E. coli* (EC), *Salmonella* y la presencia de *Listeria monocytogenes*. Los coliformes totales (CT) y fecales (CF) se cuantificaron en el agua. Los patógenos se determinaron cualitativamente por cultivo y por PCR, además *Salmonella* se cuantificó mediante número más probable (NMP). Soluciones de cloro (200 ppm), ácido peracético (80 ppm) y ácido tricloroisocianúrico (200 ppm) se expusieron por 1 y 5 minutos sobre cepas de *Salmonella* de colección y cepas aisladas en la empresa A. *Salmonella* y *E. coli* se determinaron en 1140 muestras (530 zanahoria, 198 agua, 33 tierra y 379 superficies). En ambas empresas se observó fauna silvestre y heces fecales dentro de las parcelas, reservorios de agua y área de empaque. En agua de riego no se detectó *Salmonella*; 81% mostró bajos niveles de EC desde <2.8 hasta 2.8 NMP/100 mL. Por el contrario, en el agua utilizada para arrastre y lavado del producto de la empresa “A”, se detectó *Salmonella* en 25% y *E. coli* en 71.4% con niveles de 2.8 - >3400 NMP. La zanahoria de la empresa A fue la más contaminada: EC se detectó en 58% y *Salmonella* en 9.4% con niveles de 1.4->1247 y <1.4-521 NMP/zanahoria, respectivamente. En esta empresa la incidencia de *Listeria monocytogenes* en zanahoria (N=84) y superficies (N=203) fue de 9.5 y 26%, respectivamente. En la zanahoria de la empresa B la incidencia de *Salmonella* y *E. coli* fue de 4 y 19% con niveles de <1.4-18.7 y 1.4-1247NMP/zanahoria, respectivamente. La empresa “B” mostró mejores condiciones sanitarias de trabajo. La exposición por 5 minutos a ácido tricloroisocianúrico fue más efectiva con reducción de 4 log de UFC *Salmonella*/zanahoria, independientemente del origen de la mezcla de cepas usadas como inóculo. Los resultados muestran una relación significativa entre los hallazgos microbiológicos y la frecuencia de las violaciones a las prácticas sanitarias de trabajo.

(Palabras clave: prácticas sanitarias, zanahoria, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*)

SUMMARY

Food safety for agricultural products during cultivation, selection and packing is primarily based on sanitary practices at each stage. Compliance with these practices is verified by onsite observations and laboratory studies. The main objective was to detect microbial hazards during cultivation, selection and packing of carrots in two companies and evaluate the effectiveness of chemical treatments in inactivating *Salmonella* on carrots. Carrot, water, soil and surface samples totaling 1427 samples were collected from 2 companies ("A" and "B"). A record of the frequency in the sanitary guidelines violations was recorded. An Aerobic plate count (APC) was done for subsamples and total coliforms (TC) and fecal coliforms (FC) were only quantified in water. *E. coli* (EC) was identified by most probable number (MPN) while *Salmonella* was identified by culture and PCR with positive samples quantified by MPN. *Listeria monocytogenes* was identified only by culture and PCR. Germicidal treatments for 1 and 5 minutes with sodium hypochlorite (200 ppm), peracetic acid (80 ppm) and trichloroisocyanuric acid (200 ppm) were carried out using laboratory strains and sample strains from company "A" of *Salmonella*. *Salmonella* and *E. coli* were determined in 1140 samples (530 Carrot, 198 water, 33 soil and 379 surfaces). Wildlife and feces was recorded within plots, water reservoirs and packaging areas from both companies. Irrigation water was negative for *Salmonella*; 81% showed low levels of EC from <2.8 to 2.8 MPN/100 mL, in contrast to drag and wash water in company A, where *Salmonella* was detected in 25% and *E. coli* in 71.4% of samples with levels from 2.8 to > 3400 MPN/100 mL. Carrots from company A were deemed most contaminated: EC was detected in 58% and *Salmonella* in 9.4% with levels of 1.4 to > 1247 and <1.4 to 521 MPN/carrot, respectively; with *L. monocytogenes* in carrots (N = 84) and surfaces (N = 203) it was 9.5 and 26% respectively. In the carrots from company B the incidence of *Salmonella* and *E. coli* was 4 and 19% with levels of <1.4 to 18.7 and 1.4 to 1247 NMP/carrot respectively. Company "B" showed the best levels for sanitary conditions in the work place. Exposure for 5 minutes with trichloroisocyanuric acid was most effective with a 4 log reduction of *Salmonella* CFU/carrot, irrespective of strains inoculated. The results show a high correlation between microbiological incidence and frequency in the violations of sanitary practices.

(Key Words: sanitary practices, carrot, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*).

DEDICATORIAS

A mi familia

Con cariño a ustedes que luchan por alcanzar una meta

*Deja de pensar en términos de limitaciones y
empieza a pensar en términos de posibilidades.*

(Ferry Josephson)

AGRADECIMIENTOS

- ♣ A CONACYT por el apoyo brindado para la realización de los estudios de posgrado.
- ♣ Al Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato (CESAVEG) por las facilidades brindadas.
- ♣ A las empresas que permitieron esta investigación, gracias por sus finas atenciones.
- ♣ Al Dr. Eduardo Fernández Escartín por su experiencia compartida, su apoyo y tiempo dedicado durante esta investigación.
- ♣ A los integrantes del comité de tesis por sus valiosos comentarios.
- ♣ A la Dra. Sofí por su transparencia, honestidad y disposición siempre dentro y fuera del trabajo.
- ♣ Al Dr. Peniche por su apoyo, disposición y por no dejar de ser Inge.
- ♣ A la maestra Josy, a Bety, la Sra Martha y Erika por su compañía y ayuda desinteresada.
- ♣ A todos los que compartieron mis momentos y mi trabajo en el laboratorio, por su apoyo: Brenda, Dan, Leova, Naye, Mayra, Viry, Yu, Gustavo, Julio, Chuy, Beliceño y Fernando.
- ♣ A Gregorio y Nicole por ser del equipo por siempre.
- ♣ A cada persona que participó de alguna forma en la investigación.

ÍNDICE

	Página
Resumen	i
Summary	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Índice general	v
Índice de Tablas	viii
Índice de Figuras	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
2.1 Microbiología de frutas y hortalizas	2
2.2. Riesgos a la salud asociados al consumo de frutas y verduras	2
2.3. Fuentes y mecanismos de contaminación	4
2.4. La zanahoria	7
2.5. Microorganismos indicadores	13
2.5.1. Bacterias mesófilas aerobias (BMA)	13
2.5.2. Coliformes totales (CT)	14
2.5.3. Coliformes fecales (CF)	15
2.5.4. <i>E. coli</i>	16
2.6. <i>Salmonella</i> spp.	17
2.6.1. Salmonelosis	17
2.7. <i>L. monocytogenes</i>	18
2.7.1. Listeriosis	19
2.8. Técnicas de detección de patógenos en alimentos	20
2.8.1. Detección por cultivo	20
2.8.2. Detección por PCR	21
2.9. Enfoques preventivos de la contaminación de frutas y verduras	21
2.9.1. Buenas Prácticas Sanitarias	21
2.9.2. Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control	22
2.9.3. Tratamientos descontaminantes	23

III. OBJETIVOS	26
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	27
4.1 Materiales	27
4.2. Descripción de las condiciones de cultivo y empaque de zanahoria en dos empresas, destacando violaciones a las prácticas sanitarias de trabajo	30
4.3. Determinación de la incidencia de microorganismos indicadores, <i>Salmonella</i> y <i>L. monocytogenes</i> en zanahorias y materiales asociados durante su cultivo y empaque.	34
4.3.1 Puntos de muestreo	34
4.3.2. Preparación de las muestras	35
4.3.3. Bacterias indicadoras	36
4.3.4. Determinación de <i>Salmonella</i> spp.	39
4.3.4.1. Evaluación de dos procedimientos para recuperar <i>Salmonella</i> a partir de zanahoria	41
4.3.4.2. Evaluación de una prueba de PCR para la detección de <i>Salmonella</i> en diferentes muestras	41
4.3.5. Determinación de <i>L. monocytogenes</i>	43
4.3.5.1. Evaluación de dos procedimientos para recuperar <i>L. monocytogenes</i> a partir de zanahoria.	45
4.3.5.2. PCR para la detección de <i>L. monocytogenes</i> en diferentes muestras	46
4.4. Identificación de las potenciales fuentes de contaminación	47
4.5. Evaluación de la eficacia de germicidas en la desinfección de zanahoria inoculada con <i>Salmonella</i> spp.	47
4.5.1. Efecto del ácido tricloroisocianúrico, hipoclorito de sodio y ácido peracético sobre <i>Salmonella</i> ssp. en zanahoria	47
4.6. Análisis estadísticos	49
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
5.1. Descripción de las condiciones de cultivo de la zanahoria y dos plantas empacadoras.	50

5.1.1. Campo	50
5.1.2. Empacadora	51
5.2. Determinación de <i>Salmonella</i> spp.	60
5.2.1. Evaluación de dos procedimientos para recuperar <i>Salmonella</i> a partir de zanahoria.	60
5.2.2. Detección por PCR de <i>Salmonella</i> en distintas muestras	61
5.3. Incidencia de <i>Salmonella</i> y microorganismos indicadores en zanahorias y materiales asociados a su cultivo y empaque.	64
5.3.1. Microbiología de los materiales muestreados durante el cultivo	65
5.3.2. Microbiología del agua de riego y de uso poscosecha.	68
5.3.3. Microbiología de los materiales muestreados en Empacadora	75
5.3.4. Incidencia de <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> según la época del año	93
5.4. Relación entre la frecuencia de la detección de <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i>	95
5.5. Comparación del método de cultivo y PCR para determinación de <i>Salmonella</i> .	97
5.6. Relación entre frecuencia de violaciones a las prácticas sanitarias de trabajo e incidencia de <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i>	99
5.7. Determinación de <i>L. monocytogenes</i>	102
5.7.1. Evaluación de la presencia de zanahoria durante el pre-enriquecimiento	103
5.7.2. Evaluación de una prueba de PCR para la detección de <i>L. monocytogenes</i> en zanahoria y torundas de muestreo en superficies	104
5.8. Incidencia de <i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i> en zanahoria y materiales asociados a su acondicionamiento y empaque.	108
5.9. Comparación del método de cultivo y PCR para determinación de <i>L. monocytogenes</i> .	113
5.10. Evaluación de la eficacia de germicidas aplicados en la desinfección de zanahoria íntegra inoculada con <i>Salmonella</i> spp.	114
VI. CONCLUSIONES	118
VII. BIBLIOGRAFÍA	120

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Patógenos implicados en brotes por consumo de frutas y verduras.	3
2	Valor nutricional de la zanahoria en 100 g de sustancia comestible.	8
3	Área cultivada y producción de zanahoria a nivel mundial.	10
4	Principales países productores de zanahoria en el mundo.	10
5	Área cultivada y producción de zanahoria en México.	11
6	Aspectos a los que se refieren las condiciones sanitarias de operación.	30
7	Hoja de registro de las violaciones a las prácticas sanitarias en campo y empaque.	31
8	Frecuencia de algunas violaciones a las prácticas sanitarias de trabajo en dos empresas productoras de zanahoria.	59
9	Recuperación de <i>Salmonella</i> por dos procedimientos, a) incubando la zanahoria 24 horas y b) retirando zanahoria después de frotar.	60
10	Número de muestras recuperadas de las empresas productoras de zanahoria.	64
11	<i>E. coli</i> en zanahoria en dos empresas durante las etapas de cultivo y cosecha.	66
12	<i>Salmonella</i> en zanahoria colectada en campo, empresa A y B.	66
13	<i>E. coli</i> (EC) y <i>Salmonella</i> en tierra superficial de cultivo, empresa A y B.	67
14	BMA en agua colectada en empacadora de empresa A y B.	71
15	Coliformes totales y fecales en agua colectada en las empresas A y B	72
16	Incidencia de <i>E. coli</i> en agua colectada en las en las empresas A (dos periodos) y B (un periodo).	73
17	Incidencia de <i>Salmonella</i> en agua de las empresas A y B.	74
18	Medias de BMA en zanahoria muestreada en 5 etapas del proceso en las empacadoras A y B.	76
19	Incidencia y contenido de <i>E. coli</i> en zanahoria colectada en las empresas A y B.	80
20	Incidencia de <i>Salmonella</i> en zanahoria colectada en las empresas A y B	81
21	BMA en superficies en empacadora de empresa A y B antes y después	83

del saneamiento.

22	BMA en manos y guantes en dos etapas, empresa A.	84
23	Incidencia de <i>E. coli</i> en superficies en las empresas A y B	85
24	Incidencia de <i>Salmonella</i> en superficies en las empresas A y B	86
25	Incidencia de <i>E. coli</i> en residuos de zanahoria	88
26	Incidencia de <i>Salmonella</i> en residuos de zanahoria	89
27	Incidencia de <i>E. coli</i> en diversos materiales muestreados en las empresas A y B	91
28	Incidencia de <i>Salmonella</i> en diversos materiales muestreados en las empresas A y B.	92
29	Frecuencia de detección de <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> según tipo de muestra y época del año.	94
30	Frecuencia de detección de <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> en diferentes materiales.	95
31	Detección de <i>Salmonella</i> por PCR y cultivo tradicional en los materiales analizados.	98
32	Porcentaje de <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> y violaciones a las prácticas sanitarias de trabajo en cultivo y empaque de las empresas A y B.	101
33	Recuperación de <i>L. monocytogenes</i> por dos procedimientos, a)incubando la zanahoria 48 horas y b) retirando zanahoria después de frotar.	104
34	Recuperación de <i>L. monocytogenes</i> por dos técnicas a partir de muestras de zanahoria y superficies (torundas) inoculadas artificialmente.	107
35	Incidencia de <i>L. monocytogenes</i> en diversos grupos de alimentos.	109
36	Positividad a <i>L. monocytogenes</i> por PCR y cultivo	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Fuentes y mecanismos de contaminación con microorganismos patógenos en frutas y verduras	4
2	Diagrama de flujo, empresa “A”.	32
3	Diagrama de flujo, empresa “B”.	33
4	Recuento de CT y CF por la técnica del NMP.	37
5	Recuento de <i>E. coli</i> por la técnica del NMP.	38
6	Detección y cuantificación de <i>Salmonella</i> spp. en zanahoria y materiales diversos.	40
7	. Detección de <i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i> en zanahoria y muestras diversas.	44
8	Reservorio de agua empresa A.	51
9	Descarga de zanahoria en empresa A (área cerrada) y B (área expuesta al medio ambiente).	52
10	Empresa A: desinfección de zanahoria por medio de inmersión en solución germicida a base de ácido tricloroisocianúrico.	53
11	Materia orgánica en bandas de preselección de zanahoria; etapa posterior al lavado.	53
12	Empresa A: Enfriamiento de zanahoria por medio de inmersión en agua a 2-4 °C en “hidroenfriador”.	54
13	Empresa B: Túnel de enfriamiento a base de amoníaco.	54
14	Empresa A: Empacado manual de zanahoria en volante	55
15	Área de lavado de manos con el material necesario. Empresa A.	56
16	Práctica inadecuada en empresa A.	57
17	Coladera del área de empaque en mal estado; inadecuado manejo de la zanahoria. Empresa A.	58
18	Sensibilidad de la técnica de PCR para la detección de <i>Salmonella</i> utilizando como medio de preenriquecimiento CL	62
19	Sensibilidad de la técnica de PCR para la detección de <i>Salmonella</i> utilizando como medio de preenriquecimiento CST.	62
20	Efecto del subcultivo en la detección de <i>Salmonella</i> por PCR en muestras altamente sucias.	63

21	Frecuencia de <i>Salmonella</i> con respecto a contenidos de <i>E. coli</i> en los materiales analizados.	96
22	Frecuencia de intervalos de clase de <i>Salmonella</i> en los distintos materiales analizados.	99
23	Frecuencia de <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> y frecuencia de violaciones a las prácticas sanitarias de trabajo en las dos empresas.	101
24	Especificidad de PCR empleando iniciadores LM para detección de <i>L. monocytogenes</i> :	105
25	Sensibilidad de la técnica PCR para la detección de <i>L. monocytogenes</i> utilizando como medio de preenriquecimiento caldo UVM y LEB en zanahoria y torundas de superficies inoculadas artificialmente.	107
26	Incidencia de <i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i> en zanahorias colectadas de las etapas del acondicionamiento y empaque.	110
27	Incidencia de <i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i> en superficies de maquinaria y equipo.	111
28	Distribución de especies de <i>Listeria</i> y <i>L. monocytogenes</i> en base a la hemólisis realizada.	113
29	Población de <i>Salmonella</i> reducida de zanahoria después de aplicar tratamientos germicidas	117

I. INTRODUCCIÓN

En diversos países se han reportado brotes de naturaleza microbiana por consumo de hortalizas crudas contaminadas con microorganismos patógenos. Como consecuencia, los gobiernos de cada país han establecido normas para su comercialización que exigen la ausencia de ciertos patógenos. Para cumplir estas normas se han implementado enfoques preventivos desde la obtención de los productos en el campo hasta su comercialización como son las Prácticas Sanitarias (PS). Estas prácticas se han derivado a partir del conocimiento del hábitat de los patógenos, su comportamiento en frutas y hortalizas y la eficiencia de tratamientos dirigidos a cancelar/ reducir su presencia o desarrollo.

Con la aplicación de estas prácticas la disminución de la probabilidad de contaminación de los productos puede alcanzarse.

La zanahoria tiene gran importancia en nuestro país. México es el decimo tercer productor de la hortaliza a nivel mundial (SIAP, 2008) y el segundo exportador a Estados Unidos y Canadá; además de ser la tercer verdura mas consumida en México y la quinta en Estados Unidos.

Como todos los productos que se exportan, la zanahoria tiene que cumplir con los estándares de comercialización para lo cual es necesario contar con información acerca de la microbiología del producto y del control de los peligros microbianos durante todas las etapas de producción; sin embargo, esta información es escasa y por lo tanto se tiene que generar.

El objetivo de este trabajo consistió en detectar peligros microbianos durante el cultivo, acondicionamiento y empaque de zanahoria en dos empresas establecidas en el Estado de Guanajuato. Los propietarios de estas empresas participan en el subprograma de Inocuidad de Alimentos, del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y calidad Agroalimentaria (SENASICA) operado por los Comités Estatales de Sanidad Vegetal (CESAVE).

II. ANTECEDENTES

2.1 Microbiología de frutas y hortalizas

Las hortalizas se encuentran expuestas a contaminación por microorganismos patógenos desde el cultivo hasta la comercialización. Normalmente estos productos están contaminados en la superficie externa, de donde es posible aislar una diversidad de microorganismos comunes en la tierra, que en ocasiones son patógenos lo que implica un riesgo para la inocuidad del alimento. Su presencia depende en gran medida de factores como abundancia y tipo de nutrientes, pH, Aw, potencial de oxidación-reducción, interacciones microbianas, la presencia de rizósfera y de sustancias inhibidoras o de barreras naturales como la cáscara (Beuchat, 1996), que confieren protección a las frutas o verduras (Mountney y Wilbur, 1971; Islam *et al.* 2004).

En el campo, la fuente principal de contaminación con microorganismos patógenos es la materia fecal humana y animal a través de la tierra de los cultivos, el agua de riego, animales domésticos, estiércol utilizado como fertilizante o los propios trabajadores. Los microorganismos comúnmente encontrados en las verduras crudas son gram negativos y pertenecen al género *Pseudomonas* o a la familia *Enterobacteriaceae* (Lund, 1992). También están presentes corinebacterias y microorganismos esporulados (Madden, 1992). La concentración de bacterias varía entre 10^4 y 10^9 UFC/g, dependiendo de la estación del año y las fluctuaciones climáticas (Beuchat, 1996).

El desarrollo y sobrevivencia de bacterias patógenas en el campo están influenciados por la luz ultravioleta, las altas temperaturas ocasionalmente alcanzadas, el estado físico del suelo y la escasez de agua y nutrientes. Sin embargo, bajo condiciones propicias como en época de lluvia o temporada de riego, la sobrevivencia de microorganismos patógenos es factible, incluso hasta su desarrollo (Sundin y Jacobs, 1999).

2.2. Riesgos a la salud asociados al consumo de frutas y verduras

El consumo de frutas y verduras crudas lleva implícito el riesgo de enfermedad por agentes microbianos. Teóricamente cualquier fruto o verdura puede ser vehículo de bacterias, virus o parásitos patógenos al hombre.

En la producción, procesamiento y cadena de distribución, pueden encontrarse diversas fuentes de contaminación de las frutas y verduras con microorganismos causantes de enfermedad. Estas incluyen el agua de irrigación, abono, agua de lavado, trabajadores y contacto con superficies contaminadas entre otros (Beuchat y Ryu, 1997; Tauxe *et al.* 1997).

En países desarrollados no parece ser un problema serio la presencia de microorganismos patógenos para el hombre en las frutas y verduras; sin embargo, cobra importancia en países que como el nuestro llegan a usar aguas residuales o aguas superficiales altamente contaminadas para el riego de cultivos o el lavado y enfriamiento de los productos hortofrutícolas.

Brotos de enfermedades asociadas a frutas y verduras, han ocurrido con frecuencia creciente a partir de 1990. En la Tabla 1 se ilustran algunos patógenos identificados en productos implicados en brotes. Si los reportes de brotes en nuestro país no son la regla, no se infiere una baja incidencia. Más bien resulta de deficientes servicios de epidemiología.

Tabla 1. Patógenos implicados en brotes por consumo de frutas y verduras en diversos países

Agente	Alimento implicado/sospechoso	Referencia
<i>Salmonella Poona</i>	Melón cantaloupe	CDC, 1991
<i>Escherichia coli</i>	Zanahorias	CDC, 1993
<i>Shigella flexneri</i>	Ensalada mixta con zanahoria baby	Dunn <i>et al.</i> 1995
<i>E. coli</i> O157:H7	Germinado de rábano	WHO, 1996
<i>E. coli</i> O157:H7	Germinado de rábano (mayor brote en el mundo: 5000 casos, 3 muertes).	FDA, 1998
<i>E. coli</i> O157:H7	Lechuga	CDR, 1997
<i>Campilobacter jejuni</i>	Lechuga	CDC, 1998
Hepatitis A	Cebollines	Smith, 1999
<i>Salmonella Poona</i>	Melón Cantaloupe	CDC, 2000
<i>Yersinia Pseudotuberculosis</i>	Zanahoria rallada	Jalava <i>et al.</i> 2006
<i>Salmonella</i>	Jitomates	CDC, 2006
<i>E. coli</i> O157:H7	Lechuga	FDA, 2007

Para minimizar la frecuencia de brotes es esencial implementar programas para prevenir o reducir la contaminación de productos crudos y remover patógenos previo al consumo (Guo *et al.*, 2001). El sustento para la selección apropiada de tales acciones consiste en identificar las fuentes de contaminación, y caracterizar la ecología de los patógenos en los términos en que son afectados por las prácticas agronómicas y de procesamiento (Beuchat, 1998; Brackett, 1999; Buchanan *et al.*, 1999).

2.3. Fuentes y mecanismos de contaminación

Las frutas y hortalizas pueden contaminarse a través de diversos mecanismos. La contaminación puede ocurrir durante el cultivo, cosecha, poscosecha, así como en el procesamiento, transporte, comercialización o en los sitios de preparación (como las cocinas) (Bryan, 1977; Beuchat, 1996).

La calidad microbiológica del alimento está influenciada por las condiciones que prevalecen durante el cultivo, la localización de la parte comestible de la planta (inmersa en el suelo, sobre la superficie, o en la parte aérea de la planta), y por las prácticas de trabajo que se aplican durante la cosecha. Las fuentes de contaminación son diversas (Figura 1) y pueden operar en forma simultánea o alternada (Beuchat y Ryu, 1997).

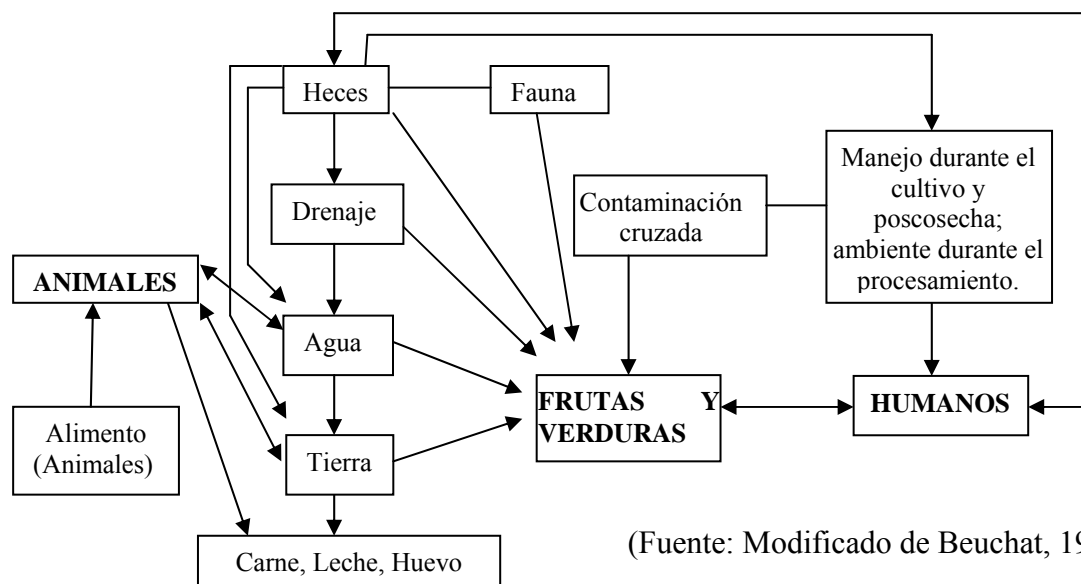


Figura 1. Fuentes y mecanismos de contaminación con microorganismos patógenos en frutas y verduras

Durante el cultivo son de interés el suelo, el agua de riego, la presencia de materia fecal humana o animal, el tipo de abono utilizado, el aire y los trabajadores que cultivan las

tierras. En la poscosecha destaca la maquinaria y equipo, los animales domésticos y silvestres, los trabajadores, el ambiente general y los vehículos (Beuchat, 1996).

a) Agua

Todas las fuentes de agua, naturales o no, son vehículos potenciales de microorganismos a los alimentos. Según sus antecedentes y procedencia puede aportar agentes patógenos o deterioradores. En ocasiones el agua entra en contacto directo con los alimentos, lo que facilita la contaminación. En estos casos, el agua como vehículo de gérmenes indeseables adquiere un significado trascendente.

La calidad del agua empleada para riego, especialmente la superficial, puede variar con el tiempo (estacionalmente o inclusive en cuestión de horas). De ahí la importancia de establecer programas de control en donde se incluya monitoreo constante para determinar su calidad microbiológica. Esta información permite a los productores aplicar medidas correctivas para prevenir la diseminación de la contaminación en el campo.

Otro aspecto importante de la transferencia de microorganismos es la técnica empleada en el riego de frutas y verduras. El riego por aspersión se considera un método que disemina con mayor facilidad la contaminación durante el cultivo (CFSAN, 1998).

El enjuague de frutas y verduras después de la cosecha remueve mucha de la tierra y suciedad adherida a la superficie. Sin embargo, también se reconoce que el agua empleada durante el enjuague puede ser una fuente de diseminación de la contaminación hacia otros frutos (ECSCF, 2002). Ejemplos claros de esta situación sucedieron en los brotes de salmonelosis registrados en 1990 y 1993 asociados al consumo de jitomate crudo, que dieron lugar por lo menos a 300 casos de enfermedades en cuatro entidades de los Estados Unidos (CDC, 1993; Wood *et al.*, 1991). Se descubrió que los jitomates en cuestión procedían de la misma empacadora en donde, al parecer, la fuente de contaminación fue el agua empleada en el enjuague.

Desafortunadamente en países como el nuestro, aunque con tendencia decreciente, se siguen llevando a cabo prácticas como el empleo de aguas negras para el riego de los cultivos y el uso de fertilizantes orgánicos no tratados, que indudablemente favorecen la presencia de microorganismos patógenos de origen intestinal sobre las verduras.

b) Tierra

La tierra es un importante reservorio de microorganismos. Generalmente en ella no se observa actividad microbiana a menos que el grado de humedad rebase un límite. El número de microorganismos varía desde unos miles hasta miles de millones por gramo según la naturaleza de los materiales que sobre ella se depositen. En general, es común encontrar esporas de bacterias y hongos. El tipo y número de microorganismos en la tierra depende de su composición, estación del año, clima, temperatura exposición al sol, nivel de profundidad, humedad y pH. Si las condiciones prevalentes permiten su actividad, entra en juego el proceso de competencia entre los grupos microbianos presentes (Fernández-Escartín, 2000).

En la actualidad diversos compuestos químicos como el estiércol y la composta de materiales orgánicos son utilizados como abono para las plantas. La calidad microbiológica de los fertilizantes orgánicos varía dependiendo de su origen y de la eficiencia de los tratamientos de descontaminación a los que son sometidos. Existe una demanda creciente en el mercado de las llamadas frutas y verduras orgánicas, que aumentará indudablemente el uso de abonos orgánicos y con ellos el riesgo de contaminación con microorganismos de origen fecal (ECSCF, 2002).

Para reducir el riesgo microbiano de frutas y verduras, se recomienda a los agricultores adoptar prácticas agrícolas sanitarias (PAS). Dichas practicas incluyen el manejo adecuado de los desechos orgánicos, que se utilizan como abono, la aplicación de tratamientos de descontaminación al estiércol y otros materiales orgánicos, así como evitar el contacto directo o indirecto del estiércol con productos que están próximos a ser cosechados (CFSAN, 1998).

c) Fauna

Cualquier animal que no es utilizado como alimento para el hombre forma parte de la llamada fauna nociva. Está constituida por artrópodos, principalmente insectos, roedores, aves, perros, gatos y otros animales también se incluyen en el grupo.

Su importancia sanitaria radica en el potencial que tienen para actuar como vehículos activos o pasivos de microorganismos patógenos y aportar materia extraña. La presencia de fauna nociva en un establecimiento de alimentos es incompatible con la

producción o almacenamiento de alimentos de buena calidad sanitaria (Fernández-Escartín, 2000)

d) El hombre

Si alguna en particular entre las fuentes de contaminación microbiana a los alimentos admite la distinción de máxima prioridad, es la humana. El hombre es un portador potencial de prácticamente todos los patógenos que pueden ser transmitidos por los alimentos. Asintomático o no, manejador de alimentos o consumidor, puede aportar microorganismos a partir de la piel, uñas, mucosa nasal y bucofaríngea, contenido intestinal, descargas bronco pulmonares, orina, cabellos y barba. Agréguese a esta lista su propia indumentaria.

También es una fuente de materia extraña que afecta la calidad comercial del alimento. La diseminación hacia los alimentos se realiza a partir de infecciones en la piel, aparato digestivo, respiratorio, urinario y otras localidades como la conjuntiva y el oído medio (Fernández-Escartín, 2000).

2.4. La zanahoria

La zanahoria es la tercer verdura más consumida en México y la quinta en Estados Unidos donde ha tenido un crecimiento de 26% en la última década y de 62% en las dos últimas décadas, llegando su consumo *percapita* a 10.2 libras por persona (DAAC, 1996).

2.4.1. Botánica

La zanahoria – *Daucus Carota* – es una *Dicotyledoneae* de la familia *Umbelliferae*. Es un planta bianual; en el primer año se forman las rosetas y las raíces, después de un periodo de letargo invernal se forma un tallo corto y las flores que son blancas y tiene un fruto diaquenio (Infoagro, 2008).

Las raíces son de forma y color variable. Tienen función almacenadora aunque también tienen raíces secundarias para la absorción. Las raíces que presentan mayor proporción de corteza exterior son las más aceptadas. Las raíces pueden ser cultivadas para usos comerciales en una temporada dependiendo de la variedad, en un ciclo de 60 a 90 días.

2.4.2. Composición

La zanahoria es una excelente fuente de vitaminas y minerales (Tabla 2), lo que la convierte en una de las hortalizas preferidas por los nutricionistas en cualquier dieta. Brinda grandes cantidades de hidratos de carbono comparada con otras hortalizas, lo que ayudará al organismo evitando el cansancio y regulando el metabolismo (Rosamel, 2007). Contiene beta-caroteno o pro-vitamina A que le brindan su color naranja, ambos son muy beneficiosos como fuente de vitamina A. Otras vitaminas incluyen la B3, folatos y E.

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

Agua(g)	88.6
Carbohidratos (g)	10.1
Lípidos (g)	0.2
Calorías (cal)	40
Vitamina A (U.I.)	2.000-12.000 según variedades
Vitamina B1 (mg)	0.13
Vitamina B2 (mg)	0.06
Vitamina B6 (mg)	0.19
Vitamina E (mg)	0.45
Ácido nicotínico (mg)	0.64
Potasio (mg)	0.1

(Fuente: Horfres, 2008)

También posee generosas cantidades de minerales como potasio, siendo en menor cantidad el aporte de yodo, calcio, magnesio y fósforo. Todos estos son elementales para un correcto crecimiento de huesos y dientes, así como generadores de impulso nervioso y reguladores de la actividad muscular (Horfres, 2008). La niacina o vitamina B3 ayudará al mantenimiento de la piel, el funcionamiento del sistema digestivo y nervioso, así como asimilación de energía de los alimentos (Infoagro, 2008).

2.4.3. Factores hortícolas

La zanahoria es una planta bastante rústica que tiene preferencia por los climas templados. La temperatura mínima de crecimiento es de 9 °C y las ideales entre 16 y 18 °C.

Soporta heladas hasta de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, y arriba de los $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ se provoca una aceleración en los procesos de envejecimiento. La humedad ideal es de 90 a 95% con una precipitación anual de entre 800 mm y 1,200 mm.

Los suelos preferidos por la zanahorias son los arcillosos - calcáreos, con pH de entre 5.8 y 7.0. Los suelos compactos generan raíces fibrosas y aumentan el riesgo de pudrición. La zanahoria es muy exigente en suelo, por lo que no conviene repetir el cultivo por 4 o 5 años en el mismo lote. Por lo general, es recomendable como cultivo precedente al tomate y la cebolla (Infoagro, 2008).

2.4.4. Cultivo

La siembra se hace por semilla en pilones y luego es trasplantada en el campo, o al voleo para uso forrajero. El uso de invernaderos o túneles es conveniente para obtener altos rendimientos y buena calidad. La plantación se desarrolla de 12 a 16 semanas dependiendo de la variedad (Infoagro, 2008).

Existen cientos de variedades de zanahorias, pero por lo general se clasifican comercialmente por tamaño y forma. Aunque recientemente se esta innovando en el color como un atributo nuevo y exótico del cultivo. Entre las labores culturales del cultivo de zanahoria sobresale la preparación del suelo, la cual debe incluir un subsoleo profundo. El riego es necesario en épocas secas y el deshierbe es esencial para obtener calidad y buenos rendimientos (Rosamel, 2007).

2.4.5. Manejo en Poscosecha

Antes del almacenamiento las zanahorias son generalmente lavadas y enfriadas con agua y cloro disuelto a 200 ppm y pH entre 6.5 y 7.5 antes de ser empacadas en cajones alineados de plástico. Sin embargo, se ha demostrado que si las zanahorias tienen que ser almacenadas por un período prolongado, su calidad es más alta y las pérdidas de post-cosecha son menores si son almacenadas sin lavar.

Las condiciones ideales de almacenamiento para la zanahoria son de $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 90% de humedad relativa (HR). Bajo estas condiciones, las zanahorias han sido almacenadas con éxito por más de siete meses con pérdidas mínimas (10 a 15%) debido a deshidratación y

podrición. A 1 °C y 98% de HR, las condiciones comunes en la mayoría de las bodegas, el máximo período de almacenamiento recomendado es de 5 meses.

2.4.6. Producción

El cultivo de la zanahoria ha experimentado un importante crecimiento en los últimos años, tanto en superficie, como en producción (Tabla 3). China es el mayor productor seguido por Rusia y Estados Unidos (Tabla 4). México ocupó, para el 2005, el 13° lugar en cuanto a producción a nivel mundial.

Tabla 3. Superficie cultivada y producción de zanahoria a nivel mundial (M: miles)

Zanahoria	Año				
	2001	2002	2003	2004	2005
Área Cultivada (Miles de hectáreas)	973.0	986.4	1,048.3	1,102.2	1,105.7
Producción (Miles de toneladas)	21,223.0	21,744.8	23,827.1	24,43.1	24,222.3

Fuente: FOSFAT, 2008.

Tabla 4. Principales países productores de zanahoria en el mundo

Clasificación	País	Producción año 2005 (Toneladas)
1	China	8 395 500
2	Federación de Rusia	1 730 000
3	Estados Unidos	1 601 790
4	Polonia	935 000
5	Ucrania	706 500
6	Reino Unido	677 144
7	Italia	641 558
8	Japón	630 000
9	Alemania	555 000
10	Países Bajos	430 000
11	Francia	417 800
12	Turquía	380 000
13	México	378 517

Fuente: FOSFAT, 2008.

La comercialización es bastante dinámica y el intercambio de zanahoria es intenso entre los países que pueden ser importadores y exportadores al mismo tiempo, como es el caso de Estados Unidos con México y Canadá. La zanahoria es admisible en Estados Unidos siempre que cumpla con las regulaciones del Servicio de Inspección Sanitaria de Animales y Plantas (APHIS) y de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) y en Europa con el Nivel Máximo de Residuos (MRL).

En México la zanahoria puede ser considerada en el plan estratégico de diversificación hortícola como una alternativa de flujo de efectivo dado su corto ciclo y alta rentabilidad. La producción de esta hortaliza en nuestro país muestra una ligera tendencia al incremento (Tabla 5).

Tabla 5. Área cultivada (miles de hectáreas) y producción de zanahoria en México (miles de toneladas)

Zanahorias	Año					
	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Área Cultivada (Miles de hectáreas)	14.9	15.6	13.2	15.4	14.1	14.2
Producción (Miles de toneladas)	355.9	370.7	338.9	385.5	378.5	358.9

Fuente: SIAP. 2008.

2.4.7. Microbiología de la zanahoria

En la zanahoria cruda entera, la carga microbiana de organismos mesófilos aerobios llega a ser hasta de 10^8 ufc/g y en la zanahoria cruda cortada entre 10^6 a 10^8 ufc/g (Abadias *et al.* 2008). Por ser una hortaliza que durante todo su cultivo está en contacto directo con la tierra y es regada con agua tratada, es de esperar que su carga microbiana sea alta. Es práctica corriente lavarlas en el campo o en empaque con agua con germicida que elimina significativamente la tierra; sin embargo, no deja de ser necesaria la aplicación de germicidas efectivos que eliminen la mayor cantidad de microorganismos, no confieran sabor a las concentraciones utilizadas y aseguren la inocuidad de la zanahoria.

Es imperativo que la separación de las unidades defectuosas se realice tan tempranamente como sea posible, como condición para prevenir la extensión del deterioro

en una partida de zanahorias, o la invasión por patógenos, incluida, desde luego, su internalización.

Parece existir una relación entre el grado de daño de los tejidos y la disponibilidad de espacio en la superficie que favorezca la colonización, con respecto a la magnitud del desarrollo microbiano en las zanahorias. El ingreso de patógenos es más expedito cuando el producto se encuentra dañado o ya colonizado por diversos microorganismos (Odumuru *et al.* 1997).

La preparación de jugo de zanahoria (con reconocido valor nutricional), tan popular en nuestro medio, constituye un problema particular. Si las zanahorias se encuentran contaminadas exteriormente por bacterias patógenas, estas aparecerán en el jugo extraído. El riesgo asociado a su consumo es evidente. Al menos en las manzanas, se ha observado que la cidra proveniente de frutos de baja calidad (cosechadas de la tierra, y usadas sin selección previa) mostraba mayor población de bacterias mesófilas aerobias y de hongos que aquella obtenida de frutos colectados directamente del árbol. El empleo de estos últimos en la producción de cidra, mostró niveles significativamente menores de patulina, que aquella fabricada con frutas defectuosas (Keller *et al.* 2004).

2.4.8. Brotes de enfermedad asociados al consumo de zanahorias

La zanahoria se ha visto implicada en brotes de enfermedad. En 1993 se presentaron 2 brotes, ambos por *E. coli* enterotoxigenica. El primero en marzo, en un vuelo de Carolina del Norte a Rhode Islan en Estados Unidos, el brote fue causado por consumo de una ensalada preparada a base de zanahoria rallada; fueron 47 las personas afectadas (CDC, 1994). El segundo brote fue en abril en New Hampshire a causa del mismo tipo de ensalada la cual fue servida en un buffet; 121 personas cumplieron con la definición de caso (Taylor, 1993).

En el 2005 en Nueva Zelanda se presentó un brote de salmonelosis asociado al consumo de zanahorias crudas. Fueron 19 los casos reportados. La fuente de contaminación no se determinó, aunque aparentemente fue el agua de lavado de la zanahoria (NZSA, 2008).

En Finlandia fue reportado un brote de yersiniosis en el cual los afectados fueron 400 niños. El brote fue asociado al consumo de zanahoria rallada servida en el lunch escolar de 23 escuelas (Rimhanen *et al.* 2008).

2.5. Microorganismos indicadores

En los alimentos existe una gran diversidad de microorganismos. Algunos sobreviven, otros se multiplican y otros más se inactivan. Además, existe una estrecha interrelación entre los distintos tipos microbianos. La diversidad permite agruparlos en función de la actividad o potencialidad que exhiban en los alimentos (Fernández-Escartín, 2000).

Los microorganismos indicadores y/o productos de su metabolismo se usan para una variedad de propósitos que incluyen la evaluación de la inocuidad y la valoración de las medidas de control sanitarias. El uso de microorganismos indicadores depende de los criterios microbiológicos de cada producto en particular. Estos criterios pueden ser normas (límites) de calidad microbiana impuestos por agencias gubernamentales o bien son estipulados en contratos de compra-venta. La FDA/CFSAN (2001) considera que generalmente la ausencia o bajas concentraciones de microorganismos indicadores en los alimentos sugiere que no han sido expuestos a condiciones que permitan la contaminación por patógenos o la oportunidad para que estos desarrollen. Entre los más usados en la industria alimentaria se encuentran las bacterias mesófilas aerobias, los coliformes totales y coliformes fecales.

2.5.1. Bacterias mesófilas aerobias (BMA)

Los microorganismos que forman parte de este grupo son muy heterogéneos. Esta cualidad se deriva de la propia definición del grupo. Se incluyen en él a todos aquellos que muestran capacidad para formar colonias visibles en las condiciones de ejecución de la prueba (medio de cultivo, y tiempo y temperatura de incubación). Resulta obvio que en una situación particular pueden quedar incluidos microorganismos patógenos (Fernández-Escartín, 2008).

Por tanto, el recuento de este grupo de microorganismos (y en general de cualquier otro grupo microbiano) tendrá significado sólo a reserva de que se definan las condiciones bajo las cuales se ha ejecutado la técnica de análisis. Las potenciales aplicaciones de las BMA en el control sanitario de los alimentos sitúa esta prueba como la de uso más amplio en la industria de alimentos en Estados Unidos (Weschler *et al.* 2001).

El recuento de BMA en el agua, alimentos y otros materiales relacionados puede tener, según el caso, algunas aplicaciones de interés que pondrían de manifiesto (Fernández-Escartín, 2008):

- La exposición a fuentes de contaminación.
- Las condiciones de almacenamiento.
- El nivel de frescura.
- La eficiencia de tratamientos antimicrobianos
- Las condiciones higiénicas que prevalecían durante la obtención, preparación, transporte comercialización de un alimento.
- La predicción de la vida de anaquel.
- El cumplimiento de normas microbianas y
- La calidad microbiológica.

Finalmente, no existen, ni pueden existir reglas que sean aplicables a todo tipo de alimento. Así, en las frutas y verduras, de manera natural, los niveles de microorganismos son muy fluctuantes, independientemente de la exposición a fuentes de contaminación comunes entre los patógenos. Una norma microbiana para BMA en estos materiales resultará engañosa y sin valor práctico (Fernández-Escartín, 2008).

2.5.2. Coliformes totales (CT)

Los organismos coliformes se definen como bacilos gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa con producción de gas dentro de 48 hs de incubación a 35 °C. Se trata de una definición totalmente convencional que pretende involucrar bacterias de hábitat típicamente intestinal (*E. coli*), si bien existen microorganismos que frecuentemente se localizan en ambientes extraintestinales (*Enterobacter aerogenes*). De hecho, el grupo no se configura a base de géneros microbianos, sino de cepas que en el desarrollo de la prueba cumplen con la definición (Fernández-Escartín, 2008).

Por lo general el hábitat natural de los organismos coliformes es el contenido intestinal del hombre y de los animales superiores. En las heces fecales alcanzan cifras de

10^7 a 10^9 UFC/g. Si bien *E. coli* es el coliforme más prominente y constante en la materia fecal (otros géneros y especies constituyen una fracción aunque pequeña), se muestra muy persistente en ella. En el caso del género *Citrobacter*, varía de algunos cientos a 500,000 o más (Prescott *et al.* 1950).

La presencia de los coliformes en la tierra, hortalizas y frutos suele estar conectada con la actividad humana o animal. Si el saneamiento es pobre en cualquier lugar, las vías de acceso se intensifican. En casos particulares, con suficiente humedad, materia orgánica de origen tanto vegetal como animal, y carbohidratos fácilmente utilizables, habrá de suscitarse una intensa proliferación de los coliformes que se sostendrá mientras estas condiciones persistan. El predominio de una u otra especie estará condicionado a otros factores; por ejemplo, si la temperatura se acerca a los 43 a 45 °C el género *Escherichia* se verá favorecido (Fernández-Escartín, 2008).

Sin embargo la incidencia de coliformes de origen no fecal y su habilidad para sobrevivir y desarrollar en algunos alimentos reduce la especificidad de los coliformes como indicadores de contaminación fecal en alimentos crudos; más bien expresan calidad microbiológica, lo que no necesariamente implica un riesgo sanitario: por ejemplo, en frutas y hortalizas crudas. En el agua los coliformes adquieren un significado totalmente distinto al que reciben en los alimentos (Kaneco *et al.* 1999). En agua se reconoce que generalmente conforme el número de coliformes se eleva, mayor es la probabilidad de estar frente a un caso de contaminación fecal reciente, hecho de gran importancia en el control sanitario del agua (Fernández-Escartín, 1976).

2.5.3. Coliformes fecales (CF)

Este grupo se refiere a aquellos coliformes que tienen capacidad para fermentar la lactosa con producción de gas a temperaturas de 44 a 45 °C. Excepto este señalamiento, los coliformes fecales se identifican con el resto de los coliformes en lo que se refiere a su resistencia al medio ambiente, agentes químicos y factores que favorecen o impiden su desarrollo (Fernández-Escartín, 2008). Al conformar el grupo se reconoce que hay una depuración de gérmenes de procedencia no fecal a lo largo de la prueba, haciéndolo más significativo que el mero recuento de coliformes totales.

Greenberg y Klowden (1992) anota que la determinación de coliformes fecales en el agua tiene valor sobre la posible fuente de contaminación fecal, específicamente en

relación con la proximidad de esa fuente (respecto al sitio de detección). Este señalamiento se apoya en la consideración de que se espera que los coliformes que no provienen de la materia fecal sobrevivirán mejor que los que son nativos de ese ambiente y para los cuales el agua resulta un medio hostil (Fernández-Escartín, 1976).

Debido a las consecuencias que pueden resultar del empleo de aguas residuales para el riego de tierras destinadas al cultivo de hortalizas, existe una norma de 1,000 coliformes fecales/100 ml de agua, para disminuir tales riesgos (CESAVEJAL, 2006).

2.5.4. *E. coli*

E. coli es reconocido universalmente como indicador de exposición a la contaminación fecal humana o animal. A diferencia de los coliformes o coliformes fecales, tiene bases taxonómicas bien establecidas (Fernández-Escartín, 2000).

Una de las desventajas de usar *E. coli* como indicador radica en que tiende a morir en ambientes secos, congelados o con pH bajo, lo que puede ocasionar que cierta población de *E. coli* sufra daño subletal. Ante esta situación el microorganismo no llega a ser detectado a menos que se recurra a los medios recomendados para su resucitación (FDA/CFSAN, 2001).

Los coliformes fecales fueron propuestos inicialmente como indicadores de contaminación fecal en sustitución de la *E. coli*, debido a la laboriosidad de la prueba para identificar a esta última: obtener un cultivo puro y a continuación realizar 4 pruebas (IMVIC) que requerían hasta 4 días para ser completadas. Actualmente, la prueba que se recomienda para identificar *E. coli*, no requiere siquiera de disponer de un cultivo puro, y puede ser completada en el mismo tiempo que el requerido para los CF.

La reacción de MUG (fluorescencia a luz UV por reacción de la glucuronidasa sobre el sustrato 4-metilumbeliferil- β -D-glucurónido) resulta muy confiable y es posible obtener una triple respuesta (fermentación de la lactosa, producción de indol y fluorescencia) con el medio caldo lauril sulfato mas MUG cuando se incubaba a $44.5 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.2$ para la confirmación del germen.

2.6. *Salmonella* spp.

Dentro de los microorganismos de interés sanitario en frutas y hortalizas, destaca *Salmonella*, bacteria con forma de bacilo, móvil, gram-negativa de la familia *Enterobacteriaceae*. Es de singular relevancia ya que se le ha visto implicada en brotes de enfermedad asociados al consumo de verduras. Este patógeno muestra capacidad para resistir factores ambientales, cualidad que favorece su aislamiento de diversos materiales. Su hábitat natural es el intestino del hombre y animales; por tanto, es expulsada a través de las heces fecales. Se le ha aislado del medio ambiente, hortalizas en cultivo, animales silvestres, domésticos, de explotación y nocivos, de humanos enfermos, asintomático o convalecientes, de utensilios y fómites (Fernández-Escartín, 2000).

La sobrevivencia de *Salmonella* fuera del cuerpo humano y de los animales está afectada por el grado de humedad ambiental, la temperatura, la exposición a agentes germicidas y la composición del material implicado (Lee, 1978).

Las hortalizas procedentes de tierras regadas con aguas negras, cercanas a animales de crianza o domésticos o abonadas con desechos animales, suelen estar contaminadas con agentes patógenos intestinales, incluida la *Salmonella*. Madden (1992) observó que a temperatura ambiente *Salmonella* se mantiene viable en la lechuga por 21 a 28 días.

El germen tiene la capacidad para colonizar virtualmente todos los animales que llegan a entrar en contacto con él. Se aísla con relativa facilidad de animales que el hombre utiliza como alimento. La fauna nociva (roedores, insectos) juega un papel prominente como reservorio y vehículo de diseminación. Finalmente, de los animales domésticos y silvestres se detecta con más o menos frecuencia (Fernández-Escartín, 2000).

2.6.1. Salmonelosis

En Estados Unidos se calculan más de 1.4 millones de casos de salmonelosis por año, con aproximadamente 500 muertes (FSIS, 2009). Chalker y Blazer (1998) estiman que el número de casos de salmonelosis que se reportan al CDC representa solamente 1 a 5% de los que realmente ocurren.

La salmonelosis ha estado asociada histórica y frecuentemente al consumo de alimentos de origen animal como pollo, huevos, carne y lácteos; sin embargo, se cree que los cambios en las prácticas agrícolas, los hábitos alimentarios y el incremento en el comercio internacional de frutas y verduras, ha contribuido al aumento de brotes asociados a hortalizas en años recientes (Altekruse *et al.* 1997).

La frecuencia de brotes de salmonelosis por mes de ocurrencia permite observar una clara distribución estacional: mayor incidencia en los meses calurosos con máximo en julio, y mínimo en enero (Bean *et al.* 1997).

La dosis infectante de la *Salmonella* puede ser tan baja como una célula para algunos serovares (Archer y Kvenberg, 1988). Usualmente, se requieren 2 a 3 log organismos para que ocurra la infección. La salmonelosis tiene un periodo de incubación de 6 a 49 horas. La promoinfección puede consistir de diarrea, dolor abdominal, deshidratación, cefalea y algunas veces vómito. Las heces fecales pueden contener sangre, leucocitos y moco. Los síntomas usualmente se resuelven en una semana, pero el patógeno puede seguirse expulsando en la materia fecal entre 8 y 20 semanas según la edad del individuo infectado.

2.7. *L. monocytogenes*

El género *Listeria* contienen seis especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. seeligeri* y *L. grayi*. Todas gram positivas, bacilos no esporulados con un diámetro 0.5 μm y un largo de 0.5 a 2.0 μm . Es aerobio facultativo, catalasa positivo, oxidasa negativo y presenta movilidad a temperatura de 20 a 25 °C (Seeliger y Jones, 1986).

L. monocytogenes destaca entre los demás patógenos debido a características singulares: amplia distribución en el medio ambiente, capacidad psicrótrófa extrema que le permite proliferar a temperaturas cercanas a 0 °C, elevada letalidad en los casos de listeriosis y gran potencial para colonizar el equipo y nichos diversos dentro de las plantas procesadoras.

Se adhiere y forma biopelículas en diversas superficies, tales como acero inoxidable, hule, vidrio, plásticos, madera y otros (Blackman y Frank, 1996) que son comunes en los sitios (fábricas, cocinas) que manejan alimentos. La adhesión puede ocurrir al cabo de pocos minutos a bajas o medianas temperaturas (Mafu *et al.* 1990). Algunas

cepas específicas se manifiestan dominantes y muy persistentes dentro de un sitio particular; su capacidad de adherencia es más acentuada (Lunden *et al.* 2000).

Tienen valor especial, y en particular para identificar *L. monocytogenes*, la fermentación de tres azúcares: manitol, xilosa y ramnosa, la prueba de hemólisis y la prueba de CAMP. La reacción de CAMP con *S. aureus* hemolítico es positiva y con *Rhodococcus equi* negativa (Fernández-Escartín, 2000). En agar soya tripticaseina con extracto de levadura forma colonias que despiden una iridiscencia peculiar ante la iluminación incidente a 45 °C (transiluminación de Henry), con carácter discriminatorio ante otras bacterias próximas (Cassiday y Brackett, 1989).

2.7.1. Listeriosis

La evidencia a través del estudio de brotes sugiere que la incubación oscila entre 1 y varias semanas (Lovett, 1989). La listeriosis se manifiesta de diferentes maneras en el hombre. La infección puede ser asintomática o asociarse con malestar general, náusea, diarrea y fiebre ligera.

En los adultos el inicio es menos abrupto, con fiebre, cefalea y malestar general; siguen dolor muscular, rigidez del cuello, náusea, vómito y fotofobia. Puede terminar en somnolencia, convulsiones deshidratación y coma. En casos severos progresa con meningitis, septicemia, endocarditis y/o encefalitis (Nieman y Lorber, 1980; García-Gimeno, R. M., 1996; Ruiz *et al.* 2007). Ocasionalmente se observa un curso fulminante, tanto en recién nacidos como en personas mayores de 50 años.

No todas las cepas de *L. monocytogenes* son patógenas. La patogenicidad que presentan algunos serotipos, está asociada a factores como la producción de hemolisina, fosfolipasa, catalasa y la superóxido dismutasa (Anónimo, 1991).

La dosis infectante mínima para el humano es difícil de establecer; en función de observaciones realizadas en algunos brotes se estima que en ciertos segmentos de la población, el número podría situarse entre varios cientos y unos cuantos miles de células de *L. monocytogenes* (Ryser y Marth, 1991). En los brotes de listeriosis se estima que la letalidad oscila entre 23 y 35% además de guardar relación con la edad de las víctimas. En las personas mayores de 60 años llega a 63% (Gellin y Broome, 1989).

Muchas autoridades consideran que bajos niveles de *L. monocytogenes* (que no excedan 10^2 a 10^3 CFU/g de alimento al momento de ser consumido), poseen un riesgo bajo

para la mayoría de los consumidores (CDC, 1999i; Gilbert *et al.* 1996). Por ello, la regulación de países como Alemania, Holanda, Francia y Canadá, proponen o han adoptado una estrategia para la gestión de los riesgos que implica cierta tolerancia ante bajos niveles del patógeno en los alimentos, siempre y cuando no pueda desarrollar hasta cifras inaceptables durante la vida comercial del producto (FAO, 1999).

2.8. Técnicas de detección de patógenos en alimentos

Los resultados que se obtienen con algunas técnicas resultan muy confiables, pero no con otras. Aparte del error personal, los resultados pueden diferir de acuerdo con la técnica de análisis utilizada. Por tal razón, antes de estudiar cada uno de los grupos microbianos, es oportuno revisar brevemente los principios que definen esas características que confieren validez a las técnicas de laboratorio, tanto para detectar la presencia de un grupo o patógeno particular, como para estimar su abundancia en un alimento o cualquier otro material. La validez se refiere a la capacidad de una prueba para que haga lo que se pretende que haga; en estos casos, detectar al patógeno si está presente, y no detectarlo si está ausente. La validez de una prueba queda determinada por un conjunto de características que han de ser objeto de evaluación. Incluyen: la sensibilidad, la especificidad, la exactitud, la precisión, la reproducibilidad (Fernández-Escartín, 2008).

2.8.1. Detección por cultivo

Las características de los patógenos en alimentos, como son su generalmente baja concentración e incidencia, distribución heterogénea y condición de estrés, requieren de un procedimiento prolongado (tres a siete días) para la detección del patógeno.

En los alimentos, los métodos de cultivo para la detección de bacterias patógenas e índice se apoyan en forma casi exclusiva en los métodos de cultivo de la AOAC y el Bacteriological Analytical Manual (BAM) (Andrews y Hammack, 1998; AOAC, 1984). El análisis de *Salmonella* es una prueba cualitativa y determina la presencia o ausencia de *Salmonella* en una muestra dada. Sin embargo, mediante el análisis de muestras idénticas en una serie de diluciones, es posible obtener una estimación cuantitativa, es decir, un número más probable (Wallace *et al.* 2001).

Generalmente, cuando se necesita procesar un gran número de muestras, el aislamiento del microorganismo en cuestión puede ser arduo, y consumir mucho tiempo, equipo, material y medios de cultivo.

2.8.2. Detección por PCR

El buscar técnicas alternativas a las de cultivo, se ha vuelto una labor de varios investigadores. Se pretende acortar los tiempos de detección, facilitar el aislamiento e incrementar la sensibilidad y especificidad además de reducir los costos.

En base a estas características es que se desarrolló la técnica conocida como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La introducción de la PCR en el diagnóstico microbiano se ha establecido en los laboratorios de investigación como una valiosa alternativa a los métodos tradicionales de cultivo (Malorny *et al.* 2003).

La PCR es una técnica que permite la amplificación *in vitro* de una secuencia específica de ADN usando un par de oligonucleótidos (para iniciar la duplicación) que hibrida los extremos opuestos de ambas cadenas del ADN blanco y delimita la sección del ADN que será repetidamente copiada. Comúnmente, se selecciona como blanco un gen de secuencia exclusiva a la especie microbiana de interés, y con frecuencia es un gen asociado a la virulencia. Después del PCR, el producto de amplificación (que es de tamaño definido y contiene la secuencia de los iniciadores en sus extremos) puede ser detectado de varias formas, siendo la más común, la electroforesis. La PCR puede amplificar específicamente la secuencia del ADN blanco en una mezcla de ADN de células asociadas al material analizado (Fratamico, 2001).

2.9. Enfoques preventivos de la contaminación de frutas y verduras

2.9.1. Buenas Prácticas Sanitarias

La disminución de la probabilidad de contaminación puede alcanzarse a través de adecuadas maniobras durante el cultivo, cosecha y empaque. Estas prácticas se han derivado del conocimiento del hábitat de los patógenos, su comportamiento en frutas y

hortalizas y la eficiencia de tratamientos dirigidos a cancelar/ reducir su presencia o desarrollo; se conocen como prácticas sanitarias.

Las buenas prácticas agrícolas (BPAs) y las buenas prácticas de manufactura (BPMs) tienen como meta la calidad del alimento sin dejar de lado la inocuidad. Las Buenas Prácticas Agrícolas se refiere a el conjunto de prácticas generales de producción de frutas y hortalizas, empleadas en el cultivo, la cosecha, la selección, el empaque, el almacenaje y el transporte e higiene del trabajador, efectuadas en el campo, que reducen la probabilidad de contaminación del cultivo que pueda poner en riesgo la inocuidad de las frutas y hortalizas o su aptitud para el consumo en etapas posteriores de la cadena alimentaria.

El programa de BPAs incorpora el Manejo Integrado de Plagas, así como otros programas con denominaciones sinónimas como el manejo integrado del cultivo, etc., dentro de su marco de trabajo. La adopción de BPA es esencial para la mejora a largo plazo de la producción de frutas y hortalizas (SENASICA, 2009).

2.9.2. Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control

El sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control (APPCC) es efectivo y racional para asegurar la inocuidad de los alimentos desde la cosecha hasta el consumo (FDA, 1998a). El objetivo esencial del sistema APPCC es prevenir los peligros microbianos en los alimentos y acercarse en cuanto sea posible al alimento inocuo. Los principios que dan sustento al APPCC están basados en el conocimiento científico (Fernández-Escartín, 2000). El sistema APPCC funciona más eficazmente cuando se aplica de manera concurrente con los programas de aseguramiento de la calidad. Elementos implícitos fundamentales del sistema son las operaciones sanitarias de producción y distribución, la adecuada sanidad, y el diseño y mantenimiento del equipo. Por lo tanto, requiere la satisfacción de ciertos prerrequisitos y acciones preliminares. Algunos ejemplos de estas últimas son la capacitación del personal y la disponibilidad de recursos elementales, como la dotación de agua potable, protección contra la fauna y la implementación de las PSAs, así como BPAs (Abadias *et al.* 2008).

Después de realizar estas acciones es necesario identificar los peligros específicos para implementar medidas de control que se monitorean de manera continua o periódica. Finalmente, si las acciones en el proceso de elaboración del alimento no cancelan las

oportunidades de contaminación, sobrevivencia y desarrollo de agentes patógenos, se recomienda modificar el proceso. Un plan de APPCC es específico para cada producto y proceso. Puede ser desarrollado para asegurar la inocuidad de una ensalada de fruta en un restaurante o de una salchicha en una planta procesadora de productos cárnicos (Fernández, 2000).

2.9.3. Tratamientos descontaminantes

La aplicación de buenas prácticas sanitarias durante todas las etapas de producción, acondicionamiento y empaque o procesado combinadas con el APPCC, ciertamente minimizan la contaminación de frutas y verduras y reducen el riesgo de enfermedad asociados con los alimentos (Beuchat, 1998). Sin embargo, no garantizan la obtención de un producto inocuo y el uso de tratamientos de desinfección se vuelve indispensable para incrementar la seguridad de los alimentos.

Generalmente las frutas y verduras son lavadas y no desinfectadas. El lavado remueve algo de tierra y suciedad pero no garantiza la total eliminación de microorganismos después de que el producto se ha contaminado. Algunos estudios muestran que el lavado reduce de 0.1 a 1 log UFC de bacterias (Beuchat, 1998), reducción que resulta insuficiente ya que la mayoría de las frutas y verduras suelen contener varios log de UFC de bacterias en su superficie.

2.9.3.1. Hipoclorito de sodio (NaClO)

El cloro es el desinfectante más comúnmente utilizado para frutas y hortalizas crudas. La actividad antimicrobiana de los compuestos clorados depende de la cantidad de cloro disponible como ácido hipocloroso no disociado (HClO) en el agua que se pone en contacto con las células microbianas (Pirovani *et al.* 2006). Por lo general este tratamiento químico no eliminar la totalidad de microorganismos que frecuentemente están presentes en las frutas y verduras crudas cuando son usados en concentraciones que no acusan deterioro en la calidad sensorial.

Para desinfectar frutas y verduras de manera comercial, el cloro es comúnmente utilizado en concentraciones de 50 a 200 ppm con un tiempo de contacto de 1 a 2 min (CFSAN/FDA, 2001); sin embargo, se ha reportado una reducción de bacterias de no más de 3 log (Beuchat, 1998). Una de las principales ventajas del cloro es el amplio espectro

antimicrobiano, fácil aplicación y bajo costo, pero también es altamente corrosivo y puede causar daño en las superficies del equipo de acero inoxidable en prolongados tiempos de exposición.

Una gran desventaja es el potencial de carcinogenicidad y mutagenicidad de los productos secundarios de sus reacciones con los compuestos orgánicos de los alimentos. (Beuchat, 1998). Cuando una solución clorada se pone en contacto con la superficie del producto a lavar el desinfectante reaccionará con la materia orgánica (tal como el tejido vegetal, jugos celulares, partículas de suelo, microorganismos, etc.), combinándose con ella y dando productos derivados que disminuirán los efectos del desinfectante (Pirovani *et al.* 2006).

2.9.3.2. Ácido peracético (CH₃COOOH)

El ácido peracético es una mezcla de ácido acético (CH₃COOH) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en una solución acuosa. El ácido peracético es un agente oxidante muy fuerte tiene un potencial de oxidación mayor al cloro y al dióxido de cloro. La concentración recomendada para la desinfección de frutas y verduras es de 80 ppm (Trevor, 1997). Se ha demostrado la eficacia en la inactivación de bacterias entéricas en aguas residuales; sin embargo, los virus, esporas bacterianas y quistes de protozoarios son más resistentes. El mecanismo se basa en la ruptura de las membranas celulares y en obstaculizar la actividad enzimática de sistemas de transporte en el microorganismo (Liberti y Notarnicola, 1999).

A diferencia del cloro, el ácido peracético es menos corrosivo, no se afecta por cambios en la temperatura y mantiene su efectividad en presencia de materia orgánica. En 1986, la FDA aprobó el uso del ácido peracético como un germicida de grado alimenticio no excediendo una concentración de 100 ppm (Rodgers *et al.* 2004).

2.11.3.3. Ácido tricloroisocianúrico (C₃N₃O₃Cl₃)

Los derivados del ácido cianúrico más utilizados son el dicloroisocianurato sódico y el ácido tricloroisocianúrico; se reconoce su amplio uso en albercas, más no en alimentos.

El ácido tricloroisocianúrico contiene un 90% de cloro activo. Una vez disuelto en agua, libera ácido hipocloroso que reacciona rápidamente con la materia orgánica, quedando ácido cianúrico como subproducto. Cuando se alcanzan niveles de ácido

cianúrico del orden de 30 a 60 ppm, éste actúa como filtro para la luz solar, previniendo la descomposición del ácido hipocloroso. Debe tenerse en cuenta que la presencia de niveles apreciables de ácido cianúrico en el agua también retarda la actividad bactericida del cloro. Esta es la razón por la que en los Reglamentos Técnicos Sanitarios de Piscinas se recomienda que los niveles de ácido cianúrico no superen las 75 ppm (IDEGIS, 2008).

El ácido cianúrico puede ser añadido al agua como agente estabilizante del cloro hasta alcanzar los niveles recomendados de 30 a 60 ppm (3-6 Kg/m³). Puesto que el ácido cianúrico tiene una baja solubilidad, debe añadirse directamente al cilindro dosificador, preferiblemente durante la noche, dejándolo hasta su total disolución (Rodgers *et al.* 2004).

La cantidad de agente germicida depende en gran medida de la cantidad de contaminantes aportados al agua, como la materia orgánica. Es un producto irritante en contacto con los ojos y las vías respiratorias.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Detectar y valorar situaciones y operaciones que comprometen la inocuidad microbiana de la zanahoria, desde el cultivo hasta el empaque en dos empresas.

3.1.1 Objetivos específicos

1. Describir las condiciones de cultivo y empaque de zanahoria en dos empresas, destacando violaciones a las prácticas sanitarias de trabajo.
2. Determinar la incidencia de *Salmonella*, *L. monocytogenes* y bacterias indicadoras en zanahorias y materiales asociados a su cultivo, acondicionamiento y empaque.
3. Identificar las potenciales fuentes de contaminación y mecanismos que propician la presencia de estos microorganismos en zanahorias a lo largo de la producción, y empaque.
4. Evaluar la eficacia de tres germicidas en la desinfección de zanahoria inoculada con *Salmonella* spp.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Equipo

Autoclave eléctrica de mesa, 121 °C (Market-Forge, Sterilimatic)
Balanza analítica digital, 120g x 0.0001g (Sartorius)
Balanza granataria, sensibilidad 0.1 g, Modelo No. CT200-S (OHAUS)
Baño María de precisión de 43 ± 0.2 °C, Modelo 251 (Precision Scientific)
Baño María de precisión de 44.5 ± 0.2 °C Modelo 251 (Precision Scientific)
Bolsas de polietileno en rollo sin marca comercial diferentes tamaños
Bolsas de polietileno capacidad 252 ml (Whirl - Pak)
Campana de flujo laminar (Alder y Veco)
Centrifuga de mesa (Hermle)
Cuenta colonias (Québec Reichert-Jung)
Homogenizador (Stomacher, Seward 400)
Horno para esterilización (Shel-lab)
Incubadora de 35° (Precision Scientific, Seward 400)
Incubadora de 22° (Precision Scientific, Seward 400)
Lámpara de luz U.V. Modelo 56 (Blas-Ray)
Microscopio luminoso (Leica)
Potenciómetro, modelo 410 (Orion)
Vortex, modelo G650 Scientific Industries Inc (Daiger Vortex Genie 2)
Micropipetas 2-1000 µl (Labsystems)
Unidades de filtración (Millipore)

4.1.2 Medios de cultivo

Agar cuenta estándar (ACE) (BD Bioxon)
Agar soya tripticaseina (AST) (BD Bioxon)
Agar sulfito bismuto (ASB) (BD Bioxon)
Agar verde brillante (AVB) (BD Bioxon)
Agar xilosa lisina desoxicolato de sodio (XLD) (BD Bioxon)

Agar hierro y triple azúcar (TSI), (BD Bioxon)
Agar hierro lisina (LIA), (BD Bioxon)
Agar cloruro de litio-feniletanol-moxalactamo (LPM), (Oxoid)
Agar Oxford modificado (MOX), (Oxoid)
Agar soya tripticasa con extracto de levadura (AST-EL), (BD Bioxon)
Agar eosina azul de metileno (EMB), (BD Bioxon)
Agar de hierro de Kligler (KIA), (BD Bioxon)
Medio de SIM, (BD Bioxon)
Medio MIO, (BD Bioxon)
Caldo de enriquecimiento para Listeria (LEB), (Oxoid)
Caldo lactosado (CL), (BD Bioxon)
Caldo lactosa bilis verde brillante (CLBVB), (BD Bioxon)
Caldo lauril sulfato mas MUG (CLF), (BD Bioxon)
Caldo Rappaport Vassiliadis (CRV), (BD Bioxon)
Caldo Soya Trypticaseina (CST), (BD Bioxon)
Caldo Tetrionato (CTT), (BD Bioxon)
Caldo Universidad Vermont (UVM), (Oxoid)
Caldo urea, (BD Bioxon)
Caldo neutralizante (CN) (pH 7.6; De neutralizing broth), (BD Bioxon)
Peptona de caseína (BD Bioxon)

4.1.3. Reactivos y colorantes

Antisuero polivalente A-I & Vi para *Salmonella* (DIFCO™)
Buffer de fosfatos (productos Químicos Monterrey)
Cloruro de sodio (Productos Químicos Monterrey)
Coloración de Gram (cristal violeta, safranina, lugol, alcohol etílico 95%), (Sigma Chemical Co.)
Rojo de metilo (Sigma Chemical Co.)
 α - naftol 5% (sol. Alcohólica), (Sigma Chemical Co.)
Suero de caballo desecado (DIFCO™)

4.1.4. Material biológico

Se utilizaron:

- Cuatro serovares de *Salmonella enterica*: *S. Agona* ATCC BAA007, *S. Gaminara* ATCC 8324 , *S. Montevideo* ATCC 8387 y *S. Typhimurium* ATCC 14028 obtenidas de la American Type Culture Collection. Se obtuvieron mutantes resistentes a rifampicina de los cuatro serovares siguiendo el método descrito por Kaspar y Tamplin (1993). Los cultivos se mantuvieron en tubos con agar base sangre a 4 °C con transferencias mensuales.

- Cinco especies del genero *Listeria*: *monocytogenes*, *ivanovii*, *inocua*, *seeligeri* y *welshimeri* del cepario del laboratorio de inocuidad de alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro. Los cultivos se mantuvieron en tubos con agar base sangre a 4 °C con transferencias mensuales.

- Cinco cepas de la especie *Listeria monocytogenes*: 101-14, 101-A, V7, Scott A y LCDC del cepario del laboratorio de Inocuidad Microbiana de Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro. Se obtuvieron mutantes resistentes a rifampicina de los cuatro serovares siguiendo el método descrito por Kaspar y Tamplin (1993). Los cultivos se mantuvieron en tubos con agar base sangre a 4 °C con transferencias mensuales.

4.2. Descripción de las condiciones de cultivo y empaque de zanahoria en dos empresas, destacando violaciones a las prácticas sanitarias de trabajo

La investigación se llevó a cabo en dos empresas productoras y empacadoras de zanahoria íntegra (empresa A y empresa B), ambas ubicadas en el estado de Guanajuato. El trabajo se realizó en el campo y en la empacadora.

Ambas empresas cuentan con infraestructura y métodos de cultivo similares. Trabajan con zanahoria propia y dan servicio a otros productores no asociados a la empresa. La empresa A cuenta con una superficie de siembra de 2000 ha (propiedad de los socios de la empresa y particulares) y la empresa B de 1300 ha resultado de sumar las parcelas de varios productores. Tanto A como B tienen una capacidad de 90 toneladas de zanahoria por día y trabajan con un aproximado de 60 a 90 trabajadores cada una. Cada empresa cuenta con agua de pozo profundo la cual utilizan para riego y en el empaque.

Se realizaron visitas periódicas (generalmente 2 por mes) a lo largo de 12 meses (mayo 2008-mayo 2009). Fueron un total de 33 visitas entre campo y empaque. En cada ocasión se realizó un estudio observacional de las maniobras, prácticas de trabajo y operaciones que pudieran comprometer la inocuidad microbiana de la zanahoria en el campo y en la empacadora. Se registro el nivel de cumplimiento de las prácticas sanitarias de trabajo.

Se describieron las prácticas de operación implementadas en cada empresa, apoyados en los aspectos que refiere el SENASICA como condiciones sanitarias de operación (Tabla 6).

Tabla 6. Aspectos referidos a las condiciones sanitarias de operación

Durante la producción	Empacadora
Fuente de agua para uso agrícola	Fuente de agua para uso post-cosecha
Protección a los cultivos	Infraestructura
Uso previo de la tierra y de tierras adyacentes	Higiene de maquinaria y equipo
Uso de fertilizantes orgánicos	Área para consumo de alimentos
Facilidades para la higiene de los trabajadores	Facilidades de higiene para los trabajadores

Fuente: SENASICA, 2002

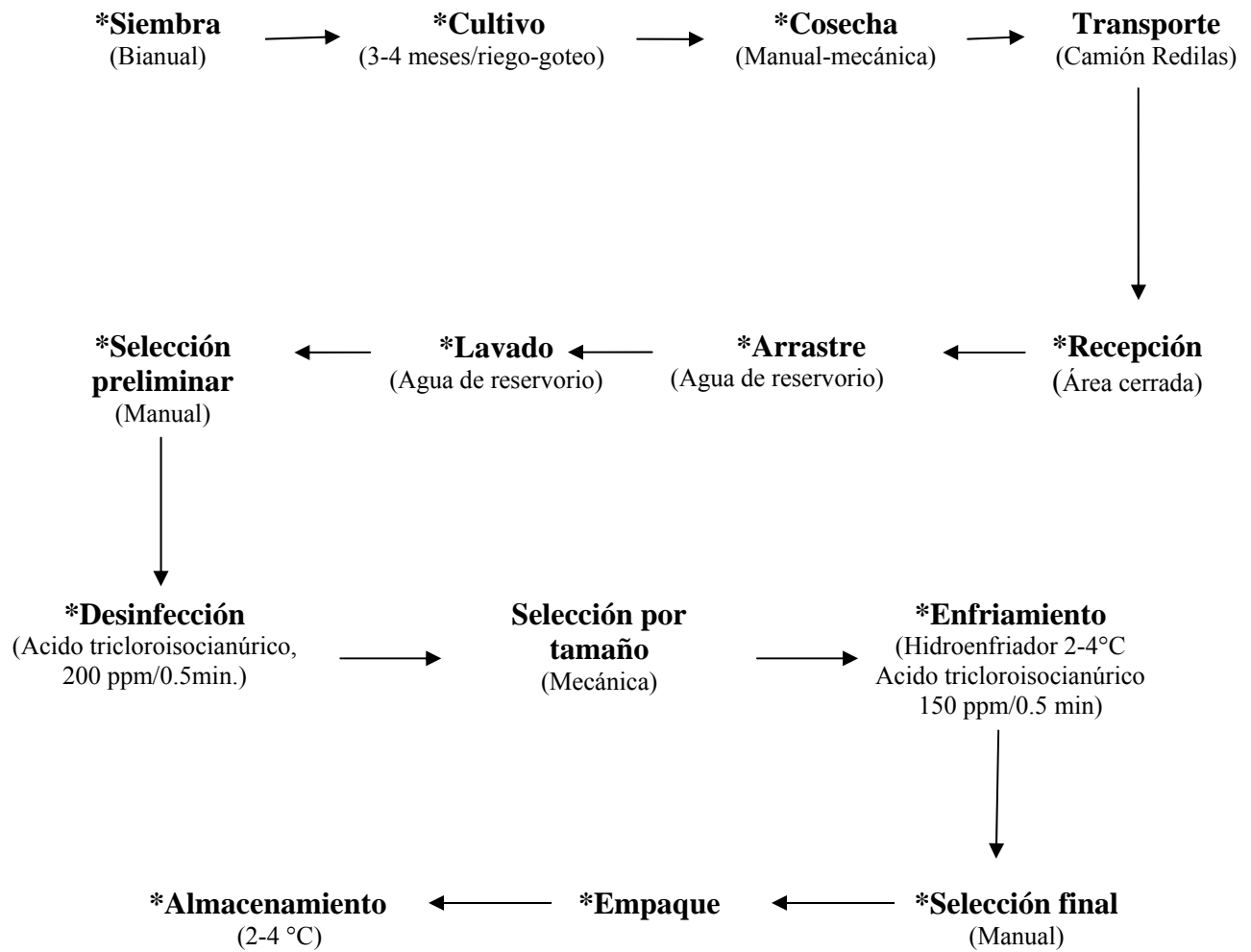
Se trazó el diagrama de flujo para cada empresa (Figura 2 y 3) y se fijaron los puntos de muestreo. Para el registro de las violaciones a las prácticas sanitarias se estableció una hoja de registro Tabla 7.

Tabla 7. Hoja de registro de las violaciones a las prácticas sanitarias en campo y empaque

Número y fecha de visita:	Registro por cada visita
Empresa :	Violación
Fauna domestica en:	
entorno al cultivo *	
empacadora	
reservorio de agua	
Fauna silvestre en empacadora	
Heces fecales cultivo:	
humanas	
animales	
Heces fecales empacadora:	
animales	
WC inaccesibles **	
cultivo	
empacadora	
Carencia de material para lavado de manos cultivo	
agua	
jabón	
Carencia de material para lavado de manos empacadora	
agua	
jabón	
Falta de cestos de basura	
Residuos de alimentos dentro de:	
cultivo	
empacadora	
Herramientas sin uso en áreas de:	
la empresa	
el cultivo	
Tapete sanitario sin germicida	
Total	

*: 100 m a la redonda

** : En cultivo, sin baños; en empacadora WC sin agua o inaccesibles.



* Puntos de muestreo

Figura 2. Diagrama de flujo, empresa "A".



Figura 3. Diagrama de flujo, empresa "B".

4.3. Determinación de la incidencia de microorganismos indicadores, *Salmonella* y *L. monocytogenes* en zanahorias y materiales asociados durante su cultivo y empaque.

Se colectaron muestras de zanahoria y diversos materiales en diferentes etapas de la producción y de la empacadora a lo largo del acondicionamiento y empaque.

4.3.1 Puntos de muestreo

Los puntos de muestreo se indican en la Figura 2 y 3 para las empresas A y B, respectivamente. Las muestras analizadas consistieron de cuatro tipos principalmente:

Zanahoria:

- Cultivo
- Cosecha
- Etapas del empaque

Agua:

- Riego
- Reservorio
- Enfriamiento
- Cisterna

Tierra

- Superficial de parcelas

Superficies

- Equipo y maquinaria de la empacadora
- Guantes y manos de trabajadores

4.3.2. Preparación de las muestras

Zanahoria

La unidad experimental consistió en tres zanahorias. Se colocó en bolsa de plástico con 107 mL de diluyente de peptona. Cada zanahoria se frotó a mano 1 minuto por fuera de la bolsa para desprender los microorganismos de la superficie.

Agua

a) de reservorio

Para la investigación de *Salmonella*, se utilizó torunda de Moore estéril, la cual fue sumergida en el reservorio durante 15 días. Se depositó en bolsa con 100 mL de CST y se homogenizó por 1 min a velocidad normal en un Stomacher. En bolsas Whirl-pak®, se colectaron 200 mL del agua para las determinaciones cuantitativas.

b) después del arrastre de zanahoria

Para la investigación de *Salmonella* en el agua después de que arrastró la zanahoria se utilizó torunda de Moore estéril, la cual fue sumergida contra corriente del agua por 1 minuto. Se depositó en bolsa con 100 mL de CST y se homogenizó por 1 minuto a velocidad normal en un Stomacher. En bolsas Whirl-pak® se colectaron 200 mL del agua para las determinaciones cuantitativas.

c) de riego, de enfriamiento, almacenada en cisterna y solución germicida

Se colectaron 200 mL del agua en bolsas Whirl-pak®. En el agua de enfriamiento y la solución germicida se aplicó 1 mL de tiosulfato de sodio al 3% para neutralizar el cloro.

Torundas de muestreo de superficies

Se muestrearon al azar 100 cm² de superficie de maquinaria o equipo y por empleado, las 2 manos o un par de guantes y 2 suelas de zapato con torunda de gasa estéril (3 por 4 cm). Se depositó la torunda en bolsa Whirl-pak® con 38 mL de diluyente de peptona y se homogenizó por 1 min a velocidad normal en Stomacher.

Tierra

Se muestreó el terreno del cultivo en 5 puntos distintos (esquinas y centro). La forma de muestreo para determinación de *Salmonella* fue arrastrando una torunda de Moore por distancia de 5 metros sobre la tierra superficial. Una torunda por punto. Cada torunda se homogenizó 1 min en 100 mL de CST contenido en una bolsa de plástico comercial. De los mismos puntos de muestreo, se colectaron 10 g de tierra para análisis de *E. coli*, se colocaron en bolsas con 90 mL de CL y se homogenizaron por 1 min a velocidad normal en Stomacher.

4.3.3. Bacterias indicadoras

a) BMA: El recuento se realizó por la técnica de vaciado en placa utilizando agar cuenta estándar (ACE) e incubando a 22 °C/24-48 h (Peeler y Maturin, 1992).

b) CT y CF: se siguió la técnica del número más probable (NMP) (Figura 4) y los valores fueron calculados empleando la aproximación de Thomas: $NMP/mL \text{ o } g = \text{número de tubos positivos} / \sqrt{(\text{volumen de muestra negativo})(\text{volumen analizado})}$ (Swanson *et al.* 2001).

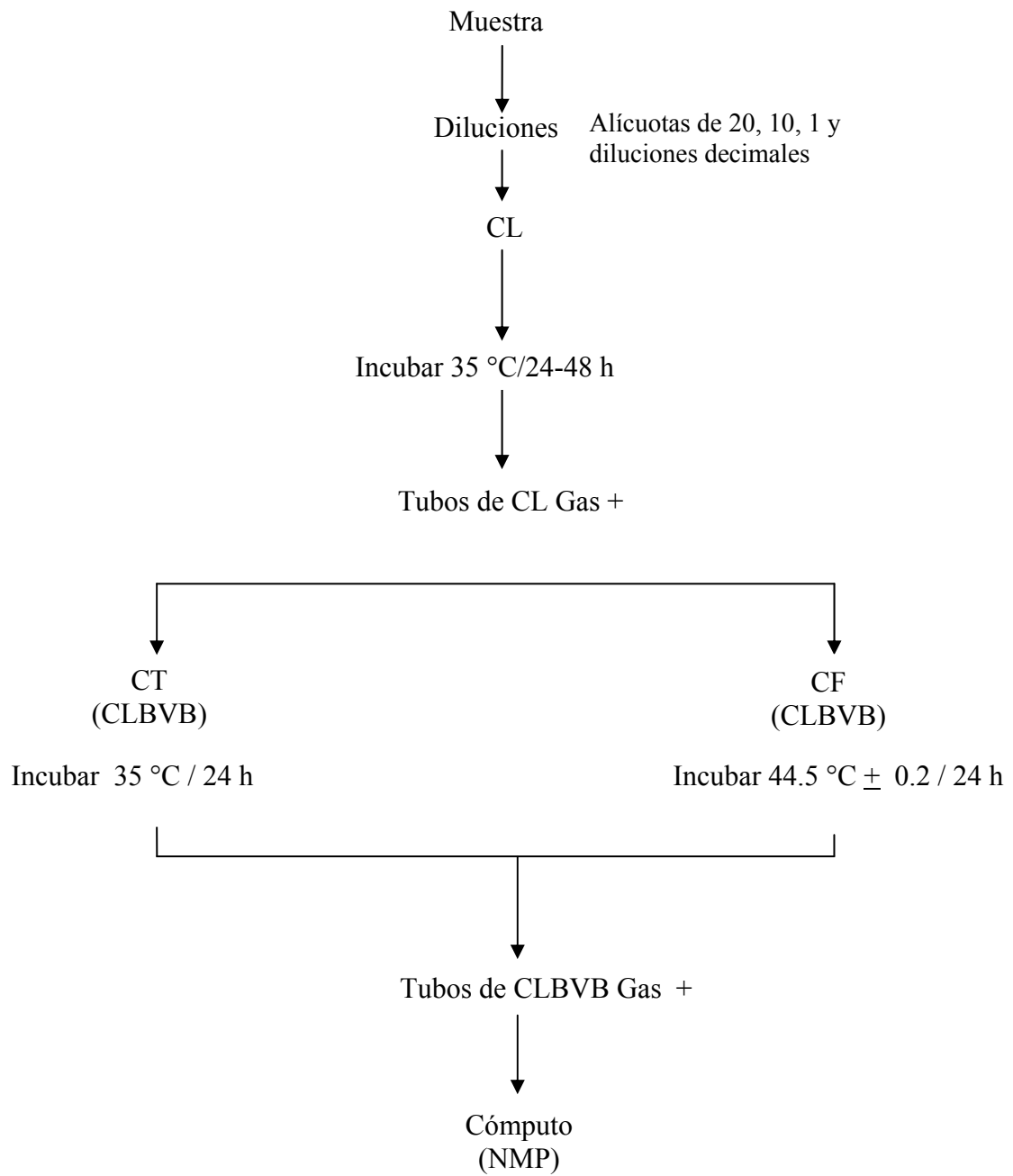


Figura 4. Recuento de CT y CF por la técnica del NMP.

c) *E. coli*: La cuantificación de *E. coli* se realizó mediante el procedimiento escrito por Kornacki y Johnson (2001) (Figura 5) y la cuantificación mediante la técnica del número más probable (NMP). Los valores fueron calculados con la aproximación de Thomas (Swanson *et al.* 2001).

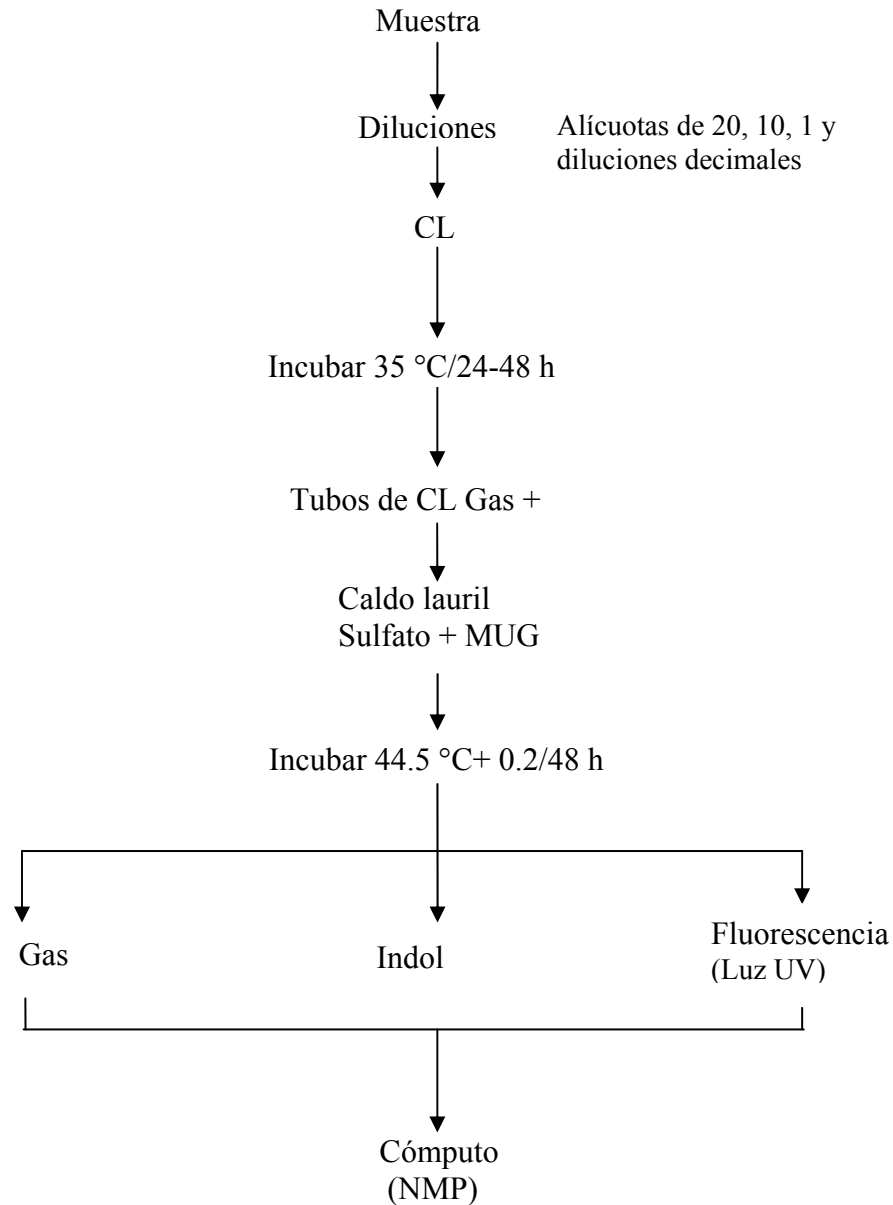


Figura 5. Recuento de *E. coli* por la técnica del NMP.

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

4.3.4. Determinación de *Salmonella* spp.

La detección de *Salmonella* se realizó por medio de dos técnicas, una molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa (la cual se explica posteriormente), mejor conocida como PCR por sus siglas en inglés y una tradicional por medio de cultivo (Figura 6). Ambas técnicas fueron validadas previamente.

Para el aislamiento de *Salmonella* por medio de cultivo se siguió la técnica especificada en el CMMEF (Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods) (Andrews *et al.*, 2001). La confirmación de las colonias con morfología típica se realizó mediante pruebas bioquímicas: fermentación de lactosa, sacarosa y glucosa (TSI), descarboxilación de lisina (LIA) y utilización de la urea (caldo urea) (Edwards y Ewing, 1972; Koneman *et al.*, 1983). Las cepas con patrón típico de *Salmonella* se confirmaron mediante aglutinación con antisuero poly A-I & Vi.

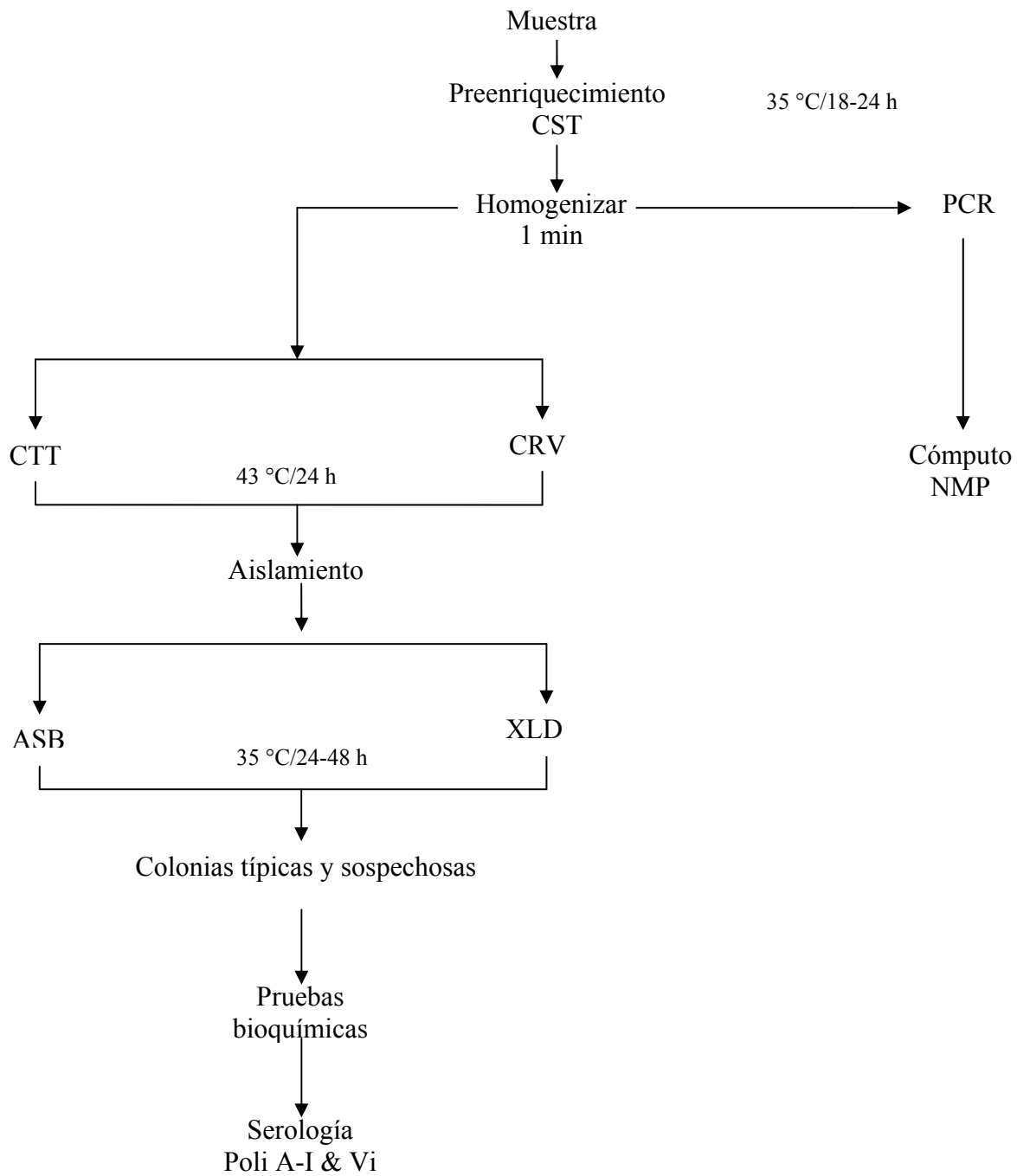


Figura 6. Detección y cuantificación de *Salmonella* spp. en zanahoria y materiales diversos.

4.3.4.1. Evaluación de dos procedimientos para recuperar *Salmonella* a partir de zanahoria

El tamaño de la zanahoria exige un preenriquecimiento con mayor cantidad de caldo de cultivo a fin de cubrir completamente la muestra. Por esto se plantearon dos procedimientos (a y b) para determinar si era necesario incubar la muestra de zanahoria para la recuperación de *Salmonella* o si solo bastaba con recuperar los microorganismos de su superficie por medio de CST y frotación.

- a) Incubando la zanahoria en CST a 35 °C/24 h.
- b) Frotando la zanahoria en CST durante un minuto y retirarla previa incubación a 35 °C/24 h.

Las muestras de zanahoria se inocularon con una mezcla de cepas del patógeno resistentes a rifampicina. El inóculo (100 µL) se colocó en forma de gotas distribuidas en la superficie de las zanahorias. Los niveles probados fueron 100, 50, 5 y 1 UFC / 3 zanahorias. Se realizaron recuentos de los inóculos por triplicado en AST suplementado con rifampicina (100 ppm).

4.3.4.2. Evaluación de una prueba de PCR para la detección de *Salmonella* en diferentes muestras

Los iniciadores utilizados fueron los derivados de *invA* diseñados por Liu *et al.* (2002). El grupo de genes *invA* (A,B,C,D), es un componente de la ruta de secreción tipo III que determina el fenotipo de invasión, se localiza en la isla de patogenicidad 1 y está ampliamente distribuido entre los serovares del patógeno (Liu *et al.* 2002). Los genes *inv A* son de composición exclusiva y altamente conservada del género *Salmonella*.

En esta investigación no fue determinada la especificidad de los iniciadores pues en estudios realizados con anterioridad en otras tesis desarrolladas en este mismo laboratorio, se han evaluado, obteniéndose resultados de alta especificidad en la detección de *Salmonella* (Orozco, 2008; García, 2009).

La técnica de PCR consta de tres partes:

Lisis celular: A partir de la muestra preenriquecida 1 ml se centrifugó a 4,500 X g/15 min. El precipitado resultante fue resuspendido en 1 ml de agua destilada estéril y se colocó en un baño de agua en ebullición (98 °C) por 20 min.

Amplificación: La mezcla por amplificar está compuesta de 1 µL de la muestra y 19 µL de la mezcla de reacción conteniendo la polimerasa. La mezcla fue preparada en microtubo e introducido en cama de hielo para evitar la acción exonucleasa de la Taq polimerasa. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador con las condiciones siguientes: 93 °C/5 min; 30 ciclos de 93 °C/ 10 s, 42 °C/ 10 s y 72 °C/ 45s; y una extensión final a 72 °C/ 10 min.

Electroforesis: Los productos de la amplificación se detectaron por electroforesis en gel de agarosa 1.5%, 90 V durante 90 min. El gel se reveló en bromuro de etidio (10mg/L) por 20 min. Se empleó un marcador de 100 pb para determinar el peso molecular de los productos de la amplificación. La imagen del gel fue capturada con el sistema Kodak EDAS 290.

Al resultar alguna muestra positiva a *Salmonella* por PCR, se cuantificó el patógeno por la técnica de NMP.

i. Caldo de preenriquecimiento

Se probaron dos medios de preenriquecimiento: CL y CST en los cuatro tipos de muestras: zanahoria, superficies, agua y tierra de la empresa A. Adicionalmente se determinó la sensibilidad de la técnica PCR para detección del patógeno en las diferentes muestras en presencia de la flora asociada.

Se utilizaron cuatro niveles de inóculo (1, 5, 50, 100 UFC/muestra) de una mezcla de cepas de *Salmonella* resistentes a rifampicina los cuales se cuantificaron en AST suplementado con rifampicina (100 ppm) mediante la técnica de vaciado en placa. Las placas se incubaron a 35 °C por 24 h. El recuento de cada inóculo se realizó por triplicado.

Una unidad experimental para zanahoria consistió en tres piezas medianas, para agua y tierra, una torunda de Moore y para superficies, una torunda de 3 por 5 cm con 3 mL de CN. Para el preenriquecimiento se agregaron 150, 100 y 50 mL de caldo de medio por

tratamiento, respectivamente. Las muestras se inocularon, homogenizaron e incubaron 24 horas a 35 °C. El patógeno también se cuantificó en las muestras a las 24 horas de incubación.

ii. Subcultivo

La evaluación de subcultivo se llevó a cabo en muestras de tierra, agua de reservorio y zanahoria sucia, que corresponden a las muestras que no amplificaron en el PCR en pruebas preliminares.

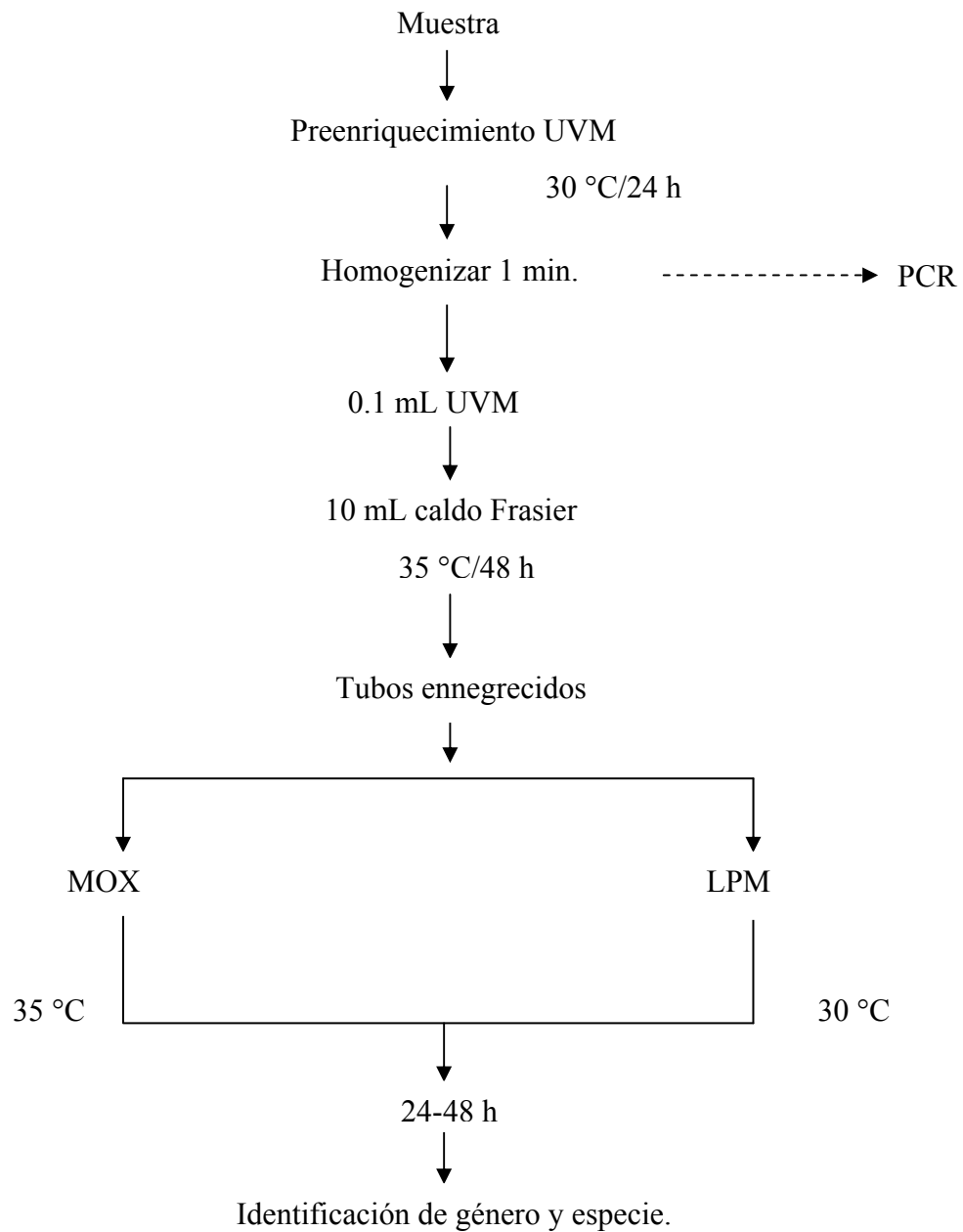
Se aplicaron dos periodos de incubación, largo y corto, este último seguido de un subcultivo: 1 mL de la muestra original se colocó en un tubo con 9 mL de CST, se incubó por 18 horas más a la misma temperatura. Ambos grupos de muestra se inocularon con 10 UFC de la mezcla de cepas de *Salmonella* resistentes a rifampicina antes de la incubación.

1. Periodo largo: Las muestras se incubaron por 24 horas a 35°C para después ser procesadas para analizar por PCR.
2. Periodo corto: Las muestras se incubaron por 6 horas a 35 °C. Posteriormente se homogenizaron y se realizó un subcultivo.

El nivel de inóculo se cuantificó por triplicado en AST suplementado con rifampicina (100 ppm) antes y después del preenriquecimiento. Finalmente se procesó la muestra por PCR.

4.3.5. Determinación de *L. monocytogenes*

La detección de *L. monocytogenes* se realizó por dos técnicas: PCR y por cultivo (Figura 7). Ambas técnicas fueron validadas para la determinación de *L. monocytogenes* en los materiales a muestrear.



Fuente: APHA, 1992

Figura 7. Detección de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en zanahoria y muestras diversas.

Mediante estudios preliminares se determinó el uso de la técnica de la USDA como técnica de cultivo (Donnelly y Brackett, 1992). Las cepas aisladas se confirmaron mediante:

- Gram
- Movilidad al microscopio y en SIM
- Fermentación de manitol
- Fermentación de xilosa
- Fermentación de ramnosa
- Producción de β -hemólisis

La detección de *L. monocytogenes* por PCR se efectuó en 1 mL de caldo preenriquecido siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.3.4.2.

Se realizaron 6 muestreos longitudinales en la empresa A para determinar la incidencia de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*. Las muestras consistieron en zanahoria colectada de las etapas de acondicionamiento y empaque, superficies de maquinaria, equipo y la cámara de frío.

4.3.5.1. Evaluación de dos procedimientos para recuperar *L. monocytogenes* a partir de zanahoria.

Para esta evaluación se siguió la metodología descrita en el apartado 4.3.4.1. ahora para *L. monocytogenes*.

- a) Incubando la zanahoria en el caldo de preenriquecimiento a 30 °C/48 h.
- b) Frotando la zanahoria en el caldo de preenriquecimiento durante un minuto y retirarla previa la incubación a 30 °C/48 h.

Se utilizaron zanahorias de la empresa A. Se utilizó una mezcla de cinco cepas del patógeno en niveles de 100, 50, 5 y 1 UFC / 3 zanahorias como inóculo. 100 μ L fueron distribuidos en forma de gotas en la superficie de las zanahorias. Se realizaron recuentos de

los inóculos por triplicado en AST. El análisis cualitativo se llevó a cabo por medio de la técnica de la USDA (Donnelly y Brackett, 1992).

4.3.5.2. PCR para la detección de *Listeria monocytogenes* en diferentes muestras

Los iniciadores utilizados fueron los derivados del gen *hly A* (LM 1 y 2) diseñados por Border *et al.*, (1990). Las condiciones de la amplificación para ADN de *L. monocytogenes* fueron: 94 °C/5 min; 35 ciclos de 94 °C/ 30 s, 5 °C/ 45 s y 72 °C/ 45s; y una extensión final a 72 °C/ 5 min.

i. Prueba de especificidad de los iniciadores LM

Se determinó la especificidad de los iniciadores elegidos con 20 cepas, 5 de *L. monocytogenes* y 15 cepas de otras especies bacterianas (*L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *Rhodococcus equi* OPS (LNSP), *Lactobacillus Casei*, *Lactobacillus Ramnosus*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 LNA 06 (LNSP), *Staphylococcus xylosus* LNA 065 OPS (LNSP), *Escherichia coli* CDC 01184, *Klebsiella pneumoniae* CDC 1332, *Salmonella* Typhimurium, *Serratia marcesens* pigmentada C-530); todas en cultivo fresco de CST (35 °C/24h). De cada cepa se tomo 1 mL, se lisó y siguió la técnica descrita para PCR en el punto 4.3.4.2., utilizando los iniciadores a evaluar.

ii. Evaluación de medio de enriquecimiento

Se probaron dos medios de enriquecimiento a) caldo de la Universidad de Vermont (UVM) y b) caldo de enriquecimiento para *Listeria* (LEB) en los dos tipos de muestras: zanahoria y torundas de muestreo de superficies de la empresa A. Se determinó la sensibilidad de la técnica PCR para detección del patógeno en las diferentes muestras en presencia de la flora asociada. Se utilizaron cuatro niveles de inóculo (1, 5, 50, 100 UFC/muestra) de una mezcla de cepas de *L. monocytogenes* resistentes a rifampicina.

La unidad experimental para zanahoria consistió en tres piezas medianas y para superficies una torunda de 3 por 5 cm con 3 mL de CN. Cada unidad experimental se inoculó y se les agregaron 150 y 20 mL de caldo en cada muestra respectivamente. Se homogenizaron e incubaron por 48 horas a 35 °C las muestras con caldo UVM y a 30 °C las que contenían caldo LEB.

4.4. Identificación de las potenciales fuentes de contaminación y mecanismos que propician la presencia de estos microorganismos en zanahorias a lo largo de la producción y empaque

Con base en los hallazgos de *E. coli* y *Salmonella* en los materiales analizados y a los registros de violaciones a las prácticas sanitarias en el campo y empaque, se relacionó su frecuencia por medio de comparación gráfica con el fin de determinar su dependencia.

Se determinó la asociación entre la incidencia de los microorganismos entéricos investigados y las potenciales fuentes de contaminación encontradas; esto es, se tomó como posible fuente de contaminación los materiales analizados que entran en contacto directo e indirecto con las zanahoria y que mostraron presencia de *Salmonella*.

4.5. Evaluación de la eficacia de germicidas en la desinfección de zanahoria inoculada con *Salmonella* spp.

Se estudió la susceptibilidad de *Salmonella* al germicida usado en la planta A para la desinfección de zanahoria. El efecto se comparó con otros dos germicidas.

4.5.1. Efecto del ácido tricloroisocianúrico, hipoclorito de sodio y ácido peracético sobre *Salmonella* ssp. en zanahoria cruda integra

La zanahoria se adquirió en la central de abastos de la ciudad de Querétaro. Se seleccionaron zanahorias sin daños mecánicos aparentes y de no más de 10 cm de longitud y 2.5 cm de grosor. Se enjuagaron por frotación por 10 segundos a chorro directo fuente de agua potable.

Se utilizó una mezcla de cuatro cepas de colección de *Salmonella* (*S. Montevideo*, *S. Thompson*, *S. Agona* y *S. Typhimurium*), obtenidas del cepario del laboratorio de Inocuidad Microbiana de Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro. También se utilizó una mezcla de cuatro cepas aisladas de muestras de zanahoria en diferentes áreas del empaque. Se indujo la resistencia a rifampicina seleccionando las colonias mutantes resistentes en las cepas de acuerdo al método señalado por Kaspar y Tamplin (1993).

La activación de las cepas de *Salmonella* se realizó transfiriendo 40 µL de los cultivos mantenidos en congelación a un tubo con 3 ml de CST y se incubaron durante 24 h a 35 °C; se realizó otro pase a las 18 h de incubación.

Las mezclas de las cepas seleccionadas se prepararon combinando volúmenes iguales (1 ml) de cada uno de los cultivos. Las células se lavaron cuatro veces (4,500 X g / 5 min.) con SSI (0.85% de NaCl). El paquete celular se resuspendió en suero de caballo. Se realizó el recuento de las suspensiones celulares en AST suplementado con rifampicina (100 ppm) mediante la técnica de vaciado en placa. Las placas se incubaron a 35 °C durante 24 h.

La unidad experimental estuvo compuesta por tres zanahorias. Cada zanahoria se inoculó con 100 µL de la suspensión celular distribuidos longitudinalmente en la superficie de cada zanahoria para obtener una concentración final de 8 log UFC por zanahoria. Se secaron a temperatura ambiente en una campana de flujo laminar durante 45 min.

Se prepararon soluciones de los tres germicidas: ácido tricloroisocianúrico (200 mg/L), ácido peracético (80 mg/L) e hipoclorito de sodio (200 mg/L). La concentración de los tres germicidas se determinó por medio del método yodométrico (Greenberg *et al.*, 1992).

Se colocaron tres zanahoria inoculadas en una bolsa conteniendo 120 mL de solución germicida.

Los tratamientos se aplicaron por 1 y 5 min. por quintuplicado, sin agitación. Cada unidad experimental se transfirió a una bolsa que contenía 50 ml de caldo neutralizante (pH 7.6). Posteriormente se realizó el recuento de la población sobreviviente a cada tratamiento en AST adicionado con rifampicina (AST + R) mediante la técnica de vaciado en placa. Las placas se incubaron a 35 °C durante 24 h.

Se confirmaron bioquímicamente las colonias recuperadas en AST+R, mediante las pruebas bioquímicas especificadas en el apartado 4.3.4 para *Salmonella*.

4.6. Análisis estadísticos

- Para los datos de BMA se realizó un análisis de varianza y prueba de medias mediante Tukey (Montgomery, 1991).
- Se determinó el valor Kappa (k) como un índice de correlación entre el PCR y el cultivo (*Salmonella* y *L. monocytogenes*) (Dupray *et al.* 1997; Orozco, 2008).
- La significancia entre las incidencias de *Salmonella* y *E. coli* en los distintos materiales entre empresas se determinó mediante la prueba Z para dos proporciones independientes (Orozco, 2008).
- Para la evaluación de germicidas se empleó un diseño factorial completamente al azar. Se efectuó el análisis de varianza de los datos y la significancia de la diferencia entre las medias de los tratamientos se determinó mediante la prueba de Tukey (Montgomery, 1991).

En todas las pruebas se utilizó el programa JMP 5.1.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Descripción de las condiciones de cultivo de la zanahoria y dos plantas empacadoras.

El estudio se llevó a cabo en dos empresas (A, B) productoras y empacadoras de zanahoria íntegra las cuales participan en el programa de sanidad vegetal de la SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, desarrollo Rural, Pesca y Alimentación).

5.1.1. Campo

Dentro de las violaciones observadas y registradas a las prácticas sanitarias agrícolas esta la presencia ocasional de fauna doméstica en el entorno de las parcelas (≤ 100 m) y heces fecales humanas y animales (Tabla 8). Además, ninguna empresa provee material de higiene para manos de trabajadores en las parcelas.

A los trabajadores de campo no se les exige una vestimenta en particular, ni el uso de guantes o botas de trabajo, sin embargo su vestimenta es aparentemente limpia.

Ambas empresas aplican riego por goteo con agua de pozo profundo (aproximadamente 100 a 135 m de profundidad). De acuerdo con Buttler *et al.* (1993) este tipo de agua generalmente es de buena calidad ya que proviene de mantos acuíferos que han estado sujetos a filtración a través de capas de tierra con intenso poder retentivo. Sin embargo, su calidad microbiana se compromete si el pozo se encuentra expuesto a fuentes de contaminación. Este no es el caso de las empresas con que se trabajó ya que los pozos se encuentran rodeados con malla ciclónica, además de no haber explotación de ganado ni tránsito humano.

Los socios de cada empresa están informados del riesgo de utilizar fertilizantes orgánicos en las parcelas; emplean sólo fertilizantes químicos de manera controlada y regulada por el CESAPEG (Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato). Sin embargo, no se tiene control sobre las parcelas de los productores independientes que solicitan el servicio de las empacadoras para acondicionar y empacar su producto.

La cosecha en ambas empresas es mecanizada excepto en periodo de lluvia ya que el terreno se vuelve inaccesible a la máquina cosechadora, además, la zanahoria que se llega a cosechar de esta forma, lleva una gran cantidad de lodo lo que disminuye la eficiencia del lavado y desinfección, por lo que se recurre a la cosecha manual.

El estudio en el campo se llevó a cabo en una parcela de cada empresa, ambos huertos situados a más de 1 km de distancia de poblado más cercano. En el huerto B no se contaba con baños móviles ni con facilidades de higiene para los trabajadores mientras que en la A sí; sin embargo, se encontraban a más de 300 m de distancia de los trabajadores.

Las parcelas de las dos empresas son limitadas por malla ciclónica; además la empresa A cuenta con barrera vegetal (árboles), sin embargo, la entrada al huerto (5 a 7m) en ambas empresas esta sin barrera lo que permite la entrada de animales domésticos y silvestres. El rastreo de la contaminación en el producto es posible siempre y cuando se tenga un control y registro estricto sobre las personas extrañas que ingresan o salen de las parcelas, sin embargo, ninguna de las empresas lo lleva a cabo.

5.1.2. Empacadora

La zanahoria es transportada al área de empaque por medio de camiones de redilas usados sólo para este fin. Ya en el área de recepción del empaque, la zanahoria es descargada del camión y llevada hasta la lavadora por medio de arrastre con agua, de esta forma disminuyen los daños mecánicos al producto y por lo tanto su calidad y vida de anaquel se preserva por más tiempo.

Ambas empresas almacenan agua de rehúso en reservorio expuesto al medio ambiente (Figura 8).



Figura 8. Reservorio de agua de la empresa A.

La empresa A reutiliza esta agua para el arrastre y lavado de la zanahoria por numerosas ocasiones lo que le da un aspecto turbio por la alta cantidad de materia orgánica

que llega a acumular y una mala calidad microbiana. Mientras que la empresa B lava el producto con agua extraída de pozo profundo. Después del lavado, el agua es recolectada en una cisterna para ser utilizada en la próxima descarga de zanahoria y finalmente ser desechada al drenaje.

La zona de descarga y lavado de la zanahoria en la empresa A se encuentra en un área cerrada, a diferencia de la empresa B, que es al aire libre (Figura 9) por lo tanto el hallazgo de aves sobre la zanahoria antes de entrar al proceso fue muy frecuente. Es bien sabido que las aves constituyen un reservorio significativo de *Salmonella*. Saenz *et al.* (2001) reportaron una incidencia del patógeno de 33% en muestras de materia fecal de aves. Estos desechos pueden diseminar gran cantidad de células de *Salmonella* lo que representa una fuente relevante de contaminación hacia la zanahoria.



Figura 9. Descarga de zanahoria en la empresa A (área cerrada) y B (área expuesta al medio ambiente).

En la empresa A, posterior al lavado, la zanahoria es llevada por medio de bandas transportadoras hacia la tina de desinfección (Figura 10) donde tiene un tiempo de residencia de 1 minuto aproximadamente. La solución germicida es turbia y con gran cantidad de materia orgánica. Generalmente todo acondicionamiento de zanahoria involucra altas cantidades de materia orgánica (Figura 11) afectando directamente la eficiencia de los germicidas clorados. El germicida empleado es un derivado del cloro llamado comercialmente “ácido tricloroisocianúrico”; del cual se reconoce su amplio uso en albercas, agua de bebedero para animales, en la desinfección de semillas y suelos. Sin

embargo, su uso en alimentos es escasamente documentado. La concentración empleada es a 200 ppm la cual es regulada al menos cuatro veces al día.



Figura 10. Empresa A: desinfección de zanahoria por medio de inmersión en solución germicida a base de ácido tricloroisocianúrico.



Figura 11. Materia orgánica en bandas de preselección de zanahoria; etapa posterior al lavado.

Después de la desinfección (empresa A) la zanahoria se enfría por medio de inmersión en una tina de enfriamiento llamada industrialmente “hydrocooler” (hidroenfriador) (Figura 12). El agua contenida en la tina se encuentra aproximadamente a 2 °C permitiendo la disminución de la temperatura interna de la zanahoria a 4 a 7°C. SAGARPA (2002) hace mención de la importancia de disminuir la temperatura en los productos agrícolas, con la comparación de que cada grado centígrado no disminuido en el producto, representa un día menos de vida de anaquel. El enfriamiento por inmersión en agua tiene la ventaja de poder realizar una desinfección a la vez que se enfría el producto.

En la empresa A se realiza así una segunda desinfección empleando el mismo agente germicida a 150 ppm.

El enfriamiento de la zanahoria en la empresa B, se realiza en túneles de enfriamiento a base de amoníaco como gas refrigerante cuando el producto ya está empacado (Figura 13). El enfriamiento en túnel de amoníaco tiene la gran ventaja de no adicionar humedad a la zanahoria lo que se traduce en menores pérdidas por prontas pudriciones del producto. Por otro lado, es bien sabido que al sumergir el producto en agua la contaminación que una unidad puede tener, se disemina en todo el conjunto, problema que se evita al enfriar la zanahoria por medio de túnel.



Figura 12. Empresa A: Enfriamiento de zanahoria por medio de inmersión en agua de 2 a 4 °C en “hidroenfriador”.



Figura 13. Empresa B: Túnel de enfriamiento a base de amoníaco.

Posterior al enfriamiento en la empresa A y al lavado en la B, la zanahoria es seleccionada por tamaño en una maquina compuesta por rodillos alineados en paralelo uno tras otro y la distancia entre estos es lo que determina que zanahoria pasa entre ellos, y separada en diferentes bandas de transporte como baby cuando el tamaño es aproximado a 4 cm, polvo de 7 cm, mediana de 15 cm de longitud por 2.5 de grosor, leña un poco más de 15 cm de longitud por 5 cm de grosor y jumbo más de 20 cm por 5 cm o mas de grosor. En ambas empresas se trabaja mayormente la zanahoria mediana pues es la más comercial.

El empaque del producto se realiza de forma manual. Mientras la zanahoria es transportada por bandas los trabajadores la van colectando en bolsas. En la empresa A, aparte de las bandas, se cuenta con un carrusel de empaque el cual denominan “volante” (Figura 14). En él se van depositando y empacando las zanahoria que no se empacaron en la banda previa. Los volantes son de acero inoxidable, sin embargo, ya están desgastados y para cubrir este desgaste y proteger la zanahoria de residuos de metal, les colocaron una cobertura tipo alfombra la cual resulta difícil de higienizar y permite la acumulación de residuos.

La zanahoria ya empacada es almacenada en cámara de frío a 2 °C aproximadamente y con una humedad relativa de 90%. Su estancia en la cámara es de uno a 15 días para después ser transportada por unidades frigoríficas a su destino de comercialización.



Figura 14. Empresa A: Empacado manual de zanahoria en volante (atrás: empaque en banda).

En cuanto a condiciones y prácticas sanitarias dentro de la empacadora, la empresa B mostró las mejores condiciones. En ambas empresas es reglamentario el uso de cofia, guantes y mandil; sin embargo, no se cumple al cien por ciento esta condición. Los trabajadores de la empresa A son los menos apegados al reglamento de su empresa siendo común ver que la zanahoria que cae al piso la juntan en el empaque con las demás sin haberla regresado a desinfección. Estornudan y no se cubren la boca. Además el saneamiento de la maquinaria es ineficiente, la asperjan diariamente con solución germicida. Sin embargo, no se le da un lavado efectivo de forma regular permitiendo la permanencia de residuos de zanahoria por varios días.

En todas las visitas a empaque de la empresa A había el material necesario para la higiene de manos de los trabajadores como agua, jabón y espuma germicida a base de alcohol (Figura 15); y los baños se encontraban aparentemente limpios y con agua potable. Sin embargo, aún así los trabajadores no siempre lavaban sus manos o guantes al entrar al empaque, o si lo hacían no era de la forma adecuada. Montville *et al.* (2002) han señalado que el adecuado lavado de manos no elimina todos los patógenos potencialmente presentes, pero puede reducir significativamente la contaminación de manos a alimentos y superficies. La empresa B, que si bien, brinda el material para higiene de manos de trabajadores (agua-jabón), los baños estuvieron inaccesibles en dos de cinco visitas (sin agua por una ocasión, y sucios por otra) (Tabla 8).



Figura 15. Área de lavado de manos con el material necesario para ello. Empresa A.

A la entrada de cada empaque se tiene un tapete sanitario, en la empresa A, con solución germicida a base de ácido tricloroisocianúrico y en la B, con sales cuaternarias de amonio. No obstante, en la empresa A se observó ausencia de germicida en el tapete, en ocho de veinte visitas. En ambas empresas cuentan con sistema de protección contra plagas, como roedores por ejemplo, sin embargo, eso no evitó que se encontrara materia fecal de este tipo de animales en 12 de 20 ocasiones en la empresa A.

Por otra parte, las malas prácticas de los trabajadores se reflejaban en diversas situaciones. Por ejemplo, en la Figura 16 se observa la escoba con la que barren la zanahoria que cae al piso, colocada sobre la tina de enfriamiento donde la zanahoria ya fue desinfectada. De igual forma es necesario el mantenimiento de algunas áreas. En la Figura 17 se muestra la coladera en mal estado lo que puede dar paso a que roedores se internen en el área de empacado, además del riesgo de contaminación existente al colocar las cajas de producto ya desinfectado en el piso y cerca de las coladeras.



Figura 16. Práctica inadecuada en empresa A.

La mayor incidencia y reincidencia de prácticas inadecuadas se presentaron en la empresa A. Cualquiera de las violaciones a las prácticas sanitarias que se listan en la Tabla 8 y su frecuencia, es fundamental para interpretar los resultados de los análisis microbiológicos.



Figura 17. Coladera del área de empaque en mal estado; inadecuado manejo de la zanahoria. Empresa A.

Tabla 8. Frecuencia de algunas violaciones a las prácticas sanitarias de trabajo en dos empresas productoras de zanahoria.

Violación	(f/n) *	
	A	B
Fauna domestica en:		
entorno al cultivo **	5/5	1/3
empacadora	0/20	1/5
reservorio de agua	10/20	0/5
Fauna silvestre en empacadora	20/20	1/5
Heces fecales cultivo:		
humanas	1/5	0/3
animales	4/5	1/3
Heces fecales empacadora:		
animales	12/20	1/5
WC inaccesibles ***		
cultivo	5/5	3/3
empacadora	0/20	2/5
Carencia de material para lavado de manos cultivo		
agua	5/5	3/3
jabón	5/5	3/3
Carencia de material para lavado de manos empacadora		
agua	0/20	0/5
jabón	0/20	1/5
Falta de cestos de basura	0/20	1/5
Residuos de alimentos dentro de:		
cultivo	1/5	0/3
empacadora	3/20	0/5
Herramientas sin uso en áreas de:		
la empresa	18/20	0/5
el cultivo	1/5	0/3
Tapete sanitario sin germicida	8/20	0/5
Total	97/260	18/79

*: (frecuencia de la violación / numero de visitas)

** : 100 m a la redonda

***: En cultivo, sin baños; en empacadora baños sin agua o inaccesibles.

5.2. Estudios preliminares para determinación de *Salmonella* spp.

5.2.1. Evaluación de dos procedimientos para recuperar *Salmonella* a partir de zanahoria.

En el preenriquecimiento de la muestra es necesario que ésta quede sumergida por completo en el caldo; sin embargo, debido al tamaño de la zanahoria (16 cm largo y 3 de grosor), la cantidad de caldo necesario para este fin se incrementa haciendo costoso el estudio. Siendo así, se planteó la recuperación del patógeno a partir de las zanahorias:

- a) Incubando la zanahoria en CST durante las 24 horas de preenriquecimiento.
- b) Frotando la zanahoria en CST durante un minuto y retirarla previo a la incubación.

Se determinó la sensibilidad de la técnica para recuperación de *Salmonella* en zanahoria. Los inóculos probados según el recuento fueron 100, 50, 5 y 1 UFC / 3 zanahorias.

En el Tabla 9 se presentan la frecuencia de recuperación de *Salmonella* en muestras de zanahoria. A altos contenidos del patógeno no existe diferencia entre la forma de recuperación. El problema se presenta cuando el nivel de inóculo es bajo y la zanahoria no es incubada con el caldo. En esta condición la recuperación del patógeno fue menor. En base a estos resultados y con el fin de incrementar la posibilidad de recuperación de *Salmonella* se decidió incubar la muestra de zanahoria junto con el caldo de preenriquecimiento.

Tabla 9. Recuperación de *Salmonella* por dos procedimientos, a) incubando la zanahoria 24 horas y b) retirando zanahoria después de frotar

Inóculo UFC / 3 zanahorias	<i>Salmonella</i> + / n (%)	
	Incubar	Frotar
100	5 / 5 (100)	5 / 5 (100)
50	5 / 5 (100)	5 / 5 (100)
5	5 / 5 (100)	2 / 5 (40)
1	4 / 5 (80)	0 / 5 (0)

n: repeticiones.

5.2.2. Detección por PCR de *Salmonella* en distintas muestras

La técnica para la detección de *Salmonella* y otros microorganismos por medio de cultivo tradicional, puede requerir 5 días o más. Sin embargo, el PCR se realiza en corto tiempo y posee gran sensibilidad y especificidad cuando se utilizan iniciadores diseñados en base a un gen exclusivo y altamente conservado del microorganismo de interés (Adrienne, 2001).

5.2.2.1. Evaluación del caldo de preenriquecimiento

Los medios de preenriquecimiento tienen como objetivo aumentar la población del microorganismo patógeno de interés. El método sugerido en el BAM (Andrews y Hammack, 1998) recomienda el uso de CL como medio de preenriquecimiento. Sin embargo, empleando el CL como preenriquecimiento en lechuga, la carga de *Salmonella* no alcanza la concentración necesaria para ser detectada en PCR (García, 2009). Empleando CST como preenriquecimiento, el contenido de *Salmonella* alcanza la concentración necesaria para ser detectada en el PCR a las 20 horas de incubación (Orozco, 2008; García, 2009). Tomando en cuenta lo anterior, resultó pertinente realizar la evaluación del caldo de preenriquecimiento en muestras de zanahoria y demás materiales a determinar *Salmonella*.

Se probaron dos medios de preenriquecimiento (CL y CST) en los diferentes tipos de muestras (zanahoria, superficies, agua y tierra), y 4 niveles de inóculo (1, 5, 50 y 100 UFC) de una mezcla de cepas de *Salmonella* de colección, con tres repeticiones por cada nivel de inóculo. El recuento se llevó a cabo en AST-R+. Las muestras después de preenriquecidas, se procesaron para su análisis por PCR obteniendo los siguientes productos de amplificación (Figura 18 y 19). Cada banda representa la detección de ADN del patógeno el grosor es subjetiva a la concentración.

La frecuencia de detección de *Salmonella* por PCR fue mayor en muestras preenriquecidas en CST. Incluso amplificaron (bandas) las muestras inoculadas con 1 UFC de *Salmonella* por unidad; sin embargo, no se detectó el patógeno en las que se encontraban aparentemente mas sucias (tierra, zanahoria sin lavar y agua de reservorio). Algunos productos pueden contener sustancias o compuestos que inhiben el PCR, interferencia que puede verse disminuida con la dilución (Rossen *et al.* 1992 y Rai *et al.* 1997). Siendo así, la amplificación posiblemente fue inhibida por compuestos presentes en muestras como la

tierra. Se procedió entonces a diluir los compuestos presentes mediante subcultivo a partir del preenriquecimiento.

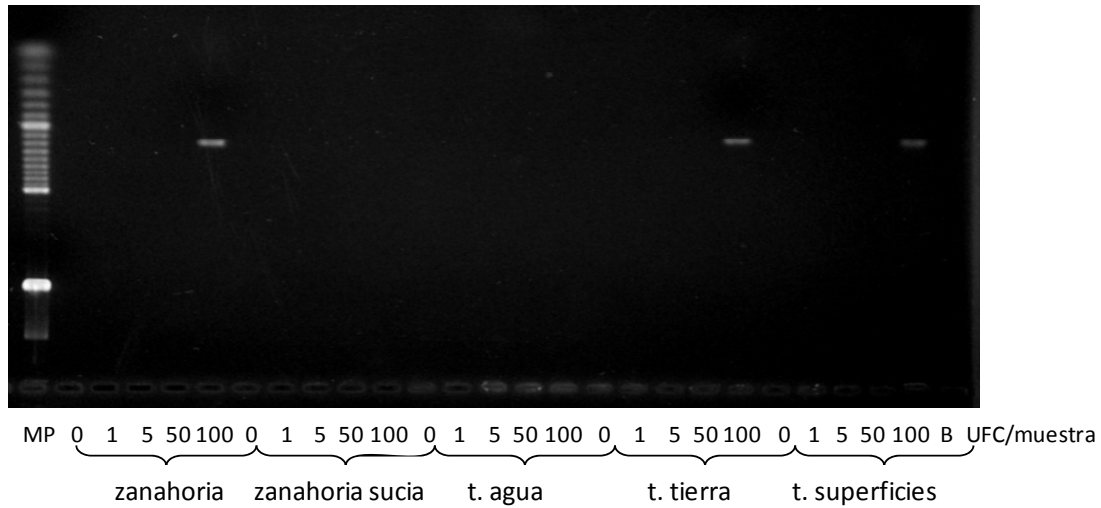


Figura 18. Sensibilidad de la técnica de PCR para la detección de *Salmonella* utilizando como medio de preenriquecimiento CL en zanahoria, torundas de Moore para el muestreo de agua (t. agua) y de tierra (t. tierra) y torundas de superficies (t. superficie), con 0, 1, 5, 50, y 100 UFC de *Salmonella*. Marcador: peso molecular 50 pb (MP), Control negativo (B).

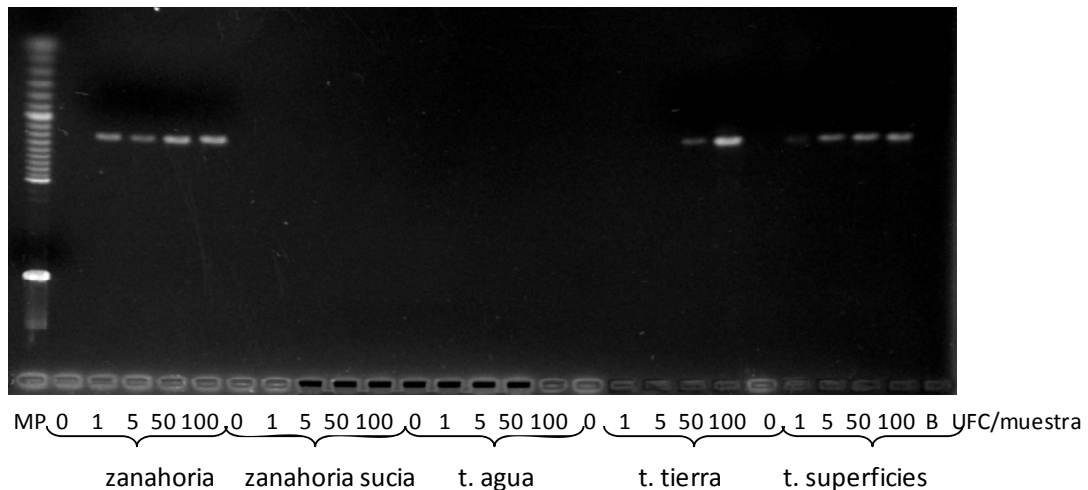


Figura 19. Sensibilidad de la técnica de PCR para la detección de *Salmonella* utilizando como medio de preenriquecimiento CST en zanahoria, torundas de Moore para el muestreo de agua (t. agua) y de tierra (t. tierra) y torundas de superficies (t. superficie), con 0, 1, 5, 50, y 100 UFC de *Salmonella*. Marcador: peso molecular 50 pb (MP), Control negativo (B).

5.2.2.2. Subcultivo

Se recurrió a un subcultivo para las muestras de tierra (torunda de Moore), agua de reservorio (torunda de Moore) y zanahoria sucia con el fin de diluir lo más posible los compuestos que pudieran interferir con la detección del patógeno. Al respecto:

1. Se inocularon las muestras con 10 UFC de *Salmonella*/unidad, se homogenizaron en CST y se incubaron por 24 horas a 35 °C previo al análisis por PCR.
2. Siguiendo el procedimiento anterior se limitó la incubación 6 horas, se transfirió 1 mL a un tubo con 9 mL de CST y se incubó por 18 horas más para completar 24 horas de incubación.

Se procesó entonces la muestra mediante PCR (Figura 20).

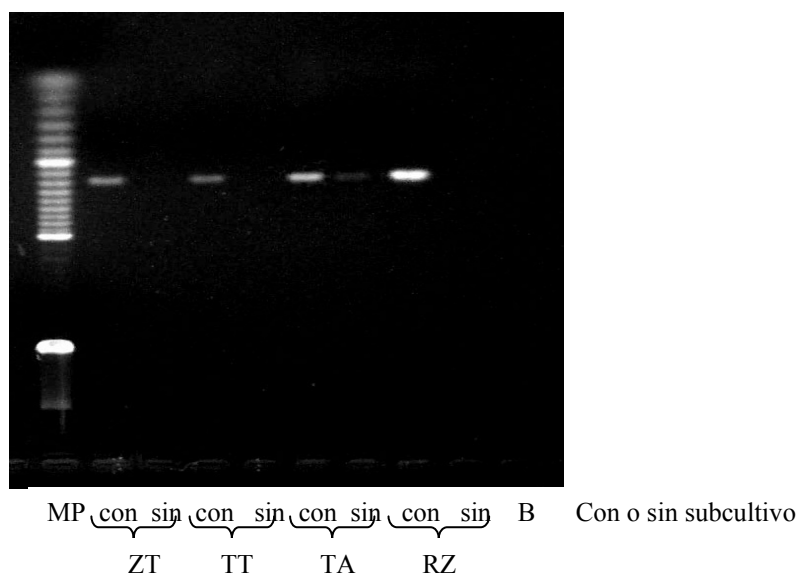


Figura 20. Efecto del subcultivo en la detección de *Salmonella* por PCR en muestras altamente sucias. Marcador de peso molecular 50 pb (MP); zanahoria con tierra (ZT); torunda de Moore con tierra (TT); torunda de Moore con agua de reservorio (TA); residuos de zanahoria en maquinaria (RZ); Control negativo (B).

El producto de amplificación de PCR se observó en los casos que se aplicó el subcultivo. En consecuencia se decidió realizar el subcultivo para las muestras visiblemente sucias: zanahoria con tierra, torundas de Moore con que se muestreo agua de reservorio,

torundas de Moore con que se muestreo tierra, así como los residuos de zanahoria incrustados en maquinaria.

5.3. Incidencia de *Salmonella* y microorganismos indicadores en zanahorias y materiales asociados a su cultivo y empaque.

Conocer cuál es el perfil sanitario dentro de las plantas empacadoras nos permite detectar posibles fuentes de contaminación, la calidad microbiológica de los productos acondicionados y empacados, conocer la eficiencia de tratamientos antimicrobianos, y valorar las condiciones higiénicas prevalentes durante el acondicionamiento.

A partir de los primeros estudios observacionales en las dos empresas se detectaron maniobras y operaciones inadecuadas que podrían propiciar la contaminación por microorganismos al producto. A partir de estos estudios se determinaron puntos a muestrear mediante estudios longitudinales. Se abarcaron etapas del cultivo, acondicionamiento y empaque. Para la detección de *Salmonella* y bacterias indicadoras se colectaron 1140 muestras en su mayoría de zanahoria y superficies (Tabla 10).

Tabla 10. Número de muestras, recuperadas de las empresas productoras de zanahoria

Muestras	Abril 2008- Agosto 2008 “A1”	Septiembre 2008- Marzo 2009 “A2”	Junio 2008- Noviembre 2008 “B”	Total
Zanahoria	178	192	160	530
Residuos en maquinaria	28	22	18	68
Agua	76	64	58	198
Superficies	125	117	69	311
Tierra	15	-	18	33
Total	422	395	323	1140

- sin muestras

La investigación en la empresa A cubre dos periodos. El periodo A1 incluye los muestreos realizados cuando el agua para el arrastre y lavado del producto, había sido recirculada desde el reservorio por varias ocasiones. El periodo A2 engloba los muestreos realizados posterior al cambio del agua del reservorio por agua de pozo profundo. Este cambio se plateó por el grado de contaminación microbiana que el agua de reservorio

presentaba. El exceso de materia orgánica impedía la eficacia de germicidas clorados con los cuales labora la empresa.

5.3.1. Microbiología de los materiales muestreados durante el cultivo

Los materiales colectados durante el cultivo para su análisis consistieron principalmente de zanahoria en cultivo y al momento de la cosecha, agua de riego y tierra superficial de las parcelas. Los resultados se resumen en términos de mediana y límites. La media aritmética tiene escaso valor debido a los casos extremos que llegan a presentarse desplazando considerablemente el valor central de las series para cada producto y empresa. La mediana es más apropiada ya que es una medida de posición central del conjunto de datos ordenados de menor a mayor (Ruiz, 2007).

5.3.1.1. Incidencia de *E. coli* y *Salmonella* en muestras de zanahoria durante el cultivo

Diversas frutas y verduras se han visto involucradas como vehículos de microorganismos patógenos en brotes de enfermedad. En general los estudios publicados indican bajos porcentajes detectados (Beuchat, 1996; Thunberg *et al.* 2002; Ruiz, 2007; García, 2009). Por otro lado, la distribución de los microorganismos es cambiante y varía de un producto a otro (Beuchat *et al.* 1996).

Los niveles de contaminación por *E. coli* en zanahoria para ambas empresas son similares. Los contenidos tanto en cultivo como en la cosecha fueron bajos, con límites de <1.4 hasta 28 y de <1.4 hasta 118 NMP/zanahoria, respectivamente (Tabla 11). Cabe resaltar que el valor de 118 NMP fue único. En general, para las dos empresas las medianas del indicador se mantuvieron por debajo del límite de detección (<1.4 NMP/zanahoria). Pese a ello es perceptible que la mayor incidencia se presentó en la zanahoria ya cosechada.

Al respecto García-Villanova (1987) encontraron en hortalizas cultivadas en campo un promedio de 12 NMP/g de *E. coli*, nivel alto comparado con los de este estudio. Por otro lado, la incidencia global del indicador es elevada (14.6 %) si se compara con reportes de otros investigadores. Por ejemplo, Mukherjee *et al.* (2004) muestrearon 8

empresas de cultivo tradicional y detectaron 1.6% de positividad para *E. coli*. Thunberg *et al.* (2002) detectaron sólo 1 de 50 muestras positivas para *E. coli*; estas muestras incluían germinado de alfalfa, brócoli, coliflor, lechuga y cilantro.

Tabla 11. *E. coli* en zanahoria en dos empresas durante las etapas de cultivo y cosecha

Etapa	Empresa			
	A		B	
	+/N (%) *	NMP/unidad	+/N (%)	NMP/unidad
Cultivo	3/25 (12) a	<1.4 ** (<1.4 - 16.4)	4 / 33 (12) a	<1.4 (<1.4-28)
Cosecha	5 / 25 (20) b	<1.4 (<1.4 -28)	3 / 21 (14.3) a	<1.4 (<1.4-118)

* Muestras positivas/muestras analizadas

** Mediana (límites)

a, b: Letras iguales no hay diferencia significativa ($P \leq 0.5$) entre empresas y etapas.

La incidencia de *Salmonella* fue baja; sólo se detectó en una ocasión en zanahoria colectada durante la cosecha en parcelas de la empresa B (Tabla 12). El patógeno se cuantificó mostrando un contenido de 0.6 NMP de *Salmonella*/zanahoria. Aunque el contenido y la incidencia del patógeno fueron bajos, su sola presencia en el producto resulta inaceptable. Cabe mencionar que la muestra positiva se colectó en un lugar cercano a donde se detectaron heces fecales en el muestreo anterior.

Tabla 12. *Salmonella* en zanahoria colectada en campo, empresa A y B

Etapa	Empresa			
	A		B	
	+/N (%)*	NMP/unidad	+/N (%)	NMP/unidad
Cultivo	0/25 (0) a	ND	0/33 (0) a	ND
Cosecha	0/25 (0) a	ND	1 /21 (4) b	1.4

* Muestras positivas/muestras analizadas

ND No determinado

a, b: Letras iguales no hay diferencia significativa ($P \leq 0.5$) entre empresas.

Beuchat (1996) menciona que las fuentes de contaminación pueden ser diversas y operar de forma simultánea o alternada. Durante el cultivo son de interés el suelo, el agua de riego, la presencia de materia fecal humana o animal, el tipo de abono utilizado, el aire y las personas que cultivan las tierras. Basados en lo anterior se procedió a identificar potenciales fuentes de contaminación en campo.

5.3.1.3. Incidencia de *E. coli* y *Salmonella* en tierra del cultivo

En el cultivo a campo abierto la contaminación de la tierra es inevitable y puede ser transportada por trabajadores a través de los zapatos, animales domésticos y vehículos que llegan a transitar por la periferia de las parcelas. Su microbiología depende de los materiales que sobre ella se depositen y algunos factores como pH, humedad, penetración de aire y luz, y el tipo de flora presente.

En este estudio se colectaron muestras de tierra superficial de cultivo a campo abierto. Ninguna de las empresas emplea abonos orgánicos o compostas. La mayor incidencia de *E. coli* se presentó en muestras de tierra de la empresa B con 44% y medianas por debajo del límite de detección para ambas empresas (Tabla 13).

Tabla 13. *E. coli* (EC) y *Salmonella* en tierra superficial de cultivo colectada en las empresas A y B

Empresa	<i>E. coli</i>		<i>Salmonella</i>	
	+ / N (%) [*]	NMP/g	+/N (%)	NMP/g
A	2/15 (13) a	<1.8** (<1.8-1.8)	1/15 (7) a	<4.1
B	8/18 (44) b	<1.8 (<1.8-17)	1/18 (6) a	15

* Muestras positivas/muestras analizadas

** Mediana (límites)

a, b: Letras iguales no hay diferencia significativa ($P \leq 0.5$) entre empresas.

Salmonella fue detectada una ocasión en la tierra del cultivo de cada empresa. Las respectivas muestras fueron colectadas de orillas de los cultivos cercanos a caminos de terracería por donde circula maquinaria agrícola y trabajadores. Es importante hacer mención del inevitable acceso de animales silvestres a las parcelas de cultivo. En el área donde transitan suelen dejar heces fecales que indudablemente contiene *E. coli* y cierta

frecuencia *Salmonella* como lo reporta Geldreich y Bordner, (1971), ellos aislaron *Salmonella* del intestino de pájaros salvajes en EUA en un 6.3% de incidencia, y *S. typhimurium* del tracto intestinal de 45 gorriones de casa. *Salmonella* también fue aislada de 253 mamíferos silvestres de 7 granjas en EUA (7.5% de la población total).

En un estudio realizado por Rico (2003), donde se colectaron muestras de tierra del exterior e interior de invernaderos en un periodo de 20 meses, se detectaron 6.1 y 3.1% respectivos de *E. coli* y *Salmonella*. Estos resultados muestran claramente qué tan difícil es mantener libre de *Salmonella* la tierra, especialmente ante ambientes no protegidos.

5.3.2. Microbiología del agua de riego y de uso poscosecha.

5.3.2.1. Incidencia de bacterias mesófilas aerobias (BMA's), coliformes totales (CT), fecales (CF), *E. coli* y *Salmonella*.

El agua puede ser un vehículo potencial de microorganismos. De todas las variedades de agua se ha aislado *E. coli*, especies de *Salmonella*, *V. cholerae*, *Shigella* spp., así como *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, *Cyclospora cayetanensis*, *Toxoplasma gondii* y los virus Norwalk y de la hepatitis A (Gast y Holt, 2000). Si bien el enjuague de frutas y verduras después de la cosecha remueve tierra y suciedad adherida a la superficie, también puede ser una fuente de diseminación de la contaminación hacia otros frutos (ECSCF, 2002).

Los CT son el grupo indicador con mayor tradición en la microbiología sanitaria. Son microorganismos de amplia ubicuidad por lo tanto su presencia es común en diversos materiales incluyendo agua y más si estas han sido expuestas al medio ambiente. Su determinación va encaminada al estudio de la sanidad de los materiales analizados. Por otro lado, la presencia de coliformes fecales desde un inicio se asoció con la contaminación fecal en el agua. Greenberg (1992) anota que la determinación de coliformes fecales en el agua tiene valor sobre la posible fuente de contaminación fecal, específicamente en relación con la proximidad de esa fuente (respecto al sitio de detección). Este señalamiento se apoya en la consideración de que se espera que los coliformes que no provienen de la materia

fecal sobrevivirán mejor que los que son nativos de ese ambiente (y para los cuales el agua resulta un medio hostil) (Fernández-Escartín, 2008).

Dentro de los lineamientos para la implementación de BPA y BPM que publicó el SENASICA (2007), se señala que el agua utilizada para uso pre y poscosecha deberá estar libre de peligros microbiológicos. Para esto, deben considerarse como referencia los límites permisibles establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994 que establece como límite <2 CF/100 ml, y es aceptada por la mayoría de los comités de sanidad vegetal. El recuento de CT, CF y *E. coli* son algunos de los estudios utilizados para determinar la calidad microbiológica del agua.

A lo largo del estudio se colectaron 198 muestras de agua, de éstas 59 son de riego y el resto de agua empleada en el área de empaque en diversas operaciones.

Tradicionalmente el agua de riego es reconocida como potencial fuente de contaminación a las hortalizas cultivadas en campo abierto. En general, los valores de BMA's, CT, CF y *E. coli* en agua de riego, son similares en ambas empresas (Tabla 14, 15 y 16). Los CT estuvieron presentes en mayores concentraciones en las 2 empresas con respecto a CF y *E. coli*, respetando así el orden de la definición de cada grupo. *E. coli* se detectó sólo en agua de riego de la empresa B con una incidencia del 7 % y medianas por debajo del límite de detección. En consecuencia el agua de riego no parece tener una influencia importante en la microbiología de la hortaliza.

La presencia de los indicadores como CF y *E. coli* en el agua de riego, aunque discreta, podrían asociarse con una contaminación en el efluente de donde es colectada para su análisis debido a una protección inadecuada contra animales silvestres y tierra. Dentro de los lineamientos exigidos por el SENASICA, para certificar la implementación de BPA's, en una empresa, uno de los requerimientos de mayor exigencia es la protección que se le brinda al pozo a fin de evitar la contaminación del agua.

En el área de empaque, el agua de la cisterna es utilizada para el enfriamiento de la zanahoria y preparación de soluciones germicidas. En general presentó bajos contenidos de los tres grupos indicadores: BMA osciló entre los 2.5 y 3.5 log UFC (Tabla 14), *E. coli* se detectó sólo en dos muestras y al igual que CF presentaron medianas por debajo del límite de detección.

De especial interés fue el análisis del agua del reservorio de la empresa A1. Esta agua presentó niveles de *E. coli* de 10.8 a >3400 con mediana de 215 NMP / 100 mL. El contenido de BMA que presenta es de hasta 11 log de UFC / 100 mL, comparable con la carga mesófila que presenta el agua de charcas fuera de la empacadora por donde transitan los trabajadores. Bien se sabe que la presencia de *E. coli* en agua en ausencia de materia orgánica, expresa claramente una contaminación fecal reciente por su imposibilidad de mantenerse en este material. En el caso de aguas con materia orgánica como la de los reservorios aquí estudiados su presencia puede deberse a una contaminación no reciente con sobrevivencia y eventual desarrollo en la materia orgánica.

Tras el cambio del agua del reservorio en la empresa A, en general el contenido de los grupos indicadores se vio disminuido. *E. coli* se detectó en niveles de <2.8 a 855 NMP/100 mL con mediana de 51 NMP / 100 mL. El agua de enfriamiento y solución germicida también se vieron favorecidas. Antes del cambio de agua presentaban una incidencia de *E. coli* de 60 y 43 %, respectivamente, disminuyendo a 0%.

El agua del reservorio de la empresa B presentó niveles de contaminación bajos a comparación de la A. CT, CF y *E. coli* presentaron medianas de 215, 51 y 10.8 NMP/100 mL, respectivamente. Esta empresa recircula el agua solo por una ocasión, es decir, el agua contenida en el reservorio no tenía más de 24 horas de utilizada y a punto de reutilizarse y desecharse al drenaje. En general el agua que utilizan en esta empresa para el lavado se puede considerar de buena calidad sanitaria ya que tanto en BMA, CT y CF sus niveles son muy bajos y nulos en el caso de *E. coli*. En sí, cumple con la Norma NOM-127-SSA1-1994 para agua de uso y consumo humano.

Cabe destacar que en el agua el recuento de BMA está actualmente enfocado como indicador de la eficiencia de las operaciones de depuración y potabilización, con escasa o nula importancia en relación directa con problemas de salud.

Si bien en agua es importante el contenido de CT y CF, su presencia sobre frutas y hortalizas crudas no necesariamente provee un índice de contaminación fecal (Beuchat, 1998), ya que entre los grupos de bacterias comúnmente encontradas sobre las plantas son positivas a la prueba, *Klebsiella* y *Enterobacter* (Duncan y Razell, 1972; Splittstoesser *et al.* 1980; Zhao *et al.* 1997). En general es difícil encontrar territorios u objetos ajenos a la

contaminación con estos microorganismos. Por lo tanto, el impacto de CT en las hortalizas sobre la salud no es relevante (Johnston *et al.* 2005).

Tabla 14. Contenido de BMA en agua colectada en la empacadora de la empresa A y B.

Muestra	Empresa A		Empresa B
	Periodo A1	Periodo A2	Periodo único B
	Log UFC/100 mL		
Riego	8 ± 0.08* a	ND	7.5 ± 0.6 b
Reservorio	10.4 ± 0.63 a	7.9 ± 0.21 b	8.4 ± 0.37 b
Después de arrastrar zanahoria	11.0 ± 0.21 a	7.7 ± 0.27 b	8.2 ± 0.26 b
Cisterna	3.4 ± 0.59 a	3.1 ± 0.25 a	2.5 ± 0.35 a
Enfriamiento	7.4 ± 0.39 a	5.2 ± 0.35 b	ND
Solución germicida	6.6 ± 0.34 a	4.9 ± 0.60 a	ND
Charcas	11 ± 0.54	ND	ND

a: Letras iguales no hay diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre empresas.

*: media ± error estándar. Comparación de medias por la prueba de tukey

Media: Los datos corresponden a la media de 6 valores.

ND No determinado

Salmonella se determinó en agua de reservorio, en agua después de arrastrar el producto y en charcas. En las primeras dos, el muestreo se realizó por medio de torunda de Moore la cual era sumergida en el agua por 15 días. Con esta técnica el volumen de agua muestreado es muy elevado, aunque imposible de precisar.

El patógeno sólo se detectó en el agua de la empresa A, con frecuencia de 50 % en reservorios, 13 % después de arrastrar la zanahoria y 17 % en charcas (Tabla 17). Si bien es reducido el número de muestras, resulta inadmisibles la incidencia observada. Las charcas se detectaron dentro y fuera de la planta empacadora, estas últimas mayormente en época de lluvias. Las charcas formadas dentro de la planta son ocasionadas por derrames y salpicaduras que provoca la zanahoria al tiempo de lavado, al caer dentro de la tina de desinfección y la de enfriamiento. El problema podría disminuirse o solucionarse recurriendo a cortinas de plástico. Se tiene bien documentada la participación de charcas como reservorio de microorganismos y potenciales fuentes de contaminación ya que por medio de los trabajadores y vehículos es factible un acarreo de los microorganismos que contienen hasta la zona de los productos (Luedtke *et al.* 2003).

Tabla 15. Coliformes totales (CT) y coliformes fecales (CF) en agua colectada en las empresas A (dos periodos) y B (un periodo)

Agua	Empresa A						Empresa B		
	Periodo A1			Periodo A2			Periodo único B		
	N*	CT	CF	N	CT	CF	N	CT	CF
Riego	28	>936** (59.2->936)	<2.8 (<2.8-6.8)		ND	ND	25	>936 (14 - >936)	<2.8 (<2.8 -14)
Reservorio	14	>3400	>3400 (215->3400)	14	855 (215-855)	215 (<2.8-855)	8	215 (<2.8->3400)	51 (<2.8-855)
Después de arrastrar zanahoria	8	>3400 (215->3400)	855 (215->3400)	8	855 (215->3400)	2.8 (<2.8-215)		ND	ND
Cisterna	10	2.8 (2.8-51)	<2.8 (<2.8-10.8)	10	11 (11-51)	<2.8	12	11 (11-51)	<2.8
Enfriamiento	15	215 (51-855)	11 (<2.8-215)	14	51 (11-215)	<2.8		ND	ND
Solución germicida	14	215 (11-855)	<2.8 (<2.8-51)	12	11 (11-215)	<2.8		ND	ND
Charcas	6	855 (215->3400)	215 (51->3400)		ND	ND		ND	ND
Total	95			58			45		

* Muestras analizadas

**Mediana (límites)

ND No determinado

Tabla 16. Incidencia de *E. coli* en agua colectada en las en las empresas A (dos periodos) y B (un periodo)

Agua	Empresa A				Empresa B	
	Periodo A1		Periodo A2		Periodo único B	
	+/N* (%)	NMP/100 mL**	+/N (%)	NMP/100 mL	+/N (%)	NMP/100 mL
Riego	0/28 (0) a	<2.8	ND	ND	2/25 (7) b	(<2.8-2.8)
Reservorio	14/14 (100) a	215 (10.8->3400)	6/14 (43) c	51 (<2.8-855)	5/8 (63) b	10.8 (2.8-855)
Después de arrastrar zanahoria	6/8 (75) a	59 (2.8->3400)	3/8 (38) b	2.8 (<2.8-215)	ND	ND
Cisterna	1/10 (10) a	<2.8 (<2.8-2.8)	0/10 b	<2.8	1/12 (8.3) a	<2.8
Enfriamiento	9/15 (60) a	10.8 (<2.8-215)	0/14 b	<2.8	ND	ND
Solución germicida	6/14 (43) a	<2.8 (<2.8-10.8)	0/12 b	<2.8	ND	ND
Charcas	6/6 (100)	215 (10.8->3400)	ND	ND	ND	ND
Total	42/67 (63)		9/58 (16)		6/20 (30)	

* Muestras positivas/analizadas

**Mediana (límites)

a, b: Letras iguales no hay diferencia significativa ($P \leq 0.5$) entre empresas.

ND No determinado

Tabla 17. Incidencia de *Salmonella* en agua de las empresas A (dos periodos) y B (un periodo)

	Empresa A		Empresa B
	Periodo A1	Periodo A2	Periodo único B
Agua	+/N (%)*	+/N (%)	+/N (%)
Reservorio	7/14 (50) a	0/14 b	0/8 b
Después de arrastrar zanahoria	1/8 (13) a	0/8 b	ND
Charcas	1/6 (17) a	ND	ND
Total	9/28 (32) a	0/22 b	0/8 b

* Muestras positivas/analizadas

a, b: Letras iguales no hay diferencia significativa ($P \leq 0.5$) entre empresas.

ND No determinado

5.3.3. Microbiología de los materiales muestreados en Empacadora

En las empacadoras de A y B, se realizaron estudios longitudinales muestreando zanahorias en las diferentes operaciones del proceso, superficies de maquinaria y equipo, manos, guantes y calzado de trabajadores, agua de reservorio, agua de pozo almacenada en cisterna y solución germicida entre otros materiales esporádicamente encontrados como heces de roedor y residuos en maquinaria.

5.3.3.1. BMA, *E. coli* y *Salmonella* en zanahoria durante el acondicionamiento y empacado.

Se estudió la calidad microbiológica de la zanahoria mediante el monitoreo longitudinal a través del recuento de BMA, *E. coli* y *Salmonella*. Se analizaron unidades experimentales compuestas de tres zanahorias. Los recuentos de BMA se muestran en la Tabla 18 para la empresa A (dos etapas) y la empresa B.

La carga bacteriana mesófila en la zanahoria antes de descargar del camión en la empresa A fue menor ($P \leq 0.05$) que B en aproximadamente 1 log. En el periodo A1 conforme la zanahoria es descargada del camión por medio de arrastre con agua, el contenido de BMA aumenta significativamente ($P \leq 0.05$) en 2.5 log. El lavado y la desinfección disminuyen el contenido del grupo indicador en casi 3 log; desafortunadamente, al empacar la zanahoria, la población microbiana se eleva al que presentaba antes del acondicionamiento.

Son diversos los factores que propician la recontaminación de la zanahoria después de la desinfección. Por ejemplo, cuando es llevada por bandas de transporte hasta el volante de empaque vuelve a ser seleccionada por tamaño de forma manual. En este transcurso la zanahoria entra en contacto con manos y guantes de trabajadores y con la superficie de maquinaria y equipo. Una característica importante de la empresa A es su falta de atención a la sanidad del equipo y superficies diversas que entran en contacto con el producto. Por otro lado, no todos los trabajadores desinfectan sus guantes o manos adecuadamente. Por lo anterior, no se puede esperar que la zanahoria mantenga la carga mesófila igual que después de la desinfección.

En la empresa A, después del cambio de agua del reservorio, el contenido de BMA en la zanahoria al empacar es significativamente menor ($P \leq 0.05$) que la del producto antes del cambio del agua, si bien entonces, el acondicionamiento de la zanahoria fue más efectivo, reduciendo el contenido de BMA en más de 2 log.

A diferencia de la empresa A, la empresa B con el solo lavado consigue una disminución significativa ($P \leq 0.05$) de BMA en la zanahoria (de 8.3 a 6.1 log), pero, la carga se incrementa en las operaciones posteriores de forma que en el empaque la zanahoria presenta un contenido de 7.8 log.

Tabla 18. Medias de BMA en zanahoria muestreada en cinco etapas del proceso en las empacadoras A (dos periodos) y B (un periodo)

Muestra	Empresa A		Empresa B
	Periodo A 1	Periodo A 2	Periodo único B
	Log UFC/zanahoria		
En el camión	7.1 ± 0.38* a	8.2 ± 0.29 b	8.3 ± 0.05 b
Al arrastrar del camión	9.4 ± 0.8 b	7.9 ± 0.27 a	8.1 ± 0.18 a
Lavada	8.0 ± 0.26 a	7.0 ± 0.18 b	6.1 ± 0.24 c
Desinfectada	6.7 ± 0.54 b	5.8 ± 0.27 a	ND
Al empacar	7.4 ± 0.55 b	5.9 ± 0.75 a	7.8 ± 0.33 b

a: Letras iguales no hay diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre columnas.

*: log medias ± error estándar.

Comparación de medias por la prueba de Tukey.

ND No determinado

Algunos investigadores reportan resultados similares a los de este trabajo. Iturriaga (1999) investigó el comportamiento de BMA en aguacates antes de procesar y en todas las operaciones de su procesamiento (enjuagado, desinfección, tratamiento térmico y congelado) hasta la obtención de guacamole. La carga inicial mostrada por los frutos antes del procesado fue de 6 log; después del enjuagado el contenido microbiano es mayor que en el aguacate recibido; el efecto se asoció con el agua de enjuague como una fuente de contaminación. Aún con la desinfección y el tratamiento térmico, la carga final del aguacate antes de ser partido fue tan solo medio logaritmo menor que la carga inicial. Si bien los niveles de BMA no se relacionan con la condición de inocuidad, la demostración

de un número excesivo sugiere fundamentalmente la necesidad de revisar de principio a fin las condiciones sanitarias de su manejo.

Como es sabido, la presencia de *Salmonella* en los alimentos es una manifiesta expresión de la exposición directa e indirecta del alimento a la materia fecal humana o animal (Fernández-Escartín, 2000). Ordinariamente su frecuencia en la materia fecal de los animales es baja (<15 %) (Galton *et al.* 1954) y se hace necesario recurrir a un microorganismo que verdaderamente se asocie con la presencia de materia fecal, independientemente que contenga microorganismos patógenos. La detección de *E. coli* sugiere presencia de bacterias enteropatógenas como *Salmonella*. Eventualmente *E. coli* llega a depositarse en la maquinaria y equipo y formar un reservorio. Aunque finalmente es cuestionable su origen fecal, sigue siendo un índice de mal saneamiento.

Se colectaron 491 muestras compuestas de tres zanahorias cada una. *E. coli* se detectó en zanahoria colectada de todas las operaciones (Tabla 19). La mayor contaminación se detectó en la empresa A. La incidencia del indicador en la zanahoria antes de entrar al proceso en las dos empresas (A: 35%; B: 15%), fue menor que la detectada después del arrastre (A: 100%; B: 71%). Tal parece que el agua del reservorio con la que se arrastra la zanahoria opera como una fuente de contaminación al producto. En la empresa A se aplica una doble desinfección, lo que disminuye la incidencia de *E. coli* de 100% con niveles de 1.4 a > 1247 NMP/zanahoria antes de la desinfección, a apenas 73% y niveles de 1.4 a 524 NMP/zanahoria al empacar. Los tratamientos aplicados no logran la disminución total de *E. coli* en la zanahoria; los factores que pueden intervenir negativamente son varios. La solución germicida usada en la desinfección es a base de cloro. Es bien sabido que el cloro pierde efecto en presencia de materia orgánica y en el proceso de acondicionamiento de la zanahoria, la presencia de tierra y materia orgánica es casi inevitable. Adicionalmente, las prácticas de operación aplicadas son inadecuadas y no permiten una disminución de la carga de *E. coli*. Por ejemplo, es común observar zanahoria en el piso; se supone que en estos casos la zanahoria es recogida y recirculada desde el lavado. No siempre lo hacen así; en ocasiones se recoge con escoba y recogedor y la vuelven a colocar en la banda de empaque junto con la zanahoria desinfectada. Este hecho es completamente reprobable ya que permite la recontaminación del producto. En las

muestras de zanahoria colectadas del piso, el 78% mostró presencia del indicador con niveles desde 1.4 a 313.4 NMP/zanahoria.

En la empresa A, *Salmonella* no fue detectada en zanahoria antes de entrar al proceso; sin embargo, después del arrastre y lavado, la incidencia del patógeno fue de hasta 33% con niveles de <1.4 a 521 NMP/unidad experimental (Tabla 20). La incidencia disminuyó con la desinfección, y posterior a esta etapa hay una recontaminación, de forma que al empacar, el patógeno se detecta en 7% de las muestras con contenidos cercanos a 1.4 NMP/zanahoria.

Tras el cambio de agua del reservorio de la empresa A, la incidencia de *E. coli* en la zanahoria al empacar disminuyó de 73 % y contenidos entre 1.4 y 524 NMP/zanahoria a 29 % y niveles entre 1.4 a 79 NMP/zanahoria. De igual forma la incidencia de *Salmonella* en la zanahoria al empacar disminuyó de 7 a 0 %.

La empresa B mantuvo una incidencia de *E. coli* mucho menor que la empresa A (Tabla 19). Al llegar la zanahoria a la empresa, la cifra de 15% se incrementa a 71% después del arrastre del camión. Sin embargo, con el lavado la incidencia en zanahoria lista a empacar disminuye a sólo 9%. Es claro que el agua de pozo profundo con que se lava el producto en esta empresa, repercute directamente con la disminución de *E. coli*. Resulta interesante que a pesar de no aplicar desinfección en esta empresa, los valores tanto de *E. coli* como de *Salmonella* son mucho menores a los de la empresa A. Hay que resaltar que la empresa B esta más apegada al manual de las buenas prácticas sanitarias en el que se rige SENASICA y los centros CESAVE's. Si bien no aplican desinfección, tratan de que el lavado sea efectivo en la disminución de contaminantes físicos y microbiológicos y mantienen prácticas sanitarias de operación.

Por otro lado, la incidencia de *Salmonella* en la zanahoria de esta misma empresa (B) es mayor antes de que el producto entre al proceso (9%), disminuyéndose considerablemente a 1.7% en la zanahoria lista a empacar (Tabla 20). Tal parece que la hortaliza viene ya contaminada por *Salmonella* desde el campo, a diferencia de la empresa A, en la cual no se detecta el patógeno hasta que se inicia el acondicionamiento.

Estos resultados no se pueden tomar como definitivos en todas las empresas de zanahoria. Son diversas las condiciones en las que trabaja cada una. En este caso por ejemplo, el agua usada en el arrastre de la hortaliza es de mala calidad microbiológica lo

que corresponde sólo al caso del reservorio analizado y no se puede extrapolar a otros campos que no se muestrearon, y mucho menos a otras empresas.

La incidencia de *Salmonella* y *E. coli* en las zanahorias muestreadas es alta en comparación con la reportada para otras verduras. Ruíz (2007) determinó *E. coli* y *Salmonella* en 284 muestras de lechuga, chicoria y jitomate este último en cultivo e invernadero encontrando una incidencia global de 7.8% para *E. coli* y 5% para *Salmonella*. Beuchat (1996) reporta una incidencia de *Salmonella* de 8% en frutas y verduras. Los valores anteriores son significativamente más bajos que los encontrados en este estudio.

Tabla 19. Incidencia y contenido de *E. coli* en zanahoria colectada en las empresas A (dos periodos) y B (un periodo)

Zanahoria	Empresa A				Empresa B	
	Periodo A1		Periodo A2		Periodo único B	
	+/N (%) [*]	NMP/unidad	+/N (%)	NMP/unidad	+/N (%)	NMP/unidad
Antes de descargar	6/26 (23) a	<1.4** (<1.4-28)	7/24 (29) a	<1.4 (<1.4-3.9)	5/33 (15) a	1.4 (<1.4-18.7)
Al arrastrar del camión	28/28 (100) a	79 (1.4->1247)	8/15 (53) b	18.4 (<1.4-1247)	15/21 (71) a	8.3 (<1.4-1247)
Lavada	19/19 (100) a	18.7 (1.4->1247)	8/18 (44) b	3.9 (<1.4-79)	6/47 (13) c	2.1 (<1.4-103.4)
Desinfectada	10/14 (71) a	1.4 (<1.4-79)	6/13 (46) b	1.4 (<1.4-79)	ND	ND
Enfriada	11/14 (78) a	3.9 (<1.4-118.4)	2/13 (15) b	<1.4 (<1.4-<1.4)	ND	ND
Al empacar	22/30 (73) a	1.4 (<1.4-524)	6/21 (29) b	1.4 (<1.4-79)	5/59 (9) c	1.4 (<1.4-78.9)
Almacenada	5/8 (63) a	2.7 (<1.4-79)	5/9 (56) a	1.4 (<1.4-79)	ND	ND
Muestreada del piso	6/8 (75) a	26.4 (<1.4-313.4)	5/6 (83) a	3.9 (<1.4-4.2)	ND	ND
Total	107/147 (73)		47/119 (40)		31/160 (19)	

* Muestras positivas/analizadas

**Mediana (límites)

a, b: Letras iguales no hay diferencia significativa ($P \leq 0.5$) entre empresas.

ND no determinado

Tabla 20. Incidencia de *Salmonella* en zanahoria colectada en las empresas A (dos periodos) y B (un periodo)

Zanahoria	Empresa A				Empresa B	
	Periodo A1		Periodo A2		Periodo único B	
	+/N (%) [*]	NMP/unidad	+/N (%)	NMP/unidad	+/N (%)	NMP/unidad
Antes de descargar	0/26 a	ND	1/24 (4) a	<1.4	3/33 (9) b	1.4 (<1.4-18.7)
Al arrastrar del camión	8/28 (28) a	31 ^{**} (<1.4-521)	2/15 (13) b	<1.4	2/21 (9) b	<1.4
Lavada	5/19 (26) a	7 (<1.4-31)	2/18 (11) a	(1.4-7)	1/47 (2.1) b	<1.4
Desinfectada	0/14 a	ND	0/13 a	ND	ND	ND
Enfriada	1/14 (7) a	<1.4	1/13 (8) a	<1.4	ND	ND
Al empacar	2/30 (7) a	<1.4	0/21 b	ND	1/59 (1.7) a	<1.4
Total	16/131 (12)		6/104 (6)		7/160 (4)	

* Muestras positivas/analizadas

**Mediana (límites)

a, b: Letras iguales no hay diferencia significativa ($P \leq 0.5$) entre empresas.

ND no determinado

5.3.3.2. Incidencia de BMA, *E. coli* y *Salmonella* en superficies de maquinaria y equipo

El saneamiento de maquinaria y equipo es considerada una de las prácticas sanitarias más importantes en una planta empacadora (SENASICA, 2009). Para este fin son de uso general agua, detergente y germicidas. Ambas empresas cuentan con un programa de saneamiento a maquinaria y equipo, pero su correcta ejecución no es la regla. Lo más confiable para verificar la eficiencia de los tratamientos aplicados es recurrir a análisis microbiológicos.

El grupo de las BMA nos informa de manera general sobre las condiciones higiénicas prevalentes durante el procesamiento. Su determinación permite verificar la eficiencia de los tratamientos aplicados, revela el incumplimiento de una norma de trabajo y la calidad microbiológica de los alimentos, entre otras (Fernández-Escartín, 2000).

Durante el estudio se analizó el contenido de BMA en superficies antes y después de su lavado y desinfección. Según los resultados obtenidos la empresa B es la más apegada a la programación y ejecución de saneamiento de sus instalaciones. En esta empresa, la limpieza del área de trabajo, lavado y desinfección de maquinaria se realiza antes y después de cada turno. El lavado consiste en un cepillado empleando agua y detergente con énfasis en lugares de difícil acceso y donde se pueden acumular residuos. Para el lavado utilizan detergentes comerciales y para la desinfección, una rotación de germicidas con hipoclorito de sodio (200 ppm), ácido peracético (150 ppm) y sales cuaternarias de amonio (300 ppm) cada seis meses.

En la empresa A el saneamiento de la maquinaria y equipo no es regular y cuando se realiza no es de la forma adecuada. En esta empresa las escobas para barrer el piso son empleadas también para el cepillado de la maquinaria y para retirar los residuos visibles en las superficies de esta. Eventualmente realizan un lavado con agua a presión para retirar residuos incrustados en la maquinaria. Lo más común y frecuente en esta empresa, es asperjar solución germicida a base de ácido tricloroisocianúrico en superficies en general.

Bajo el esquema de trabajo en que laboran ambas empresas, la carga de BMA en la empresa B antes del lavado y desinfección, varió de 3.1 log UFC en dos manos o guantes, a 6.4 log UFC/100 cm² para superficies de bandas transportadoras (Tabla 21). En la empresa A los límites fueron de 5.2 log UFC/100 cm² en cajas de almacenaje, hasta 8.7 log UFC/100 cm² para superficie de la alfombra del carrusel donde se empaca la zanahoria.

Con el saneamiento aplicado, la carga del grupo indicador disminuye en las superficies de ambas empresas, especialmente en las bandas transportadoras, guantes y manos. Es evidente que las superficies de la empresa B presentan una carga de BMA muy por debajo de las de la empresa A, situación congruente con el nivel de saneamiento aplicado.

Tabla 21. BMA en superficies en empacadora de empresa A y B antes y después del saneamiento

Muestras	Empresa A		Empresa B	
	Antes	Después	Antes	Después
Bandas transportadoras	7.6 ± 0.85* a	6.4 ± 1.1 b	6.4 ± 0.93 a	3.8 ± 1.08 b
Carrusel de empaque	8.7 ± 0.46 a	8.3 ± 0.78 a	-	-
Manos/Guantes en preselección	7.8 ± 0.82 a	4.4 ± 0.67 b	6.2 ± 1.02 a	4.8 ± 0.36 b
Manos/Guantes en empaque	5.9 ± 0.89 a	4.7 ± 0.73 ab	3.1 ± 0.90 a	2.8 ± 0.56 a
Cajas de plástico	5.2 ± 1.31 a	4.6 ± 0.64 ab	4.6 ± 0.49 a	2.1 ± 0.73 b

*Medias de seis valores ± desviación estándar.

a: Letras iguales no hay diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre columnas.

Comparación de medias por la prueba de Tukey

- No hay carrusel de empaque

El uso de guantes es actualmente uno de los requisitos para los trabajadores que entran en contacto directo con los alimentos. Tal es el caso de las dos empresas estudiadas; no obstante, no todos los trabajadores siguen esta indicación. La empresa A es la más alejada de los protocolos; sólo el 20% de los trabajadores utilizan guantes, mientras en la empresa B, más del 80%. Cabe destacar que el contenido de mesófilos entre manos y guantes no muestra una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) (Tabla 22). El uso de guantes no garantiza que los trabajadores dejen de transferir microorganismos a las zanahorias. De hecho con o sin guantes los trabajadores pueden contribuir a dicha transferencia. Esto no significa que el uso de guantes sea innecesario, aunque la prevención de la contaminación del trabajador al producto y viceversa, exige un uso adecuado de ellos incluyendo el saneamiento correspondiente.

Las superficies dentro de las industrias suelen albergar múltiples microorganismos. Si se les permite, los microorganismos pueden multiplicarse y las superficies funcionar como una fuente de contaminación masiva hacia los productos, en este caso, las zanahorias.

Tabla 22. BMA en manos y guantes en dos etapas, empresa A.

Etapa	Manos	Guantes
	Log UFC/2 manos o guantes	
Preselección	7.3 ± 0.74* a	6.9 ± 0.86 a
Empaque	4.9 ± 0.61 b	5.2 ± 0.93 b

*Medias de seis valores ± desviación estándar.

a: Letras iguales no hay diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre columnas y filas.

En términos globales, la empresa A mostró la mayor incidencia y contenido del indicador y del patógeno en estos materiales con porcentajes de 50 y 25% en niveles de <4.1 a 521 NMP/100 cm² y <4.1 a 15 NMP/100 cm², respectivamente, antes del cambio de agua del reservorio, y de 39% y 8% después del cambio con medianas por debajo del límite de detección tanto para *E. coli* como para *Salmonella* (Tablas 23 y 24). Las superficies de la empresa B mostraron una incidencia de *E. coli* del 22% con niveles de <4.1 a 15 NMP/100 cm² y de *Salmonella* de 4% y mediana por debajo del límite de detección. Dentro de las superficies con mayor incidencia de ambos microorganismos se encuentra la lavadora y manos-guantes de trabajadores para ambas empresas, y en la empresa A en particular las superficies del carrusel de empaque. Es notorio que las superficies de la empresa B mantuvieron valores para *E. coli* y *Salmonella* significativamente menores a los de la empresa A.

Como ya se mencionó, *E. coli* es prototipo indicador de contaminación fecal; sin embargo, eventualmente este microorganismo ya estando en la maquinaria sobrevive y se multiplica formando reservorios que funcionan como una fuente de contaminación hacia los alimentos. Su presencia ya no es indicador de contaminación fecal directa pero sigue siendo un indicador de mal saneamiento. La alta incidencia de *E. coli* y *Salmonella* en las superficies, especialmente de la empresa A revela la falta de higiene que en esta se tiene. Tomando en cuenta que los microorganismos presentes en las superficies de la maquinaria pueden contaminar la zanahoria, es imperativo se establezca un programa de higiene en toda la planta, así como la verificación de su correcta y constante aplicación. No hay que dejar de lado que más que el lavado y desinfección, que son tratamientos correctivos, es necesaria la concientización del personal que en la planta labora.

Tabla 23. Incidencia de *E. coli* en superficies en las empresas A (dos periodos) y B (un periodo)

Muestras	Empresa A				Empresa B	
	Periodo A1		Periodo A2		Periodo único B	
	+/N (%)*	NMP/unidad	+/N (%)	NMP/unidad	+/N (%)	NMP/unidad
Bandas transportadoras	4/20 (20) a	4.1** (<4.1-521)	12/24 (50) b	<4.1 (<4.1-15)	5/19 (26) a	<4.1 (<4.1-15)
Lavadora	7/9 (78) a	4.1 (<4.1-470)	5/22 (45) b	4.1 (<4.1-15)	4/13 (31) b	<4.1 (<4.1-51)
Seleccionador por tamaño	7/12 (58) a	81 (<4.1-521)	4/10 (40) a	<4.1 (<4.1-31)	0/12 b	<4.1
Carrusel de empaque	11/11 (100) a	4.1 (<4.1-521)	11/25 (44) b	<4.1 (<4.1-131)	ND	ND
Manos-guantes preselección	6/14 (43) a	<4.1 (<4.1-131)	3/16 (19) b	<4.1 (<4.1-15)	ND	ND
Manos-guantes empaque	7/18 (39) a	<4.1 (<4.1-31)	2/19 (11) b	<4.1 (<4.1-4.1)	3/10 (30) a	<4.1 (<4.1-15)
Total	42/84 (50)		37/116 (39)		12/54 (22)	

* Muestras positivas/analizadas

** Mediana (límites); Número más probable por 100 cm², 2 manos, 2 guantes.

a, b: Letras iguales no hay diferencia significativa ($P \leq 0.5$) entre empresas.

ND No determinado

Tabla 24. Incidencia de *Salmonella* en superficies en las empresas A (dos periodos) y B (un periodo)

Muestras	Empresa A				Empresa B	
	Periodo A1		Periodo A2		Periodo único B	
	+ /N (%)*	NMP/unidad	+ /N (%)	NMP/unidad*	+/N (%)	NMP/unidad*
Bandas transportadoras	4/20 (20) a	4.1** (<4.1-15)	1/24 (4) b	<4.1	1/19 (5) b	<4.1
Lavadora	2/9 (22) a	(<4.1-15)	1/22 (4.5) b	<4.1	1/13 (8) b	<4.1
Seleccionador por tamaño	1/12 (8) a	<4.1	1/10 (10) a	<4.1	0/12 b	ND
Carrusel de empaque	6/11 (55) a	4.1 (<4.1-4.1)	3/25 (12) b	<4.1 (<4.1-4.1)	ND	ND
Manos-guantes preselección	4/14 (29) a	4.1 (<4.1-15)	4/16 (25) a	<4.1 (<4.1-15)	ND	ND
Manos-guantes empaque	4/18 (22) a	<4.1 (<4.1-4.1)	0/19 b	ND	0/10	ND
Total	21/84 (13)		10/116 (8)		2/54 (4)	

* Muestras positivas/analizadas

** Mediana (límites); Número más probable por 100 cm², 2 manos, 2 guantes.

a, b: Letras iguales no hay diferencia significativa ($P \leq 0.5$) entre empresas.

ND No determinado

5.3.3.3. Incidencia de *E. coli* y *Salmonella* en residuos de zanahoria encontrados en maquinaria.

Las zanahorias pueden contaminarse por contacto con el equipo, cuya sanidad no es fácil de implementar con eficacia (Koneko *et al.* 1999). Más aun, cuando en el equipo permanecen residuos de la propia hortaliza que sirven como fuente de nutrientes a multitud de microorganismos incluyendo patógenos.

E. coli se detectó en todos los residuos analizados, con una mayor incidencia en la empresa A (Tabla 25). *Salmonella* también se detectó en residuos incrustados en la maquinaria de la empresa A en todas las etapas durante el periodo A1 (Tabla 26). Estos residuos llegan a permanecer por mucho tiempo, pues el lavado que se da al equipo no es ni frecuente ni correcto. El que estos residuos contengan el patógeno aunque sea en baja cantidad y permanezcan por periodos largos los convierte en un posible reservorio del germen y una fuente constante de contaminación hacia el producto. Al realizarse el cambio de agua del reservorio, se aprovechó para efectuar una limpieza completa de todo el equipo. Posteriormente el patógeno ya no se detectó en los pocos residuos que se iban incrustando nuevamente en la maquinaria. En la empresa B no se detectó *Salmonella* en ninguno de los residuos (por cierto fueron escasos) lo que es congruente con el saneamiento realizado en el equipo antes y después de cada turno de trabajo.

Existen estudios donde se señala la gran sobrevivencia de los microorganismos en superficies de frutas y hortalizas, la cual seguramente es mayor al exponerse los nutrientes que naturalmente contienen, como es el caso de los residuos. Madden (1992) observó que a temperatura ambiente *Salmonella* se mantiene viable en la lechuga 21 a 28 días, mientras que el período para *V. cholerae* es de 3 a 5 días; los tiempos respectivos a 2 a 4 °C son 42 a 56 y 7 a 14 días. La mayor sobrevivencia de *Salmonella* en ambas condiciones también ocurre en la col y zanahoria. *S. flexneri* sobrevive en zanahoria, coliflor, apio, rábanos y brócoli almacenados a 5, 10 °C y temperatura ambiente durante más de 7 días (Rafil *et al.* 1995).

Tabla 25. Incidencia de *E. coli* en residuos de zanahoria colectados en las empresas A (dos periodos) y B (un periodo).

Muestras	Empresa A				Empresa B	
	Periodo A1		Periodo A2		Periodo único B	
	+/N (%) [*]	NMP/g	+/N (%)	NMP/g	+/N (%)	NMP/g
Residuos en lavadora	7/7 (100) a	115** (9->1923)	2/7 (28) b	<9 (<9-114)	4/13 (31) b	<9 (<9 - 9)
Residuos en hidrogenfriador	4/5 (80) a	24 (<9-484)	ND	ND	ND	ND
Residuos en seleccionador de tamaño	7/8 (88) a	24 (<4.1-521)	1/5 (20) b	<9 (<9-24)	ND	ND
Residuos en carrusel de empaque	7/8 (88) a	9 (<9->1923)	1/4 (25) b	9 (<9-114)	ND	ND
Total	25/28 (89)		4/16 (25)		4/13 (31)	

* Muestras positivas/analizadas

** Mediana (límites)

a, b: Letras iguales no hay diferencia significativa ($P \leq 0.5$) entre empresas.

ND No determinado

Tabla 26. Incidencia de *Salmonella* en residuos de zanahoria colectados en las empresas A (dos periodos) y B (un periodo).

Muestras	Empresa A				Empresa B	
	Periodo A1		Periodo A2		Periodo único B	
	+/N (%) [*]	NMP/g	+/N (%)	NMP/g	+/N (%)	NMP/g
Residuos en lavadora	3/7 (43) a	<2.1 ^{**} (<2.1-9)	0/7 b	ND	0/13 b	ND
Residuos en hidrogenfriador	2/5 (40)	<2.1	ND	ND	ND	ND
Residuos en seleccionador de tamaño	3/8 (37) a	<2.1 (<2.1-9)	0/5 b	ND	ND	ND
Residuos en carrusel de empaque	6/8 (75) a	9 (<2.1-9)	0/4 b	ND	ND	ND
Total	14/28 (50)		0/16		0/13	

* Muestras positivas/analizadas

** Mediana (límites)

a, b: Letras iguales no hay diferencia significativa ($P \leq 0.5$) entre empresas.

ND No determinado

5.3.3.4. Incidencia de *E. coli* y *Salmonella* en materiales diversos

La presencia de *E. coli*, y por ende de contaminación fecal, fue evidenciada en diversos materiales incluyendo cajas de empaque, zapatos, tapete sanitario, trampas de roedores, manija del servidor de papel seca manos y heces fecales (Tabla 27).

En la empresa B no se detectó *Salmonella* en ninguno de los materiales listados en la Tabla 28. De forma contrastante, la empresa A mostró presencia del germen desde el calzado de los trabajadores hasta el tapete sanitario con germicida lo cual es de sorprenderse pues se trata de un material que se utiliza justamente para la desinfección del calzado de los trabajadores. Su detección pone en evidencia que los tratamientos de desinfección no están funcionando. Los zapatos de los trabajadores rara vez han sido mencionados como vehículo de contaminación en los sitios de producción de alimentos (Favero *et al.* 1996) lo que no quiere decir que no funcionen. De hecho en este estudio se detectó la presencia de *Salmonella* en 12 de 17 pares de calzado analizados.

Otro hecho relevante es el hallazgo de *Salmonella* en la manija del servidor de papel para secar las manos. Un estudio realizado por Pether y Gilbert (1991), muestra que el lavado de manos con jabón y agua, seguido por un secado con toallas de papel, reduce el riesgo de transferencia de microorganismos de la piel hacia los alimentos. Sin embargo, por bien que se laven algunos trabajadores las manos, si algunos lo hacen indebidamente, el beneficio de los primeros pierde valor, pues basta con tocar la palanca del servidor de papel para secar las manos y contaminarse con *Salmonella*.

Por otro lado, a pesar de que ambas empresas cuenta con trampas y cebos para roedores e insectos, se encontraron heces fecales al parecer de roedor dentro del área de empaque en las cuales *Salmonella* fue detectada en cantidades que rebasaron el límite de la técnica. Debe reconocerse que tanto los trabajadores como los animales constituyen una fuente de contaminación y diseminación del patógeno en el producto y áreas de la empresa.

Tabla 27. Incidencia de *E. coli* en diversos materiales muestreados en las empresas A (dos periodos) y B (un periodo)

Muestras	Empresa A				Empresa B	
	Periodo A1		Periodo A2		Periodo único B	
	+ (%) [*]	NMP	+ (%)	NMP	+ (%)	NMP
Suelas zapato	2/8 (25) a	<4.1 ^{**} (<4.1-31)	3/9 (33) a	<4.1 (<4.1-4.1)	1/10 b	<4.1 (<4.1-31)
Tapete sanitario	3/8 (38) a	<4.1 (<4.1-31)	3/6 (50) a	4.1 (<4.1-131)	ND	ND
Trampa roedores	5/6 (83) a	15 (<4.1-131)	5/5 (100) a	<4.1 (<4.1-15)	0/8 b	ND
Manija servidor de papel seca manos	1/3 (33) a	31	1/1 (100) b	131	ND	ND
Heces fecales	3/3 (100) a	521 (23 - >2071)	1/1 (100) a	>2071	ND	ND
Total	14/28 (50)		13/22 (59)		1/18 (10)	

* Muestras positivas/analizadas

** Mediana (límites); NMP por 2 suelas, 100 cm², g.

a, b: Letras iguales no hay diferencia significativa ($P \leq 0.5$) entre empresas.

ND No determinado

Tabla 28. Incidencia de *Salmonella* en diversos materiales muestreados en las empresas A y B

Superficies	Empresa A			
	Periodo A1		Periodo A2	
	+/N (%) [*]	NMP	+/N (%)	NMP
Suelas zapato	7/8 (88) a	4.1 ^{**} (<4.1-15)	5/9 (55) a	4.1 (<4.1->2072)
Tapete sanitario	1/8 (13) a	4.1	1/6 (17) a	4.1
Trampa roedores	1/6 (16) a	<4.1	1/5 (20) a	15
Manija servidor de papel seca manos	1/3 (33) a	<4.1	1/1 (100) b	<4.1
Heces fecales	2/3 (67) a	(2072 - >2072)	1/1 (100) a	2072
Total	12/28 (43)		9/22 (41)	

* Muestras positivas/analizadas

** Mediana (límites); NMP por 2 suelas, 100 cm², g.

a, b: Letras iguales no hay diferencia significativa ($P \leq 0.5$) entre empresas.

5.3.4. Incidencia de *E. coli* y *Salmonella* según la época del año

Es bien sabido que en ciertas épocas del año, la frecuencia de enfermedades respiratorias en la población se incrementan de manera significativa. Lo mismo sucede con las enfermedades entéricas. Nuestro estudio se realizó a lo largo de un año, y se abarcaron las tres principales épocas del año como son la calurosa, lluviosa y fría en los meses de marzo-junio, julio-octubre y noviembre-febrero, respectivamente.

Tanto *E. coli* como *Salmonella* aparecieron con mayor frecuencia en la época calurosa seguida de la lluviosa y por último la fría, aunque sólo la primera es estadísticamente diferente a las otras dos ($P \leq 0.05$) (Tabla 29). Los datos pueden estar influenciados por el cambio del agua de reservorio en la empresa A, que ocurrió en agosto. A partir de esta fecha la incidencia de ambos microorganismos disminuyó significativamente. Por otra parte resulta pertinente mencionar el hecho de que en época de lluvias y época fría, los muestreos fueron menos frecuentes ya que la cosecha de zanahoria es mínima en estas épocas por la podredumbre que suele afectar la hortaliza a causa del exceso de humedad en la tierra y dificultades para cosecharla.

Generalmente *E. coli* y *Salmonella* tienden a morir en materiales como agua y tierra; ocasionalmente llegan a sobrevivir y desarrollar según los factores ambientales y condiciones de los propios microorganismos. Existen estudios realizados por otros autores (Ruiz, 2007; García, 2009) con tendencias similares a las mostradas en este estudio por *E. coli* y *Salmonella* entre una época y otra.

Tabla 29. Frecuencia de detección de *E. coli* y *Salmonella* según tipo de muestra y época del año

Material	N	Microorganismo	Época		
			Calurosa	Lluviosa	Fría
			+ / N (%)*		
Zanahoria	530	<i>E. coli</i>	130/282 (46) a	42/112 (38) b	32/136 (23.5) c
		<i>Salmonella</i>	19/282 (6.7) a	6/112 (5.4) b	5/136 (3.7) b
Agua	198	<i>E. coli</i>	31/92 (34) a	15/52 (28.8) a	13/54 (24) b
		<i>Salmonella</i>	7/92 (7.6) a	2/52 (3.8) b	0/54 (0) c
Superficies	379	<i>E. coli</i>	93/173 (54) a	42/112 (37.5) b	17/94 (18) c
		<i>Salmonella</i>	38/173 (22) a	17/112 (15.2) b	13/94 (13.8) b
Tierra	33	<i>E. coli</i>	10/33 (30)	ND	ND
		<i>Salmonella</i>	2/33 (6)	ND	ND
Total	1140				

* Positivas/analizadas

a, b: Letras iguales no hay diferencia significativa ($P \leq 0.5$) entre épocas.

ND No determinado

5.4. Relación entre la frecuencia de la detección de *E. coli* y *Salmonella*

Salmonella es un microorganismo patógeno entérico que comparte ciertas condiciones y hábitat con *E. coli*. Existen estudios para correlacionar la presencia del indicador de contaminación fecal como indicador directo de la presencia de *Salmonella*, con resultados contradictorios. Stewart *et al.* (1978) encontraron baja relación entre *E. coli* y *Salmonella* en hortalizas crudas. García *et al.* (1978) analizaron 345 muestras de verduras, en 8 muestras positivas a *Salmonella*, *E. coli* no se detectó. Ruíz (2007), en 7 ocasiones en que el patógeno estuvo presente en muestras de hortalizas, *E. coli* no. García (2009), en un estudio realizado con lechuga, el 86 % de los resultados fueron coherentes (*E. coli* en presencia de *Salmonella*); sin embargo, el número de muestras positivas (4) no son suficientemente representativas para afirmar que *E. coli* es un adecuado indicador de *Salmonella*.

En este estudio, de 109 muestras positivas a *Salmonella* en sólo 16 no se detectó *E. coli*, esto es, en la gran mayoría de muestras positivas a *Salmonella* el indicador estaba presente, lo que sugiere que *E. coli* funcionaría como indicador de presencia de *Salmonella* (Tabla 30). Los eventos más frecuentes fueron el hallazgo de *E. coli* sin la presencia del patógeno y la ausencia de ambos microorganismos. Esto no está fuera de lo normal ya que en el primer caso detectamos contaminación fecal en ausencia de patógenos entéricos, y en el segundo caso no se detectó ni siquiera contaminación fecal.

Tabla 30. Frecuencia de detección de *E. coli* y *Salmonella* en diferentes materiales

Material	N	<i>Salmonella</i> / <i>E. coli</i> (%)*			
		+/+	+/-	-/+	-/-
Zanahoria	530	25 (4.7)	5 (0.9)	234 (44.1)	266 (50.2)
Agua	198	9 (4.5)	0 (0)	50 (25.2)	139 (70.2)
Superficies	379	57 (15)	11 (2.9)	134 (35.3)	177 (46.7)
Tierra	33	2 (6.1)	0 (0)	15 (45.5)	16 (48.5)
Total	1140	93 (8.2)	16 (1.4)	433 (38)	598 (52.4)

*: Número de muestras positivas o negativas a *Salmonella* o *E. coli* (% de correlación entre *Salmonella* y *E. coli* según material).

La presencia de *Salmonella* en las zanahorias y superficies que resultaron negativas a *E. coli* sugiere una mayor capacidad de *Salmonella* para sobrevivir en el medio ambiente y en particular en frutas y verduras. Se ha reportado que *E. coli* difícilmente sobrevive y más bien tiende a morir en frutas y verduras (Fernández-Escartín, 2008). Por el contrario *Salmonella* mantiene mejor su viabilidad en las hortalizas: más de 40 días en papas, en hojas de betabel por 21 días, más de 5 en col, de 3 a 20 días en jitomate y más de 10 días en zanahorias (Bryan, 1977). En esta última existen posibilidades de multiplicación, por la exposición de nutrientes al sufrir daños mecánicos, el alto contenido de humedad y el pH muy por arriba del 3.8 mínimo del patógeno.

El análisis global de los resultados en los distintos materiales, muestra que al menos para el agua y las zanahorias la tendencia es que a mayor contenido de *E. coli* existe una mayor probabilidad de detectar *Salmonella* (Figura 21). El hecho de que la tendencia se observe sólo en agua y zanahoria puede deberse al contenido de materia orgánica en la primera y a la exposición de nutrientes en la segunda, que podría permitir la sobrevivencia de los microorganismos e incluso un eventual desarrollo. Las muestras de tierra positivas a *Salmonella* coincidieron con un contenido de *E. coli* entre 10 y 99 NMP/g, mientras que muestras de superficies fueron las únicas con positividad a *Salmonella* y bajos contenidos del indicador.

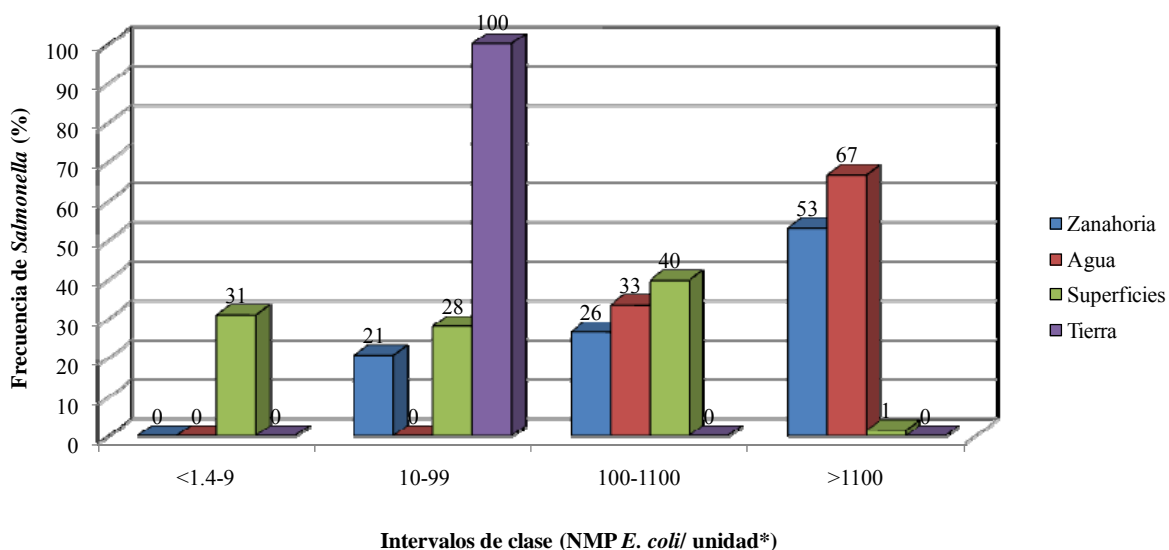


Figura 21. Frecuencia de *Salmonella* con respecto a contenidos de *E. coli* en los materiales analizados.

5.5. Comparación del método de cultivo y PCR para determinación de *Salmonella*.

En la investigación es común reportar la presencia de *Salmonella* sólo de forma cualitativa; sin embargo, no es lo mismo hablar de presencia de una célula a mil o más células del patógeno en un alimento; el riesgo a enfermar por su consumo no es el mismo. En el desenlace interviene la virulencia del patógeno, la susceptibilidad de los individuos, así como dosis ingerida del patógeno. De esta forma, conocer el número de células de patógenos en los alimentos, sobre todo en aquellos que se consumen crudos, resulta relevante en la estimación del riesgo de enfermar al tiempo del consumo.

La técnica tradicional por medio de cultivo tiene la gran ventaja de poder recuperar la cepa, lo que le da confiabilidad; sin embargo, en algunos casos la muestra utilizada para esta técnica no es útil para cuantificar al patógeno pues el tiempo transcurrido es tan amplio que el microorganismo pierde su viabilidad. Contrariamente a la técnica de PCR es posible conocer en corto tiempo si el patógeno está presente, y en tal caso la cuantificación puede llevarse a cabo.

Se calculó el valor Kappa del PCR en comparación con la técnica tradicional por medio de cultivo. El valor Kappa es un índice estadístico que indica la concordancia entre dos técnicas, < 0 se toma como ausencia de concordancia y 1 como concordancia excelente (Dupray *et al.* 1997; Orozco, 2008). Según los resultados acerca de la positividad de *Salmonella* en muestras de zanahorias y residuos la concordancia de ambas técnicas es casi perfecta (Tabla 31). Mientras que para el agua y superficies se obtienen más discrepancias entre las técnicas debido al número de falsos negativos y positivos, mediante PCR la concordancia fue menor que en zanahorias, aunque, sigue considerándose alta. La menor concordancia entre las técnicas se observó en las muestras de tierra, donde el valor de Kappa resulta influenciado por el bajo número de muestras positivas.

Estudios por otros autores sobre la detección de *Salmonella* por PCR reportan valores de Kappa similares. Orozco (2008) reporta K de 0.97 en muestras de jitomate inoculado y sin inocular, Feder *et al.* (2001) de 0.76 en muestras de agua y 0.8 en muestras de canales de pollo (Liu *et al.* 2002).

Tabla 31. Detección de *Salmonella* por PCR y cultivo tradicional en los materiales analizados

Muestras colectadas	Muestras positivas				Total	Valor Kappa (K)
	Cultivo	PCR	Cultivo-PCR			
Zanahorias	530	1	2	27	30	0.94
Residuos	68	1	0	13	14	0.95
Agua	198	2	0	7	9	0.89
Superficies y materiales diversos	311	7	5	42	54	0.88
Tierra	33	1	0	1	2	0.65
Total	1140	12	7	90	109	0.89

Entre las muestras detectadas como positivas, 68 de 100 muestras (las 9 muestras positivas de agua, no se cuantificaron) presentaron contenidos por arriba de la sensibilidad, sólo dos muestras clasificadas como materiales diversos, una de heces y una de zapatos sobrepasaron el límite de cuantificación (>2072 NMP/unidad) (Figura 22). El 32 % de las muestras positivas estuvieron por debajo del límite de detección (<1.4 NMP/unidad), pues a pesar de resultar positivas por ambas técnicas, en la cuantificación por NMP no se detectó el patógeno.

En general, la mayoría de las muestras positivas a *Salmonella* (75 %) presentaron contenidos por debajo de 9 NMP/unidad. El riesgo existente al consumir alimentos contaminados con salmonelas aunque sea en bajo número. D'Aoust *et al.* (1985), señala que la dosis mínima infectante llega a ser de 10 células de *Salmonella*. En un estudio realizado en EE.UU, se encontró que el nivel promedio de *Salmonella* en un brote de salmonelosis fue de 1.3 NMP/ 100g en almendras (Danyluk *et al.* 2006), menor al límite de detección en este trabajo.

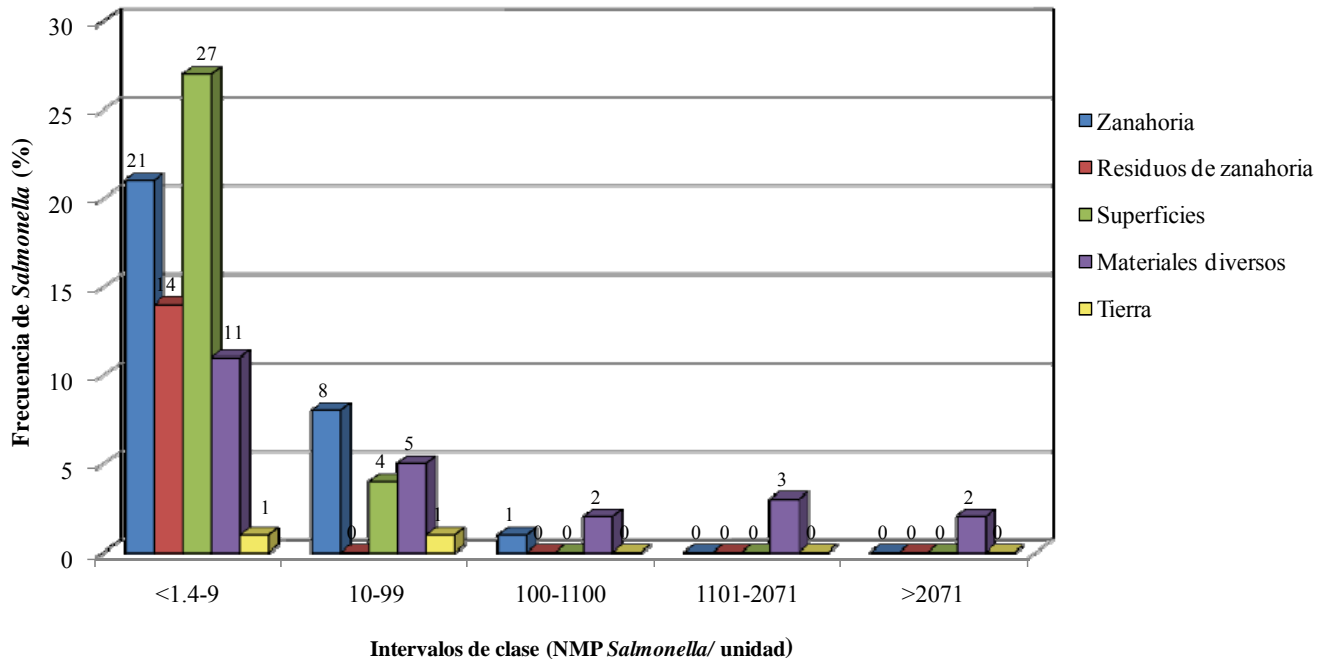


Figura 22. Frecuencia de intervalos de clase de *Salmonella* en los distintos materiales analizados (Zanahoria, g, 100 cm², 2 manos o guantes, 2 suelas).

5.6. Relación entre frecuencia de violaciones a las prácticas sanitarias de trabajo (estudio observacional) e incidencia de *E. coli* y *Salmonella*

El aseguramiento de la inocuidad de los alimentos es una prioridad ampliamente justificada entre las sociedades modernas. Con el tiempo se va instrumentando una diversidad de estrategias y enfoques. La práctica de la sanidad en todo sitio que tenga que ver con los alimentos es un requisito cuya validez es imperativa (Fernández Escartín, 2008). Sin embargo la realidad es que la insalubridad, el descuido y la indiferencia ante los principios de higiene aún prevalecen. A este respecto, Fernández-Escartín (2003) advierte que las violaciones de las condiciones sanitarias que debieran prevalecer en el manejo de ciertos alimentos, tenderían a asociarse con un incremento en la concentración de grupos específicos de microorganismos para un alimento particular.

Existen instancias nacionales e internacionales que se encargan de guiar, regular y/o normar los sistemas de calidad e inocuidad de los alimentos desde su producción hasta su comercialización a fin de reducir al máximo las faltas sanitarias y lograr un producto más inocuo. Dentro de estas se encuentra el Codex Alimentarius, encargado del establecimiento de normas aplicables a nivel internacional. En nuestro país el Servicio

Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) que mediante la Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera (DGI AAP) evalúa, comprueba y certifica las prácticas sanitarias realizadas en parcelas de producción y plantas de empaque.

La verificación de las prácticas sanitarias aplicadas se aborda por medio de dos estudios, observacional y de análisis de laboratorio. El observacional se aplica a fin de detectar de manera visual la aplicación de dichas prácticas. Sin embargo, debe considerarse que durante las visitas que se realizan en forma de auditorias (observacional) a los campos de cultivo y empaque, es escasa la oportunidad de que se observen incumplimientos en algunas prácticas críticas que comprometen seriamente la inocuidad de los productos, justo cuando el auditor esta presente en la unidad de producción (Fernández-Escartín, 2003). Por tal razón se recurre al apoyo de los análisis microbiológicos. Con estos resultados se puede evaluar la eficiencia de las prácticas sanitarias aplicadas. Desafortunadamente se tiene la desventaja de la representatividad. La contaminación por los microorganismos de interés sanitario es esporádica y su distribución heterogénea. Por lo tanto, el apoyo de cualquiera de los estudios no es el enfoque más seguro para decidir acerca de la inocuidad de los alimentos como condición para una prevención segura de las enfermedades (Fernández-Escartín, 1993).

Durante el estudio se realizaron 33 visitas en el campo y empaque de ambas empresas. Se realizó un análisis observacional para detectar violaciones a las prácticas sanitarias de trabajo y otros eventos potencialmente nocivos a la inocuidad microbiana de la zanahoria. En cada visita se muestreó la zanahoria y materiales diversos como el agua, superficies, manos-guantes y calzado de trabajadores así como muestras eventuales como heces fecales.

A fin de determinar la relación entre los dos estudios mencionados (observacional y microbiológico) se registró la frecuencia de violaciones a las prácticas sanitarias de trabajo y la frecuencia de *E. coli* y *Salmonella* en cada empresa (la empresa A en sus dos periodos) (Tabla 32).

Al graficar ambas frecuencias con cada empresa (Figura 23), la correspondencia entre ambos estudios se hace más clara. La empresa B mostró la menor frecuencia de las violaciones a las prácticas sanitarias y la menor frecuencia de los microorganismos,

mientras que la empresa A durante el periodo 1, mostró el mayor número de violaciones; la frecuencia de ambos microorganismos fue mayor. Para el periodo A2, las violaciones a las prácticas sanitarias fueron menores que en el periodo A1; *E. coli* y *Salmonella* mostraron la misma tendencia, aunque, esta última no sólo se vio influenciada por la reducción de las violaciones, también por el cambio de agua del reservorio la cual aportaba gran carga microbiana a los materiales analizados.

Tabla 32. Porcentaje de *E. coli*, *Salmonella* y violaciones a las prácticas sanitarias de trabajo en cultivo y empaque de las empresas A (dos periodos) y B (un periodo).

Empresa	N*	<i>E. coli</i> <i>Salmonella</i>		Violaciones a PS	
		%		n**	%
A periodo 1	422	48	16.5	66/146	45
A periodo 2	395	38	6.7	31/114	27
B	323	27	4.4	18/79	23
Total	1140	36	9.6	115/339	40

* Muestras analizadas

** Violaciones detectadas/número máximo de violaciones posibles

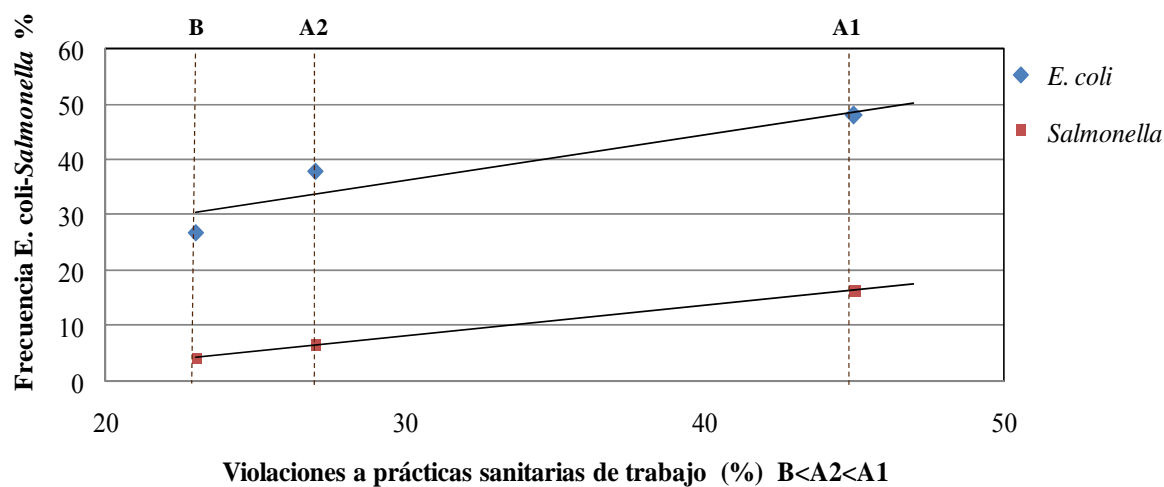


Figura 23. Frecuencia de *E. coli* y *Salmonella* y frecuencia de violaciones a las prácticas sanitarias de trabajo en las dos empresas.

Es importante resaltar que la empresa B no desinfecta el producto, sin embargo, tal parece que gracias al apego que los productores y empacadores tienen con las prácticas sanitarias de trabajo, los microorganismos de interés se mantienen muy por debajo de la empresa A. En esta última a pesar de aplicar desinfección, es evidente que sin buenas prácticas sanitarias, el tratamiento aplicado resultaría sin beneficios al producto. La implementación de buenas prácticas agrícolas y de manejo en campo y empaque son fundamentales para reducir la presencia de microorganismos de interés sanitario.

5.7. Estudios preliminares para determinación de *Listeria monocytogenes*

La determinación de *L. monocytogenes* se realizó en muestras de la empresa A, independientes a las analizadas para los microorganismos entéricos tratados anteriormente. Al igual que para *Salmonella*, *L. monocytogenes* se determinó por dos métodos, PCR y el tradicional por medio de cultivo. Efectuamos la validación de ambos métodos para la determinación del patógeno en muestras de zanahoria y superficies de maquinaria y equipo.

En la actualidad, se sabe del efecto antilisteria de algunos compuestos de la zanahoria. Tal efecto parece ser significativo bajo ciertas condiciones de pH, temperatura y el más importante, de concentración de los compuestos antilisteria, los cuales se liberan cuando la hortaliza es transformada en jugo. Al respecto Beuchat *et al.* (1994) evaluaron el comportamiento de la población de *L. monocytogenes* inoculada en jugo de zanahoria a diferentes concentraciones, pH, temperaturas y tiempo de incubación. Las concentraciones probadas fueron 1, 10 y 100% de jugo, siendo la de 10 % la que más población redujo (4 a 5 log UFC/mL) a pH's ligeramente ácidos (5) y temperaturas por debajo de los 20 °C, sin ser significativamente diferentes a las otras condiciones. Ellos resaltan, que no es el mismo efecto de reducción con jugo donde todos los compuestos están expuestos, que el efecto logrado con la zanahoria integra. De hecho la reducción del patógeno alcanzada por tratamiento con zanahorias peladas es significativamente menor a la alcanzada con el jugo y sin embargo, es mayor que la reducción causada por la exposición con zanahorias íntegras sin daños mecánicos aparentes (Liao *et al.* 2007). Ellos realizaron un estudio donde se investigaron los efectos inhibitorios de zanahoria baby carrot cruda pelada y sin pelar conteniendo su flora natural, sobre la viabilidad y crecimiento de *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enterica*, *E. coli* O 157:H7 y *Pseudomonas marginalis*.

La población viable de *L. monocytogenes* se redujo en más de 2 log después de la inmersión de las zanahorias peladas en la suspensión bacteriana durante dos minutos. Mientras que la inmersión de zanahoria integra sin pelar, no causó diferencia significativa en la población viable del patógeno. Los otros agentes patógenos sometidos a los mismos tratamientos no mostraron reducción en la población.

En otro estudio realizado por el mismo autor (Liao *et al.* 2003) donde el objetivo consistió en evaluar el comportamiento de ciertos microorganismos patógenos en zanahoria se encontró que la desinfección de las superficies de las zanahorias antes de inocularlas con los patógenos redujo la flora nativa y, a su vez aumentó el crecimiento de cada patógeno en este producto por 2 hasta 3 log incluida *L. monocytogenes*.

En base a lo anterior y al costo que representa el cubrir con caldo de preenriquecimiento las muestras de gran volumen como las zanahorias, se evaluaron dos procedimientos para recuperación de *L. monocytogenes* a partir de zanahoria.

5.7.1. Evaluación de la presencia de zanahoria durante el pre-enriquecimiento

La hipótesis es que si se incuba la zanahoria como tal en el caldo, ésta podría desprender compuestos que inhibieran al microorganismo, y por otro lado el volumen del caldo necesario para cubrir las zanahorias sería alto. Los enfoques fueron:

1. Incubar la zanahoria en el caldo de preenriquecimiento durante las 48 horas que señala la técnica.
2. Frotar la zanahoria en el caldo de preenriquecimiento durante un minuto y retirarla previa incubación.

Para ensayar la sensibilidad de la técnica para recuperación de *Listeria* en zanahoria, los inóculos probados fueron 100, 50, 5 y 1 UFC / 3 zanahorias con 5 repeticiones cada inóculo. La recuperación del microorganismo se llevó a cabo por medio de una técnica tradicional de cultivo: la de la USDA donde el medio de preenriquecimiento es el UVM y se emplea el caldo fraiser como enriquecimiento selectivo.

En el Tabla 33 se presenta la frecuencia de recuperación de *L. monocytogenes*. A altos contenidos del patógeno, no existe diferencia entre la forma de recuperación; sin

embargo, el contenido de los patógenos en las frutas y verduras comúnmente es discreto y la sensibilidad óptima sería la detección de 1 UFC por la unidad experimental. Cuando las zanahorias fueron incubadas junto con el caldo de preenriquecimiento, sólo en dos de veinte ocasiones no se detectó el patógeno, siendo en las muestras con el más bajo inóculo. Al tratarse sólo de 1 UFC posiblemente la suspensión del inóculo tomada no contenía ninguna célula del patógeno y por ello resultaron negativas las muestras. No sé puede descartar un posible efecto antilisteria que haya influido en los resultados.

De manera general parece conveniente la incubación de la muestra junto con el caldo de preenriquecimiento por el tiempo estipulado en la técnica. Orozco (2008), evaluó el efecto de la presencia/ausencia de jitomate durante el preenriquecimiento en caldo lactosado para la recuperación de *Salmonella*, sin encontrar diferencias significativas entre los dos procedimientos.

Tabla 33. Recuperación de *L. monocytogenes* por dos procedimientos, a) incubando la zanahoria 48 horas y b) retirando zanahoria después de frotar

Inóculo UFC/unidad	*Inóculo real UFC/unidad \pm Desvest.	<i>L. monocytogenes</i> + / n (%)	
		Sin retirar	Retirando
100	127 \pm 13.2	5 / 5 (100)	5 / 5 (100)
50	57 \pm 8.5	5 / 5 (100)	5 / 5 (100)
5	7 \pm 2.1	5 / 5 (100)	2 / 5 (40)
1	1.8 \pm 1.4	3 / 5 (60)	0 / 5 (0)

5.7.2. Evaluación de una prueba de PCR para la detección de *L. monocytogenes* en zanahoria y torundas de muestreo en superficies

5.7.2.1. Evaluación de la especificidad de los iniciadores LM para detección de *L. monocytogenes*

Se determinó la especificidad de los iniciadores seleccionados (LM 1 y 2) diseñados por Border *et al.* (1990). Se utilizaron 5 cepas de *L. monocytogenes* y 15 cepas diferentes a *L. monocytogenes*, algunas Gram (+) y otras Gram (-). Todas las cepas de *L. monocytogenes* amplificaron una banda cercana a las 700 pb y no hubo amplificaciones

inespecíficas. Todas las cepas de diferente especie, no mostraron amplificación. (Figura 24).

Nuestros resultados concuerdan con los de Aznar y Alarcon (2003). Ellos evaluaron la especificidad de nueve pares de iniciadores, algunos diseñados por ellos y otros de diferentes investigadores, todos aplicados en la detección de las diferentes especies del genero *Listeria*. Los iniciadores LM resultaron ser los más específicos en la detección de *L. monocytogenes* y no presentaron amplificaciones inespecíficas.

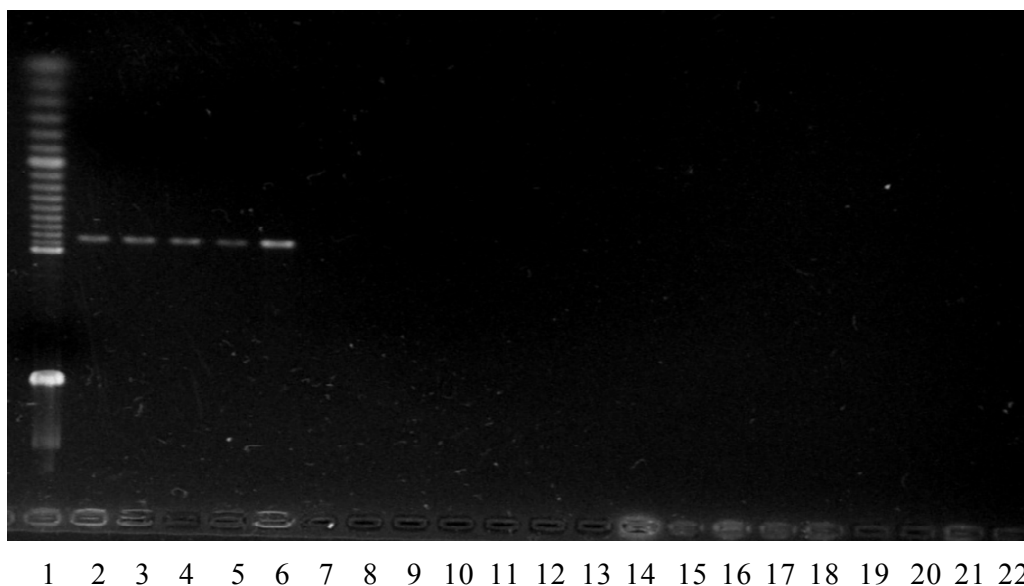


Figura 24. Especificidad de PCR empleando iniciadores LM para detección de *L. monocytogenes*: electroforesis de productos de amplificación de ADN de cepas de *L. monocytogenes* y especies diferentes.

Carril 1, Marcador de peso molecular 50 pb; 2, *L. monocytogenes* Scott A; 3, *L. monocytogenes* 101 M; 4, *L. monocytogenes* 101-14; 5, *L. monocytogenes* LCDC; 6, *L. monocytogenes* V7; 7, *L. ivanovii*; 8, *L. innocua*; 9, *L. seeligeri*; 10, *L. welshimeri*; 11, *Rhodococcus equi* OPS (LNSP); 12, *Lb. Casei*; 13, *Lb. Ramnosus*; 14, *B. cereus*; 15, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; 16, *S. epidermidis* ATCC 12228 LNA 06 (LNSP); 17, *S. xylosus* LNA 065 OPS (LNSP); 18, *Escherichia coli* CDC 01184; 19, *Klebsiella pneumoniae* CDC 1332; 20, *Salmonella* Typhimurium; 21, *Serratia marcesens* pigmentada C-530; 22, Control negativo.

5.7.2.2. Preenriquecimiento

Para la detección de *L. monocytogenes* en los alimentos, se emplean enriquecimientos selectivos y técnicas de aislamiento que han sido desarrollados considerando la resistencia del microorganismo a compuestos selectivos; se pretende inhibir el desarrollo de la flora acompañante de los alimentos (Donnelly *et al.* 1994). La

FDA y la USDA han propuesto una técnica cada una para la detección y aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de muestras ambientales y alimentos, respectivamente; ambos han tenido gran aceptación.

Diversos investigadores han comparado ambas técnicas y en la gran mayoría la técnica de la USDA ha sido la más eficiente en la detección y aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de muestras tanto ambientales como de alimentos. Fernández-Garayzabal (1998) realizaron una evaluación comparativa en la cual 899 alimentos fueron analizados por tres métodos utilizados para el aislamiento de *Listeria*: el de la USDA, FDA y el de Netherlands Government Food Inspection Service (NGFIS). La detección del germen fue de 65 % para FDA, 74 % para USDA y el de NGFIS. Esquivel (2008), analizó 428 muestras entre espinacas, superficies y agua para determinar la incidencia de *L. monocytogenes*. De 45 muestras positivas 37 fueron detectadas por medio de la técnica de la USDA y sólo 27 por la de la FDA.

En nuestro estudio se valoró el caldo de preenriquecimiento para la detección de *L. monocytogenes* por PCR a partir de zanahoria y muestras de superficies tomadas con torundas. Después del preenriquecimiento se realizó el PCR y con el resto de la muestra se siguió cada una de las técnicas mencionadas, FDA para el caldo LEB y USDA para el caldo UVM.

Se utilizó una mezcla de 5 cepas de *L. monocytogenes*. Se probaron dos medios, UVM y LEB con 5 niveles de inóculo 0, 1, 5, 50 y 100 UFC de *L. monocytogenes*/muestra.

Todas las muestras incubadas en caldo UVM presentaron producto de amplificación; entre las incubadas con caldo LEB solo amplificaron tres, las inoculadas con el mayor número de UFC (Figura 25). La sensibilidad para las zanahorias incubadas en caldo UVM fue de 5 UFC/muestra mientras que para las torundas de 1 UFC/torunda. Para las muestras preenriquecidas en caldo LEB la mínima sensibilidad para la detección en las zanahorias y torundas fue de 100 y 50 UFC, respectivamente.

En la recuperación del patógeno mediante cultivo, la mayor recuperación se obtuvo siguiendo la técnica de la USDA (Tabla 34). Resultados negativos ocurrieron en las

muestras con más bajo inóculo. En lo sucesivo se optó por utilizar la técnica de la USDA para la determinación de *L. monocytogenes* en ambos tipos de muestras.

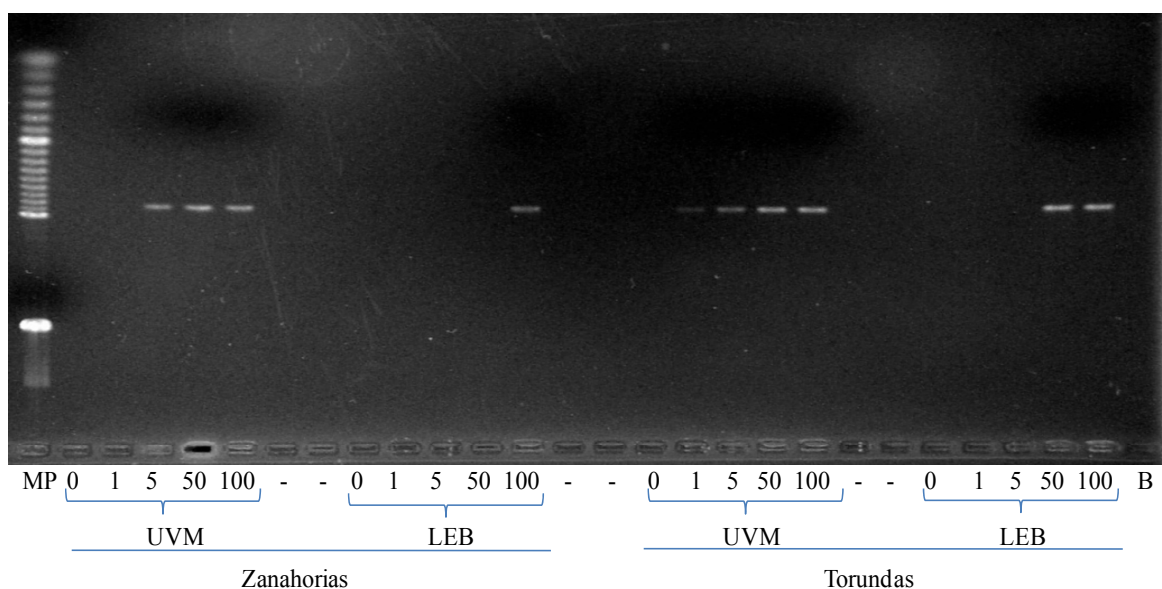


Figura 25. Sensibilidad de la técnica PCR para la detección de *L. monocytogenes* utilizando como medio de preenriquecimiento caldo UVM y LEB en zanahoria y torundas de superficies inoculadas artificialmente.

MP: Marcador de peso molecular 50 pb.; B: testigo negativo; 0, 1, 5, 50, 100 UFC/unidad experimental; - sin muestra.

Tabla 34. Recuperación de *L. monocytogenes* por dos técnicas a partir de muestras de zanahoria y torundas de muestreo de superficies inoculadas artificialmente.

Inóculo UFC/unidad	Inóculo real UFC/unidad \pm Desvest.	<i>L. monocytogenes</i> + / n (%)			
		USDA		FDA	
		Zanañorias	Torundas	Zanañoria	Torundas
100	119 \pm 17*	3 / 3 (100)	3 / 3 (100)	3 / 3 (100)	3 / 3 (100)
50	59 \pm 7*	3 / 3 (100)	3 / 3 (100)	3 / 3 (100)	3 / 3 (100)
5	7 \pm 2**	5 / 5 (100)	5 / 5 (100)	2 / 5 (40)	5 / 5 (100)
1	1.7 \pm 1.2**	3 / 5 (60)	5 / 5 (100)	1 / 5 (20)	2 / 5 (40)

* Promedio de 12 valores; ** Promedio de 20 valores.

5.8. Incidencia de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en zanahoria y materiales asociados a su acondicionamiento y empaque.

El interés por estudiar la presencia de *L. monocytogenes* en zanahoria surge por el conocimiento que se tiene acerca de la facilidad del germen de establecerse en equipo y maquinaria de empresas de alimentos, además de la alarmante letalidad en brotes de listeriosis. Es un germen ambiental, con capacidad de desarrollo a temperaturas de refrigeración por lo cual su aislamiento de superficies de cámaras de frío es más frecuente que del producto mismo (Beuchat y Brackett, 1990; Berran *et al.* 1989; Rocourt, y Crossart, 1997).

Diversos estudios señalan una baja incidencia del patógeno en frutas y verduras, mucho menor si se compara con la incidencia en carnes y lácteos (Tabla 35). Faber *et al.* (1989) reportan que de 110 muestras de verduras analizadas, ninguna resultó positiva para *L. monocytogenes* y que sólo en una se recuperó *Listeria* spp. Coincidiendo, Peltran *et al.* (1988) analizaron muestras de remolacha, brócoli, col, coliflor, lechuga, champiñones, papas y muestras de verduras congeladas como ejotes, chícharos y espinacas; en ningún caso demostraron la presencia de *L. monocytogenes*. Otros autores señalan que la incidencia del patógeno es mayor en verduras que entran en contacto directo con la tierra como las raíces ya que este material es un reservorio natural de microorganismos incluyendo el del estudio. Por ejemplo, García-Gimeno *et al.* (1996) aislaron *L. monocytogenes* de 21 muestras de tubérculos de un total de 70. El autor señala que la incidencia del patógeno se vio favorecida en las muestras con mayor contaminación por tierra. Esta idea la comparten otros investigadores como Heisik (1989) y Beuchat (1996). Siendo así, se esperaría que las muestras de zanahoria muestren una alta incidencia del patógeno.

Las muestras analizadas en este estudio fueron colectadas de la empresa A. En esta empresa generalmente el producto empacado es zanahoria íntegra; sin embargo, eventualmente (no durante los muestreos) cortan y rebanan zanahoria para comercializarla como lista para el consumo, lo que deja en claro que la higiene en toda la planta debe ser escrupulosamente vigilado.

Listeria en general, se aisló de zanahoria en todas las etapas, y *L. monocytogenes* en particular de zanahoria antes de entrar al proceso, después del enfriamiento y en el almacenamiento.

Tabla 35. Incidencia de *L. monocytogenes* en diversos grupos de alimentos

Alimento	Muestras analizadas	Incidencia (%)	Referencia
Carnes crudas	1123	51	Samelis <i>et al.</i> 1999
Carnes procesadas	1123	49	Samelis <i>et al.</i> 1999
Leche cruda	133	2.3	Dennis <i>et al.</i> 2008
Verduras:			
• Ensaladas	467	1.4	Crepet <i>et al.</i> 2007
• Lechuga	898	1.1	FDA, 2007
• Verduras cocidas	1102	6.1	Odumeru <i>et al.</i> 2004
• Espinacas	1356	0.7	Sanja <i>et al.</i> 2008

La incidencia global del género como de la especie patógena en zanahoria fue de 38 y 9.5 %, respectivamente (Figura 26). Aparentemente la desinfección disminuye a lo máximo la presencia del patógeno pero no de *Listeria* spp en zanahoria. Posterior a la etapa de desinfección, *L. monocytogenes* vuelve a detectarse en la zanahoria enfriada, al igual que en la almacenada en la cámara de frío. Estos hechos sugieren la presencia de potenciales fuentes de contaminación dentro de la planta empacadora.

En las visitas se observaron aves volando dentro del área de empaque, e incluso heces fecales tanto de aves como roedores. En más de cinco ocasiones, el personal encargado de la limpieza barría el área de empaque estando en operación. Beuchat *et al.* (1997) señalan que dentro de las plantas empacadoras las fuentes de interés son la maquinaria, animales domésticos o silvestres, los trabajadores, el polvo, los vehículos, etc.

Los animales silvestres son inevitables en el campo pero en la empacadora es totalmente inaceptable. En la literatura esta ampliamente documentada su participación como fuente de contaminación. Las aves por ejemplo, generalmente se les relaciona con *Salmonella* sin embargo, también se ha demostrado su participación como fuente de diseminación de *L. monocytogenes* hacia frutas y verduras. Weis y Seeliger (1975), analizaron 46 muestras de heces de aves colectadas de plantas empacadoras de alimentos y encontraron 17.3 % de positividad a *L. monocytogenes*

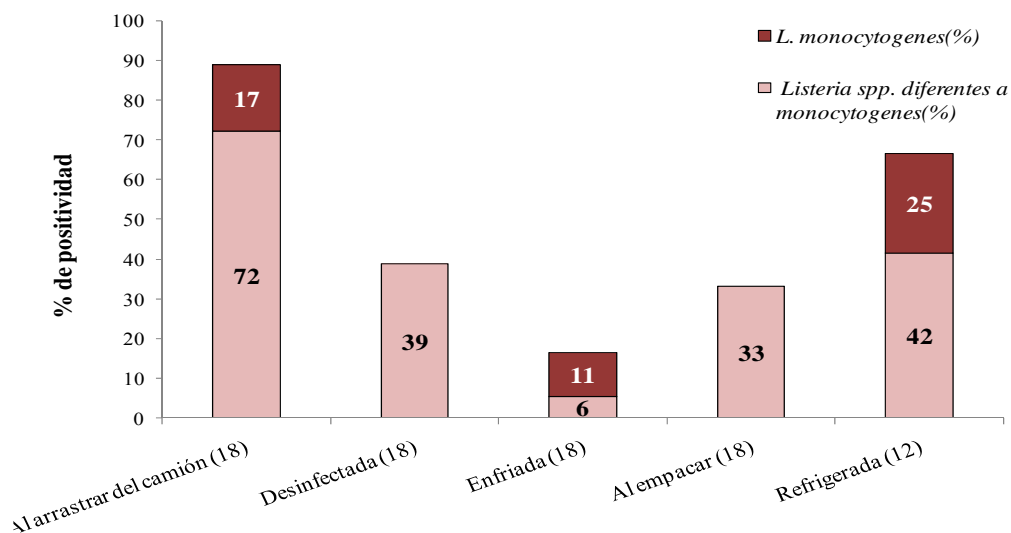


Figura 26. Incidencia de *Listeria spp.* y *L. monocytogenes* en zanahorias colectadas de las etapas del acondicionamiento y empaque de la empresa A.

La presencia de *L. monocytogenes* en plantas empacadoras de frutas y verduras es un hecho que no causa alarma, ya que se sabe que el patógeno es ambiental y por lo tanto de difícil exclusión en este tipo de sitios. Sin embargo, el riesgo de su presencia toma sentido cuando se trata de alimentos listos para el consumo, como el caso de verduras precocidas congeladas y otro tipo de alimentos listos para ser ingeridos.

En los Estados Unidos la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) y la Inocuidad e Inspección de los Alimentos del departamento de Agricultura (USDA-FSIS) impusieron una norma cero (0 UFC/25 g de muestra) para la presencia de *L. monocytogenes* en muchos alimentos incluyendo productos lácteos y alimentos listos para el consumo (FDA, 1992). Como la dosis mínima infectante se desconoce, algunos no consideran necesario una tolerancia tan estricta (Blyzik-Mckennal *et al.* 1994).

Por otro lado, aún siendo tan común en el ambiente este microorganismo, no se puede dejar de lado que el riesgo existe. Tal es el caso de los brotes de listeriosis en diversos países. Un brote ocasionado por *L. monocytogenes* ocurrió en 1981 en Canadá, 34 casos de listeriosis perinatal y siete casos en adultos fueron diagnosticados, todos ellos ligados al consumo de col (Ho *et al.* 1986). Recientemente se reportó un brote que hasta el momento había afectado a 40 personas de 10 entidades de Estados Unidos (CDC, 1998c). El alimento implicado fueron salchichas de hot-dog, de donde el serovar 4b de *L.*

monocytogenes se identificó. El Centro de Control de Enfermedades reporta anualmente en los Estados Unidos aproximadamente 1700 casos de listeriosis con 450 muertes (Gellin *et al.* 1991). Los sitios que se han identificado como reservorios potenciales de *Listeria* incluyen apagadores, rodillos de los transportadores, puertas selladas con plástico, manijas, rebañadoras, agua estancada en las áreas de producción y residuos de producto entre otros (Bernard, 1994; Slade, 1992). En este estudio se analizaron 203 muestras correspondientes a superficies diversas. La participación del equipo como fuente de contaminación se ilustra en la Figura 27. La mayor incidencia de *L. monocytogenes* se presentó en superficies de la cámara de frío, como piso, manijas, paredes, tarimas. Al respecto estudios señalan la habilidad de *L. monocytogenes* para adherirse en forma de biopelículas en diversas superficies tales como acero inoxidable, hule, vidrio, plásticos, madera y otros (Blackman y Frank, 1996).

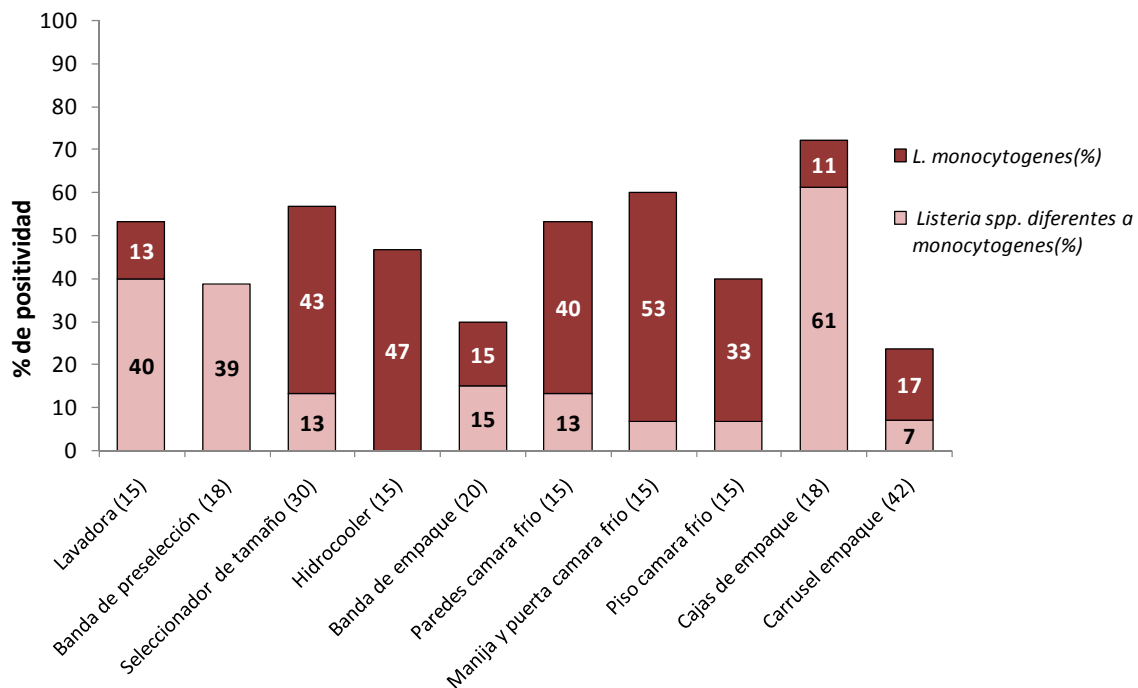


Figura 27. Incidencia de *Listeria spp.* y *L. monocytogenes* en superficies de maquinaria y equipo de la empresa A.

A pesar de que el muestreo no fue intensivo, el hallazgo del patógeno en el equipo y precisamente en las etapas de empaque y área de almacenamiento de producto empaquetado, evidencia la necesidad de un sistema de saneamiento mejor implementado, sobre todo si se

reitera que en esta empresa eventualmente cortan y empacan la zanahoria para comercializarla lista para el consumo.

De las muestras analizadas se aislaron cepas de todas las especies del genero *Listeria*. Es notable el predominio de la especie *L. monocytogenes*. En general de 137 aislamientos del género, 61 (44%) corresponden a la especie patógena (Figura 28). Álvarez (1998), justifica esta proporción de aislamientos, favoreciendo a *L. monocytogenes*, por una posible mayor resistencia a los germicidas, una mayor sobrevivencia en las superficies debido a su habilidad de formar biopelículas o por ser más competitiva con la flora asociada que las demás especies de su genero.

L. ivanovii que fue una de las especies menos frecuentes en la planta empacadora, es considerada también como patógena aunque los casos de infección humana por esta especie son escasos (Hof *et al.*1994). Aunque *L. ivanovii* se reporta en el 10% de los casos de listeriosis en animales en Bulgaria, este microorganismo es generalmente considerado menos virulento que *L. monocytogenes* (Ryser *et al.*1991). Tanto *L. ivanovii* como *L. monocytogenes* son las únicas especies que se reportan como productoras de β -hemolisina. Dicha hemolisina se relaciona con la virulencia. En este estudio de las 61 cepas de *L. monocytogenes* aisladas, 79% presentaron hemolisis en agar sangre (Figura 28).

Dentro de las diferentes cepas de *L. monocytogenes* existen cepas patógenas con alta o baja virulencia y otras bien reconocidas como no patógenas (Brosh *et al.* 1993). En la literatura se afirma que las cepas virulentas de *L. monocytogenes* son hemolíticas sin embargo, investigadores reportan que este factor de virulencia lo puede perder o adquirir. Por ejemplo, Arvizu (1999), evaluó la patogenicidad de cepas hemolíticas y no hemolíticas de *L. monocytogenes* en ratones bajo el supuesto de que las hemolíticas son patógenas y las no hemolíticas no. De las 16 cepas hemolíticas ensayadas, todas mataron al menos a tres de los cinco ratones desde las 24 horas de la inoculación, y al final de los cinco días 13 de las 16 cepas habría matado a los cinco ratones. La sorpresa fue que las cepas no hemolíticas también fueron letales para los ratones, pero requirieron más tiempo que las cepas hemolíticas, y el número de animales muertos fue menor. De seis de las siete cepas no hemolíticas que presentaron capacidad para infectar y matar al menos a dos ratones inoculados, resultaron hemolíticas después de ser aisladas de los ratones. Pudieron verse forzadas a producir hemolisina para sobrevivir dentro del ratón.

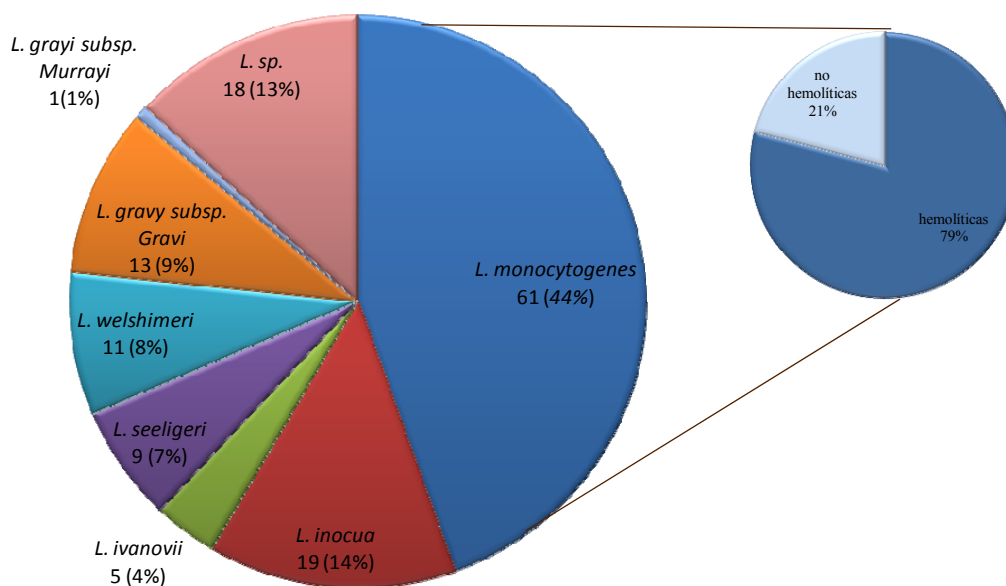


Figura 28. Distribución de especies de *Listeria* y *L. monocytogenes* en base a la hemolisis realizada.

5.9. Comparación del método de cultivo y PCR para determinación de *L. monocytogenes*.

Cada técnica en particular detectó una incidencia global de 16.7% por la técnica de cultivo y 18.5% por PCR mientras que la combinación de ambas técnicas detectó una incidencia de 21.2% (Tabla 36). Se calculó el valor Kappa del PCR en comparación con la técnica tradicional por medio de cultivo. El valor Kappa como ya se mencionó, indica la concordancia entre las dos técnicas. De manera global, el índice Kappa entre ambas técnicas, es de 0.75. Según interpretación del índice estadístico, este nivel de concordancia es aceptable; sin embargo, se esperaba una mayor concordancia entre ambas pruebas. Estos resultados concuerdan con los reportados por Feder *et al.* (2001) de 0.76 en muestras de agua y verduras diversas.

El método de PCR está considerado como de alta sensibilidad y especificidad, según evaluaciones previas en este trabajo y en otras investigaciones por otros autores (Nguyen *et al.*1991; Babic *et al.*1994; Aznar y Alarcon, 2003). La diferencia entre ambas

técnicas puede deberse a que la sensibilidad en la detección de una especie biológica mediante PCR se reconoce como mayor que la técnica de cultivo. La discrepancia entre ambas pruebas podría deberse a la incapacidad de PCR para diferenciar entre células vivas y muertas, así como las diferentes condiciones de cultivo y morfologías coloniales atípicas en agares diferenciales-selectivos de *L. monocytogenes* (Orozco, 2008).

Tabla 36. Positividad a *L. monocytogenes* por PCR y cultivo en zanahorias y superficies

Muestras colectadas	Muestras positivas				Total	Valor Kappa
	Técnica	Cultivo	Técnica PCR	Cultivo-PCR		
Zanahorias	84	3	0	5	8	0.75
Superficies	203	5	13	35	53	0.74
Total	287	8	13	40	61	0.75

5.10. Evaluación de la eficacia de germicidas aplicados en la desinfección de zanahoria íntegra inoculada con *Salmonella* spp.

La aplicación de buenas prácticas de higiene durante la producción, transporte y procesamiento combinadas con el APPCC, ciertamente minimizan la contaminación de frutas y verduras y reducen el riesgo de enfermedad asociados al consumo de los alimentos (Beuchat, 1998). Sin embargo, no garantizan la obtención de un producto inocuo y el uso de tratamientos de desinfección se vuelve indispensable para incrementar la seguridad del alimento.

El proceso de desinfección se refiere a la destrucción física de los microorganismos cuya actividad compromete la inocuidad o las características sensoriales de un alimento. La eficacia está en función de cuatro consideraciones: los microorganismos (tipo y número), el substrato sobre el cual se encuentran (presencia de materia orgánica), la estructura del material (que permita el acceso directo del germicida a los microorganismos), y el germicida (concentración, temperatura y tiempo de contacto) (Fernández-Escartín, 2008).

Con relativa frecuencia las frutas y verduras son lavadas y no desinfectadas. El lavado remueve algo de tierra y suciedad pero no garantiza la total eliminación de microorganismos después de que el producto se ha contaminado. Algunos estudios muestran que el lavado reduce de 0.1 a 1 log UFC de bacterias (Beuchat, 1998), reducción que es insuficiente ya que la mayoría de las frutas y verduras suelen contener varios log de UFC de bacterias en su superficie.

La AOAC (Association of Official Analytical Chemists) en los Estados Unidos refiere que un germicida eficaz es aquel que reduce 99.999 % (5 log) las poblaciones bacterianas sin alterar las características del producto ni comprometer la salud del consumidor (AOAC, 1995).

5.10.1. Efecto del ácido tricloroisocianúrico, hipoclorito de sodio y ácido periacético sobre *Salmonella* spp. en zanahoria cruda integra.

La desinfección de zanahoria en la empresa A se realiza con ácido tricloroisocianúrico. Para el inóculo se utilizó una mezcla de cuatro cepas de colección de *Salmonella* (*S. Montevideo*, *S. Thompson*, *S. Agona* y *S. Typhimurium*). A fin de eliminar sesgos y diferencias en los resultados debido a la diferencia entre cepas de colección con las cepas nativas halladas en la planta empacadora se utilizó además una mezcla de cuatro de estas cepas.

La Figura 29 muestra la reducción lograda en la población de *Salmonella* nativa y de colección (\log_{10} de UFC/zanahoria) expuesta a los germicidas: ácido tricloroisocianúrico pH 2 (200 mg/L), ácido peracético pH 3 (80 mg/L) e hipoclorito de sodio con pH 6.5 (200 mg/L) por 1 y 5 minutos. La gráfica se elaboró con los resultados que corresponden a la media de cinco valores del patógeno recuperado por cada tratamiento \pm error estándar y las letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos de desinfección. Los resultados muestran (como era de esperar) que la exposición por 5 min a los germicidas fue más efectiva que a 1 minuto. Bajo esta condición el ácido tricloroisocianúrico fue el más efectivo con reducción de 4.1 log de UFC de *Salmonella*/zanahoria con las cepas de colección y 3.7 con las nativas, seguido por el hipoclorito de sodio con de 3.6 y 2.9 log respectivamente. La diferencia entre el ácido tricloroisocianúrico y el hipoclorito de sodio sólo fue significativa ante las cepas nativas,

mientras que con las de colección, su efecto fue estadísticamente similar ($P \leq 0.05$). El ácido tricloroisocianúrico presentó el inconveniente de decolorar y escaldar el producto al cabo de 5 minutos, lo cual afectaría la vida de anaquel de la zanahoria ya que deja expuestos sus propios nutrientes. El ácido peracético fue el único que redujo la población independientemente del origen de las cepas, aunque la reducción alcanzada estuvo por debajo de los 2.5 log.

Resulta evidente la resistencia de las cepas nativas a los compuestos clorados, contrario al ácido peracético donde la reducción es indiferente del origen de cepa inoculada. Este resultado es congruente con el hecho de que en la empresa donde se aislaron las cepas nativas, siempre han desinfectado con germicidas clorados, lo que pudo haber provocado cierta resistencia de los microorganismos a ese compuesto. Al respecto Fernández-Escartín (2008) menciona que el desarrollo de resistencia a los germicidas (o su ineficacia) puede asociarse con el empleo de concentraciones inferiores a las requeridas, o con pérdida de la concentración inicial debido a reacciones de los compuestos activos con los presentes en los materiales tratados. Por otra parte, se sabe que algunos microorganismos patógenos son capaces de alojarse en sitios protectores como la cámara estomática y tricomas (Seo y Frank, 1999). También es posible una adhesión activa y producción de material polímero, con formación de glicocálix que les protegerá del efecto letal de germicidas que se apliquen en las cocinas durante la preparación de ensaladas (Hood *et al.* 1997). De una u otra forma resulta de suma importancia la regulación y monitoreo de las soluciones germicidas en las plantas de alimentos, incluso la rotación de germicidas es una práctica que varios expertos consideran fundamental.

Resulta importante mencionar que este experimento se llevó a cabo después de enjuagar y frotar las zanahorias a chorro directo de agua potable, lo que eliminó la suciedad visible y materia orgánica de su superficie. Esto no sucede en la planta empacadora, donde la desinfección pierde efecto por el exceso de tierra y materia orgánica siempre presente en el acondicionamiento de la zanahoria.

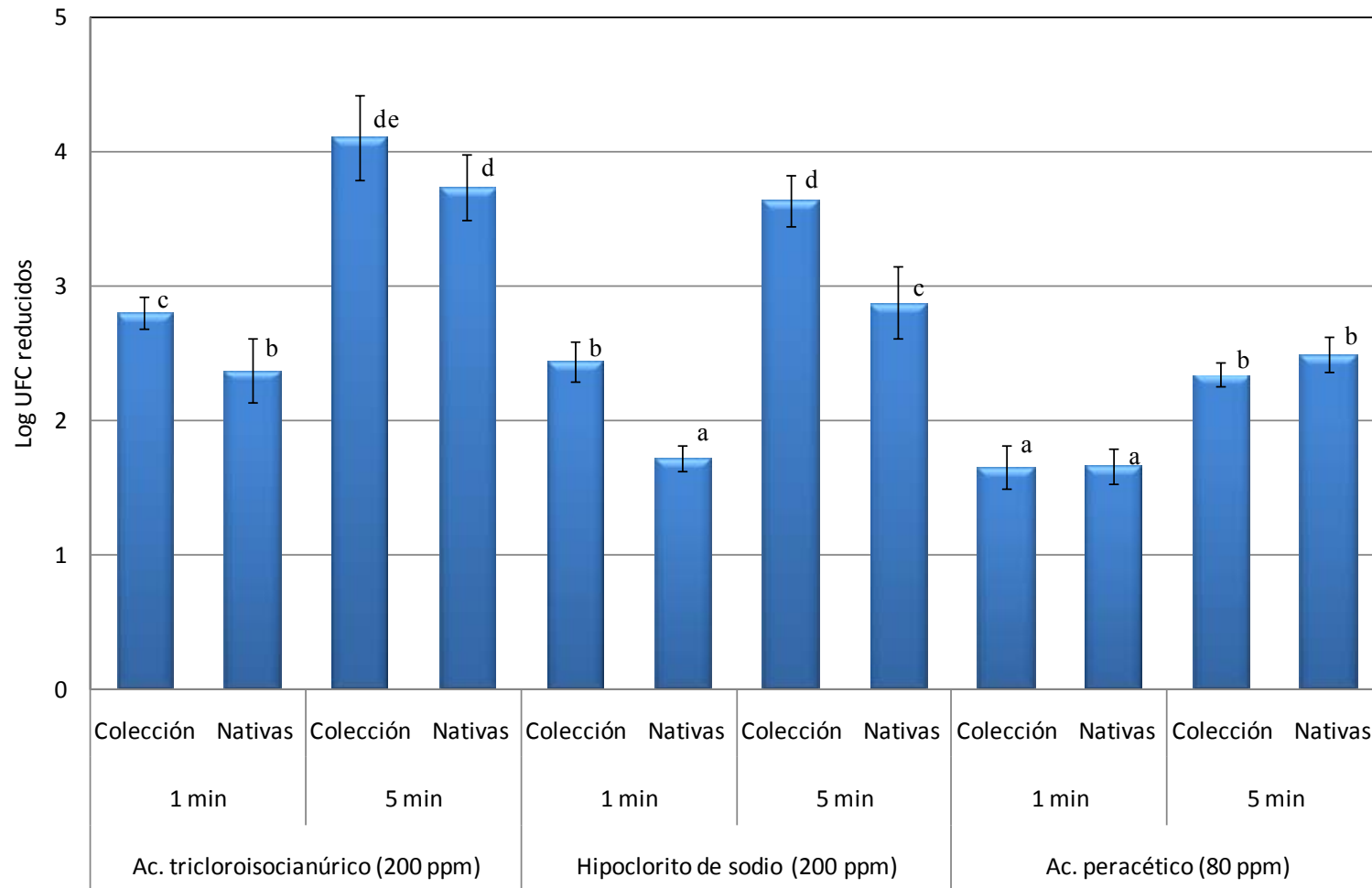


Figura 29. Población de *Salmonella* reducida de zanahoria después de aplicar tratamientos germicidas por 1 y 5 minutos de contacto, según el origen del patógeno usado como microorganismo de prueba.

VI. CONCLUSIONES

Las dos empresas participantes cuentan con similar infraestructura y capacidad de trabajo, sin embargo, mostraron diferencias relevantes en el nivel de protección que proveen a sus cultivos, fuente de agua y empaque. La empresa B mostró el mayor apego a las prácticas sanitarias de trabajo tanto en campo como en empaque; mientras la empresa A presentó el mayor número de violaciones a las prácticas sanitarias; de mayor gravedad fue la presencia de heces fecales animales dentro del área de empaque.

Los hallazgos microbiológicos y la frecuencia de las violaciones a las prácticas sanitarias de trabajo en ambas empresas muestran una asociación significativa, esto es, al disminuir las violaciones a las prácticas sanitarias de trabajo, la incidencia de *E. coli* y *Salmonella* se abatió.

En general, la zanahoria en cultivo y cosecha en ambas empresas presentaron baja incidencia de *E. coli* con contenidos por debajo del límite de detección, mientras que *Salmonella* se detectó sólo por una ocasión en zanahoria cosechada de la empresa B.

El contenido de coliformes fecales en agua de riego para ambas empresas estuvo por debajo del límite de detección (<2.8 NMP/100 mL) mientras que *E. coli* se detectó sólo en dos ocasiones en la empresa B con medianas por debajo del límite de detección; por lo tanto, el agua de riego no representa una fuente de contaminación.

La práctica de recircular agua estancada conduce a la alta positividad de *Salmonella* y *E. coli* en la empresa A.

La presencia de *E. coli* y *Salmonella* se vio influenciada por la temperatura y humedad del ambiente durante las épocas del año. Se detectaron con mayor frecuencia en la época calurosa (23 y 5.7%) seguida de la lluviosa (8.7 y 2.2%) y por último la fría (5.4 y 1.6%), aunque sólo la primera es estadísticamente diferente a las otras dos ($P < 0.05$).

La relación en el hallazgo de *E. coli* y *Salmonella* en las muestras analizadas señala a *E. coli* como un indicador mas apropiado de la presencia de *Salmonella*. En 16 ocasiones en las que el patógeno estuvo presente *E. coli* no fue detectada. Sin embargo, en 1124 ocasiones (98.6%) de los casos existió una congruencia en los resultados. Las muestras con los mayores contenidos de *E. coli* generalmente resultaban positivas a *Salmonella*.

Es factible la cuantificación de *Salmonella* en las muestras positivas si se recurre al uso de PCR y cultivo, con alto grado de confiabilidad. El 32 % de las muestras positivas al patógeno estuvieron por debajo del límite de detección. Los límites para *E. coli* y *Salmonella* fueron: $<1.4 - >3400$ y $<1.4 - >2071$ NMP. El 75 % de las muestras positivas a *Salmonella* presentaron contenidos por debajo de 9 NMP/unidad.

Durante el acondicionamiento y empaqueo de zanahoria las principales fuentes de contaminación de *L. monocytogenes* incluyen la tierra adherida a la superficie de la hortaliza, residuos incrustados en maquinaria y los propios trabajadores.

La combinación de técnicas: tradicional por medio de cultivo y PCR elevan la frecuencia de detección de *L. monocytogenes*.

Entre las 287 muestras de zanahoria y superficie, *L. monocytogenes* mostró mayor incidencia entre las demás especies del género. Esto sugiere una mayor capacidad de supervivencia a los germicidas y a las condiciones adversas en la planta empacadora.

El orden de efectividad de los tratamientos de desinfección probados en la zanahoria inoculada con *Salmonella* fue: ácido tricloroisocianúrico pH 2 (200 ppm) > hipoclorito de sodio pH 6.5 (200 ppm) > ácido peracético pH 3 (80 ppm).

VII. BIBLIOGRAFÍA

Abadias M., Usall J., Anguera M., Solsona C. and Viñas I. 2008. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprout from retail establishments. Intern. J. Food Microbiol. 123: 121-129.

Adrienne E. H. 2001. Evaluation of a Polymerase Chain Reaction-Based System for Detection of *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria* spp., and *Listeria monocytogenes* on Fresh Fruits and Vegetables†; J. Food Prot. 64:6 788-795

Altekruse, S. F., M. L. Cohen, and D. L. Swerdlow. 1997. Emerging foodborne disease. Emerg. Infect. Dis. 3:285-293.

Álvarez, M. B. 1998. Contaminación, sobrevivencia y desarrollo de *L. monocytogenes* durante el procesamiento de brócoli precocido y congelado. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México

Andrews, W. H., and T. S. Hammack, 1998. Chapter 5: *Salmonella* In: Bacteriological analytical manual., 8th ed. Revision A. U. S. Food and Drug Administration. AOAC International, Gaithersburg, Md.

Andrews, W. H. S. Russell, F., John S., and J. Stan B.. 2001. *Salmonella*. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Fourth Edition. American Public Health Association, p. 5.05-5.20.

AOAC. Anonymous. 1984, 1995. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA. 17th edition.

APHA. 1992. Compendium of methods for the microbiological examination of foods fourth edition edited by frances. Pouch Downnes Keith Ho p. 69:82, 357-380.

Archer, D. L., and J. E. Kvenberg. 1988. Incidence and cost of foodborne diarrheal disease in the Unites States. J. Food. Prot. 48: 887-894.

Arvizu. M. S. 1999. Evaluación de riesgos microbianos, implicados en la preparación y almacenamiento de guacamole. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México

Aznar. R. and Alarcon B. 2003. On the Specificity of PCR Detection of *Listeria monocytogenes* in Food: a Comparison of Published Primers. Appl. Microbiol. 25: 109-119.

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

Bernard, D. 1994. Industry perspectives on *Listeria monocytogenes* in foods: Manufacturing and processing. *Dairy Food Environ. Sanitation*. 14:140-143.

Berran, M. E., Brackett R. E. and Beuchat L. R.. 1989. Growth of *Listeria monocytogenes* on fresh vegetables stored under controlled atmosphere. *J. Food Prot.* 52:702-705.

Beuchat, L.R 1994. Efficacy of spray application of chlorinated water in killing pathogenic bacteria on raw apples, tomatoes and lettuce. *J. Food Prot.* 61:1305.

Berrang, M. E., Brackett, R. E. and Beuchat, L. R. 1989. Growth of *Aeromonas hydrophila* on fresh vegetables stored under a controlled atmosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2167-2170.

Beuchat, L. R. and R. E. Brackett. 1990. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on lettuce as influenced by shredding, chlorine treatment, modified atmosphere packaging and temperature. *J. Food Sci.* 55:755-758.

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

Beuchat, L. R., and Ryu J.-H. 1997. Produce handling and processing practices. *Emerg. Infect. Dis.* 3:439-465.

Beuchat, L. R. 1998. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. W. H. O./FSF/FOS/98.2. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Blackman R., and Frank. J.K. 1996. New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruit and vegetables. *Trends Food Sci. Technol.* 7:179-187.

Brackett, R. E. 1999. Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens in produce. *Postharvest Biol. Technol.* 15:305-311.

Blysk-Mckennal D. N. and Schaffner D. W. 1994. Prediction of most probable number of *Listeria monocytogenes* using a generalized linear model and a modified FDA *Listeria* isolation method. *J. Food Prot.* 57: 1052-1056.

Bryan, F. L. 1977. Diseases Transmitted by foods contaminated by wastewater. *J. Food Protection.* 40: 45-56.

Brosch, R., Catimel, B., Milon, G., Buchrieser, C., Videl, E. and Rocourt, J. 1993. Virulence heterogeneity of *Listeria monocytogenes* strains from various sources in immunocompetent mice and its association with typing characteristics. J. Food Prot. 56: 296-301.

Buchanan, R. L., S. G. Edelson, R. L. Miller, and G. M. Sapers. 1999. Contamination of intact apples after immersion in aqueous environment containing *Escherichia coli* O157:H7. J. Food Prot. 62:444-450.

Buttler, T., W. Martinkovic, and O. N. Nesheim. 1993 Factors influencing pesticide movement to ground water. University of Florida. Florida cooperative extension service. Fact Sheet PI-2. June 1993

Cassiday, P.P.K. and Brackett, R. E. 1989. Methods and Media to Isolate and Enumerate *Listeria monocytogenes*: a Review. J. Food Prot. 52:207-214.

CDC 1991. Centers for Disease Control and Prevention. Multi-state outbreak of *Salmonella poona* infections-United States and Canada. MMWR, 40:549-552.

CDC. 1993. Centers for Disease Control and Prevention. Multi-state outbreak of *Salmonella* serotype Montevideo infection. EPI-AID, Atlanta. 93-97,

CDC. 1994. Alimentos brotes de *Escherichia coli* enterotoxigénicas - Rhode Island y New Hampshire. 43:05;81,87-88.

CDC 1998c. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of *Campilobacter* enteritis associated with cross contamination of food, Oklahoma, 1996. MMWR, 47:129-131.

CDC. 1999i. Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for foodborne disease outbreaks United States, 1988-1992. CDC surveillance summaries. MMWR. 49(SS-1): 1-7.

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

CDC. 2006. Centers for Disease Control and Prevention. Alimentos brotes de *Escherichia coli* enterotoxigénicas - Rhode Island y New Hampshire. 43:05 81,87-88

CDR, 1997. Communicable Disease Report. Hospital outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated with a rare phage type, Ontario, Canada., 23-5:33-39.

CESAVEG. 2005. Manual de buenas prácticas agrícolas y de manufactura en frutas y hortalizas. Comité estatal de Sanidad vegetal del estado de Guanajuato.

CESAVEJAL. 2006. Manual de buenas prácticas agrícolas y de manufactura en frutas y hortalizas. Comité estatal de Sanidad vegetal del estado de Guadajajara.

CFSAN/FDA. (Center for Food Safety and Applied Nutrition). 2001. Analysis and evaluation of preventive control measure for the control and reduction / elimination of microbial hazards on fresh and fresh-cut produce. U.S. Department for Health and Human Services. Food and Drug Administration Center and Applied Nutrition available:<http://www.cfsan.fda.gov/~com/ift3-toc.html>

CFSAN (Center for Food Safety and Applied Nutrition). 1998. Survey of domestic fresh produce; FY 2000/2001 field assignment. U.S. Food and Drug Administration, Washington, D.C. Available: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/prodsu10.html>.

Chalker, R.B. and Blazer, M.J. 1998. A review of human Salmonellosis: III. Magnitude of *Salmonella* infections in the United States. Rev. Inf. Dis. 10:111-124

Codex Alimentarius. 1999. Codex Alimentarius Commission. Principles and guidelines for the conduct of microbial risk assessment. CAC/GL-30. 6 p. [Fecha de acceso: 25-05-08 disponible en: http://www.codexalimentarius.net/download/standards/357/CXG_030.pdf.

DAAC. 1996. Earth System Science Data and Services. Seasing Our Planet. Disponible en: http://nasadaacs.eos.nasa.gov/articles/1996_menu.html

Danyluk Michelle, T. Jones, S. Abd, F. Schlitt-dittrich, M. Jacobs, L. Harris 2006. Prevalence and Amounts of *Salmonella* Found on Raw California Almonds J. Food Prot. 70: 820-827

D'aoust, J. Y., Andrews, W. H. and Bailey, J. S. 1985. *Salmonella*. In: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Vanderzant, C. and Splittstoesser, D.F. (eds.). 3th. ed., American Public Health Assoc. Washington, D. C. p: 371-422.

Donnelly, C.W., Brackett, R.E., Doores, S., Lee, W.H. and Lovett, J. 1992. *Listeria* In: Compendium of methods for the microbiological Examination of Foods. Vanderzant, C. and Splittstoesser, D. F. (Eds.) 3th Edition. P. 637-663. American Public Health Association. Washington, D.C.

Donnelly, C. W. and Brackett, R.E., 1994. In compendium of methods for the microbiological examination of foods. Vanderzant. And Solittstoedder. 3° Ed. American public health association (APHA). U.S.A.

Duncan, D. W, and W. E, Razzell. 1972. *Klebsiella* biotypes among coliforms from forest environments and farm produce. Appl Microbiol. 24: 933-938.

Dunn, R. A., Hall W. N., Altamirano J.V., Dietrich S. E., B. Robinson-Dunn, and D. R. Johnson. 1995. Outbreak of *Shigella flexneri* linked to salad prepared at a central commissary in Michigan. Public Health Reports. p. 110:580-586.

Dupray, E., M. P. Caprais, A. Derrien, and P. Fach. 1997. *Salmonella* DNA persistence in natural seawaters using PCR analysis. J. Appl. Microbiol. 82:507-510.

ECSCF. 2002. Analysis and evaluation of preventive control measure for the control and reduction / elimination of microbial hazards on fresh and fresh-cut produce. U.S. Department for Health and Human Services. Food and Drug Administration Center and Applied Nutrition disponible en :<http://www.cfsan.fda.gov/~com/ift3-toc.html>

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

Ercolani, G. L. 1976. Bacteriological quality assessment of fresh marketed lettuce and fennel. Appl. Environ. Microbiol. 31:847-852.

FAO (Food and Agriculture Organization). 1999. Quality control of wastewater for irrigated crop production. Water report 10. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/W5367E/W5367E00.htm>

Farber, J. M., Sanders G. W., and Johnston M. A., 1989. A survey of various foods for the presence of *Listeria* species. J. Food Prot. 52:456-458

Favero, M. S., Puleo J. R., Marshall J. H. and Oxborrow G. S.. 1996. Comparative levels and types of microbial contamination detected in industrial clean rooms. Appl. Microbiol. 14:539-551.

Feder, I., J. C. Nietfeld, J. Gallard, T. Yearly. J.M. sergeant, R. Oberst, M. L. Tamplin, and J. B. Luchansky. 2001. Comparison of cultivation and PCR-hybridization for detection of *Salmonella* in porcine fecal and water samples. J. Clin. Microbiol. 39:2477-2484.

Fernández-Escartín, E. 1976. El diseño y la aplicación de los estándares microbianos en el control sanitario de los alimentos. Dirección General de la Investigación en Salud Pública. Secretaria de Salubridad y Asistencia. México, DF.

Fernández Escartín, E. 1993. Riesgos microbianos en los alimentos su naturaleza y control racional. Tesis Doctoral. UAQ

Fernández Escartín E. 2000 Microbiología e Inocuidad de los alimentos. ED. Universidad Autónoma de Querétaro. México p.p . 535-536.

Fernández Escartín E. 2003 Microbiología e Inocuidad de los alimentos. ED. Universidad Autónoma de Querétaro. México p.p . 535-536.

Fernández-Grarayzabal J. and Genigiorgis C. 1998. Quantitative evaluation of three selective enrichment broths and agars used in recovering *Listeria* microorganisms. J. Food Prot. 53: 105-110.

FDA. 1992. Hazard analysis and critical control point principles and application guidelines. Department for Health and Human Services. Food and Drug Administration Center and Applied Nutrition. Washington D.C.USA.

FDA. 1998. Food and Drug Administration. Guía para reducir al mínimo el riesgo microbiano en los alimentos, en el caso de frutas y verduras crudas. Disponible en: <http://www.foodsafety.gov/~mow/sprodgui.html>.

FDA. 2000a. Food and Drug Administration. Acidified sodium chlorite solutions. Code of Federal Regulations 21 CFR 173.325. Office of the Federal Register, U. S. Government Printing Office Washington, D.C.

FDA. 1998a. Mejorando la seguridad y calidad de frutas y hortalizas frescas: manual de formación para instructores. University of Maryland, Joint Institute for food safety and applied nutrition. Department for Health and Human Services. Food and Drug Administration Center and Applied Nutrition. Washington D.C. USA.

Fratamico, P. M. 2001. Applications of the polymerase chain reaction for detection, identification, and typing of foodborne microorganisms, p. 95-115. *IN* C.L. Wilson, and S. Droby (ed.), Microbial Food Contamination. CRC Press, Boca Raton, FL.

García, A., Mount, J.R. and Davidson, P.M. 2003. Ozone and chlorine treatment of minimally processed lettuce. J. Food Sci. 68:2747.

García Galván. S. G. 2009. Riesgo de enfermar asociado al consumo de lechuga expuesta a contaminación por *Salmonella*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México

García-Gimeno, R. M. 1996. Incidence, survival and growth of *Listeria monocytogenes* in ready-to-use mixed vegetable salads in Spain. J. Food Safety 16:75-86

García-Villanova Ruiz, B., R. Galvez Vargas. 1978. Contamination on fresh vegetables during cultivation and marketing. *Internat. J. Food Microbiol.* 4:285-291

Gast K. L., and K. Holt. 2000. Agricultural water. Kansas state university agricultural experiment station and cooperative extension service. Disponible en: <http://www.oznet.ksu.edu.com>

Geldenhuis, J.C., and P.D. Pretorius, 1989. "The occurrence of enteric viruses in polluted water, correlation to indicator organisms and factors influencing their numbers," *Water Science Technology*, 21: 105-109.

Geldreich, E. E. and R. H, Bordner. 1971. Fecal contamination of fruits and vegetables during cultivation and processing for market. A review. *J. Milk Food Technol.* 34: 184-195.

Gellin, B. G., Broome, C.V., Bibb, W. F. 1989. The epidemiology of listeriosis in the United States-1986. *Am. J. Epidemiol.* 133:392-401.

Gellin, B. G. and Broome. C. V. 1991. Listeriosis. *J. Of Am. Med. Assoc.* 261:1313-1320.

Gilbert, M., Ryan, M.J., P.G. Wall, R.J. Griffin, B. Rowe. 1996. Risk factors for outbreaks of infectious intestinal disease linked to domestic catering. *Communicable Disease Report, CDR. Review*, vol. 13, pp. R179–R182.

Greenberg, B., and M. Klowden. 1992. Enteric bacterial interactions in insects. *Am. J. Clin. Nutr.* 25:1459-1466.

Guo, X. J. Chen, Brackett R. E., and Beuchat L.R. 2001. Survival of *Salmonella* on and in tomato plants from the time of inoculation at flowering and early stages of fruit development through fruit ripening. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4760-4764.

Heisick J. E., D. E. Wagner, M.L. Nierman, and J. T. Peeler. 1989. *Listeria* ssp. Found on firsh market produce. *Appl. Environ. Microbial.* 55:1925-1927.

Ho, J. L., K. N. Shands, G. Friedland, P. Ecklind, and D. W. Fraser. 1986. An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. *Arch. Intern. Med.* 146:520-524.

Hof, H., Nichterlein, T. and Kretschmar, M. 1994. When are *Listeria* in foods a health risk? *Trends Food Sci. Technol.* 5: 185-189.

Hood, S. K., and E. Zottola. 1997. Growth media and surface conditioning influence the adherence of *Pseudomonas fragi*, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* cells to staninless steel. *J. Food Prot.* 60:1034-1037.

Horfres. 2008. Cultivos, producción invernadero y campo abierto. Disponible en: www.horfres.com/zanahoria.htm.

Infoagro. 2008. Agricultura, sectores, información y precios. Disponible en: <http://www.infoagro.com/>. 7:08-08.

Islam M., Morgan J., Doyle M. and Jiang X. 2004. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in Manure Compost-Amended Soil and Onions Grown in an Environmentally Controlled Growth Chamber. *J. Food Protect.* 67:3:574-578.

Iturriaga, H. M. 1999. Perfil de contaminación de guacamole congelado durante su procesamiento y factores que influyen en la sobrevivencia y desarrollo de *L. monocytogenes*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México

Johnston, L.M., L. Jaykus, D. Moll, M., Martínez, C. Anciso, J., B. Mora, and C. L. Moe 2005. A field study of the microbiological quality of fresh produce. *J. Food Prot.* 68:1840-1847.

Kaneko, K., H. Hayashidani, K. Takahashi, Y. Shiraki, S. Limawongpranee, and M. Ogawa. 1999 (b). Bacterial contamination in the environment of food factories processing ready-to-fresh vegetables. *J. Food Prot.* 62: 800-804.

Kaspar, C. W. and M. L. Tamplin. 1993. Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. *App. Environ. Microbiol.* 59 (8): 2425-2429.

Kraft, D. J., C. Olechowski-Gerhardt, J. Berkowits, and M. S., Finstein. 1969. *Salmonella* in wastes produced at commercial poultry farms. *App. Microbiol.* 18: 703-707.

Keller, S.E., Chirtel, S.J., Merker, R.I., et al. 2004. Influence of fruit variety, harvest technique, quality sorting, and storage on the native microflora of unpasteurized apple cider. *J. Food Prot.* 67:2240.

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

Kornacki, J. L., and J. L. Johnson. 2001. *Enterobacteriaceae*, coliformes, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators, p. 69-82. In F. P. Downes, and K. Ito. (ed.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. American Public Health Association, Washington, DC, EUA.

Lee, A. 1978. What constitutes an infective dose of a food poisoning organism. *Food Technol. Austral.* 30:335-338.

Liao, C. H. 2007 Inhibition of Foodborne Pathogens by Native Microflora Recovered from Fresh Peeled Baby Carrot and Propagated in Cultures. *J. Food Sci.* 72:4, M134–M139

Liberti, L., Notarnicola, M., 1999. Advanced treatment and disinfection for municipal wastewater reuse in agriculture. *Water Sci. Techn.* 40(4-5), 235-245.

Liu, T., K.Liljebelke, E. Bartlett, C. Hofacre, S. Sánchez, and J.J. Maurer. 2002. Application of nested polymerase chain reaction to detection of *Salmonella* in poultry environment. *J. Food Prot.* 65:1227-1232.

Lovett, J. Francis, D.W., y Hunt, J.M. 1989. *L. monocytogenes* in raw milk: Detection, incidence and pathogenicity. *J. Food Prot.* 50:188-192.

Luedtke, A. N., B. Chapman, and D. A. Powell. 2003. Implementation and analysis of an on-farm food safety program for the production of greenhouse vegetables. *J. Food Prot.* 66:485-489.

Lund, B.M 1992. Ecosystems in vegetable foods. *J. Appl. Bact.* 73-21; 115S-135S.

Lundén, J., Autio, T., Markkula, A., Hellström, S. and Korkeala, H. 2000. Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. *Int. J. Food Microbiol.* 82:265.272.

Madden, J.M. 1992. Microbial pathogens in fresh produce: the regulatory perspective. *J. Food Prot.* 55:821-823.

Mafu, A.S., Roy, D., Goulet, J., and Magny, P. 1990. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. *J. Food Prot.* 53:742-746.

Malorny, B., P.T. Tassios, P. Radstrom, N. Cook, M. Wagner, and J. Hoorfar. 2003. Standardization of diagnostic PCR for the detection of food-borne pathogens. *Int J. Food Microbiol.* 83:39-48.

Montgomery, D.C. 1991. Diseño y análisis de experimentos. Editorial Iberoamericana. México D.F.

Montville, R., Y. Chen, and D. Schaffner. 2002. Risk assessment of hand washing efficacy using literature and experimental data. *Int.J. Food Microbiol.* 73:305-313.

Mountney, G. J. and Wilbur, A. G. 1971. Fruits and vegetables. *Pract. Food Microbial. And Techn.* 3th Ed. AVI, Published by Von Nostrand R.N.Y.

Mukherjee, A., D. Speh, E. Dyck, F. Diaz Gonzalez. 2004. Preharvest evaluation of coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157: H7 in organic and conventional produce grow by Minnesota farmers. *J. Food Prot.* 67: 494-900

National Advisory Committee on Microbiological Criteria for foods. 1991. Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce. *Food Control.* 10:117-143.

Nieman, R. E., and Lorber, B. 1980. Listeriosis in adult: a changing pattern-report of fruits and vegetables. Critical review of the literature, 1968, 1978. *Rev. Infec. Dis.* 2:207-227.

NZSA, 2008, New Zealand Food Safety Authority, 2008. The A-B-Cs of *Salmonella*. Disponible en: <http://www.nzfsa.govt.nz/publications/food-focus/2008-may/page-15.htm>

Odumuru, J., Mitchell, S.J., Alves, D.M. et al. 1997. Assessment of the microbiological quality of ready-to-use vegetables for health –care food services. *J. Food Prot.* 60:954.

Orozco Ramírez L. 2008. Rastreo de la fuente de *Salmonella* en jitomate durante su producción en invernaderos hidropónicos. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México

Peeler, J. T., and Maturin L. J. 1992. Aerobic plate count. In: Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 7th Ed. AOAC International. USA. p. 17-26.

Peltran, R. L. E.A. Zottola, and R. B. Gravani. 1988. Incidence of *Listeria monocytogenes* in market samples of fresh and frozen vegetables. *J. Food Sci.* 53: 1238_1240

Pether, J. V. and Gilbert, R. J., 1991. The survival of salmonellas on fingers-tips and transfer of the organisms to foods. *J. Hyg.* 69:673-681.

Pirovani M. E., Piagentini, A. M., Guemes D. R. 2006. Survival and growth of *Salmonella* hadar on minimally processed cabbage as influenced by storage abuse conditions. *Journal of Food Science.* 62(3), p.616 - 618.

Prescott, S. C., C. A. Winslow, M. Mc Crady. 1950. Water bacteriology. J Wiley Sons, Inc. 6th Rafil, F., Holland, M.A., Hill, W. E. and Cerniglia, C. E. 199 . Survival of *Shigella flexneri* on vegetables and detection by polymerase chain reaction. *J. Food Prot.* 58:727-732.

Rai, F., and P. Lunsford. 1997. Survival and detection of *Shigella flexneri* in vegetables and commercially prepared salads. *J. AOAC Int.* 80:1191–1197.

Rico, R. M. L. 2003. Perfil de contaminación microbiana de una planta productora de jitomate hidropónico. Tesis de maestría. Facultad de química. Universidad Autónoma de Querétaro.

Rimhanen-Finne R, Niskanen T, Hallanvuo S, Makary P, Haukka K, Pajunen S, Siitonen A, Ristolainen R, Pöyry H, Ollgren J, Kuusi M. 2008. *Yersinia pseudotuberculosis* causing a large outbreak associated with carrots in Finland. *Epidemiol Infect.* Jan 4; 1-6.

Rodgers, S.L., Cash, J., Siddiq, M. And Ryser, E. 2004. A Comparison of Different Chemical Sanitizers for Inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in Solution and Apples, Lettuce, and Cantaloupe. *J. Food Prot.* 67(4):721:731

Rosamel, C. 2007. Las zanahorias cultivo, cuidado y consejos prácticos. Ed. Deveci. p. 46-68.

Rossen, L., P. Nørskov, K. Holmstrøm, and O. F. Rasmussen. 1992. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.* 17:37–45.

Ruiz Ávalos A. 2007. Fuentes y mecanismos de contaminación de *Salmonella* hacia frutas y hortalizas durante su cultivo y cosecha. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México

Ryser Elliot T., Marth Elmer H., 1991. *Listeria*, listeriosis an food safety. Marcel Dekker. Ney York, E. U.

Sanja Ilic, y col., 2008; Coliforms and Prevalence of *Escherichia coli* and Foodborne Pathogens on Minimally Processed Spinach in Two Packing Plants; *J. Food Prot.*; 71:12 2398-2403.

SENASICA, SAGARPA, CMCC 2007. Manual de buenas prácticas agrícolas, guía para el agricultor. Centro de investigación en alimentos y desarrollo Fisiología y Tecnología Poscosecha de Frutas y Hortalizas. Unidad Culiacán Disponible en: <http://welo2.senasica.sagarpa.gob.mx>

Seeliger, H.P.R., and Jones, D. 1986. *Listeria*, spp.. *In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Vol 2. 9th ed. Sneath, P.H.A., Mair, N. S., Sharpe, M.E., and Holt. J. G. (eds). Williams & Wilkins, Baltimore p.556-570.

Seo, K. H., and J.F. Frank. 1999. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to lettuce leaf surface and bacterial viability in response to chlorine treatment as demonstrated by using confocal scanning laser microscopy. *J. Food Prot.* 62:3-9.

SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) 2008. Cultivo de la zanahoria. Disponible en: <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ventanaIM.php?idCat=196&url=w4>. siap.gob.mx/AppEstado/Monografias/Monografias2/Lechuga.html. Fecha de consulta: 3/12/08

Slade, P.J. 1992. Monitoring *Listeria* in the food production environment. I. Detection of *Listeria* in processing plants and isolation methodology. *Food Research International* 25:45-56.

Smith G. C., Duffy, E. A., K. E. Belk, J. N. Sofos, G. R. Bellinger, & A. Pape, (1999).Extent of microbial contamination in United States pork retail products. *Journal of Food Protection*, 64:172–178.

Splittoesser, D. F., Queale D. T., J. L. Bowers, M, Wilkson. 1980. Coliform content frozen blanched vegetables packed in the United States. *J. Food Safety*, 2:1-11.

Stewart A. W., A. F. Langford, C. Hall, and, M. G. Johnson. 1978. Bacteriological survey of saw soul foods available in South California. *J. Food Prot.* 41:364-366.

Sundin, J., J. L. Jacobs. 1999. Ultraviolet radiation (UVR) sensitivity analysis and UVR survival strategies of a bacterial community from phyllosphere of field-grow peanut (*Arachis hypogaeal*). *Microb, Ecol* 38:27-38.

Swanson, K. M. J., R. L. Petran, and J. H. Hanlin. 2001. Most probable number technique Cap. 6 Culture methods for enumeration of microorganisms. p 59 - 61. In Pouch, F. ND Ito, K. 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th Ed. American Public Health Association.

Tauxe, R. 1991. *Salmonella*: a postmodern pathogen. *J. Food Prot.* 54: 563-568.

Tauxe, R., H. Kruse, C. Hedberg, M. Potter, J. Madden, and K. Wachsmuth.1997. Microbial hazards and emerging issues associated with produce: a preliminary criteria for foods. Report to the national advisory committee on microbiologic. *J. Food Prot.* 60:1400–1408.

Taylor WR, Schell WL and Wells JG. 1993. A foodborne outbreak of enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea. Un brote de origen alimentario de *Escherichia coli* enterotoxigénicas diarrhea. *N Engl J Med* 1982;306:1093-5. *N Engl J Med* 1993; 306:1093-5.

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

Trevor S. 1997. Postharvest Chlorination Basic Properties and Key Points for Effective Disinfection. Publication 8003 University of California.

USDA, U. S Department of Agriculture, National Agricultural Statistics Service. 2001. Fruit and Vegetable Agricultural practices. 1999. USDA. Disponible en: <http://usda.gov/nass/pubs/rpts106.htm>

Wallace, J. S., T. Cheasty, and K. Jones. 2001. Isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from wild bird. *J. Appl. Microbiol.* 82:399-404.

Weschler, M. R., L. C. Whitehand, and R. E. Mandrell. 2001. Association of *Escherichia coli* O157:H7 with preharvest leaf lettuce upon exposure to contaminated irrigation water. *J. Food Prot.* 65:18-25.

WHO (World Health Organization Regional Office Europe), 1996. Informe de trabajo regional de la OMS. Disponible en: <http://www.euro.who.int/Governance/resolutions>. 9-12-08

Wood, R. C., C. Hedberg, and K. White. 1991. A multistate outbreak of *Salmonella javiana* infections associated with raw tomatoes. *Epidemic Intelligence Service*, 40th Annual Confer. CDC, Atlanta, Ga, EUA. Poster Abstract.

Zhao T, M.R, Clavero, Doyle M.P, and Beuchat L.R. 1997. Health relevance of the presence of fecal coliforms in iced tea and in leaf tea. *J. Food Prot.* 60:215-218.